

2004A

COD. 394413958

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



“MANUAL DE PRÁCTICAS DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO”

PRODUCCIÓN DE MATERIALES EDUCATIVOS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGIA

PRESENTA

MARIA DOLORES PONCE REGALADO

Las Agujas, Zapopan, Jalisco a 14 de diciembre de 2004.



Universidad de Guadalajara
Centro Universitario de Ciencias Biológicas y
Agropecuarias

*Coordinación de titulación y Carrera de Licenciatura
en Biología*

049 C. C. BIOLOGÍA

**C. MARÍA DOLORES PONCE REGALADO
PRESENTE**

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de: **PRODUCCIÓN DE MATERIALES EDUCATIVOS** opción **PAQUETE DIDÁCTICO** con el título: “ **MANUAL DE PRÁCTICAS DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO** ” para obtener la Licenciatura en Biología

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo al **DR. DANIEL ORTUÑO SAHAGUN** y como asesor/a el/la **MCP. ARGELIA E. RIOJAS MAYORQUIN** y el/la **DRA. GRACIELA GUDIÑO CABRERA**

Sin más por el momento, le envío un caluroso saludo

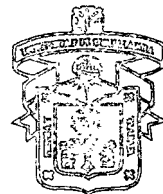
ATENTAMENTE
“PIENSA Y TRABAJA”
Las Agujas, Zapopan., 2 de Diciembre del 2004


DR. CARLOS ALVAREZ MOYA

PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA



CUCBA



BIBLIOTECA CENTRAL



DRA. ANA ISABEL RAMIREZ QUINTANA
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

Dr. Carlos Álvarez Moya.
 Presidente del Comité de Titulación.
 Carrera de Licenciado en Biología.
 CUCBA.
 Presente

Por medio de la presente nos permitimos informar a usted que habiendo revisado el trabajo de titulación de producción de materiales educativos *opción I*. Paquete didáctico titulado: **"MANUAL DE PRACTICAS DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO"**, que realizó la pasante MARIA DOLORES PONCE REGALADO con número de código 394413958 consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión.

Sin otro particular quedamos de usted con un cordial saludo.

Atentamente
 Zapopan, Jalisco, 02 de diciembre del 2004

DR. DANIEL ORTUNO SAHAGUN
 Director del Trabajo



DRA. GRACIELA GUDIÑO CABRERA
 Asesor



MCP ARGELIA E. ROJAS MAYORQUIN
 Asesor

V.B
~~*Cucba*~~
6/ Dic / 04

	Firma de aprobado el anteproyecto	Fecha de aprobación
S	CARLOS ALVAREZ MOYA	
✓	ESTHER ALBARRAN RODRIGUEZ	06/12/04
✓	GUILLERMO BARBA CALVILLO	03/12/04
P	Suplente: ALMA ROSA VILLALOBOS ARAMBULA	6/12/04

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Programa de Incorporación Temprana a la Investigación (PITI/23/2004) de la Unidad para el Desarrollo de la Investigación y el Posgrado de la Coordinación General Académica de la Universidad de Guadalajara.

Agradezco a mis padres por haberme dado lo mejor, su apoyo, cariño y educación.

A mis asesoras Graciela Gudiño y Argelia Rojas por su valiosa colaboración y apoyo para la realización de mi tesis.

A mi director Daniel Ortuño por su tiempo, ejemplo, paciencia y dedicación incondicional.

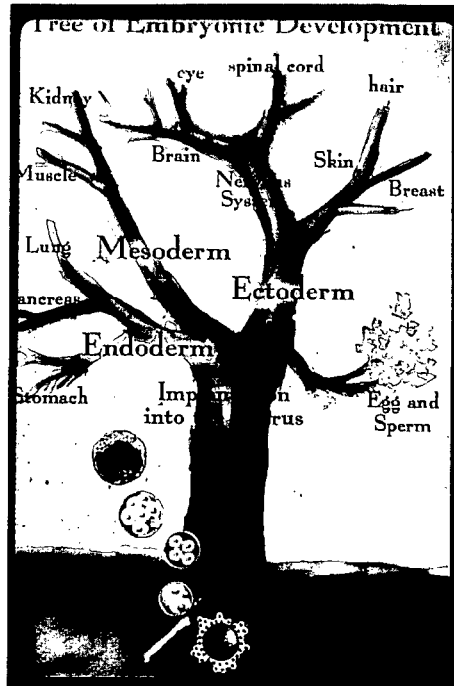
A mis amigos y compañeros de laboratorio por brindarme sus mejores ánimos.

A mis sinodales por sus aportaciones: Esther Albarrán, Alma Villalobos, Guillermo Barba y Carlos Álvarez.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Desarrollo y Regeneración Neural del Instituto de Fisiología Celular del Departamento de Biología Celular y Molecular de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales del CUCBA, bajo la Dirección del Dr. Daniel Ortuño Sahagún y la asesoría de la Dra. Graciela Gudíño Cabrera y de la M.C.P. Argelia E. Rojas Mayorquín.

Es producto de un proyecto apoyado por el Programa de Incorporación Temprana a la Investigación (PITI/23/2004) de la Unidad para el Desarrollo de la Investigación y el Posgrado de la Coordinación General Académica de la Universidad de Guadalajara.

Derivado de dicho proyecto y como parte del presente trabajo, se elaboró el correspondiente Manual de Prácticas de Laboratorio de la Materia de Biología del Desarrollo, el cual se registró con el número de ISBN 970-93690-2-4 en la Agencia Nacional del ISBN del Instituto Nacional de Derechos de Autor, por lo que el material contenido debe señalarse con Derechos Reservados en favor de los autores y de la Universidad de Guadalajara.



"The tree of embryonic development"

Autor: anónimo, dominio público.

**MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE BIOLOGÍA
DEL DESARROLLO**

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL	4
REGLAMENTO DEL LABORATORIO.....	5
GUIA DE USO DEL MANUAL.....	6
DESARROLLO DE LAS PRÁCTICAS	
I CICLO DE VIDA DE <i>Drosophila melanogaster</i>.....	7
II NIVELES DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA: CROMOSOMAS POLITÉNICOS EN <i>Drosophila melanogaster</i>....	13
III GAMETOGÉNESIS EN MAMÍFEROS: ANATOMIA E HISTOLOGÍA DE LAS GÓNADAS EN <i>Rattus norvergicus</i>.....	18
IV DESARROLLO EMBRIONARIO EN <i>Gallus gallus</i> : FORMACIÓN DE SOMITAS Y NEURULACIÓN.....	24
V DESARROLLO EMBRIONARIO EN <i>Rattus Norvergicus</i> : HISTOGÉNESIS DE TEJIDO OSEO Y CARTÍLAGO.....	29
VI ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ORGANOGÉNESIS DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR EN PECES, ANFIBIOS, AVES Y MAMÍFEROS	34
VII DIFERENCIACIÓN CELULAR: CULTIVO DE CELULAS MADRE Y DE CELULAS GLIALES	43



INTRODUCCIÓN GENERAL

Los avances de la Biología Celular y Molecular logrados en las dos últimas décadas del siglo XX han propiciado un importante resurgimiento de la Biología del Desarrollo como un área de primordial interés en la comunidad científica internacional así como una de las disciplinas que más perspectivas de avance presenta en los próximos años.

El concepto actual sobre el desarrollo de los organismos, va más allá de la descripción anatómica, ya que la biología del desarrollo experimental y las investigaciones en genética han generado conocimiento suficiente para lograr integrar todos los resultados obtenidos en una sola materia. Desde la visión molecular, el desarrollo se convierte en una serie de procesos dinámicos que dependen de la regulación de la expresión de grupos génicos particulares en el cigoto, blastocisto y embrión, con el objetivo de definir, tanto en lo molecular como en lo estructural, el plan corporal especie-específico, que tendrá sus variables individuales con base en la expresión de los genes que codifican para este tipo de características.

La Biología del Desarrollo, estudia la compleja cascada de cambios progresivos e irreversibles durante los cuales se forma un individuo a partir de una sola célula. Estudia cómo las células se especializan y convierten en fábricas funcionales con una organización predecible a lo largo de los principales ejes del individuo. Estudia como se realiza la generación de la diversidad celular y su orden dentro de cada generación así como la continuidad de la vida de una generación a otra.

La asignatura de biología del desarrollo es una materia básica particular selectiva de tipo teórico-práctico, con una carga horaria de 4 horas a la semana, con gran importancia en la formación del biólogo general y que tiene como objetivo iniciar al alumno en el campo de biología experimental.

El manual de prácticas de la materia de Biología del Desarrollo, tiene el propósito de complementar el conocimiento adquirido en el salón de clase, mediante un refuerzo práctico con el fin de que el estudiante incremente su desarrollo educativo y le motive a la investigación. Pretende introducir de manera general al estudiante a conocer los modelos empleados en el estudio del desarrollo de los organismos. Tiene la finalidad de complementar los conocimientos teóricos adquiridos en clase y obtener un adiestramiento práctico en el área de la Biología del Desarrollo mediante la realización de 7 prácticas de laboratorio, que permitirán al alumno adquirir habilidades en el manejo de equipo, material y reactivos, así como el manejo de diversos especímenes biológicos, en temas relacionados con el ciclo de vida de los organismos, los procesos de gametogénesis, el desarrollo del embrión, así como la diferenciación de células, tejidos y órganos.

REGLAMENTO DE LABORATORIO

1. Se permitirá ingresar al laboratorio un máximo de 10 minutos después de la hora señalada.
2. Es obligatorio el uso de bata blanca y de manga larga.
3. El alumno deberá respetar las disposiciones del profesor, de no ser así, el profesor tiene la autoridad para elaborar un reporte disciplinario.
4. No se permite introducir alimentos o bebidas, ni consumirlos en el laboratorio.
5. Esta prohibido fumar en el laboratorio.
6. El alumno no podrá abandonar el laboratorio sin permiso del profesor, de hacerlo, se le considerará como inasistencia a la práctica.
7. No se permite colocar ropa, libros o bolsas sobre las mesas de trabajo, excepto el manual de prácticas o el cuaderno de notas y el material de trabajo.
8. Se prohíbe arrojar material sólido a las tarjas (papel, algodón, cubreobjetos, restos de tejidos, etc.)
9. Cada equipo debe limpiar y desinfectar su área de trabajo antes de iniciar la práctica y al final de la misma. Es necesario lavarse las manos antes de salir del laboratorio.
10. El alumno debe asegurarse de que las llaves de gas, agua y aire queden perfectamente cerradas antes de salir del laboratorio.
11. Todo material de cristalería que se rompa, deberá ser reemplazado por el equipo de trabajo o alumno responsable, así como de cualquier tipo de material faltante al término de la práctica.
12. El alumno debe de contar previamente con el manual de prácticas correspondiente aprobado por la academia, por lo cual deberá conocer el procedimiento de la práctica antes de ingresar al laboratorio.
13. Los reportes de cada práctica deben ser presentados en forma individual con base en las indicaciones particulares del profesor y deberá incluir los puntos señalados en el manual correspondiente.
14. Sólo se calificaran los reportes de prácticas cuando el alumno cuente con la respectiva asistencia al laboratorio.

GUIA DE USO PARA EL MANUAL DE PRÁCTICAS DE BIOLOGIA DEL DESARROLLO

Este manual se diseñó con la finalidad de proporcionar a los alumnos un apoyo práctico para los conocimientos adquiridos en clases.

Cada práctica está organizada de la siguiente manera:

Introducción

Es una breve relación de aspectos básicos del tema a tratar en la práctica.

Antecedentes

Explicación, en resumen, de los conceptos básicos de la práctica a realizar.

Justificación

Indica la importancia de realizar la práctica y su relación con el temario.

Objetivos

Señalan los conocimientos que se busca adquirir al finalizar la práctica.

Materiales y métodos

Relación de los materiales biológicos y reactivos, así como descripción del procedimiento para la realización de la práctica.

Resultados

El estudiante observará y registrará la información obtenida con base en lo señalado.

Discusión

Comprende una serie de preguntas que el alumno debe contestar, con base en los resultados obtenidos y con el apoyo de una investigación bibliográfica realizada.

Conclusiones

El alumno describirá, de manera breve y concisa, el conocimiento adquirido durante el desarrollo de la práctica así como los puntos que considere destacables.

Bibliografía

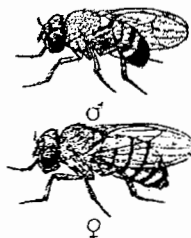
Se citan referencias utilizadas en la elaboración de cada práctica; además el alumno incluirá las referencias consultadas por el alumno para las discusiones de cada práctica. Incluye la dirección de páginas WEB.

PRACTICA I

CICLO DE VIDA DE *Drosophila melanogaster*

INTRODUCCIÓN

Clasificación: Phylum: Artrópoda
Clase: Hexápoda
Orden: Díptera
Familia: Drosophilidae
Género: *Drosophila*
Especie: *melanogaster*



La mosca del vinagre o *Drosophila melanogaster*, es un modelo adecuado para el estudio de diferentes áreas de la biología, debido principalmente a su fácil mantenimiento en el laboratorio, su corto ciclo de vida, y al amplio conocimiento que se tiene de sus características biológicas y moleculares.

La mosca *Drosophila melanogaster* mide entre 1 y 2 mm, dependiendo de la especie y de su fuente de alimentación, es de un color ocre y sus ojos son generalmente de color rojo. La podemos localizar fácilmente en frutas maduras en proceso de descomposición o cerca de recipientes que contengan vinagre o vino. La familia de *Drosophilidae* tiene mas de 3000 especies descritas clasificadas en aproximadamente 60 géneros (Salceda y Gallo, 1984).

ANTECEDENTES

Las etapas del ciclo de vida de la mosca son cuatro: huevo, larva, pupa y adulto. (fig. 1). El huevo de *Drosophila* es blanco lechoso y mide aproximadamente 0.5 mm de largo, es formado en los ovarios a partir de la maduración de las cámaras de huevo en las ovariolas, y es fertilizado en el paso del oviducto al útero, inmediatamente después de la fecundación comienza el desarrollo embrionario, etapa que dura aproximadamente 24 horas a 25 °C. La hembra deposita los huevos en la superficie del medio de cultivo y posteriormente sucede la eclosión.

El periodo larvario dura aproximadamente de 3 a 4 días, en los cuales pasa por tres estadios resultantes de dos mudas (larva I, II y III) originando la formación de la pupa. El desarrollo de las estructuras y tejidos adultos se realiza, a partir de los discos imaginales, en el interior del pupario, durante aproximadamente 3-4 días, en los que atravesará por los estadios de pupa blanca, pupa marrón y pupa negra. El adulto emerge del caparazón pupal y conforme envejece adquiere la forma y colores típicos del adulto.

JUSTIFICACIÓN

El ciclo de vida de los organismos es la secuencia de eventos que ocurren durante el desarrollo. Inicia con la fertilización de un oocito y continúa hasta la muerte del individuo, atravesando por diversas etapas y reiniciando una vez más, en un nuevo organismo, a través de la reproducción.

Uno de los mayores triunfos de la embriología descriptiva fue la idea de un ciclo de vida generalizable. Durante el desarrollo de cualquier organismo podemos distinguir 3 etapas principales; la embriogénesis, el desarrollo juvenil y la etapa adulta, las cuales pueden, a su vez, subdividirse en diversos estadios. En esta práctica se busca ejemplificar dicho proceso, utilizando el modelo de *Drosophila melanogaster*.

OBJETIVOS

1. Conocer las condiciones de mantenimiento de *Drosophila melanogaster* en el laboratorio.
2. Identificar y caracterizar las diferentes etapas del ciclo de vida de *Drosophila melanogaster*.

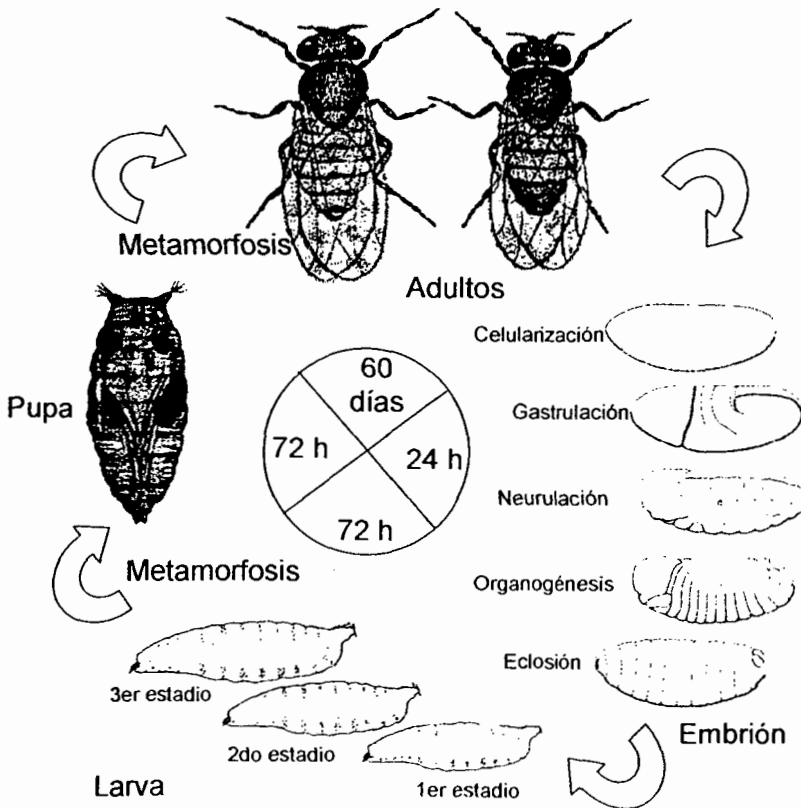


Fig. 1 Esquema de los distintos estados que se presentan en *Drosophila m.* durante su ciclo de vida

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Mosca *Drosophila melanogaster*
(cepa Canton/S)

Cajas de Petri
Pinzas de sujeción

Material y Equipo de laboratorio

Frasco de vidrio con tapa
Tubos de ensaye con algodón
Embudo
Frasco para anestesia
Horno (p/ esterilizar material)
Platina de calor
Microscopio estereoscópico
Portaobjetos

Soluciones y reactivos

Éter etílico

Alimento:

piloncillo	100 gr
agua destilada	1lt
agar	16 gr
levadura de maíz en barra	100gr
grentina	16 gr
ácido propiónico	10 ml

Nota: los tubos de ensaye, antes de ser usados deben estar limpios y estériles (160°C durante un periodo de 3 hrs).

Metodología:

Mantenimiento de las moscas en laboratorio

Para conservar especímenes de *Drosophila melanogaster* en el laboratorio es recomendable hacerlo en condiciones controladas, mantener la temperatura constante a 25°C, y la humedad relativa del aire entre 70 y 80%.

Las moscas se colocan en frascos de vidrio, con alimento preparado según se describe más adelante, cuya cantidad no debe sobrepasar los 2 cm de la base del frasco y posteriormente son cerrados con borlas de algodón (Figura 2).

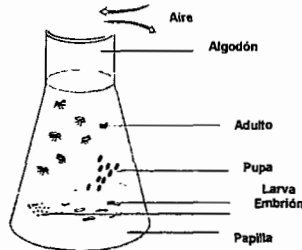
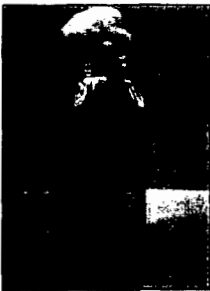


Fig. 2 A) Botella de vidrio y C) Medio de cultivo en tubo de vidrio, que ilustran la forma en que se mantienen en el laboratorio las colonias de *D. melanogaster*. En B) se esquematiza la localización de los diferentes estadios del ciclo de vida de *D. melanogaster* en el frasco del cultivo.

Preparación del alimento

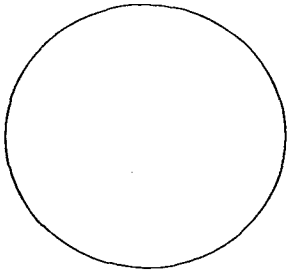
Requiere de una preparación especial para evitar problemas de contaminación por: hongos, bacterias o parásitos.

1. En el frasco con tapa, disolver el piloncillo en agua destilada mediante calor.
2. Agregar la levadura de maíz en barra, hasta lograr el cocimiento completo.
3. Mezclar las dos porciones y añadir el agar (disuelto previamente en agua).
4. Se retira del calor y se procede a esterilizar en autoclave (121°C durante un periodo de 20 min).
5. Una vez estéril, agrega la grenetina, la cual se mezcla bien hasta lograr que se disuelva, posteriormente se deja enfriar hasta alcanzar una temperatura aprox. de 35°C y se añade el ácido propiónico; ambos se agregan justo antes de verter el alimento en los tubos o frascos.
6. Se procede a verter, aun caliente, en tubos de ensaye previamente esterilizados.
7. Una vez que el medio se ha enfriado presentará una consistencia semisólida y estará listo para su uso.
8. Finalmente, se espolvorea levadura instantánea sobre el alimento y queda listo para colocar las moscas.

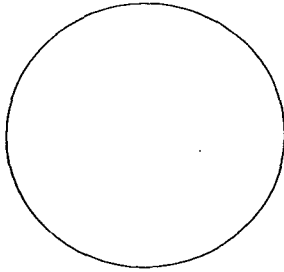
Observación del ciclo:

- Con ayuda de un embudo de plástico, pasar los ejemplares adultos al tubo de anestesiado, que contiene un algodón impregnado en eter. Una vez anestesiadas las moscas se transfieren a un cartón blanco para su observación al microscopio estereoscopio.
- Posteriormente, con las pinzas de sujeción, se extraen de los tubos, especímenes en distintos estadios larvarios, pupales y los huevos.
- Se colocan en una caja petri con solución salina fisiológica, para eliminar los restos de papilla y se transfieren a otra caja petri para observarlos al microscopio estereoscopio.
- Finalmente se realiza la identificación morfológica de las diferentes etapas del ciclo de vida acorde al esquema presentado.
- Registrar sus observaciones.

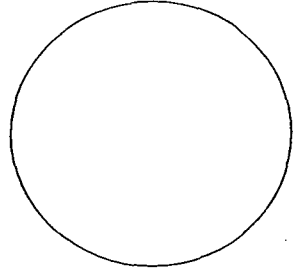
RESULTADOS



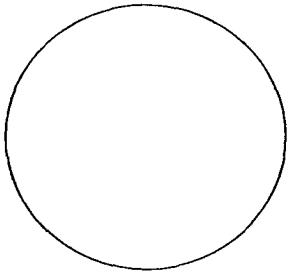
Etapa embrionaria (huevos)



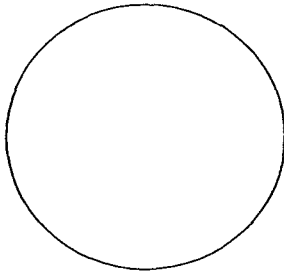
Etapa Juvenil Larvaria I



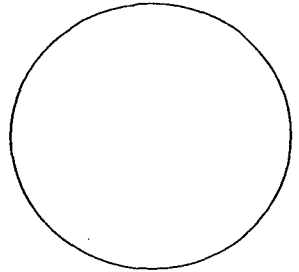
Etapa Juvenil Larvaria II



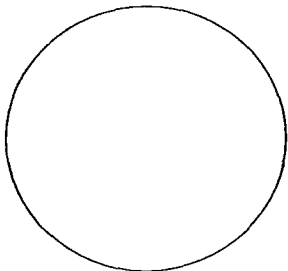
Etapa Juvenil Larvaria III



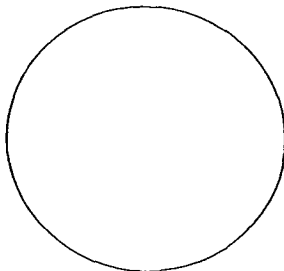
Etapa Juvenil Pupal I



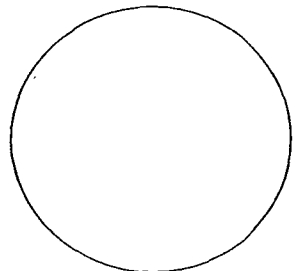
Etapa Juvenil Pupal II



Etapa Juvenil Pupal III



Etapa Adulta Macho



Etapa Adulta Hembra

DISCUSIÓN

1.- ¿Cómo afecta la variación de temperatura el desarrollo de *D. melanogaster*?

2.- Mencione las características fenotípicas que permiten diferenciar un macho de una hembra en la sp. *D. melanogaster*.

3.- ¿Quién realizó los primeros trabajos experimentales en genética con la mosca de la fruta y en qué consistieron?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

- *Genética de Drosophila. Técnicas de Laboratorio*; Víctor M. Salceda S. y Aluisio J. Gallo. Ed. LIMUSA. (1984) pp 9 – 26.
- Cap. 2 "Life cycles and the evolution of developmental patterns" en *Developmental Biology*; Scott F. Gilbert, Ed. SINAUER (2000) pp 25-48.

PRÁCTICA II

NIVELES DE COMPACTACIÓN DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA: CROMOSOMAS POLITÉNICOS DE *Drosophila melanogaster*.

INTRODUCCIÓN

Los cromosomas son complejos supramacromoleculares compuestos de nucleoproteínas (ácidos nucleicos y proteínas tipo histona). *Drosophila melanogaster* presenta cuatro pares de cromosomas, los cuales pueden apreciarse fácilmente en algunos tejidos que presentan células poliploides, como son el intestino y las glándulas salivales.

En las glándulas salivales de las larvas de *Drosophila*, cada cromosoma gigante es el producto de aproximadamente nueve ciclos de replicación, con variados y abundantes polimorfismos característicos de los diferentes géneros: *melanogaster*, *virilis*, *pseudoscura*, entre otros.

Los cromosomas poliploides, denominados gigantes, son cromosomas formados por heterocromatina y presentan una longitud mucho mayor que los cromosomas de metafase. Están constituidos por una serie lineal de bandas oscuras alternantes con interbandas claras. La mayor parte del DNA se localiza en las bandas oscuras. Los cromosomas gigantes sufren rondas de duplicaciones repetidas pero sin separarse, resultado de la sinápsis de los cromosomas homólogos, seguida por la replicación de los mismos sin que ocurra una división celular posterior.

ANTECEDENTES

A fines del siglo pasado, Balbiani descubrió la presencia de cromosomas politénicos en las glándulas salivales de los dípteros, después se comprobó su presencia en otras estructuras como en los tubos de malpighi y en los cuerpos grasos del epitelio intestinal; sin embargo en glándulas salivales son más comunes.

El complemento cromosómico normal de *Drosophila melanogaster* es de 4 pares de cromosomas. El conjunto de cromosomas en la fase politénica adquiere una forma de 5 brazos unidos por el centrómero. Gracias al fenómeno de politenia se originan cromosomas extremadamente grandes, que dan origen a un patrón característico de diferente espesor y afinidad cromática (Fig. 1).



Fig 1. Fotografías de cromosomas politénicos extraídos de glándulas salivales de *Drosophila m.* Fig 1A marcaje con fluorescencia, Fig 1B marcaje radioactivo. Imagen proporcionada por el Dr. Antonio Prado, Univ. Pablo de Olavide, Sevilla España.

JUSTIFICACIÓN

Las células de las glándulas salivales de la larva *Drosophila* contienen cromosomas casi 100 veces más grandes que los observados en la mayor parte de las otras células del organismo. El poder observarlos permite a los investigadores comparar los patrones de bandas de cromosomas politénicos de diferentes especies y así tener oportunidad de investigar cambios evolutivos a nivel cromosómico. Por otra parte, los cromosomas politénicos cambian durante etapas particulares del desarrollo. En esta práctica, los alumnos conocerán una metodología simple que les permitirá visualizar directamente la expresión de genes mediante la localización de zonas de transcripción activa en los cromosomas politénicos.

OBJETIVOS

1. Observar e identificar los cromosomas politénicos en *D. melanogaster*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Larvas de *Drosophila melanogaster*

Soluciones y reactivos

Agua destilada
Ácido acético glacial
Ácido láctico 85%
Orceína

Material y Equipo de laboratorio

Cajas de Petri
Gotero
Agujas de disección
Microscopio de luz
Microscopio estereoscópico
Cubreobjetos y portaobjetos
Papel filtro o absorbente
Barniz transparente de uñas



Metodología (desarrollo de la práctica):

Obtención de larvas:

1. Colocar aproximadamente 10 parejas de *Drosophila m.* durante 2 días en un frasco con medio de cultivo reciente.
2. Transcurrido este tiempo se eliminan los adultos y se procede a colocar el frasco en un incubador a una temperatura de 15°-18°C; este frasco contendrá huevos y larvas recién emergidas para realizar el experimento.



El frasco permanecerá a esta temperatura durante 5-7 días y cuando aparezca la primera pupa o se observe la presencia de varias larvas del tercer estadio, se recomienda colocar el frasco a temperatura de 5°-8°C para prolongar la sobrevivencia del cultivo en condiciones óptimas para su disección.

Es recomendable colocar un poco de levadura granulada para proporcionar una sobrealimentación y con ello un aumento de tamaño en las glándulas salivales.

3. Aquellas larvas que se vean inactivas y de preferencia grandes y gordas será a las cuales se les extraerá las glándulas para su tinción.

Preparación de colorante:

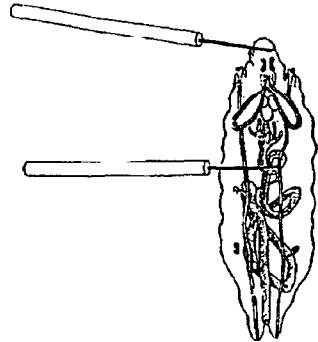
Se utilizan dos soluciones, una para la disección (solución I) y otra para la tinción (solución II).

	Solución I	Solución II
Orceína	1 gr	1 gr
Ácido acético glacial	45 cc	45 cc
Ácido láctico al 85%	-----	25 cc
Agua destilada	55 cc	30 cc

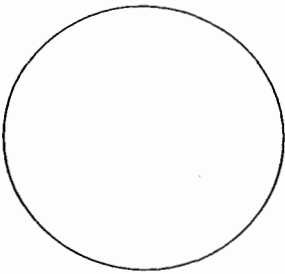
En ambos casos la solución se calienta a punto de ebullición, de preferencia usando un refrigerante de reflujo por un periodo mínimo de dos horas, se filtra y se coloca en frascos goteros y una vez frío puede utilizarse.

Extracción de glándulas:

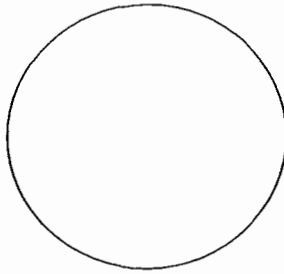
1. Coloque en la caja Petri algunas gotas de solución I.
2. Extraiga una larva de tamaño apropiado y colóquela en la solución y con el uso del microscopio estereoscópico realice la disección: coloque la punta de una aguja en el tercio anterior de la larva y sujétela con la otra mano y con ayuda de otra aguja, que se coloca en el extremo anterior de la larva, separe firmemente el tejido. Si se hace con cuidado, en el extremo de la aguja se verá parte del sistema nervioso y adheridas a él las glándulas.
3. Pase las glándulas a un portaobjetos, donde se ha colocado previamente una gota de solución II y permita que se tiñan durante 5 min., evite que se evapore el colorante adicionando algunas gotas.
4. Pasado el tiempo de tinción, coloque sobre el espécimen un cubreobjetos; después colocar la laminilla entre los dobleces de una tira de papel filtro de tamaño adecuado, sostenga con los dedos índice y pulgar de una mano los extremos del portaobjetos y con el pulgar de la otra mano presione fuertemente sobre el cubreobjetos, éste se verá enmarcado por el exceso de colorante, procurando dar al dedo pulgar un movimiento de rotación, terminada esta presión seque el exceso de colorante con un papel filtro.
5. Observe al microscopio la laminilla y en caso de observar células suficientemente claras y con los brazos cromosómicos extendidos, selle los bordes de la preparación con barniz de uñas, esto le permitirá almacenar la preparación hasta por un año.



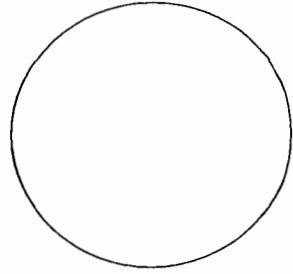
RESULTADOS



Etapa Juvenil Larvaria III



Glándulas Salivales de una Larvaria III



Cromosomas politénicos

DISCUSIÓN

1.- ¿Cuántos y cuáles son los cromosomas que constituyen el genoma de *Drosophila m*?

2.- Indique en que tejidos se presentan cromosomas politénicos.

3.- Explique en qué consiste el fenómeno de politenia

4.- ¿Qué características manifiestan las regiones de los cromosomas politénicos denominadas "puffs"?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

- *Genética de Drosophila Técnicas de Laboratorio*; Víctor M. Salceda S., Aluisio J. Gallo. Cap. "Citogenética: preparación y observación de cromosomas politénicos" Ed. LIMUSA (1984) pp.57-60
- *Biología Celular y Molecular*; Gerald Karp, Cap. 10 "Naturaleza del gen y del genoma" Ed. McGraw-Hill Interamericana. (1998). pp 389 – 433.
- *Genes*; Benjamín Lewin. Cap. 25 "Acerca de los genomas y los cromosomas" Ed. REVERTE, S.A. (1991).pp 555-558.

PRÁCTICA III

GAMETOGENÉISIS EN MAMÍFEROS: ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE GÓNADAS EN *Rattus norvegicus*

INTRODUCCIÓN

La gametogénesis es el proceso de formación y desarrollo de las células germinales denominadas gametos. Incluye transformaciones, tanto a nivel de los cromosomas como a nivel del citoplasma, y prepara a las células sexuales para la reproducción. Implica la recombinación genética y la reducción cromosómica realizadas por la meiosis. En la gametogénesis se obtienen células diferentes según el sexo; por tal motivo se dividen en: espermatogénesis y ovogénesis. Ambos procesos presentan tres periodos sucesivos comunes que se ilustran en la figura 1.

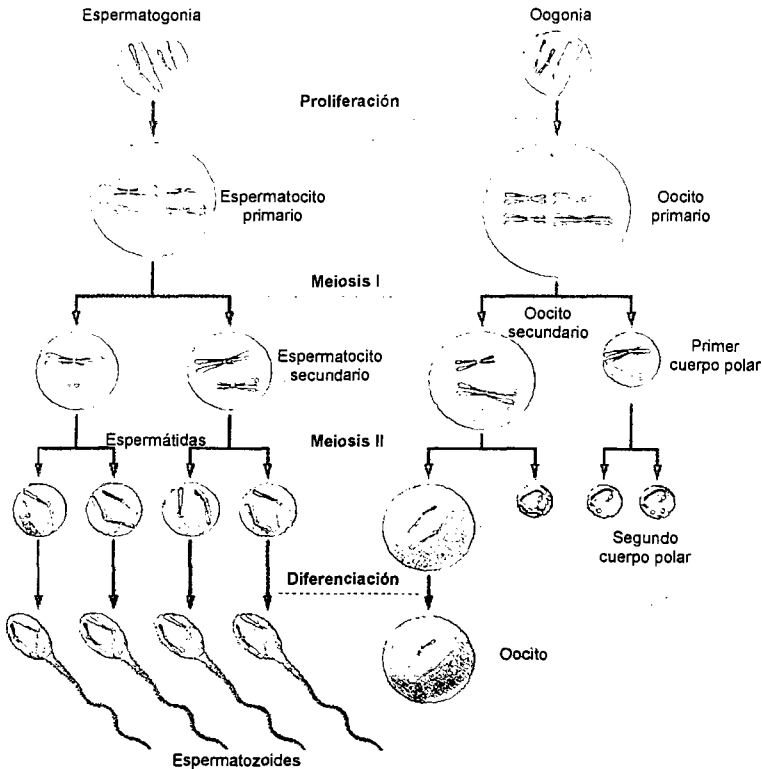


Fig. 1 Esquema de las distintas etapas de maduración de la célula germinativa masculina (espermatocito) y femenina (ocito).

Recombinación: Durante esta etapa las células precursoras, o células germinativas primordiales proliferan por mitosis simétricas, hasta el momento en que, por una mitosis asimétrica, generan una célula que entrará a la siguiente fase; la meiosis.

Reducción: Durante esta etapa los gametos experimentan un tipo especial de división celular, la meiosis, con dos divisiones sucesivas con duplicación del DNA sólo en la primera, reduciendo la carga genética a la mitad, generando células haploides.

Especialización: Esta etapa se caracteriza por el rápido crecimiento de las células, así como por las transformaciones morfológicas que darán lugar a los gametos maduros. En los espermatozoides estas transformaciones son: la formación de la vesícula acrosómica, la cual rodea al núcleo constituyendo el acrosoma, la organización de las mitocondrias en torno al cuello y la redistribución o reabsorción del citoplasma formando un flagelo.

ANTECEDENTES

Evolutivamente, la reproducción sexual implicó el desarrollo de células especializadas para la reproducción denominadas células germinales. Estas células atraviesan por un proceso de maduración conocido como gametogénesis. Dicho proceso implica la recombinación genética y la reducción cromosómica realizadas durante la meiosis, para obtener gametos haploides con diversidad genómica.

La evolución llevó al desarrollo de la anisogamia, es decir la generación de dos tipos de gametos con características diferentes. De esta forma se desarrollan gametos femeninos y masculinos con marcado dimorfismo, así como un aporte diferencial en la fecundación. Los gametos femeninos se especializaron en regular los procesos tempranos del desarrollo.

JUSTIFICACIÓN

Los organismos tienen la capacidad de reproducirse sexualmente para perpetuar su especie. El proceso de reproducción sexual ha permitido el desarrollo de una gran diversidad de organismos. La principal condición para que este tipo de reproducción ocurra es la formación, y posterior fusión, de células especializadas; los gametos. Las gónadas son las estructuras encargadas de la producción de los gametos de ambos sexos.

En ésta práctica se observarán las estructuras anatómicas de organismos adultos, en las que se lleva a cabo la formación de los gametos masculinos y femeninos.

OBJETIVOS

1. Analizar las estructuras anatómicas de las gónadas masculinas y femeninas de mamíferos.
2. Analizar las estructuras tisulares de las gónadas masculinas y femeninas de mamíferos.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico

Ratas adultas, macho y hembra, de la cepa Wistar.

Clasificación: Phylum: Vertebrata
Clase: Mammalia
Orden: Rodentia
Familia: Muridae
Género: *Rattus*
Especie: *norvegicus*.

Material y Equipo de laboratorio

Cámara de gas
Dislocador de cervicales
Estuche de disección
Charola o mesa de disección
Caja de Petri
Morteros
Microscopio de luz
Microscopio estereoscopio

Microtomo

Tina de flotación
Canastilla para tinción
Gasas
Guantes
Cubre bocas
Portaobjetos y cubreobjetos
Cartulina y tijeras

Soluciones y reactivos

Formol
Parafina
Agua destilada
Alcohol absoluto
Alcohol 96°
Xilol
Hematoxilina
Eosina
Acido acético glacial
Glicerina

Metodología (desarrollo de la práctica):

Preparación de colorantes:

Hematoxilina (tinción de núcleos)

Hematoxilina 0.2 gr
Agua destilada 100 ml

Eosina (tinción de fondo)

Eosina 0.3 gr
Ácido acético glacial 0.025 ml
Agua destilada 100 ml

Técnica de disección:

1. Se sacrifica a la rata, macho o hembra, en una atmósfera de CO₂ con posterior dislocación de cervicales.
2. Sobre la charola o mesa de disección, colocar a la rata en decúbito supino y realizar una incisión abdominal central con el bisturí.
3. Tras la apertura de la pared abdominal y la retirada de la grasa pre-peritoneal, podemos observar el intestino.

4. Utilizando el instrumental, extraer los cuernos uterinos (hembra) o testículos (macho), cortando con cuidado los ligamentos de unión.
5. Una vez extraídas las gónadas colocarlas en formol para dar inicio a la técnica histológica.

Técnica histológica:

Fijación

- Colocar el tejido en un frasco de boca ancha en formol al 10% por 15 min

Deshidratación y Aclaramiento

- Alcohol 30% 20 min; Alcohol 50% 20 min; Alcohol 80% 20 min; Alcohol 96% 20 min; Alcohol absoluto 20 min, Xilol 20 min

Impregnación con parafina

- Pasar el tejido a un recipiente con parafina a 65°C, agitar por 5 min. y dejar reposar otros 5 min. y pasar a parafina nueva a 60°C por 5 min.

Bloqueo en paraplast.

- Elaborar moldes cúbicos de cartulina de 2 cm de lado.
- Calentar la parafina hasta fundir, y colocar las muestras dentro del molde, al centro y aplanando ligeramente para no destruir el tejido
- Vaciar la parafina fundida en el molde y dejar enfriar a temperatura ambiente (30 min aprox.)
- Colocar dentro de un recipiente con agua a temperatura ambiente por 3 min. y después retirar el papel.

Corte Microtómico

- Utilizar microtomo para obtener el "listón" de muestra.
- Colocar la muestra en la tina de flotación.
- Tomar con un portaobjetos la muestra a teñir.
- Pasar de 12 a 15 veces sobre el mechero para fijar al portaobjetos.

Técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina

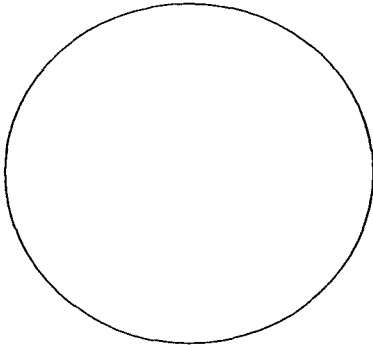
- Utilizando canastillas de tinción, pasar las muestras por las siguientes soluciones :
- Xilol 5 baños
- Alcohol absoluto 5 baños y alcohol de 96% 5 baños
- Agua 5 baños
- Hematoxilina 5 min. Agua 5 baños
- Alcohol ácido 0.5% 1 baño rápido
- Agua 5 baños
- Alcohol amoniacal 0.5% 2 baños Agua 5 baños
- Alcohol 96% 5 baños
- Eosina 1 min.
- Alcohol 96% 5 baños, Alcohol absoluto 5 baños
- Xilol 5 baños

Montaje

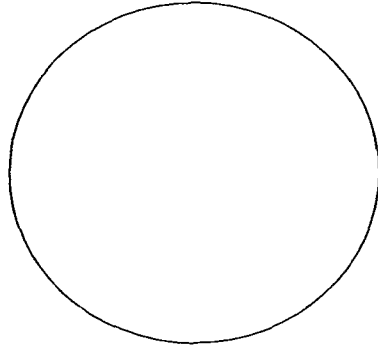
- Colocar una gota de glicerina sobre la muestra
- Poner un cubreobjeto
- Limpiar el exceso con papel y sin presionar.

Observación al microscopio de luz.

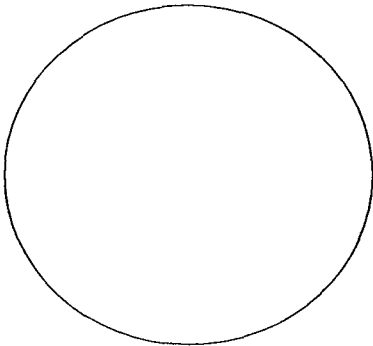
RESULTADOS



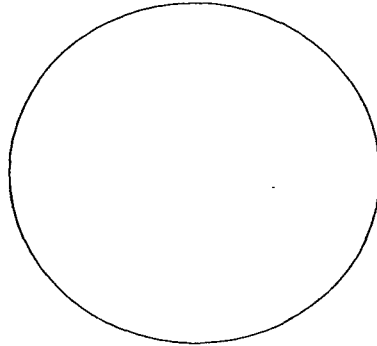
**Gónada Masculina
(observación macroscópica)**



**Gónada Femenina
(observación macroscópica)**



**Gónada Masculina
(observación microscópica)**



**Gónada Femenina
(observación microscópica)**

DISCUSIÓN

1.- ¿Cuáles son los tipos de gametogenesis?

2.- Mencione 3 diferencias y 3 semejanzas entre ambos procesos

3.- ¿Qué es un cuerpo polar, un folículo primordial y un cigoto?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

- "Formación de gónadas y gametos" en *Manual de biología del desarrollo*; Martha Patricia Fernández Guzmán, Ed. JGH SALVAT Medicina. 2ed.(1998) pp.50-53
- *Embriología Médica*; Langman. T.W. Sadler, Ph.D. Ed. Médica Panamericana 6 ed. (1994) pp 19-35.

PRACTICA IV

DESARROLLO EMBRIONARIO EN *Gallus gallus*: FORMACIÓN DE SOMITAS Y NEURULACIÓN

INTRODUCCIÓN

Clasificación: Phylum: vertebrata
Clase: aves
Orden: galliformes
Familia: phasianidae
Género: *Gallus*
Especie: *gallus*

En el desarrollo embrionario de vertebrados, los acontecimientos iniciales del desarrollo del sistema nervioso (SN) tienen lugar durante la neurulación. Comienzan con un proceso de inducción neural, mediante el cual una parte del tejido embrionario se determina como tejido neural precursor, a partir del que se originará el sistema nervioso (neuroectodermo/placa neural). Seguidamente se forman las crestas neurales a partir de los pliegues de la placa neural originando las dos partes principales del SN; el central (SNC) y el periférico (SNP).

Posteriormente, se suceden diversas fases en el desarrollo del SN a nivel celular; proliferación, migración, diferenciación neural, formación de las vías de conexión, establecimiento de conexiones y muerte celular. Se producen de manera precisa y secuencial en cada una de las células nerviosas, pero no al mismo tiempo en las distintas zonas del SN ya que cada estructura tiene su propio tiempo de desarrollo.

ANTECEDENTES

El sistema nervioso de mamíferos comienza a desarrollarse luego de la gastrulación. Lo primero que se forma es una placa alargada de origen ectodérmico, llamada placa neural, la que mediante una invaginación y plegamiento denominado surco neural, y luego de una fusión de la región dorsal determina la formación del tubo neural (Fig. 1).

En esta etapa, un grupo de células ectodérmicas vecinas al sitio del cierre del tubo neural se separan para constituir las crestas neurales. El cierre del tubo no es simultáneo a todo lo largo de él, comienza en la región cervical del embrión progresando luego tanto en dirección caudal como en dirección cefálica. El tubo permanece temporalmente abierto a la cavidad amniótica mediante los denominados neuroporos anterior o cefálico y posterior o caudal. El neuroporo es el primero en cerrarse y posteriormente se cierra el neuroporo caudal (Fig. 2).

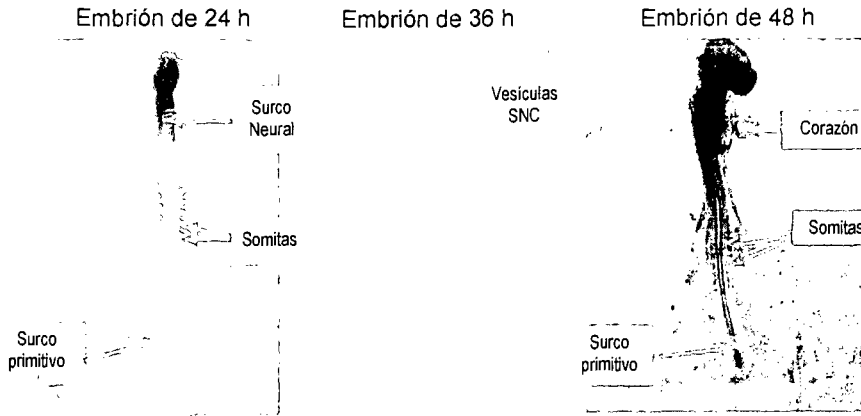


Fig.1 Desarrollo embrionario temprano del *Gallus gallus*.

1. Tubo neural
2. Cresta neural
3. Capa del manto
4. Capa marginal
5. Somito
6. Epéndima
7. Dermatoma
8. Miotoma
9. Raíz posterior del nervio raquídeo
10. Cadena simpática
11. Nervio espinal (raquídeo) Raíz anterior del nervio raquídeo

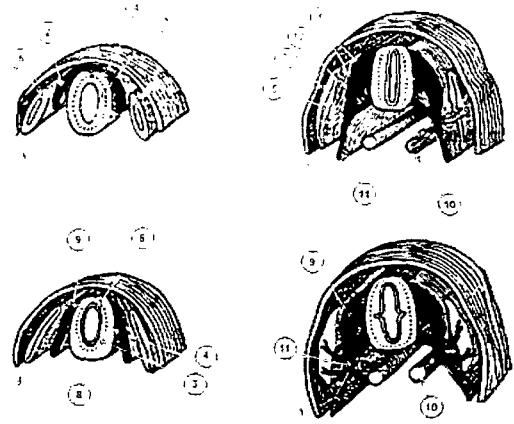


Fig 2. Esquema de la formación del tubo neural en distintas etapas del desarrollo embrionario del *Gallus gallus*.

JUSTIFICACIÓN

El tubo neural da origen al sistema nervioso central, mientras que las crestas neurales dan origen a casi todo el sistema nervioso periférico. Una vez que el tubo neural se ha formado produce una intensa proliferación celular, continuando con la organogénesis. En la presente práctica, el alumno será capaz de observar los cambios que experimenta el producto desde la fertilización hasta el término del feto, relacionados con el desarrollo del sistema nervioso, así como de identificar las diferentes etapas del desarrollo embrionario de las aves.

OBJETIVOS

- 1- Observar la formación de los somitas en un embrión de pollo en diferentes etapas durante su desarrollo embrionario.
- 2- Observar la formación de las principales estructuras del SNC en un embrión de pollo en diferentes etapas durante su desarrollo embrionario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico:

Embriones de pollo (*Gallus gallus*)

Material y Equipo de laboratorio

Incubadora para embrión de pollo

Ovoscopio

Cajas de Petri

Gasas

Guantes

Estuche de disección

Microscopio estereoscópico

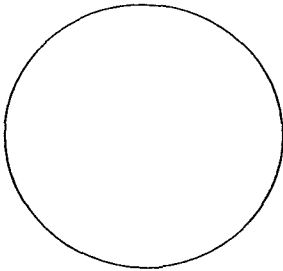
Soluciones y reactivos

Solución fisiológica (NaCl 0.9%)

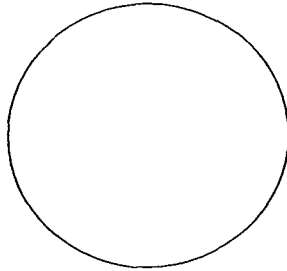
Metodología (desarrollo de la práctica):

- Mantener el huevo fecundado en el incubador a 37°C y 65% de humedad, en movimiento aleatorio. La circulación del aire dentro de la incubadora es importante ya que la cáscara presenta numerosos poros que permiten el intercambio gaseoso del embrión, a medida que se desarrolla, consume oxígeno y libera dióxido de carbono. Durante el almacenamiento y la incubación los huevos deben ser volteados dos a tres veces al día, para mantener el desarrollo del embrión en el centro del mismo.
- Extraer el huevo del incubador, colocarlo sobre el ovoscopio y observar el embrión en formación.
- Abrir el cascaron utilizando pinzas de disección, golpeando levemente la superficie para formar un pequeño hueco.
- Colocar el embrión en caja Petri sobre solución fisiológica.
- Observar con microscopio estereoscópico.

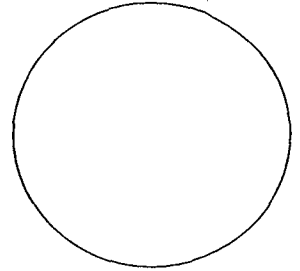
RESULTADOS



Embrión de pollo de 3 somitas



Embrión de pollo de 7 somitas



Embrión de pollo de 9 somitas

DISCUSIÓN

1- Mencione los principales tejidos derivados de las siguientes capas blastodérmicas: Endodermo, Ectodermo y Mesodermo

3- ¿Cuáles son las consecuencias de un defecto en el cierre del tubo neural?

4- ¿Qué estructuras se originan a partir de los pliegues neurales?

PRACTICA V

DESARROLLO EMBRIONARIO EN *Rattus norvegicus*: HISTOGÉNESIS DE TEJIDO OSEO Y CARTÍLAGO



INTRODUCCIÓN

El tejido óseo representa la parte más importante del esqueleto. A pesar de su dureza y resistencia, posee cierta elasticidad. El tejido óseo es una forma especializada de tejido conectivo denso, provee al esqueleto de fortaleza para funcionar como sitio de inserción y sostén.

La osificación cartilaginosa ocurre a partir de un molde de cartílago en cuyos extremos, de cartílago en reposo, los condrocitos empiezan a dividirse activamente y a hipertrofiarse (zona de cartílago en proliferación) y luego mueren por falta de nutrientes (cartílago en maduración), simultáneamente la matriz cartilaginosa sufre una calcificación que es la responsable directa de la muerte de los condrocitos.

ANTECEDENTES

El tejido óseo es una variedad de tejido conjuntivo. Está formado por células separadas y sustancia intercelular, la distancia intercelular esta mineralizada: se trata de una malla de fibras de colágena que se endurece y es muy resistente, no rígida, sino elástica.

Un hueso tiene como base tejido óseo, pero un hueso es un órgano, tiene tejido conjuntivo fibroso en su parte externa (periostio), zonas con cartílagos, cavidad con tejido blanco (medula ósea), vasos sanguíneos (también son órganos) y nervios.

Osteocitos: son células de tejido óseo ubicadas en el interior, en zonas llamadas lagunas óseas y se comunican unas con otras para el aporte metabólico por medio de conductos calcoforos o canaliculo; estos llegan finalmente a la superficie del tejido, donde hay vasos sanguíneos de tipo capilar. En el espesor del tejido no hay vasos sanguíneos; por el interior no circulan sangre, sino liquido tisular

Osteoblastos: son células responsables de la síntesis y secreción del componente orgánico de la matriz extracelular del nuevo hueso, que luego experimentara una rápida mineralización.

Osteoclastos: son células multinucleadas implicadas en el proceso de reabsorción necesario para la remodelación del hueso

Células limitantes: se encuentran en la superficie libre del tejido, en la capa de células que se ubican en la superficie del hueso; son una reserva celular del tejido

Tejido cartilaginoso: El cartilago esta compuesto por células y componentes extracelulares. Las células, los condorcitos, están aislados en pequeños espacios de la matriz extracelular, mas abundante, compuesta por fibras inmersas en la sustancia fundamental. El cartilago no posee vasos ni terminaciones nerviosas (excepto las articulaciones); la nutrición de las células se produce por difusión a través de la sustancia fundamental. Existen tres tipos de cartilago:

Cartilago hialino: es el mas abundante, se localiza en esqueleto nasal, laringe, traquea, bronquios y superficies articulares.

Cartilago elástico: se encuentra formando parte del cartilago de la epiglotis, cartilago corniculado y del cuneiforme, paredes del conducto auditivo externo y la trompa de Eustaquio.

Cartilago fibroso: Es una forma de transición entre el tejido conectivo denso y el cartilago hialino, por una combinación de fibras de colágeno y células cartilaginosas ubicadas en la matriz hialina. El cartilago fibroso se relaciona con ciertas articulaciones (discos intervertebrales y meniscos).

JUSTIFICACIÓN

La visualización directa del cartilago y del hueso en fetos teñidos ayuda a interpretar alteraciones en la formación del esqueleto. La técnica por diafanización o transparentación permite la visualización *in situ* de los centros de osificación en embriones y fetos, tiñendo con rojo alizarin. En esta práctica se pretende que el alumno conozca y realice la tinción ósea por el método de transparentación o diafanización en *Rattus norvegicus*.

OBJETIVOS

1.- Observar la distribución y las características anatómicas del tejido óseo y del tejido cartilaginoso al finalizar el desarrollo embrionario en *R. norvegicus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Ratas de la cepa wistar de 2 días de nacidas

Material y Equipo de laboratorio

Estuche de disección
Papel estroza
Gasas
Guantes
Vaso de precipitado
Pipeta de 5 ml.

Probeta
Vaso de muestras biológicas
Refrigerador

Soluciones y reactivos

Cloroformo
Agua bidestilada
Hidróxido de potasio (KOH 2%)
Glicerina
Colorante rojo alizarin
Colorante azul alceano
Glicerol puro

Preparación de colorantes:

Rojo Alizarín. (Alizarin Red S) 15 ml	Azúl Alceano. (Alcian Blue 8GX) 100 ml
Acido Acético 1 ml	Colorante 0.05 gr
Glicerina 2 ml	Ácido acético 5 ml
Agua bidestilada 12 ml	Agua bidestilada 95 ml
Colorante 0.12 gr	

Metodología (desarrollo de la práctica):

Desprendimiento de la piel

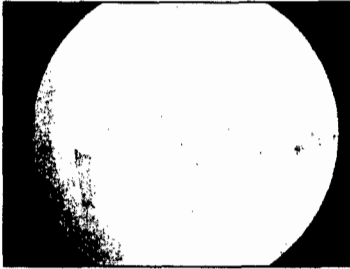
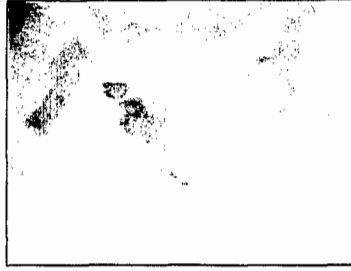
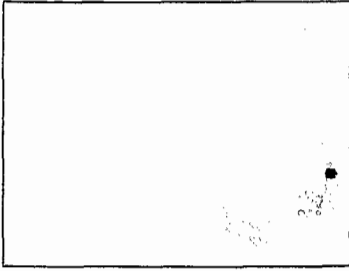
- 1- Sacrificar los fetos con cloroformo
- 2- Eviscerarlos perfectamente
- 3- Lavarlos con agua bidestilada
- 4- Sumergirlos en agua a 70°C por 30 segundos.
- 5- Desprender la piel completamente, a ser posible en una sola pieza y remover también el tejido adiposo.

Adelgazamiento

- 1- Sumergir en KOH 2% por 24 hrs a 4°C.

Tinción

- 1- Para la tinción, agregar 1 ml de colorante rojo alizarin y dejar a 4°C por 24 hrs.
- 2- Lavar con solución glicerina/agua (1:1)
- 3- Sumergir en colorante azul alceano y dejar a 4°C por 24 hrs.
- 4- Lavar con solución
- 5- glicerina/agua (1:1)
- 6- Dejar en glicerol puro a 4°C para su conservación.



Fotografías de una rata de la cepa Wistar sometida a la técnica de transparentación.

RESULTADOS

Incluya 2-3 fotografías de los especímenes una vez finalizado el proceso de diafanización

DISCUSIÓN

1- Describa los tipos de osificación y la manera en que se organiza el sistema óseo

2- Mencione cuales son las funciones del tejido óseo y del tejido cartilaginoso

3.- Mencione la importancia de los Osteoclastos

4.- Qué patologías están relacionadas a defectos en el desarrollo de huesos y cartílagos?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

Principios de Anatomía y Fisiología: Sistema Esquelético, Tejido Óseo. Tortora Grabowsky. PP 165-173. Ed. Oxford.

PRACTICA VI

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ORGANOGÉNESIS DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR EN PECES, ANFIBIOS, AVES Y MAMÍFEROS

INTRODUCCIÓN

Durante el desarrollo embrionario de las diferentes especies, luego de la gastrulación, ocurre una etapa de definición de cada una de las capas embrionarias que previamente se formaron. A esta etapa se le conoce como **organogénesis**, y el proceso que en ella ocurre es la interacción de los diferentes campos embrionarios para la formación de tejidos y órganos.

La formación del corazón es un proceso complejo en el cual intervienen distintos tipos celulares. Según el grupo filogenético, el desarrollo del músculo cardíaco presentará diferentes características. En vertebrados, en las primeras fases del desarrollo embrionario, dos regiones simétricas del mesodermo se diferencian en tejido del premiocardio, expresando una serie de factores de transcripción que invariablemente las convierten en miocardiocitos. Estas dos regiones promiocrdicas, denominadas crestas cardíacas, se fusionan en la línea media del embrión del desarrollo y dan lugar a un tubo cardíaco inicial, compuesto de dos capas; una capa de endocardio rodeada por una capa externa de miocardio. Entre dos capas se localizan una sustancia amorfa y acelular a modo de lámina basal denominada gelatina cardíaca.

El corazón es un órgano hueco, y se encuentra protegido por el esternón y las costillas. Una membrana de dos capas, denominada pericardio envuelve al corazón como una bolsa. La capa externa del pericardio rodea el nacimiento de los principales vasos sanguíneos del corazón y esta unida a la espina dorsal, al diafragma y a otras partes del cuerpo por medio de ligamentos. La capa interna del pericardio esta unida al músculo cardíaco. Una capa de líquido separa las dos capas de la membrana, permitiendo que el corazón se mueva al latir a la vez que permanece unido al cuerpo.

Anfibios: la estructura del corazón de los anfibios es altamente variable, se ha modificado a un corazón con tres cámaras, con dos receptáculos de entrada y uno de salida. En orden: seno venoso, aurícula derecha, ventrículo, aurícula izquierda y cono arterioso.

Clasificación: Phylum: Vertebrata
Clase: Anura
Orden: Anfibia
Familia: Ranidae
Género: *Rana*
Especie: *sp.*



Peces: los peces poseen un corazón lineal (seno venoso, atrio, ventrículo y cono arteriosos). En la mayoría de los peces el corazón está ubicado inmediatamente hacia atrás de las branquias. Entre los peces óseos superiores que tiene coberturas branquiales el corazón está situado muy por delante en el cuerpo. El saco pericardio membranosos que contiene al corazón es de capacidad amplia, el corazón varía considerablemente en lo que respecta a su desarrollo y tamaño relativo.

Clasificación: Phylum: Vertebrata
Clase: Teleostei
Orden: Cypriniformes
Familia: Cyprinidae
Género: *Cyprinus*
Especie: *carpio.*



Aves: su corazón está formado por cuatro cavidades, dos aurículas y dos ventrículos, como en los mamíferos. Lo cual evita que se mezcle la sangre venosa que viene del resto del organismo, con la que ha sido oxigenada en los pulmones.

Mamíferos: Tienen el corazón dividido en cuatro compartimentos, de modo que la circulación es doble y completa. Se encuentra localizado ventralmente en la región posterior de la faringe embrionaria, en el pericardio. En tetrápodos adultos se localiza en el tórax. En embriones es un tubo simple y recto: venas embrionarias seno venoso atrio (vestíbulo, que puede tener dos evaginaciones laterales: aurículas) ventrículo bulbo cardiaco (cono arterioso) aorta ventral (vaso eferente o tronco arterioso).

ANTECEDENTES

El sistema cardiovascular es el primer sistema que entra en funcionamiento durante el desarrollo embrionario en todos los vertebrados. El corazón del embrión humano empieza a latir entre el día 21 y el 22 de gestación. En el proceso evolutivo de los vertebrados el corazón pasa por una especialización desde peces, aves y mamíferos, relacionado con el cambio de respiración branquial a respiración pulmonar. La afirmación de que "la ontogenia recapitula la filogenia", se confirma parcialmente con el hecho de que, durante el desarrollo, el corazón de mamíferos adopta transitoriamente formas que son las definitivas para otros grupos de vertebrados. Por ejemplo, cuando tiene una forma tubular, es semejante al corazón de un pez, mas adelante al presentar dos aurículas y un ventrículo su morfología es como la del corazón de los anfibios, después en la etapa en que se presenta cuatro cavidades, tiene aspecto similar al corazón de los reptiles y finalmente las aves y en los mamíferos, es tetracavitario, con cámaras totalmente separadas.

JUSTIFICACIÓN

El sistema circulatorio es uno de los principales derivados de la placa mesodérmica lateral y es el primer sistema en funcionar durante el desarrollo del embrión. A su vez, el corazón el primer órgano en realizar sus funciones. Por ello la organogénesis cardíaca es un modelo adecuado para comparar entre especies las principales características de su organogénesis. En ésta práctica se pretende que el alumno identifique las semejanzas y diferencias que existen en el desarrollo del sistema cardiovascular en distintos organismos representantes de los principales grupos filogenéticos a lo largo de la escala biológica.

OBJETIVOS

- 1- Analizar, por visualización macroscópica, la anatomía interna y externa de las cavidades cardíacas en diferentes vertebrados; peces, anfibios, aves y mamíferos.
- 2- Describir las principales características estructurales y funcionales del miocardio comparando diferentes especies.

MATERIALES Y METODOS

Material biológico

Rana o Sapo.
Pez.
Pollo.
Rata.

Charola o mesa de disección
Gasas
Guantes
Papel estraza
Microscopio estereoscópico

Soluciones y reactivos

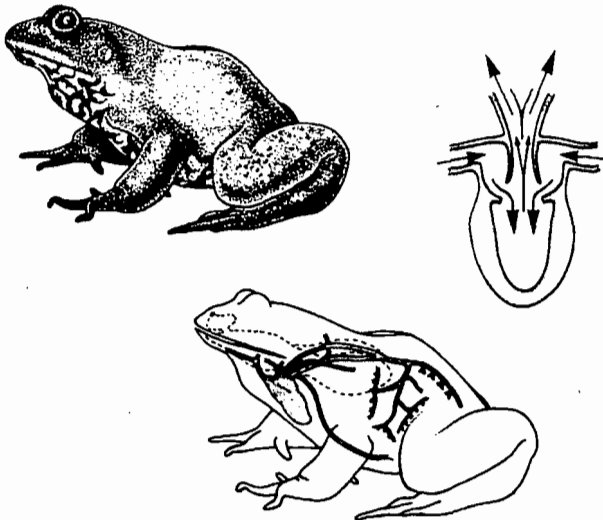
Material y Equipo de laboratorio

Estuche de disección
Cajas de Petri

Agua destilada
Solución fisiológica (NaCl 0.9%)
Formaldehído 10%

Disección de la rana

- Se sacrifica a la rana o al sapo por descerebración empleando un estilete
- Colocarla sobre la mesa de disección en decúbito supino como se muestra en el esquema.
- Realizar una pequeña incisión longitudinal a mitad del vientre.
- Se observan las vísceras de la rana.
- Realizar cortes para desprender el corazón de las membranas que lo sostienen, extraerlo y colocarlo en solución fisiológica (NaCl 0.9%) para lavar.
- Colocarlo sobre la charola o mesa de disección y realizar cortes longitudinales para descubrir las cavidades cardíacas.
- Observar las estructuras internas con microscopio estereoscópico.
- Conservar el corazón en formaldehído 10%.



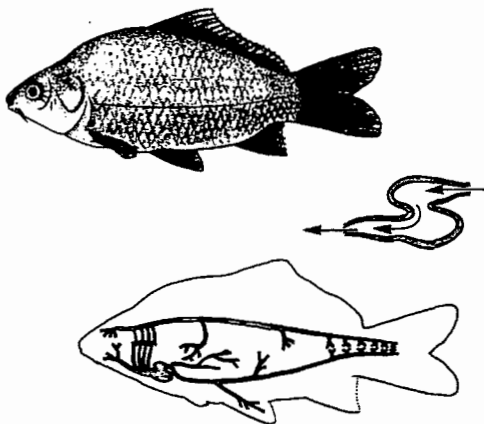
Fotografías que ilustran la disección del corazón del anfibio, así como el tipo de corazón tricavitario.

Disección del pez

- Se sacrifica al pez con cloroformo.
- Se coloca en la charola o mesa de disección. El corte para exponer las vísceras del pez es en forma rectangular. La disección comienza con un corte en el vientre del pez desde las branquias hasta el ano. El siguiente corte se realiza por un costado del pez desde la parte superior de la branquia hasta el ano. Finalmente, realizar un corte uniendo la parte superior e inferior de la branquia. (Nota: Es necesario tener precaución de no realizar incisiones profundas para evitar daño en órganos superficiales o en el corazón).
- Separar el rectángulo de piel cortado y exponer las vísceras:



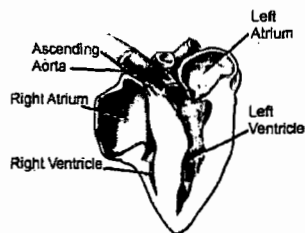
- Para visualizar el corazón es necesario cortar y separar el último arco branquial detrás del cuál se encuentra; con cuidado para no desgarrarlo. Una vez separado colocarlo en solución fisiológica (NaCl 0.9%) para lavar.
- Con ayuda de un bisturí delgado realizar cortes longitudinales para descubrir las pequeñas cavidades cardiacas.
- Observar las estructuras internas con microscopio estereoscópico.
- Conservar el corazón en formaldehído 10%.



Fotografías que ilustran la disección del corazón del pez, así como el tipo de corazón bicavitario.

Disección del pollo

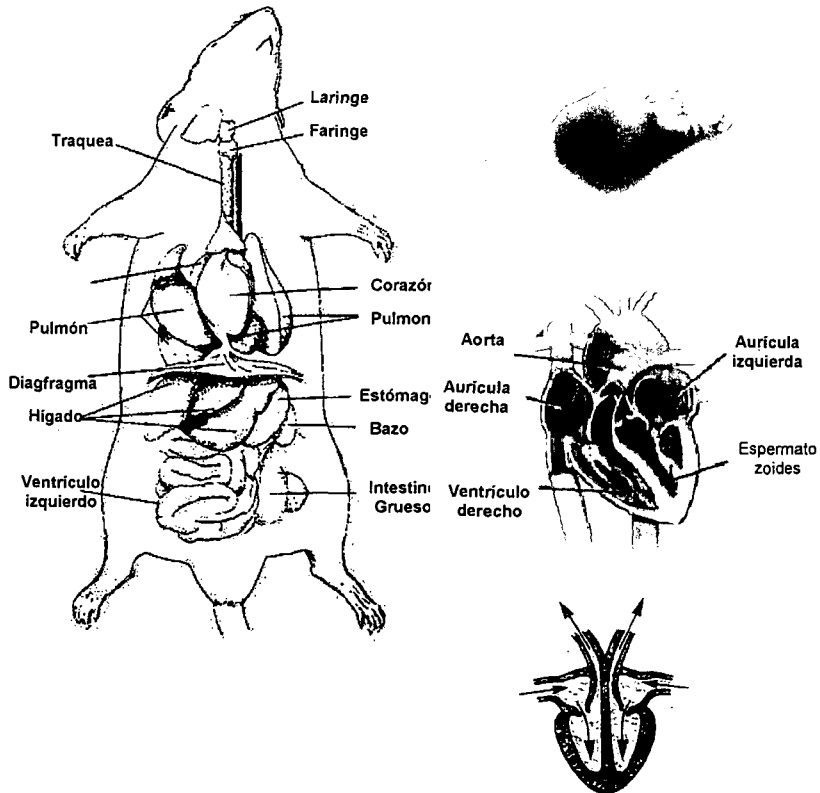
- Se sacrifica al pollo con atmósfera de CO₂ y dislocación de cervicales. Colocarlo en una charola o mesa de disección en decúbito supino y retirar las plumas del área a cortar.
- A continuación, se procede a disecar los músculos pectorales hasta encontrar la quilla, la cual se extrae cuidadosamente cortando las uniones con los arcos costales, teniendo cuidado de no cortar las arterias principales del corazón.
- Ubicar y separar el corazón haciendo corte de membranas de unión y sostén; colocarlo en solución fisiológica (NaCl 0.9%) para lavar.
- Colocarlo sobre la charola o mesa de disección y realizar cortes longitudinales para descubrir las cavidades cardíacas.
- Observar las estructuras internas con microscopio estereoscópico.
- Conservar el corazón en formaldehído 10%.



Fotografías que ilustran la disección del corazón del ave, así como el tipo de corazón tetracavitario

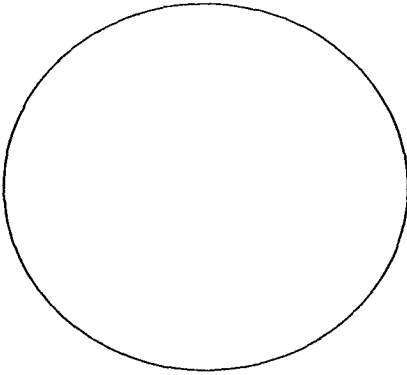
Dissección de la rata

- Se sacrifica la rata con atmósfera de CO₂ y dislocación de cervicales.
- Sobre la mesa de disección, colocar a la rata en decúbito supino y realizar una incisión toraco-abdominal central con el bisturí.
- Tras la apertura de la pared toraco-abdominal y la retirada de la grasa pre-peritoneal, podemos observar pulmones, hígado e intestino.
- Separar el corazón y colocar en solución fisiológica (NaCl 0.9%) para lavar.
- Colocarlo sobre la charola de disección y realizar cortes longitudinales para descubrir las cavidades cardiacas. Observar las estructuras internas con microscopio estereoscópico.
- Conservar el corazón en formaldehído 10%.

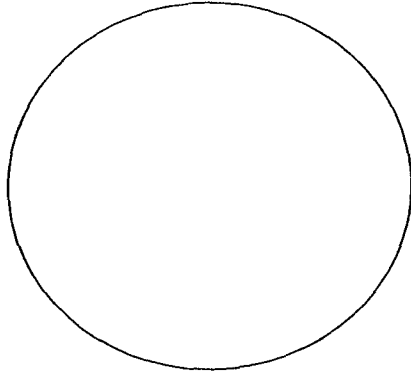


Esquemas que ilustran la discción del corazón de la rata, así como el tipo de corazón tetracavitario

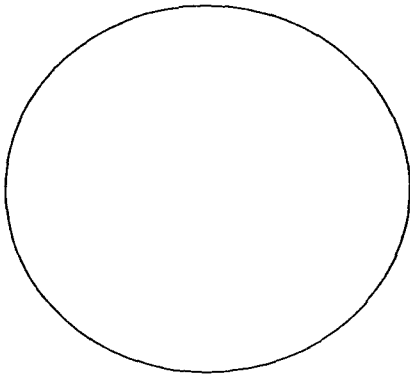
RESULTADOS



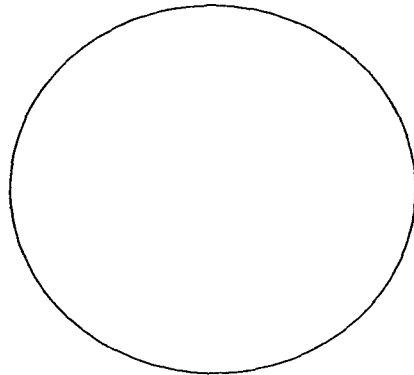
Corazón de Pez
(observación macroscópica)



Corazón de Anfibio
(observación macroscópica)



Corazón de Ave
(observación microscópica)



Corazón de Mamífero
(observación microscópica)

DISCUSIÓN

1-Defina los conceptos: Ventriculo, Seno venoso, Miocardio, y Endocardio

2-Cuales son las capas de tejido que dan origen al corazón

3- Cuales son las funciones del sistema cardiovascular

4- A qué se le denomina circulación mayor y circulación menor:

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA:

- Colección de Medicina Materno-Fetal; Medicina del Embrión. José M. Carrera, Asim Kurjak. PP 111-115. Ed. MASSON. 1997
- Lo esencial en Sistema Cardiovascular; Estructura y Función del Corazón. Romeshan Sunthareswaran. PP 9-18. Ed. Harcourt.1999.
- Fernández Guzmán M.P. *Manual de biología del desarrollo*, Ed. JGH SALVAT Medicina 2ed. (1998).
- Scott F. Gilbert (2000) *Developmental Biology*, SINAUER. Cap 15 "Lateral plate mesoderm and endoderm" pp 471 – 501.

PRACTICA VII

DIFERENCIACIÓN CELULAR: CULTIVO DE CELULAS MADRE Y DE CELULAS GLIALES

(Práctica demostrativa)

INTRODUCCIÓN

Al inicio de su ciclo de vida, un ser vivo se forma a partir de una sola célula (huevo fertilizado) en un individuo adulto, este proceso se denomina: Epigénesis. A lo largo de ese trayecto, las células del organismo no sólo varían en cantidad mediante la proliferación, sino que también se diferencian y se especializan, modificando sus fenotipos. Se denomina **diferenciación celular** al proceso mediante el cual una célula modifica su fenotipo hacia tipos específicos con funciones definidas, y si posteriormente se compromete con una función, y pierde su capacidad de proliferar, se convierte en una célula especializada. Durante el proceso de formación de un ser vivo se constituyen los diferentes linajes celulares, en los que cada tipo celular se identifica por su morfología y características moleculares.

ANTECEDENTES

Durante el desarrollo del sistema nervioso central y periférico, Neurogénesis y Gliogénesis son los términos utilizados para referirse al proceso de formación de neuronas y células gliales respectivamente. Ambos procesos ocurren tanto en la etapa embrionaria como en individuos adultos, a partir de células madre neurales indiferenciadas, es decir, a partir de células que no han llegado a su destino ó estado final del desarrollo en su linaje. Las células madre se dividen en forma asimétrica, es decir, cada célula progenitora origina otra célula progenitora y una célula hija diferenciada. Posteriormente, las células hijas adquieren destinos diferentes por la segregación desigual de factores citoplasmáticos o por influencias del medio en el que se encuentran. Todo esto facilita la respuesta tisular ante cambios fisiológicos, como por ejemplo, la necesidad de producción de neuronas o células gliales ante una lesión leve.

Actualmente el estudio y la investigación de las células madre ha recibido gran atención porque es cada vez mas evidente su capacidad de diferenciación, tanto *in vitro* como *in vivo*, y de dar lugar a diferentes estirpes tanto de neuronas como de células gliales. Esto ha sido posible gracias a la inducción del proceso de diferenciación al exponer a las células madre a diferentes condiciones de cultivo.

Uno de los modelos celulares que con facilidad se puede cultivar en el laboratorio es la glía envolvente del bulbo olfatorio. Las células gliales de bulbo olfatorio, son un tipo celular glial que ha llegado a su destino y cuyas características morfológicas se encuentran bien descritas. Por otro lado se encuentran las células

madre de embriones de rata que también pueden aislarse para ser cultivadas en el laboratorio durante diferentes etapas del desarrollo embrionario.

JUSTIFICACIÓN

En la actualidad aún existen interrogantes relacionadas con los procesos de diferenciación de algunos tipos celulares en particular. Por ello, un campo importante de la investigación se dedica a la búsqueda de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la diferenciación celular.

El cultivo celular es una metodología que nos permite estudiar los procesos de diferenciación celular con relativa facilidad, ya que reproduce las condiciones fisiológicas de supervivencia de las células. En esta práctica el alumno conocerá uno de los modelos de estudio de diferenciación celular así como las condiciones que favorecen dicho proceso.

OBJETIVOS

1. Conocer metodologías de cultivo celular, de células precursoras y de células diferenciadas.
2. Observar las características morfológicas de células madre embrionarias y de células diferenciadas; glía envolvente del bulbo olfatorio, cultivadas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

- Rata macho de la cepa Wistar de 8 semanas de edad
- Rata preñada de 14 días

- Tubo falcon de 15 ml (3) y de 50 ml
- Baño de circulación
- Frascos de cultivo chicos (2)
- Malla
- Incubador de CO₂
- Centrífuga
- Microscopio invertido

Material y Equipo de laboratorio

- Cama para CO₂
- Guantes y cubrebocas
- Estuche de disección
- Bolsa de plástico y papel estraza
- Plumón indeleble
- Dislocador de cervicales
- Microscopio-estereoscopio
- Micropipeta y puntas estériles
- Caja de Petri chica y grande (2c/u)

Soluciones y reactivos

- CO₂
- Hank's con Ca²⁺ y Mg²⁺ (3 y 5 ml)
- Hank's sin Ca²⁺ y Mg (1 y 2 ml)
- Tripsina (100 µl)
- DF10S (8 ml)
- Poli-L-Lisina
- Medio para células madre (6 ml)

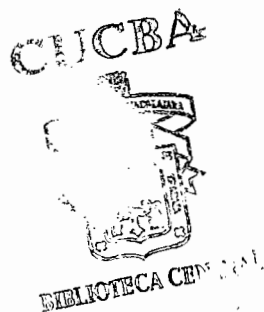
Metodología (desarrollo de la práctica):

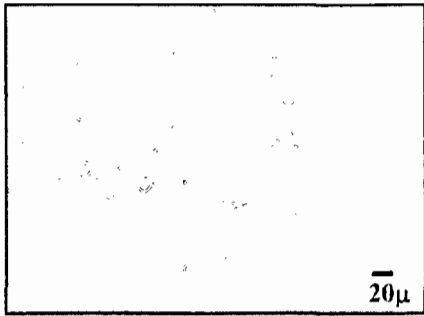
Para cultivo de glía envolvente

1. Se sacrifica la rata con atmósfera de CO₂ y decapitación.
2. Utilizando el microscopio-estereoscopio, realizar las disecciones necesarias para extraer los bulbos olfatorios y colocarlos en sol de Hank's con Ca y Mg.
3. Disecar la capa mas externa de cada bulbo y colocarla en sol. de Hank's sin Ca y Mg (1 ml)
4. Agregar tripsina y colocar en baño de circulación a 37°C por 10 min
5. Disociar mecánicamente con la pipeta y colocar 2 ml de DF 10S
6. Centrifugar 5 min a 1300 rpm y posteriormente aspirar sobrenadante.
7. Resuspender en 2 ml de DF 10S.
8. Repetir paso 6 y 7
9. Filtrar en malla y agregar 4 ml de DF 10S
10. Tomar el medio y sembrar en frasco de cultivo
11. Colocar en el incubador de CO₂.
12. Esperar 48-72 hrs para ver celulas de glía envolvente.

Para cultivo de células madre embrionarias

1. Se sacrifica la rata con atmósfera de CO₂ y dislocación.
2. Utilizando el microscopio-estereoscopio, realizar las disecciones necesarias para extraer los cuernos uterinos.
3. Extraer los embriones de los sacos amnióticos y colocarlos en 5 ml de sol. de Hank's con Ca y Mg donde se decapitarán.
4. Disecar el cuerpo estriado de cada cabeza de embrión y colocarlo en sol. de Hank's sin Ca y Mg (2 ml).
5. Disociar con p1000
6. Centrifugar a 1200 rpm por 5 min.
7. Aspirar sobrenadante
8. Resuspender en medio para stem cells.
9. Sembrar en frasco de cultivo y colocar en incubador
10. Esperar 24 a 48 hrs para ver las neuroesferas.

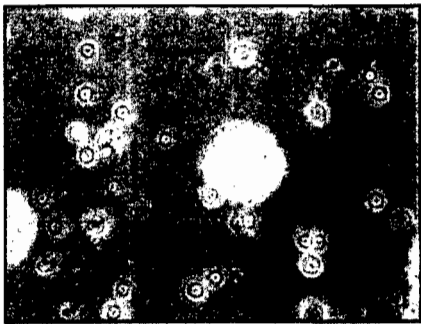




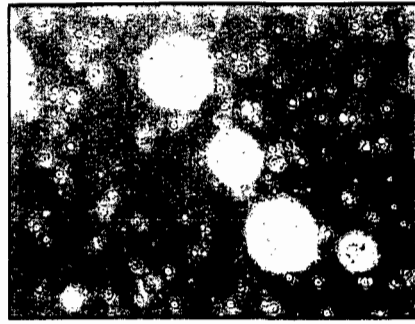
GLIA ENVOLVENTE 6 DIV



GLIA ENVOLVENTE 14 DIV

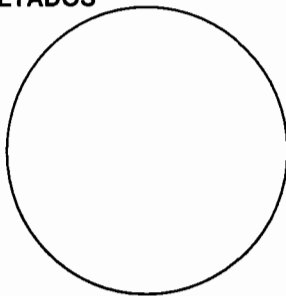


PRECURSORES NEURALES 1 DIV

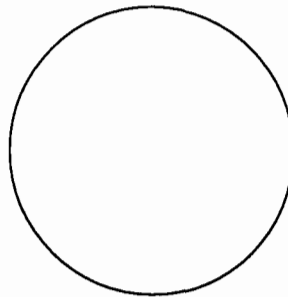


PRECURSORES NEURALES 4 DIV

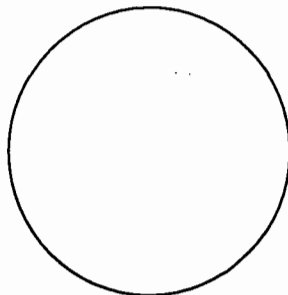
RESULTADOS



Células Madre Neurales



Células de Glía Envlovente



Células Diferenciadas

DISCUSIÓN

1. ¿Cuáles son los elementos que interviene en el proceso de diferenciación celular?

2. ¿Dónde podemos encontrar células madre?

3. ¿Qué establece el principio de la diferenciación celular?

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez Buylla y col. (1995) *Neuronal stem cells in the brain of adult vertebrated*. Stem Cells 13(3):263-72
- Cap 19 "Cell Differentiation" en *Analysis of Biological Development*; Klaus Kalthoff ,McGraw-Hill (1996). pp 447 – 468.