

Técnica para inoculación directa de embriones de pollo de 16 a 48 horas de desarrollo

Por **ARNALDO FIORINI ***

Con el objeto de realizar una serie de experimentos que requieren la inoculación directa del material infectante sobre el embrión de pollo en desarrollo, tales como la adaptación hasta hoy no lograda de aftosa y poliomielitis, el aislamiento de varicela, y la acción teratológica de los virus, nos vimos obligados a desarrollar una técnica sencilla y práctica que llenara nuestras necesidades. Las técnicas embriológicas utilizadas para trabajar en embriones de este tipo, tales como la descripta por Hamburger, consisten en incubar los huevos verticalmente, con la cámara de aire hacia arriba, entrar por ella, romper la colear, y efectuar la coloración del embrión utilizando láminas de agar blando embebidas en azul nilo o rojo neutro, que después de permanecer unos diez minutos en el blastodermo deben ser removidas. Las dificultades del método de incubación que luego señalaremos, el tiempo grande que permanece abierto el huevo antes de ser coloreado, y la dificultad de saber si hay un exceso de colorante, nos decidieron a subsanar esos inconvenientes. Otros autores colorean con gránulos de colorantes, que dejan difundir a través de la membrana vitelina, sin salvar así el obstáculo de la técnica de Hamburger.⁽¹⁾

La que presentamos aquí, ha sido utilizada por nosotros para efectuar inoculaciones sobre el embrión de 16 a 48 horas, con resultados altamente satisfactorios.

TÉCNICA

El cálculo aproximado de la edad se hace teniendo en cuenta que el desarrollo se inicia recién a las tres o cuatro horas de puesto en la incubadora, de tal modo que habrá que restar esa cifra a las horas de incubación, para tener el tiempo de desarrollo efectivo. Este último es el que consideramos.

* De la Sección Virus del Instituto Bacteriológico "Malbrán". Secretaría de Salud Pública de la Nación.

Presentado en la reunión de comunicaciones del 21 de diciembre de 1948.

Además influyen otros factores, como el tiempo que ha tardado el huevo en recorrer el oviducto y la retención nocturna, los que hacen que unos huevos al ser puestos tengan un desarrollo mayor del disco embrionario que otros. Debido a esto es que lo utilizamos como simple orientación para sacarlos de la incubadora; el tiempo efectivo se determina al ver el embrión con todas sus características.

Los huevos se ponen a incubar en posición horizontal, lo que hace que la yema tenga que efectuar a lo máximo un movimiento de rotación de 180° sobre la chalaza como eje, para que el disco embrionario quede en la parte superior de la misma. Los autores que hemos consultado, los incuban en posición vertical con la cámara de aire hacia arriba, y entonces el blastodermo se sitúa inmediatamente por debajo de ella; pero esto es cierto solamente para los embriones de más de 48 horas, en los de menos tiempo pocas veces se da esa posibilidad y es fácil comprender porqué: la yema tiene que vencer una fuerza muy grande para girar en contra del eje natural (chalaza), lo que es muy difícil a esta edad por la poca diferencia de densidad entre la parte germinal y la porción alimenticia. Con este método apenas en un 50 % de los casos se encuentra el embrión en el sitio deseado, mientras que con el nuestro, prácticamente en el 100 %.

A la hora indicada se sacan los huevos de la estufa, se les marca la parte que estuvo arriba durante la incubación, para saber la situación del blastodermo; se limpian rápidamente en esa zona con un algodón mojado en una solución de antibáctero y luego con alcohol, tratando de no humedecerlos mucho, porque parte de estas sustancias se absorbe y pueden perjudicar, el desarrollo ulterior del germen. Con un disco de carborundum adaptado a un torno dental se corta la cáscara solamente, alrededor de la marca, formando un rectángulo de 1.5 cm. por 1 cm. más o menos, orientado según el eje mayor del huevo. Con un punzón se hace una perforación a nivel de la cámara de aire para descomprimir. Con una lanceta se levanta la cáscara quedando así una ventana cubierta por la colear; se agujerea ésta sobre uno de los ángulos y muy suavemente (nosotros utilizamos una lanceta mellada con la cual raspamos), porque si no se corre el riesgo de lesionar el embrión que está inmediatamente por debajo y casi pegado a ella. Una vez perforada la colear, vemos que se hace por sí sola una cámara de aire entre esta membrana y las demás partes del contenido, y cuyo resultado es alejar el embrión. A veces no se produce por sí sola o es muy pequeña, entonces se aspira con una pera por el orificio hecho sobre la cámara de aire verdadera, no tardando aquélla en formarse.

Con pinza pequeña y tijera curva se corta la colear quedando al descubierto el disco embrionario que en esta época del desarrollo está

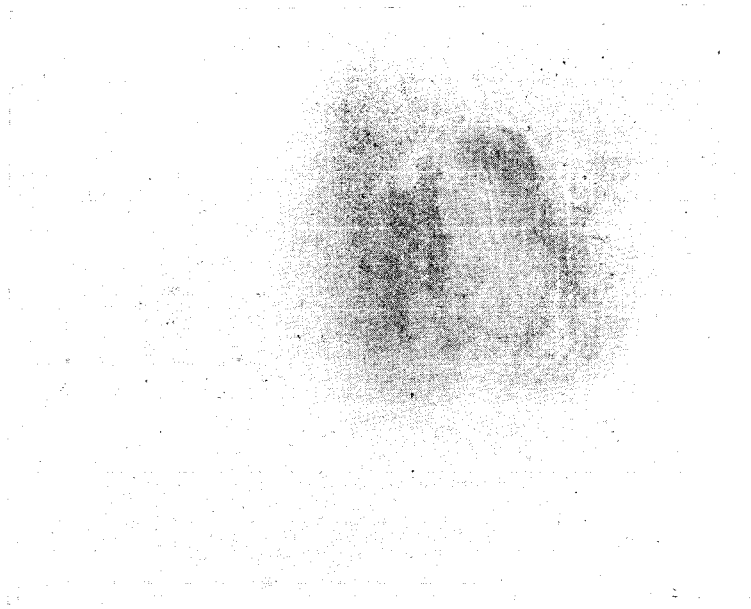


FIG. 1. -- Embrión de pollo de 16 horas.

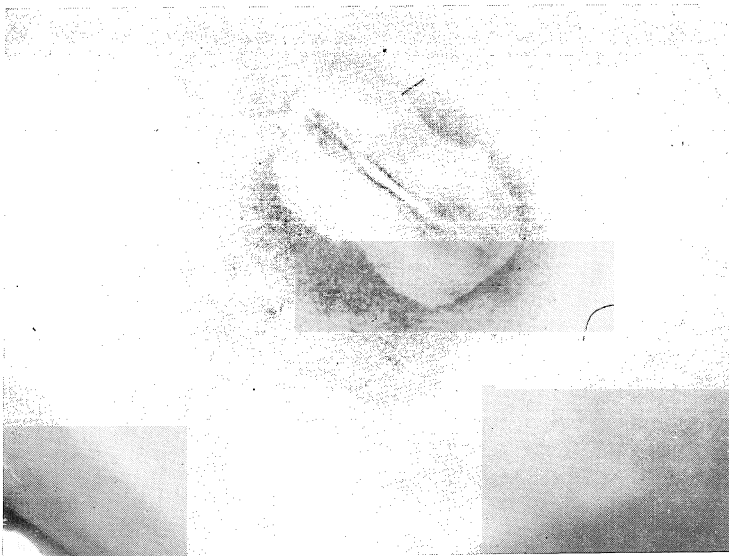


FIG. 2. — Embrión de pollo de 24 horas.



FIG. 3. — Embrión de pollo de 45 horas.

cubierto por la membrana vitelina solamente, comportándose ésta de tal modo ⁽²⁾ que impide el pasaje del virus, pero permite el de ciertas sustancias colorantes. Entre la membrana vitelina y el embrión hay un espacio muy pequeño pero real. Con una jeringa dejamos caer una gota de una solución estéril de rojo neutro al 0.05 % (O. Olce), éste difunde a través de la membrana vitelina coloreando el embrión antes de un minuto, y parte queda sobre la misma, lo que nos sirve para su visualización; tenemos entonces dos puntos de referencias y en base a ello nos hacemos una composición de lugar, pudiendo "medir" por así decirlo el espacio que tenemos para trabajar. El colorante es tomado por los glóbulos de grasa y las células, pudiendo causar la muerte de las mismas si se vierte en exceso. El embrión aparece coloreado destacándose con nitidez y presentando las características que nos permiten deducir el tiempo que tiene: a las 16 horas se nos presenta con la línea primitiva, y el nódulo de Hensen en medio de un disco claro en la parte central (área pelúcida) y más opaco en la periferia (área opaca); a las 18 aparece ya la notocorda, la placa neural y más adelante el proamnios; a las 21 horas ya se ha formado el repliegue cefálico y comienzan a organizarse las somitas; a las 24 horas aparecen los islotes vasculares en la parte más interna del área opaca. El tiempo se anota en horas de incubación aproximadamente, o en somitas con mayor exactitud. Para hacer la inoculación utilizamos una jeringuilla de tuberculina de 0.25 cc. con aguja B-D./25; punzamos la membrana vitelina a nivel de la parte más externa de la zona pelúcida, dejando caer una gota del material a inocular, sobre el embrión; retiramos la jeringa y dejamos unas gotas sobre la membrana vitelina. Hecho esto se tapa la ventana hecha en la cáscara con un trozo de parafilm que se adhiere a su contorno con el fondo caliente de un tubo de ensayo, y se ponen a incubar horizontalmente con el embrión hacia arriba.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) HAMBURGER, VIKTOR: *A Manual of Experimental Embryology*, Chicago University.
- (2) HAMBURGER, V.: *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 1947, 66, 608.