

Capítulo 7

Resultados

El embrión de pollo es uno de los modelos animales utilizados en la investigación que permiten la manipulación experimental, los cuales ayudan a comprender mejor el proceso del desarrollo embrionario. Además de que este embrión proporciona accesibilidad y fácil manipulación durante los diferentes estadios embrionarios, lo que permite conocer la función de los genes.

Al producir la alteración en el potencial de la membrana con el sistema de electroporación se conseguirá una apertura momentánea en la zona de la membrana celular del embrión de pollo que esta siendo electroporada para el ingreso de un plásmido (ADN circular) hacia su interior, los poros formados por el pulso eléctrico se sellaran tras un corto periodo de tiempo, durante el cual el plásmido quedara insertado dentro de la célula.

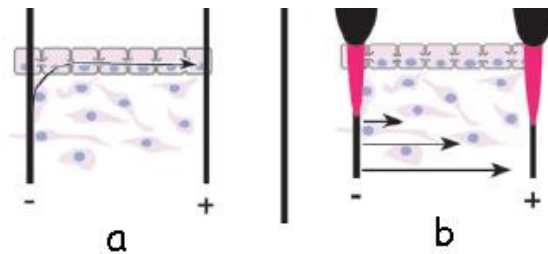


Figura 7.1 (a) “La corriente eléctrica afecta las células del ectodermo” (b) el aislamiento de los electrodos impide que se electroporesn células del ectodermo (Oberg, et al, 2002)

El plásmido se dosificara a través de una micro-aguja dentro de las células del interdigitio del embrión de pollo con electrodos de tungsteno en los costados, estos electrodos deben ir aislados con pintura de acrílico, exceptuando la punta. La punta debe estar afilada de manera que atraviese el interdigitio del embrión sin traspasarlo, de esta forma se electroporarán tan solo células de mesénquima y no así del ectodermo figura 7.1 , el electrodo positivo tiene una forma de asa como base para sostener la extremidad (de flecha roja en la figura 7.2.b). Tanto los electrodos que se utilizaron como la micro-aguja que microinyectó el plásmido se muestra en la figura 7.2.a.

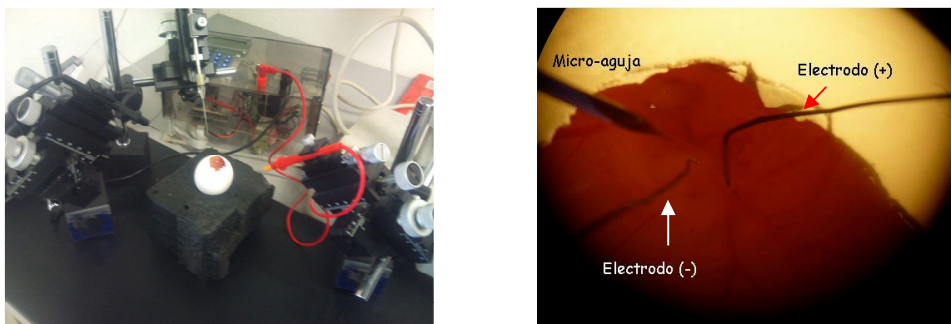


Figura 7.2 (a) “Electrodos apoyados en micromanipuladores (World Precision Instrument, inc)” (b) “Electrodos insertados en el interdigitio y micro-aguja dosificando el plásmido”.

El plásmido utilizado es el GFP (proteína verde fluorescente); pcx-GFP (Figura 7.3).La construcción pex-GFP se encontró bajo el promotor de citomegalovirus y el promotor de β -Actina de pollo.

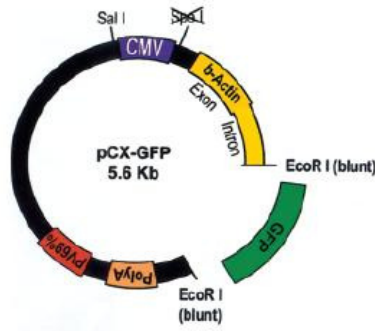


Figura 7.3 “ Construcción del plásmido pcx-GFP”

El éxito de la electroporación depende varios factores la pureza del plásmido, la concentración del mismo, y las condiciones del tratamiento de electroporación, para probar que dichos tratamientos no causen alteraciones al interdedo se llevaron a cabo diferentes condiciones de electroporación los cuales se muestran en la tabla comparativa embrionaria de pollo (Figura 7.4) siguiente.

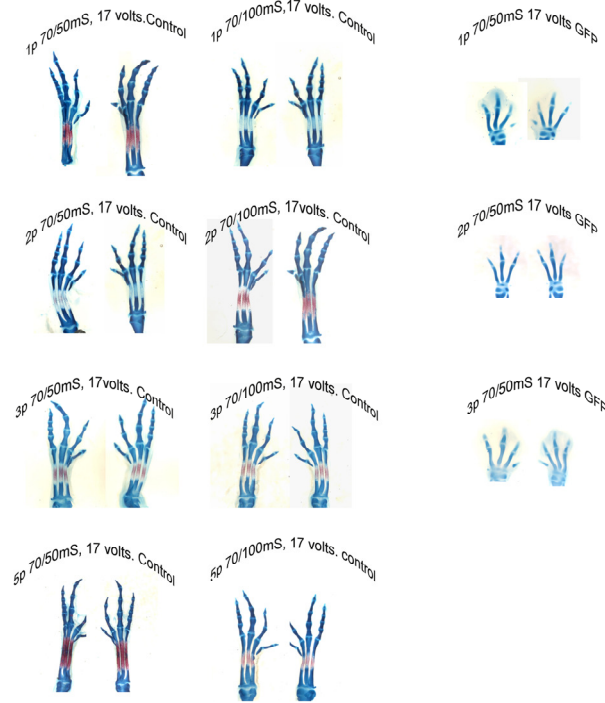


Figura 7.4 “Tabla comparativa de distintas condiciones de electroporación”

Y por ultimo en las figuras 7.5(a,b,c) se muestran las condiciones de electroporación optimas que se utilizan en el laboratorio del Departamento de Medicina Gnómica y Toxicología Ambiental.

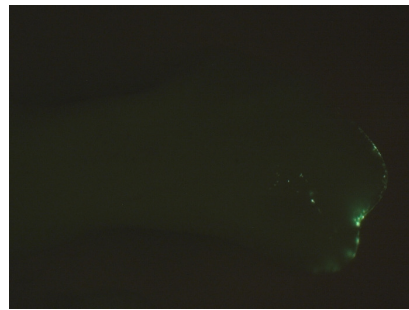
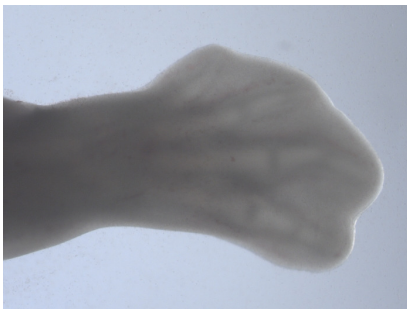


Figura 7.5.a Electroporación @ 13V, 70ms, 50ms, 2 pulsos

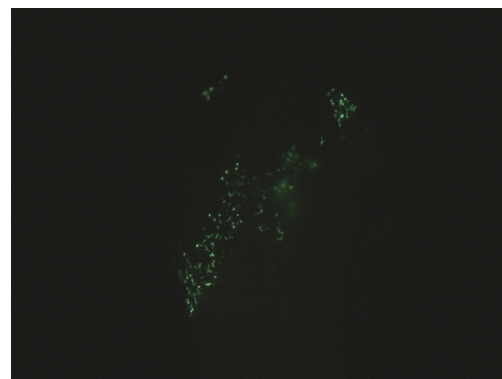


Figura 7.5.b Electroporación @ 13V, 70ms, 50ms, 2 pulsos

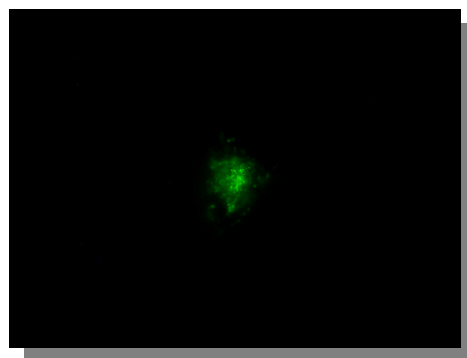
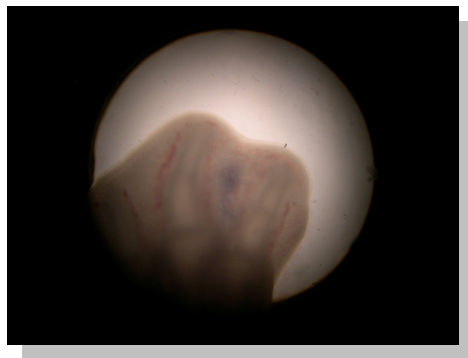


Figura 7.5.c Electroporación @ 17V, 70ms, 50ms, 1 pulsos

Con esto podemos concluir que las condiciones de electroporación descritas no afectan al fenotipo del interdígito de embrión de pollo.