



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS

Biología del Desarrollo

MANUAL DE PRÁCTICAS



BIOLOGÍA: PLAN DE ESTUDIOS 2017-2

Nombre del Profesor: M.C. María Isabel Montes Pérez

CONTENIDO

<i>No. de práctica</i>	<i>Nombre de la práctica</i>	<i>No. Página</i>
	<i>Reglas de seguridad en el laboratorio</i>	<i>3</i>
1	MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA EMBRIOLOGÍA	4
2	GAMETOGÉNESIS	15
3	FECUNDACIÓN	19
4	SEGMENTACIÓN	29
5	GASTRULACIÓN	35
6	NEURULACIÓN	37
7	ANEXOS EMBRIONARIOS Y PLACENTA	43
8	LITERATURA	46

REGLAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO



- Localizar todos los equipos de seguridad como extinguidores, lavador de ojos, regaderas, etc.
- Proteger los ojos si trabajará con reactivos corrosivos, peligrosos o con luz ultravioleta.
- Usar bata de laboratorio, lo protegerá del material corrosivo o blanqueador.
- Nunca pipetee con la boca o pruebe algún reactivo.
- No fumar, comer o beber en el laboratorio.
- El pelo largo de preferencia recogerlo.
- No usar sandalias con los pies descubiertos.
- No colocar los libros o cuadernos en el área de trabajo.
- Reporte cualquier daño o accidente en el laboratorio.
- Pregunte al maestro cualquier duda en el manejo de reactivos y/o equipos.
- Todos los reactivos pueden ser un riesgo para la salud, trabaje con cuidado.
- La mayoría de las prácticas de este laboratorio usan reactivos cancerígenos o tóxicos, así como agentes potencialmente patógenos, trabaje con seriedad y cuidado.

- En caso de contaminarse con algún reactivo lavarse con agua rápidamente y avisar al maestro.

PRACTICA No. 1

MÉTODOS DE ESTUDIO DE LA EMBRIOLOGÍA

Duración 6 horas

INTRODUCCIÓN:

TÉCNICA DE MONTAJE PARA EMBRIONES DE POLLO EN BLOCK:

MÉTODO:

El período de desarrollo del pollo dura 21 días aproximadamente, cuando se incuba a 37°C. El tipo de segmentación para este caso es meroblástica: ésta termina unas horas después de la puesta con la formación del escudo embrionario.

La formación del surco primitivo (homólogo al blastoporo) se refiere a una invaginación de las células del blastodermo cuyo movimiento hacia dentro dará origen a las tres capas embrionarias, al arquenterón y más adelante al notocordio. Las referencias posteriores a términos como pliegues neurales y cefálicos, tienen que ver con la formación del tubo neural.

El plegamiento del ectodermo y mesodermo extraembrionario origina las membranas extraembrionarias, que corresponden a: amnios, alantoides y el corion. Las somitas son bloques de tejido en que están divididos el mesodermo, dispuestos longitudinalmente a cada lado del notocordio. Cada somita forma un bloque muscular (miotomo), una porción del riñón (nefrotomo) y contribuye a la formación del esqueleto axial (esclerotomo) y de la dermis.

COMPETENCIA:

Aplicar correctamente, algunos métodos de estudio de la embriología para establecer la importancia de los diferentes métodos de estudio y presentar resultados en forma oral y escrita con una actitud científica y crítica.

MATERIAL:

- Huevos de gallina.
- 1 cajas de Finger Bowl.
- 1 estuche de disección.
- 1 cuchara sopera.
- Cajas de petri (Una para cada embrión)
- Papel filtro.
- Un termoplato.

- Tijeras
- Pipeta Pasteur

REACTIVOS:

500 ml de solución salina al 9%.

Reactivos de Bouin (fijador)

Alcohol etílico al 70%.

METODOLOGÍA:

1. Obtención de huevos de gallina
2. Prepare la incubadora y establezca una temperatura de 37°C.
3. Incubar durante 24 horas o más, dependiendo de la fase de desarrollo que se quiera obtener.
4. Colocar una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 9% a una temperatura de 25°C, en una caja de finger Bowl.
5. Partir el huevo en dos y colocarlo con mucho cuidado en la caja de Finger Bowl.
6. Se localiza el disco germinal y con unas tijeras se recorta al embrión. El disco germinal debe estar siempre en la parte superior y central del huevo. Al blastodermo se le queda anexo una fina película, que es la membrana vitelina.
7. Se toma el disco germinal con una cuchara (espumadera) y se coloca en una caja de petri que deberá tener solución salina y un papel filtro recortado al tamaño del embrión, donde quedará centrado.
8. Se hacen dos lavados sucesivos con solución salina, teniendo cuidado de no tocar el embrión.
9. Se fija en Bouin por un período de 24 horas.
10. Pasadas las 24 horas se tira el fijador y se procede a la deshidratación con alcohol de diferentes graduaciones (alcohol del 30%, de dos en dos hasta el absoluto).

NOTA: Para centrar el embrión se corta un papel filtro de diámetro de la caja, en el centro de dicho papel se hace un círculo con el diámetro que el embrión requiera y se coloca el embrión.



Fig. 1 Manera en que deberá obtener los embriones de pollo, una vez colocado el cloruro de sodio a una temperatura de 25°C.



Fig.2 Embrión de pollo en caja de Finger Bowl, con solución de cloruro de sodio al 9%.

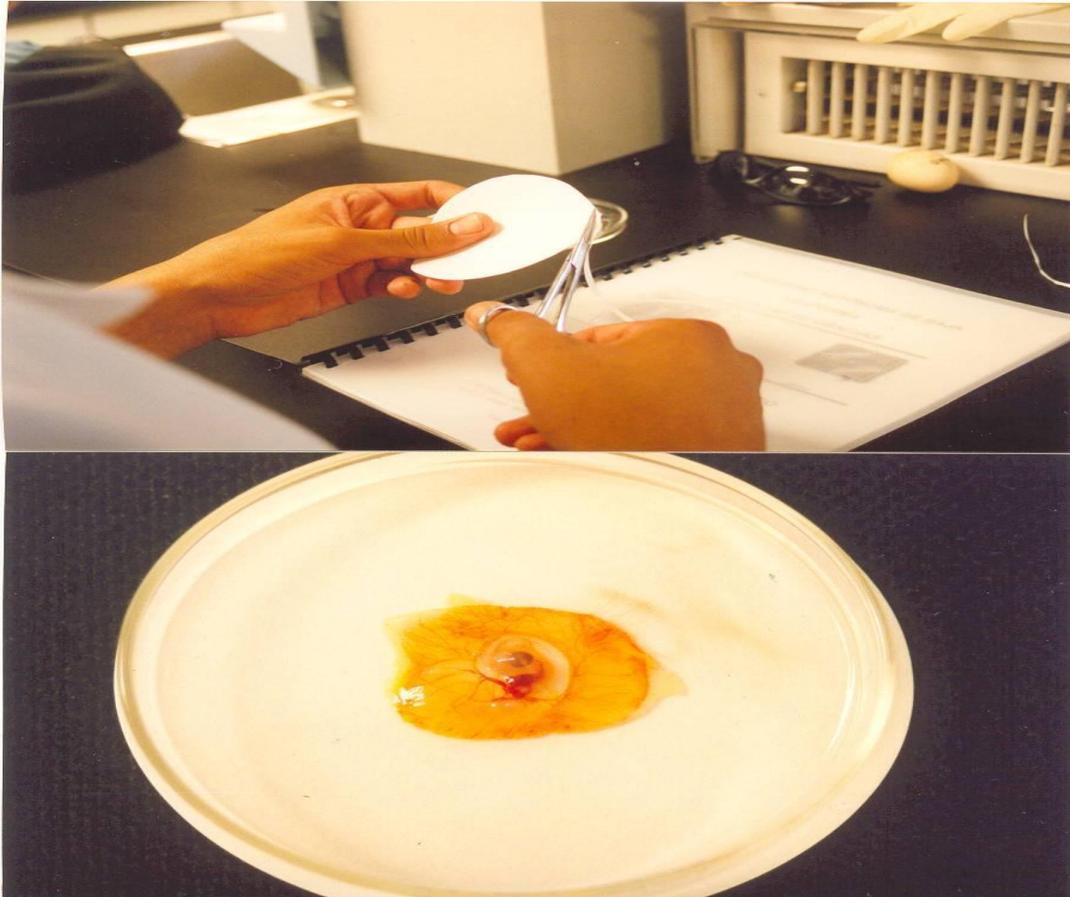


Fig. 3 Embrión de pollo colocado en una caja de petri, y la preparación del papel filtro, que deberá ser cortado a la medida del embrión, para su fijación y siguiente procesamiento.

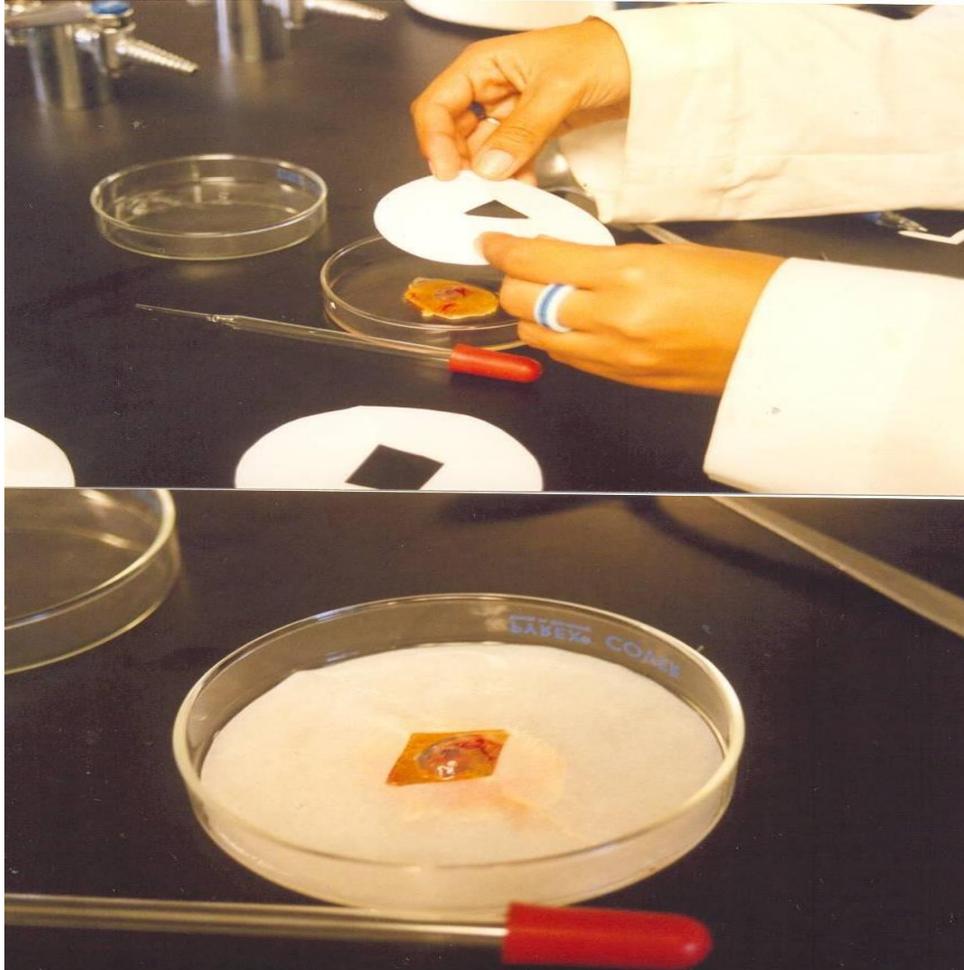


Fig. 4 Forma en que debe colocarse el papel filtro, una vez cortado en la caja de petri.

Método de coloración en block:

Deshidratación de embriones según Carmegio.

La fijación de las piezas embriológicas siempre se hace en Bouin y por un lapso de 12 a 24 horas, después del cual se procede al lavado en alcoholes, según la técnica a seguir.

Alcohol 30%	por la mañana
Alcohol 32%	por la tarde

Alcohol 34%	por la mañana
Alcohol 36%	por la tarde
Alcohol 38%	por la mañana
Alcohol 40%	por la tarde
Alcohol 42%	por la mañana
Alcohol 44%	por la tarde
Alcohol 46%	por la mañana
Alcohol 48%	por la tarde
Alcohol 50%	por la mañana

Por dos semanas más, se sigue el mismo procedimiento hasta llegar al alcohol absoluto.

Alcohol absoluto xileno	un cambio de 1 a 3 minutos.*
Xileno	un cambio de 3 minutos.*

***Deben ser observados los embriones en forma constante, hasta que queden transparentes; ya que si no se hace así, se tiene el riesgo de quemarse el embrión.**

Xileno parafina de	10 a 15 min.
Parafina I (52-54°C)	30 min.
Parafina II (52-54°C)	30 min.
Parafina Ameraffin	1 hora

Después de éstos pasos se procede a la inclusión y a la obtención de cortes del orden de 5 a 8 micras, por medio del microtomo. Los portaobjetos y los cubreobjetos deben lavarse con alcohol del 96% aunque sean nuevos y secarse perfectamente, ya lavados los portaobjetos se les unta albúmina de Mayer o gelatina. Para el montaje de los cortes, se introduce el portaobjeto inclinado dentro del baño de flotación que contendrá gelatina que se prepara de la siguiente manera:

En un matraz o vaso de precipitado se agregan 500 ml de agua destilada y se cubre la superficie con un poco de gelatina; mientras se hincha la gelatina, se pone a calentar agua destilada en un matraz y una vez caliente se agrega al vaso que contiene a la gelatina, hasta disolver totalmente. Ya disuelta se agrega al baño de flotación, manteniendo una temperatura entre los 40°C. Los cortes se colocan en el portaobjeto en forma seriada y en el mismo sentido, en el centro del porta; cuidando que la superficie brillante quede sobre la superficie de él. Después de colocar los cortes sobre los portaobjetos, debe secarse el exceso de agua con un trapo limpio y después debe dejarse la preparación 10 minutos al aire antes de que se pongan en la plancha secadora, para que se evapore el agua que permanece bajo los cortes y estos quedan más firmemente pegados; dejando posteriormente en la incubadora

a una temperatura de 37°C por lo menos 24 hrs. Posteriormente se procede a la aplicación de la técnica de desparafinación.

TÉCNICA DE DESPARAFINACIÓN:

1. Xileno tres cambios de cinco minutos, cada vez. Hasta eliminar totalmente la parafina.
2. Alcohol absoluto xileno, tres cambios de cinco minutos, cada vez.
3. Alcohol absoluto o 96%, tres cambios de cinco minutos cada vez
4. Alcohol del 70% tres cambios de cinco minutos cada vez.
5. Lavar en agua formolada (para una mejor coloración).

TÉCNICA DE COLORACIÓN HEMATOXILINA-EOSINA.

1. Hematoxilina 1 minuto.
2. Lave en agua de la llave.
3. Alcohol ácido (vira a color rosa o rojo).
4. Agua de la llave.
5. Agua amoniacal (vira a color azul).
6. Agua de la llave.
7. Agua destilada.
8. Eosina un minuto.
9. Alcohol del 96%, un cambio de dos minutos.
10. Alcohol absoluto xileno, un cambio de dos minutos.
11. Xileno tres cambios de cinco minutos cada vez.
12. Montar en resina sintética.

NOTA: Es importante observar, que no contengan nada de agua.

TÉCNICA DE DAWSON:

La técnica de Dawson es excelente para la demostración de la formación del tejido óseo en los embriones o en los animales pequeños y depende de la aclaración de los tejidos blandos con KOH; basada en la tinción del hueso con alizarina y el emplazamiento de los tejidos corporales por glicerina.

MÉTODO:

- 1.- Se fijan los embriones o los animales pequeños en alcohol del 96%, durante 48 a 72 horas, la fijación prolongada en alcohol hace a los tejidos menos vulnerables a la maceración por las soluciones cáusticas de potasas.
- 2.- En los especímenes preparados por este método, cualquier grasa se saponifica en el material aclarado como masas blancas y opacas. Por lo tanto hay que extraer las grasas inmediatamente después de la fijación por medio de un tratamiento con acetona durante 2 a 4 días. Regrese el espécimen al alcohol del 96° por 12 a 24 horas.

3.- Coloque el espécimen en hidróxido de potasio al 1% hasta que los huesos sean claros a través del músculo.

4.- Transferir los especímenes al rojo de alizarina al 0.1% en una solución de KOH al 1%, el espécimen se deja en la mezcla hasta que los huesos se tiñan del color adecuado, para esto hay que observar al embrión por transluminación. Si el colorante es absorbido por la solución antes de que se haya obtenido la máxima intensidad, el espécimen puede ser transferido a una nueva solución. Si el aclaramiento en potasa cáustica ha evolucionado hasta mejor grado, solo el hueso tomará la tinción.

5.- Coloque luego el espécimen en la siguiente solución, por tres días.

Hidróxido de potasio	_____	1 g
Agua destilada	_____	79 ml
Glicerina	_____	20 ml

6.- Cuando los tejidos estén bien claros y los huesos sean visibles a través de los músculos, los especímenes se pasan a concentraciones de glicerina de 20%, 40%, 80% y se dejan una semana en cada una.

Finalmente cuando los huesos quedan teñidos y no hay restos de colorante en los tejidos se pasa a glicerina pura y se colocan unos granitos de timol como conservador.



Fig. 5 Técnica Dawson, embrión de cerdo.



Fig. 6 Técnica de Dawson, embrión de armadillo.

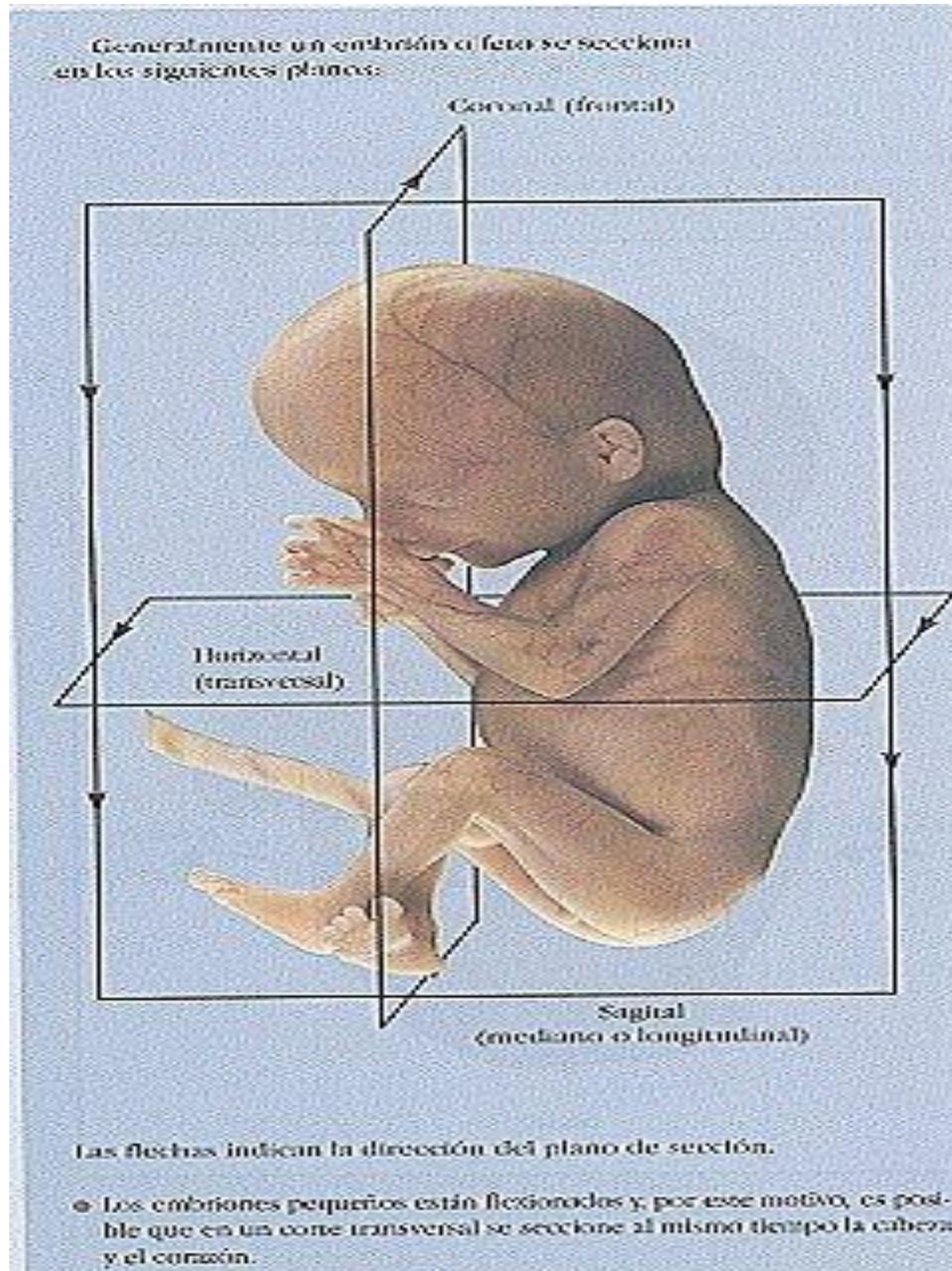


Fig. 7. Embrión humano, mostrando los planos de simetría.

PRÁCTICA No. 2

GAMETOGÉNESIS

Duración: 6 horas

INTRODUCCIÓN.

La gametogénesis es el proceso de formación de gametos en las gónadas (ovarios y testículos), por medio de la meiosis a partir de células germinales. Mediante este proceso, el número de cromosomas que existe en las células sexuales se reduce de diploide a haploide, es decir, a la mitad del número de cromosomas que contiene una célula normal de la especie de que se trate. En el caso de los humanos, si el proceso tiene como fin producir espermatozoides, se le denomina espermatogénesis y se realiza en las gónadas masculinas o testículos. Si el resultado son óvulos, se denomina ovogénesis y se realiza en las gónadas femeninas u ovarios.

CÉLULAS GERMINALES:

La mayor parte de los organismos pluricelulares presentan dos tipos de células: Las células somáticas que representan a la parte del organismo que no hereda las características a las nuevas generaciones y las células germinales que representan características genéticas y fenotípicas que las hace diferentes del resto de las células.

Las células germinales o gametos de los distintos animales, difieren en forma y tamaño. En ambos sexos existen diferencias muy marcadas en lo que se refiere a dimensiones, longevidad, nutrientes, etc.

ÓVULO:

La célula sexual femenina es el óvulo, originada en el ovario, generalmente es de forma esférica aunque los hay de forma ovóide en aves, alargados en lampreas y peces gonoideos. Su tamaño es también muy variable los hay desde 70 μm hasta los grandes huevos de reptiles y aves.

Los óvulos presentan muchas características que los diferencian de las células somáticas, todos los óvulos son más grandes que el resto de las células, la disposición de los organelos es diferente así como su cantidad, presenta una disposición polar bien definida debido a la posición del núcleo y del vitelo.

Todos los óvulos, con pocas excepciones, presentan membrana vitelina, algunas veces con elementos accesorios, presentes de acuerdo a las necesidades ambientales en los que se desarrollan. En los peces más primitivos, como amphioxus, los óvulos tienen un diámetro de 0.1 mm con un núcleo desplazado hacia el polo animal y con muy poco vitelo en el citoplasma.

ESPERMATOZOIDES:

Los espermatozoides de los diferentes grupos animales, presentan una gran variedad de formas. Sin embargo, los espermatozoides de los vertebrados presentan una estructura común, la cual se compone de dos partes: la cabeza y la cola. La cola a su vez se divide en cuatro regiones: el cuello, parte media, parte principal y la parte final. En la cabeza se encuentra el acrosoma y el núcleo muy condensado donde residen las características genéticas. Al acrosoma también se le da el nombre de casquete anterior.

En los tubos seminíferos los espermatozoides no tienen movilidad hasta que son transportados al epidídimo, donde adquieren su madurez fisiológica. En los vertebrados inferiores, los espermatozoides son mezclados con sustancias mucoides secretadas en los conductos genitales de los machos. En los mamíferos existen glándulas que colaboran en la formación del semen y corresponden a la próstata y la vesícula seminal. Estas sustancias son ricas en fructuosa que probablemente sirve como nutriente a los espermatozoides.

COMPETENCIA

Identificar al epitelio germinativo en los ovarios y testículos mediante la observación microscópica de laminilla de gónadas para identificar los diferentes tipos celulares, durante el proceso de ovogénesis y espermatogénesis y explicar la importancia de la relación morfofisiológica, con una actitud crítica y responsable.

MÉTODO:

A. Análisis microscópico de ovarios, testículos y espermatozoides de:

Ovario	Testículo	Espermatozoides

OBSERVACIONES:

- Localiza el epitelio germinativo.
- Identificará los diferentes tipos celulares.
- Establecerá las diferencias morfológicas entre los diferentes tipos de células germinales.
- Establecerá las diferencias entre los tipos de ovocitos maduros de las especies observadas en el laboratorio.
- Establecerá las diferencias entre los tipos de espermatozoides de las especies observadas en el laboratorio.

MÉTODO TÉCNICA DE WRIGHT:

1. Colocar una gota de semen en un extremo de un portaobjetos limpio.
2. Con otro portaobjetos hacer un extendido de la gota de semen.
3. Colocar el portaobjetos dentro de una caja petri y agregar un número determinado de gotas de la solución colorante de Wright, hasta cubrir el frotis.
4. Tapar la caja petri y dejar actuar por 10 minutos.
5. Agregar el mismo número de gotas de la solución Buffer sobre el frotis sin lavar el colorante, dejar actuar la solución por 20 minutos.
6. Eliminar la mezcla de colorante y solución Buffer lavando con agua destilada.
7. Dejar secar al aire libre, montar con resina sintética y observar.

ACTIVIDADES:

- 1.- Mediante el uso de bibliografía, elabore el esquema de un espermatozoide humano, indicando el nombre de las diferentes estructuras.
- 2.- Observación in "vitro" de los espermatozoides humanos.
- 3.- Identifique e indique las características morfológicas de las espermatogonias, espermatocitos, espermátides y espermatozoides. Deberá poner nombre a todas las estructuras observadas, técnica, organismo y aumentos.

COMPONENTES DEL SEMEN:

Color. Blanco opalescente.

Densidad: 1.028

pH: 7.35 – 7.5

Cuenta normal de espermatozoides:

Un promedio de 100 millones / ml, con menos del 20% de formas anormales.

Otros componentes:

Fructosa (1.5 – 6.5 mg/ml., Fosforilcolina, ergotionina, ácido ascórbico, flavinas, inositol, prostaglandinas.

Espermina, ácido cítrico, colesterol, fosfolípidos, zinc, fibrinogenasa, fosfatasa ácida, fibrolisina, Fosfato, bicarbonato, Hialuronidasa.

RESULTADOS:

Entregar un informe, que incluya lo siguiente:

- 1.- Esquemas, con nombre en todas las estructuras observadas, técnica, aumentos y organismo.
- 2.- Respuestas al cuestionario anexo.
- 3.- Respuestas a las preguntas de investigación bibliográfica.

INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA:

1. Indica en forma clara cómo se originan y se diferencia la gónada masculina (testículo).
2. ¿A qué se debe la importancia de las células de Sertoli y de las células de Leydig?

PRÁCTICA No. 3 FECUNDACIÓN

Duración: 6 horas

FECUNDACIÓN EN ORGANISMOS ACUÁTICOS (ERIZO DE MAR).

La observación del desarrollo embrionario en los organismos acuáticos es de suma importancia para los Investigadores, técnicos que se dedican a la acuicultura y los dedicados a la pesca en general, porque comprende varios aspectos del origen de los organismos, así como la necesidad de estudiar la biología del desarrollo, tipo de reproducción y ciclos reproductivos de los recursos pesqueros.

Además, un aspecto por demás importante, es que los ovocitos de erizo tienen grandes ventajas en didáctica porque son de buen tamaño, translúcidos y fáciles de observar, sobre todo para el proceso de fecundación, poliespermia; así como las primeras fases de desarrollo.

FECUNDACIÓN:

La fecundación es la fusión de los gametos (óvulos y espermatozoide), seguida de la unión de los dos núcleos de los gametos; esta acción inicia el proceso de desarrollo embrionario.

La acción del espermatozoide sobre el óvulo, estimula a este último para desarrollar la serie de fenómenos que llevan a la organización del nuevo embrión. Por lo tanto, la fecundación ejerce funciones de activador sobre el óvulo. La adición de cromosomas es otro aspecto totalmente diferente.

Debe señalarse que el papel que tiene la fecundación en el ciclo biológico de varios organismos no siempre es el mismo. Aunque en los metazoos y metáfitos la fecundación origina el desarrollo del huevo que conducirá al embrión.

Uno es la activación del huevo y el otro es la mezcla de los caracteres hereditarios en la descendencia. El último aspecto de la fecundación se llama anfimixia y de hecho cae dentro de las ciencias genéticas.

COMPETENCIA:

Describir la formación, estructura de los gametos y su papel en la fecundación, mediante la observación in vitro, para comprender el proceso de meiosis en la fecundación en erizo de mar, para definir su importancia en el cultivo de especies comerciales y protegidas, con un sentido responsable y ético.

Material y equipo:

- 6 erizos (es necesario conocer previamente la época de desove de las diferentes especies)
- 6 vasos precipitados de 300 ml.
- 6 matraces de 300 ml.
- 3 pipetas de 5 ml. y 3 pipetas de 1 ml.
- 3 vidrios de reloj.
- 3 jeringas de 5 ml.
- 3 pipetas Pasteur.
- Microscopio

Reactivos:

- Agua de mar, decantada o filtrada.
- Sol. KCl al 0.5 mol.
- Gasa.

MÉTODO:

1. Inducción al desove. (Utilizando solución de KCl de 0.5 Mol).
Para saber si las gónadas están desarrolladas, se prepara una solución de KCl de 0.5 Mol y se efectúa un muestreo que consiste en inyectar 1 ml. de la solución a cada erizo en la parte bucal, y si la gónada está desarrollada, en un minuto expulsará los óvulos o espermatozoides; si el material colectado va a ser utilizado después de 1 o 2 días, es recomendable envolverlos en gasa y guardarlos en refrigeración a 10°C (Fig. 26).
2. Llena 5 matraces con agua de mar hasta el tope.
3. Inyecta 1 ml de solución de KCl de 0.5 Mol en el labio bucal del erizo.
4. Lava al erizo inyectado, con agua de mar para limpiarle el líquido somático y el excremento, y coloca a cada erizo sobre un matraz con el ano hacia abajo; espera unos minutos.
5. La hembra empieza a expulsar los óvulos, de color amarillo blanquecino que caen en el matraz (Fig. 27).
6. El macho expulsa el esperma que cae en el matraz como una nube de color lechoso y enturbia el agua (Fig. 27).

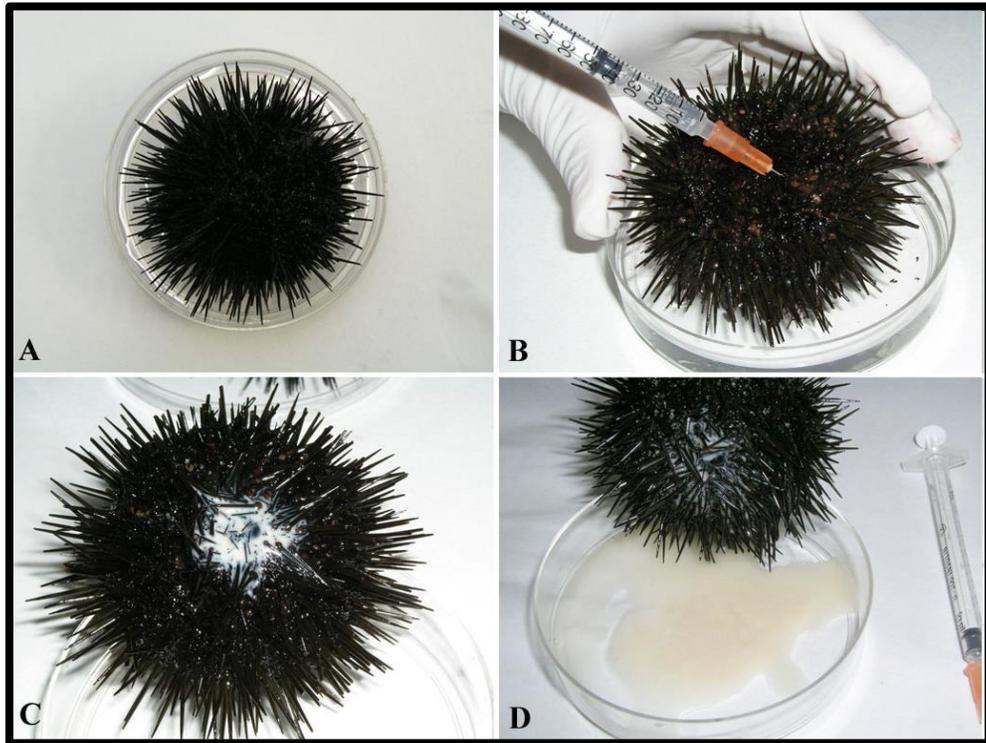


Fig.8 Inyección de la solución de KCL de 0.5 ml. Al erizo.



Fig. 9 Hembra y macho en desove.

Precauciones que se deben tomar en cuenta para el método de inseminación artificial y el método de lavado.

- 1) Examina los ovocitos y utiliza aquellos que estén maduros y de forma esférica. (No deben emplearse ovocitos obtenidos de hembras inmaduras, ya que éstos son de forma irregular y de distintos tamaños).
- 2) Como una hembra desova de 3 a 5 millones de ovocitos, los que se suspendan en la superficie del líquido es mejor eliminarlos a la hora del lavado.
- 3) Distribuye los ovocitos obtenidos en 6 vasos de precipitado de 300 ml y mide la temperatura.
- 4) Mezcla en un vaso de precipitado el esperma obtenido de 2 o 3 organismos. Agrega 5 ml de esperma a cada uno de los vasos de precipitado que contienen los óvulos; (a este proceso se le denomina inseminación, y anota en el vaso la hora exacta de la inseminación. (Fig. 28)
- 5) Una vez realizada la fecundación, se elimina el excedente de esperma mediante 6 lavados continuos, a intervalos de 10 minutos cada uno, para evitar que el agua se ensucie y perjudique el desarrollo embrionario.
- 6) Durante el lavado elimina los huevecillos que no se sumerjan en el lapso de reposo de 10 minutos.
- 7) Presta atención a la fluctuación de temperatura durante el desarrollo embrionario y evita que ésta se eleve a más de 30 °C.



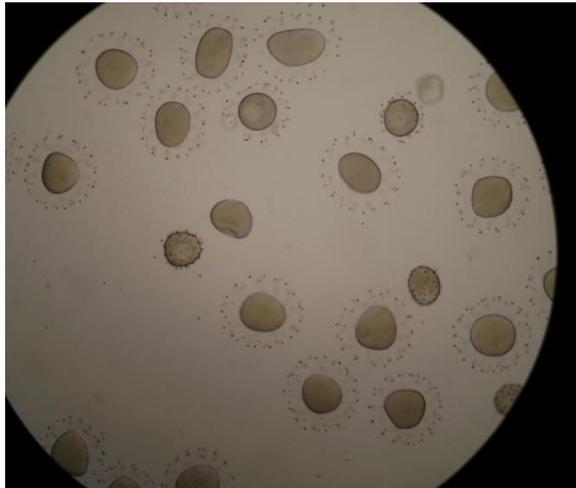


Fig. 10 Obtención de gametos, fecundación de galleta de mar

OBSERVACIONES AL MICROSCOPIO

1. Óvulo no fecundado y espermatozoide.

Coloca primero en un vidrio de reloj óvulos no fecundados y observarlos bajo el microscopio (15x10) y posteriormente agrega una gota de espermatozoide con una pipeta. Observarás que alrededor del óvulo se juntan infinidad de espermatozoides. (Dibuja un esquema de lo observado) (Fig.11).



Fig. 11 Infinidad de espermatozoides alrededor del óvulo.

2. Óvulo fecundado.

Mientras haces el esquema de la Fig. 29 en el transcurso de 10 a 20 minutos se forma la membrana de fecundación. Esta empieza a formarse inmediatamente después que penetra un espermatozoide para evitar la penetración de otro. (Fig. 12).

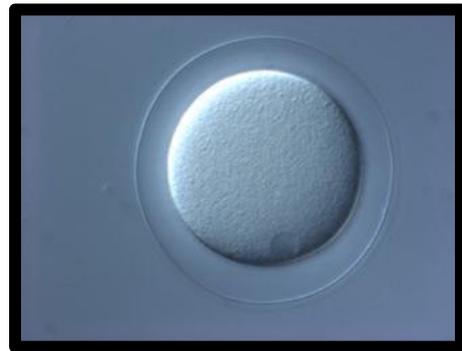


Fig. 12 Formación de la membrana de fecundación.

2. Etapa de 2 y de 4 células.

Mientras terminas de dibujar el esquema 2, el huevecillo se divide en dos células. La división se termina en aproximadamente 5 minutos. Observa cuidadosamente ese proceso. Para pasar de la etapa de dos células a cuatro transcurren 30 minutos. Dibuja esos dos esquemas (Fig. 13).

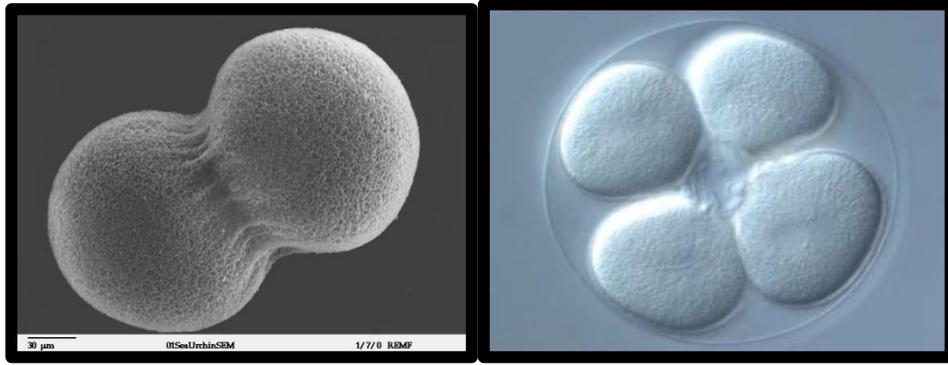


Fig. 13 Formación de 2 y 4 células.

3. Para que te expliques cómo ocurre la segmentación del huevecillo, imagínatelo como el globo terrestre. Las etapas de 2 y 4 células serían como si se partiera al globo con un cuchillo del polo norte hacia el polo sur, quedando dividido en 4 partes. La etapa de 8 células sería un corte transversal por el ecuador, quedando 4 células en el hemisferio norte y 4 en el hemisferio sur, sumando un total de 8 células del mismo tamaño (Fig. 13).



Fig. 14 Formación de 8 células.

4. Etapa de 16 células.

Para pasar de la etapa de 8 células a 16 células, las 4 células del hemisferio norte se segmentan longitudinalmente y las 4 del hemisferio sur transversalmente, sumando un total de 16 células de 3 distintos tamaños: grandes, medianas y chicas. Dibuja el esquema teniendo en mente lo anterior (Fig. 14).



Fig. 15 Formación de 16 células.

6.- Etapa de mórula.

Como la célula inicial se va segmentando a intervalos de 30 minutos, el tamaño de las células se va haciendo más pequeño cada vez, y el número de éstas es casi incontable. Esta etapa recibe el nombre de mórula por el parecido que tiene al fruto de la mora (Fig. 16).



Fig. 16. Etapa mórula.

7.- Etapa de blástula y gástrula.

El embrión da vueltas con la ayuda de los cilios hasta romper la membrana y eclosionar. Se le denomina blástula, y tiene forma de pelota de baseball. Posteriormente, empieza la invaginación, que ocurre como si empujaran el embrión con un palo por el polo sur. Allí se va formando el origen del intestino. El orificio que se forma es el blastoporo que posteriormente viene a ser el ano. La boca se forma cuando la parte A llega a tocar la B (Fig.17)

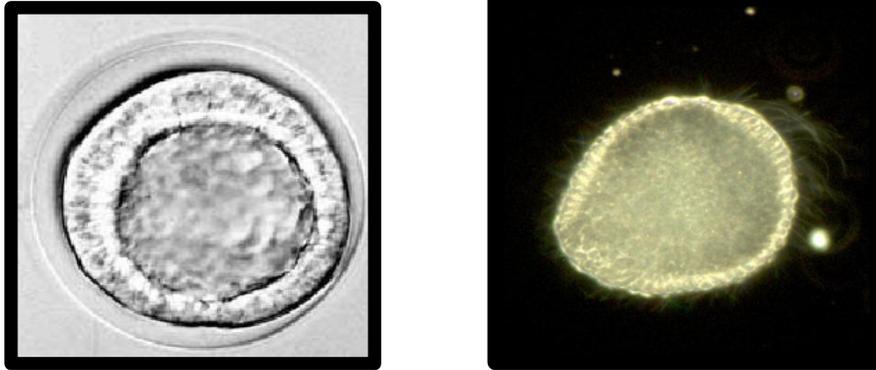


Fig. 17. Etapa de gástrula.

8. Larva prismática.

Como la forma que presenta la larva es triangular se le denomina prismática o piramidal. Debido a que estas larvas se mueven muy activamente dentro del acuario, al observarlas al microscopio es conveniente colocarlas en un vidrio de reloj. Los puntos A y B anteriores han llegado a unirse y se abre el orificio de la boca (Fig. 18)

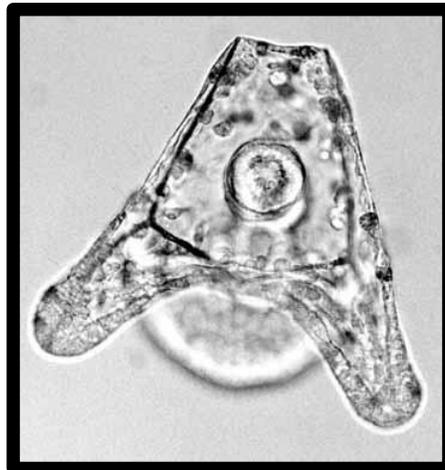


Fig. 18 Larva prismática.

9. Larvas pluteus.

Al igual que en el caso anterior estas larvas son muy activas. Observa primero este movimiento con bajo aumento de 5 x 10 y observa en la larva su formación esquelética y pigmentación (Fig. 19).



Fig. 19 Larva pluteus.

ACTIVIDADES:

- Localiza el epitelio germinativo.
- Identificará los diferentes tipos celulares.
- Establecerá las diferencias morfológicas entre los diferentes tipos de células germinales.
- Establecerá las diferencias entre los tipos de ovocitos maduros de las especies observadas en el laboratorio.
- Establecerá las diferencias entre los tipos de espermatozoides de las especies observadas en el laboratorio.
- Obtener los gametos masculinos y femeninos de erizo de mar y realizar la fecundación *in vitro*.
- Observar la membrana de fecundación y los consecuentes estadios de desarrollo.
- Esquemas, con nombre en todas las **estructuras observadas, técnica, aumentos y organismo.**
- Realizará laminillas fijas con las divisiones celulares obtenidas, a partir de la fecundación realizada en clase.

PRÁCTICA No. 4 SEGMENTACIÓN

Duración: 6 horas

INTRODUCCIÓN.

Una de las características de la reproducción sexual en los animales, es que su compleja estructura pluricelular, se origina a partir de una sola célula: el óvulo fecundado; ésta célula única, ahora llamada cigoto o huevo se transforma en un cuerpo pluricelular, que se caracteriza por un drástico aumento en sus actividades respiratorias y sintéticas la cual tiene lugar al principio del desarrollo y se logra mediante varias divisiones celulares (MITOSIS), lo que corresponde al proceso de **Segmentación**.

Las células resultantes de las primeras divisiones de la segmentación no son especializadas en su mayor parte y permanecen por igual sin especialización metabólica, dado que su actividad sintética está adaptada, antes que para actividades moleculares especializadas, para la reproducción de DNA y de las proteínas requeridas para la división celular. Después de algunas divisiones celulares sincronizadas el embrión se asemeja a una mora, de ahí el nombre de mórula, de aquí en adelante las divisiones celulares pierden su sincronía dependiendo de la cantidad de vitelo (yema) que se presente.

Con el tiempo el embrión en proceso de segmentación desarrolla una cavidad central denominada blastocelo denominándose entonces etapa de blástula, iniciándose cambios importantes a nivel bioquímico, que permiten comunicaciones celulares en nuevas y diferentes formas.

COMPETENCIA:

Comprender la formación y estructura del proceso de segmentación mediante la observación de material fijado y láminas histológicas, para reconocer diferencias entre grupos de vertebrados y su aplicación en la embriología experimental, con una actitud crítica y responsable.

TRABAJO PRÁCTICO:

DESARROLLO EMBRIONARIO DE ANFIBIOS.

MATERIAL:

- 1 jeringa de 1 ml. (insulina)
- Estuche de disección
- Portaobjetos excavados.

REACTIVOS:

- 0.5 ml. De progesterona en solución.
- 100 ml. De solución Holfreter.

MÉTODO:

INDUCCIÓN AL DESOVE:

- 1.- Succionar 1 ml de la inyección con la jeringa, y sacar el aire.
- 2.- Inyectar a la rana, tomando con una mano las patas de la rana y con la cabeza baja, e inyectar a través de la piel y del músculo abdominal, hasta la cavidad del cuerpo, en uno de los cuartos abdominales inferiores. Presionar el émbolo de la jeringa lentamente para evitar dañar los órganos internos con la solución, y sacar con sumo cuidado la jeringa, limpiando con una torunda de algodón suavemente.
- 3.- Coloque al animal en un frasco o recipiente adecuado, con poca agua.
- 4.- La ovulación dependerá de la temperatura a la que se mantenga el animal.
- 5.- Después de tiempo requerido se procede a “ordeñar” al animal para forzar el desove. La hembra limpia se toma de las patas traseras con una mano, manteniéndola con el dorso hacia arriba; la otra mano se coloca con la palma hacia abajo sobre la cabeza, apretando el cuerpo del animal por detrás de las patas anteriores. Entonces, con las patas traseras ligeramente dobladas hacia abajo, se comprime suavemente el abdomen, ejerciendo la presión hacia la cloaca, extrayendo así algunos huevos, se suspende el ordeño y se coloca al animal en su recipiente. Para preparar la suspensión de esperma, se procede de la misma manera que la ovulación.
- 6.- Una vez que se han obtenido espermatozoides y ovocitos, previamente identificados en el microscopio, se juntan ambos en una caja petri, se remueven y se dejan reposar unos 20 a 30 minutos. Cuidando que no haya excesiva cantidad de espermatozoides por óvulo (poliespermia).
- 7.- Transferir los huevos a diferentes cajas petri conteniendo una solución recién preparada de Holfreter y observar su desarrollo. La gradual hinchazón de la ganga que circunda los huevos, además de la evidencia de la inseminación manifiesta por la rotación de los huevos, con los polos pigmentados hacia arriba. El primer plano de división empieza antes de terminar la primera. Se desechan los huevos moteados o rotos.
- 8.- Fijar los diferentes estadios de desarrollo.

9.- Esquematizar los diferentes estadios de desarrollo.

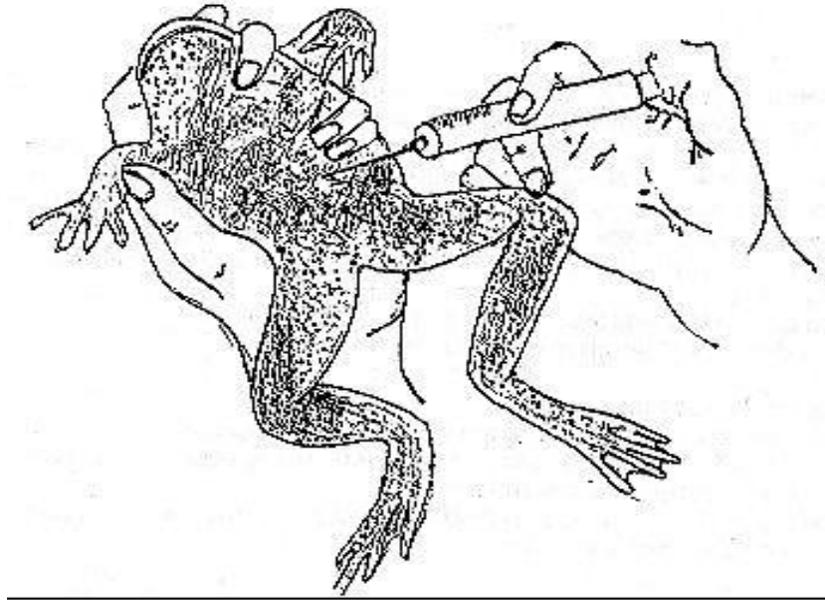


Fig. 20 Representación esquemática de la manera como se debe llevar a cabo la inyección de la hormona o glándula pituitaria.

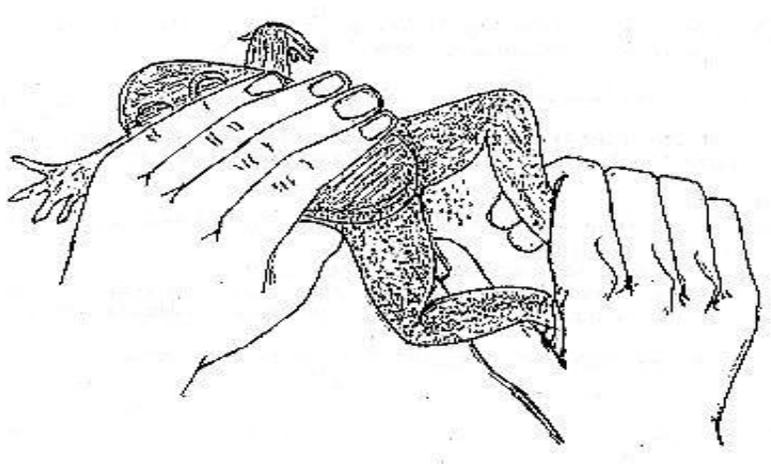


Fig. 21 Desove o Expulsión de gametos por presión.

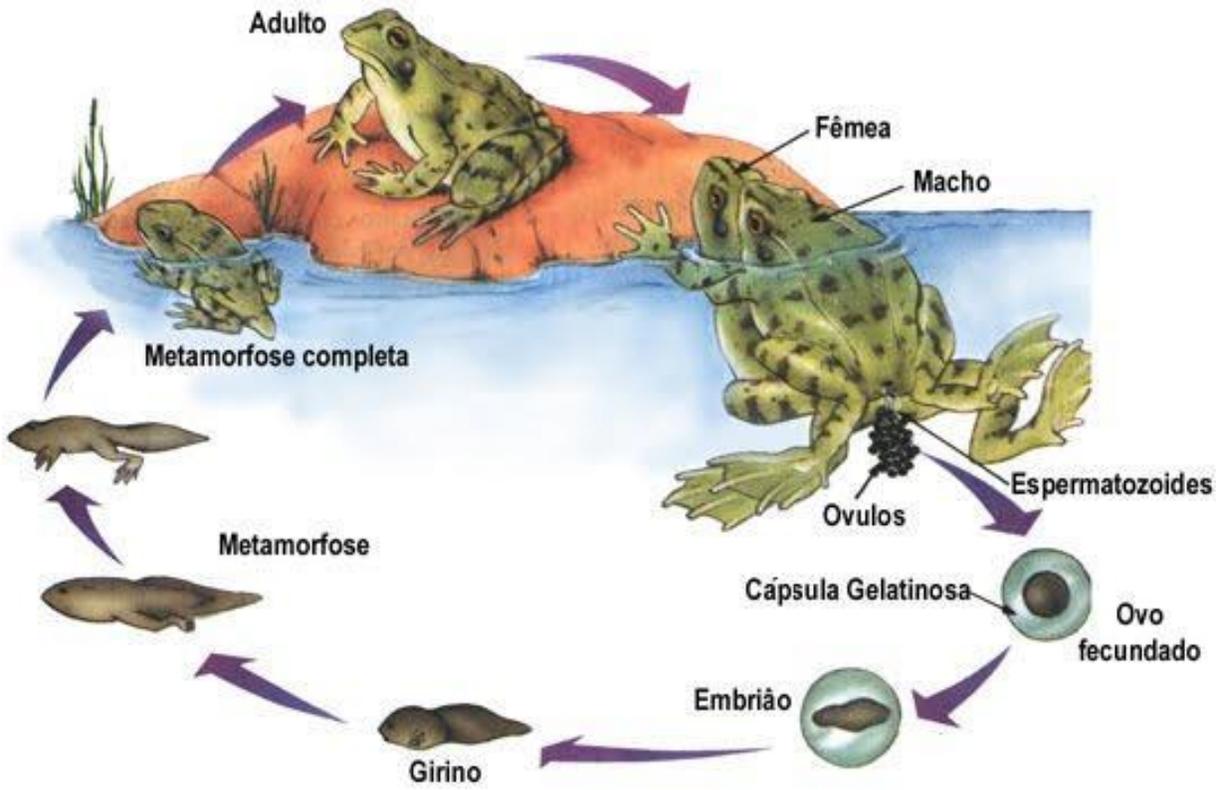
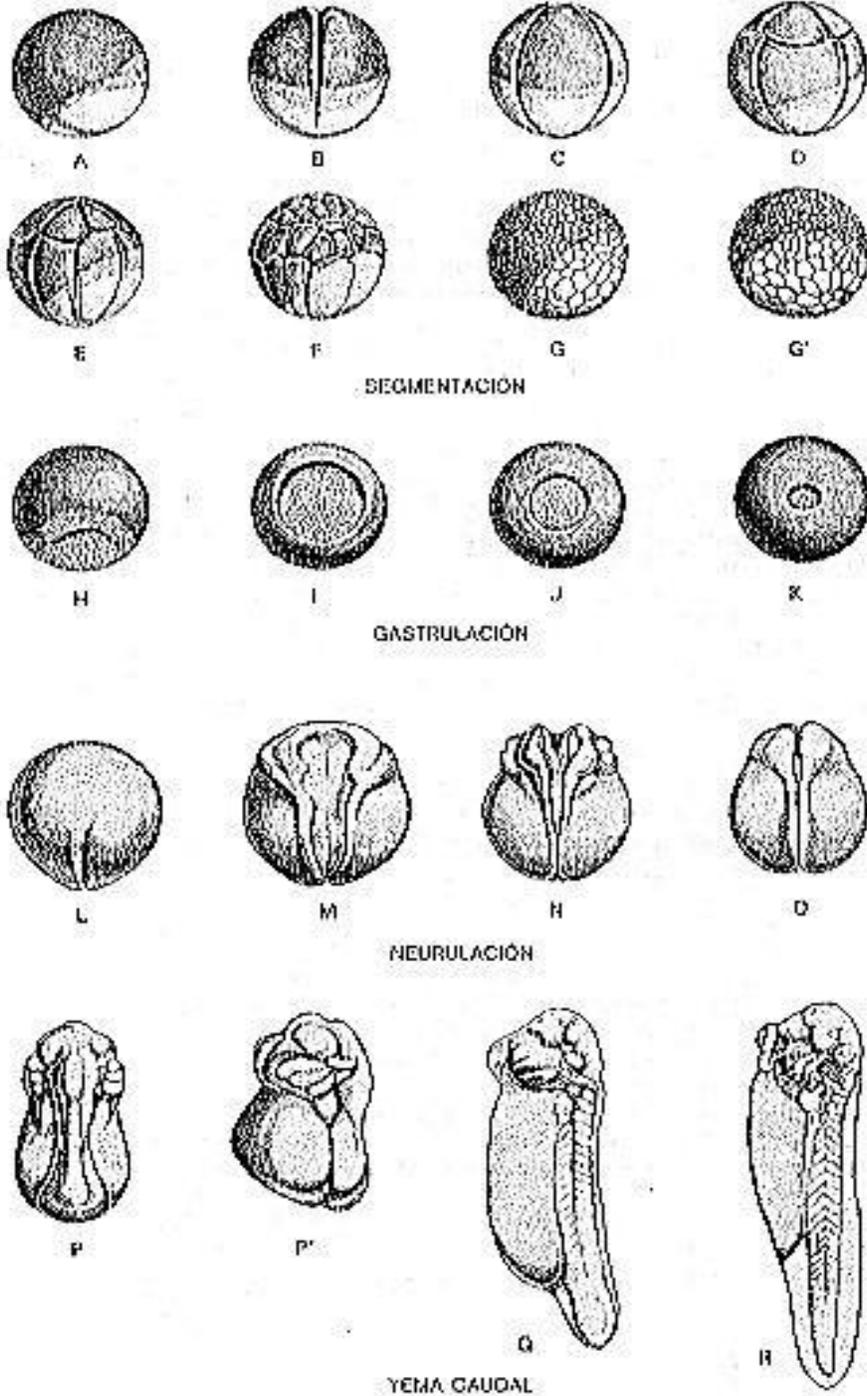


Fig. 22 Ciclo de vida de anfibio.



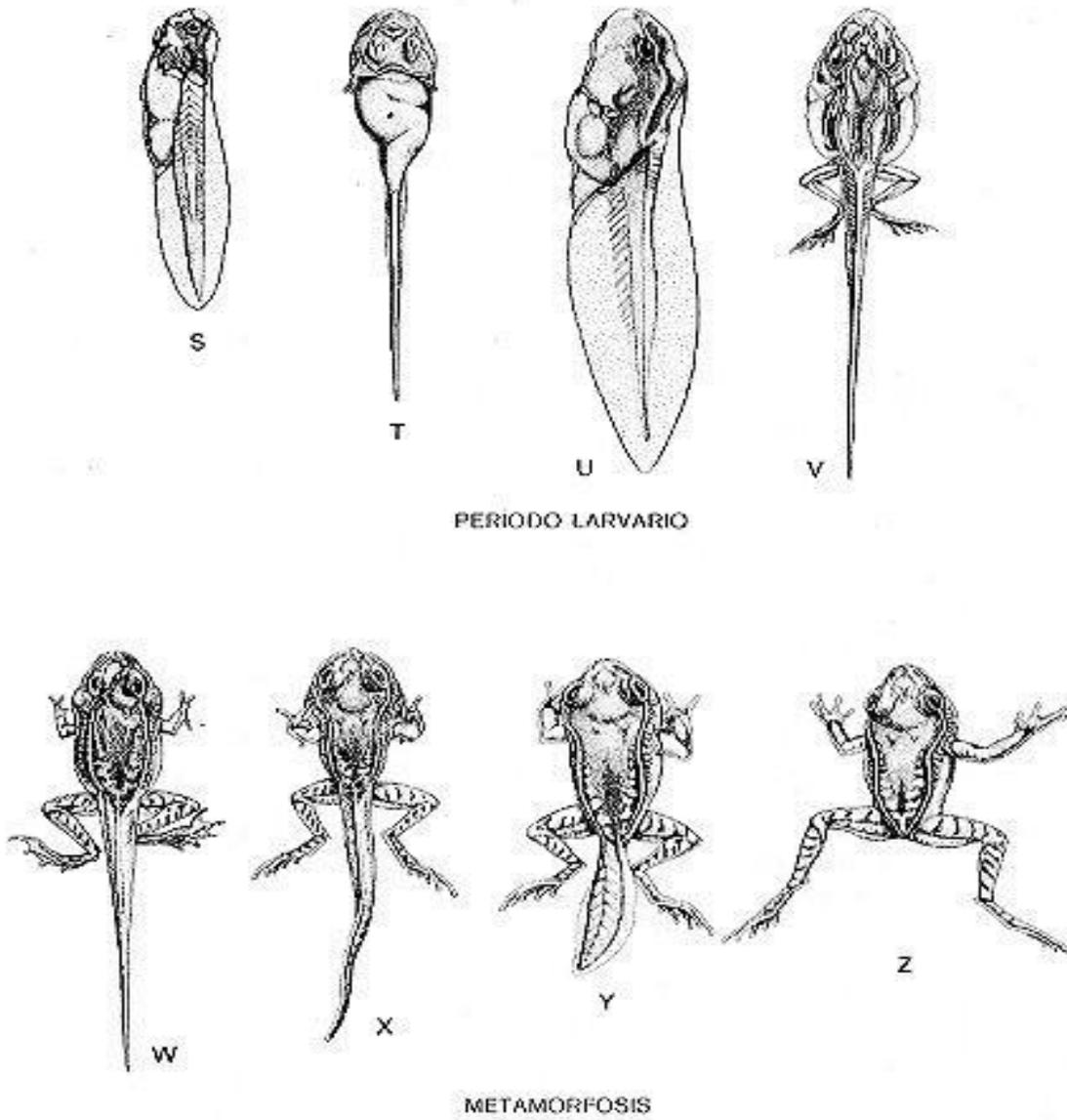


Fig. 23 Desarrollo de la rana (Según Witschi)

PRÁCTICA No. 5

GASTRULACIÓN

Duración: 6 horas

INTRODUCCIÓN:

Los anfibios poseen huevos de tipo heterolecitos, por lo que presentan una segmentación total que rápidamente se hace desigual, de manera que pasando el estado de seis blastómeros las divisiones se hacen asincrónicas, dividiéndose el polo animal con más rapidez que el vegetativo. En total este proceso dura unas 24 horas, quedando el germen de unas 5000 a 6000 células. La blástula resultante es una celoblastula irregular.

Durante la gastrulación observamos la formación de las siguientes estructuras:

- 1.- Labio dorsal del blastoporo. Surco curvado, formado por invaginaciones en medio de la línea de unión del micro y el macrómeros.
- 2.- Labios laterales del blastoporo. Labio dorsal que toma forma de herradura debido a que desciende lateralmente hacia el polo vegetativo.
- 3.- Tapón vitelino. Círculo que queda cuando los labios laterales del blastoporo se unen. Desaparece cuando todo el vitelo es reabsorbido.

Con base en lo anteriormente mencionado inicia en el embrión uno de los períodos más críticos de su desarrollo y que corresponde a la etapa de *gastrulación*. Hasta este momento, la evolución del desarrollo de la mayor parte de los animales se ha encontrado bajo la dirección de las instrucciones de derivación materna y de los procesos que se llevaron a cabo en el huevo antes de la fecundación. La gastrulación se caracteriza por profundos rearrreglos, aunque bien ordenados, de las células en el embrión, Uno de los principales cambios durante la gastrulación temprana es la adquisición que realizan las células para experimentar movimientos morfogenéticos dirigidos, reorganizando al embrión (Tabla 1), los cuales ocasionan la reordenación del embrión a partir de la blástula, a una etapa que se caracteriza por la presencia de tres capas germinales.

COMPETENCIA:

Compara la estructura de la gástrula en diferentes vertebrados para establecer las diferencias estructurales y funciones mediante la observación de material fijado y laminillas histológicas, para establecer su importancia en la organogénesis con un sentido responsable y ético.

ACTIVIDADES:

Tabla 1. Describe los movimientos de la gastrulación que involucran al embrión en su totalidad y da un ejemplo de cada uno de ellos.

TIPO DE MOVIMIENTO	DESCRIPCIÓN	EJEMPLO
INVAGINACIÓN		
INVOLUCIÓN		
EPIBOLIA		
INGRESION		
DELAMINACIÓN		

2. Análisis microscópico de las preparaciones de los diferentes estadios de desarrollo embrionario.

3. Identificación de estructuras.

4. Elaboración de esquemas.

PRÁCTICA No. 6 NEURULACIÓN

Duración: 6 horas

INTRODUCCIÓN

Después de los movimientos morfogenéticos, el futuro destino en el desarrollo del embrión depende en consecuencia, de las interacciones inductoras entre estos grupos celulares recién asociados; de tal forma que el fenómeno inductor primario estriba en la influencia que ejerce el notocordio o cordamesodermo en el ectodermo suprayacente, dando lugar a la transformación de una banda de células ectodérmicas no especializadas, en el primordio del sistema nervioso central; iniciando el proceso de **neurulación**.

La neurulación por lo general se considera como el periodo de desarrollo que comienza al presentar los primeros indicios de formación de la placa neural y que concluye con el cierre del tubo neural.

Neurulación:

1. Placa neural: Achatamiento de la región dorsal situada encima de la hendidura blastoporal.
2. Pliegues medulares: Engrosamiento y levantamiento de los bordes de la placa neural.
3. Tubo nervioso: Aproximación de los pliegues medulares.
4. Placa sensorial: Elevaciones en forma de cresta del ectodermo de cada uno de los pliegues neurales.
5. Protuberancia óptica: Se desarrolla a ambos lados de la placa sensorial cuando se unen las placas neurales.
6. Invaginación estomodea: Surco formado durante la unión de las placas neurales, el cual divide a la placa sensorial en dos arcos mandibulares

COMPETENCIA:

Identificar las estructuras que conforman las neurulas de diferentes tipos de vertebrados mediante la observación microscópica de laminillas histológicas de aves y anfibios, para entender el origen del sistema nervioso y su importancia de la fisiología del mismo, con una actitud crítica y ética.

DESARROLLO EMBRIONARIO DE AVES

MATERIAL:

Embriones de aves obtenidos en la práctica número 1.

MÉTODO:



Fig. 24 Aparato reproductor de ave y corte histológico de ovario.

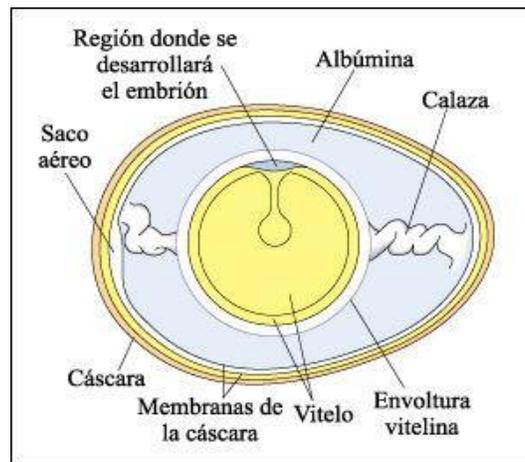


Fig.25 Huevo de ave mostrando sus estructuras.

Tabla 2. Cronológica que indica la aparición de los principales caracteres morfológicos de la ontogenia del pollo.

TIEMPO	Caracteres morfológicos	TIEMPO	Caracteres morfológicos
18 h	Línea primitiva completa, prolongación cefálica	45 h	Arcos aórticos I y II.
20 h	Repliegue cefálico anterior.	48 h	25-26 pares de somitas, fin de la línea primitiva, repliegue amniótico posterior.
24 h	4 pares de somitas, pliegues medulares salientes.	56 h	Inicio de los esbozos de los miembros, arcos aórticos I, II, y III.
26 h	Inicio de la soldadura de los pliegues neurales.	60 h	Inicio de la alantoides.
33 h	12-13 pares de somitas, cerebro completo, repliegue amniótico anterior, corazón diferenciado, arco aórtico.	72 h	37-39 pares de somitas, poro amniótico, alantoides externamente visible, arcos aórticos I, II, III, y IV.
37 h	Movimientos cardíacos, inicio de la torsión	96 h	Amnios definitivo, embrión colocado sobre el flanco izquierdo, somitas completas, arcos aórticos III, IV, V y VI.

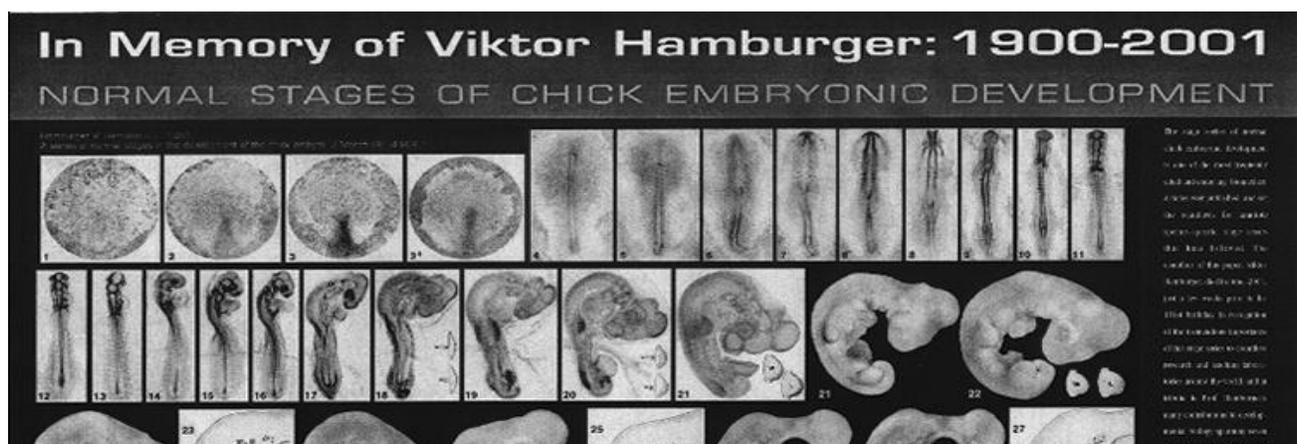


Fig. 26 Principales estadios de desarrollo del huevo de gallina.

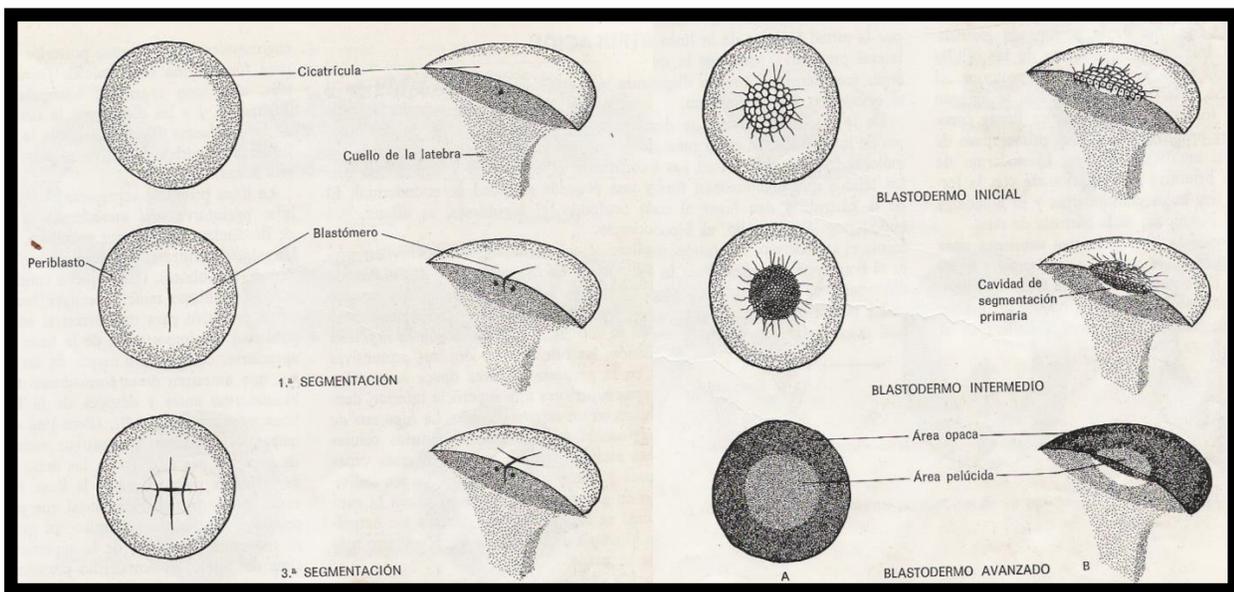


Fig. 27 Segmentación en aves.

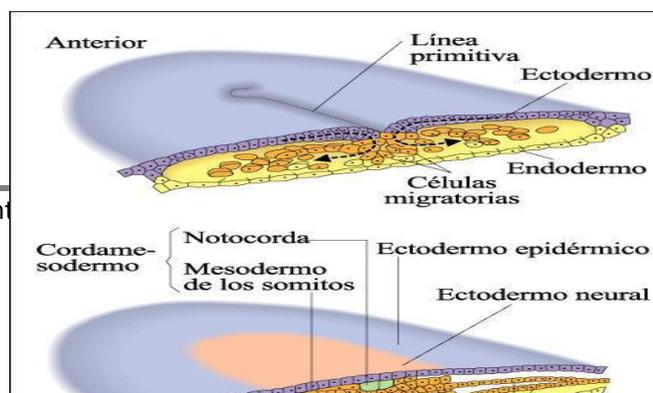


Fig. 28. Gastrulación en aves.

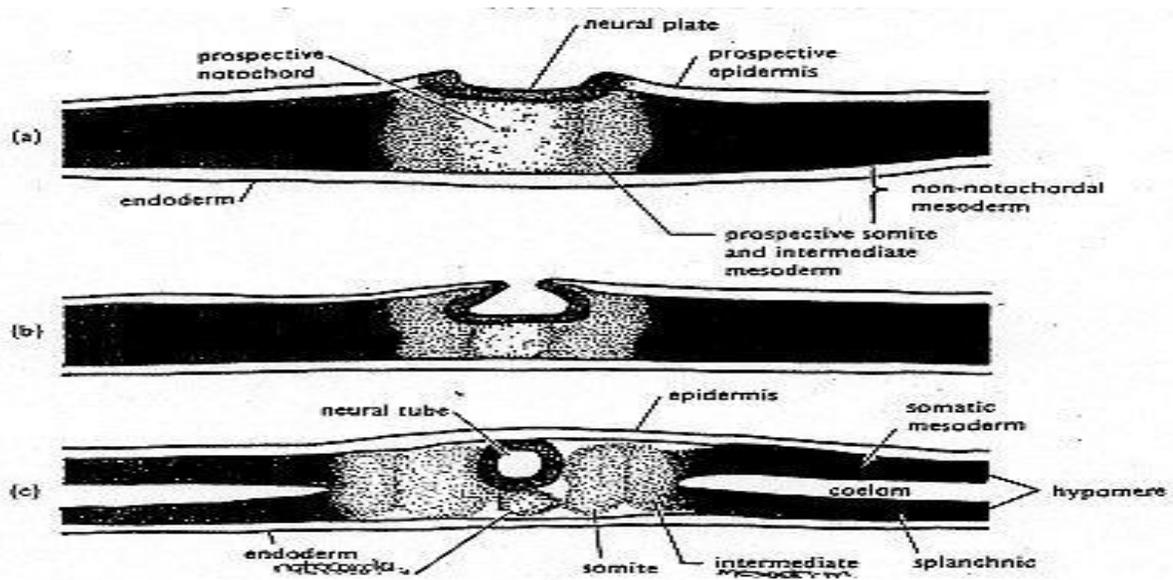


Fig. 29 Formación del tubo neural.

PRÁCTICA No. 7
ANEXOS EMBRIONARIOS Y PLACENTA

Duración: 6 horas

INTRODUCCIÓN

En general se puede decir que los anexos embrionarios son todos los tejidos o estructuras que se desarrollan a partir del cigoto pero que no forman parte del embrión propiamente dicho. Esto en los mamíferos Eutheria incluye ciertos elementos como la placenta y el cordón umbilical (membranas fetales) (Ruiz, 1988).

Los anexos embrionarios suplen las necesidades fisiológicas durante el desarrollo ontogénico (Ruiz, 1988).

La mayoría de los anamniotas depositan sus huevos en el agua. Pero hay otros grupos de vertebrados megalecíticos (reptiles, aves y monotremas) que los depositan en la tierra. Se caracterizan por poseer amnios que es una modificación de la pared corporal

extraembrionaria (somatopleura), que forma una cavidad llena de líquido donde permanece el embrión (Ruiz, 1988).

La función evolutiva más obvia del amnios es propiciar un hábitat acuático local, para un embrión que debe permanecer en medios no acuáticos. El amnios se desarrolla antes de que se forme el cuerpo del embrión y persiste hasta el nacimiento. El corion o serosa se forma durante el cierre de los pliegues amnióticos a partir de la porción de la pared corporal extraembrionaria que forma el amnios. El desarrollo del celoma extraembrionario, separa completa o incompletamente a la somatopleura extraembrionaria (amnios y corion) de la esplacnopleura extraembrionaria (saco vitelino y divertículo alantoideo) (Ruiz, 1988).

COMPETENCIA:

Compara la estructura y función de los anexos embrionarios y la placenta de diferentes vertebrados mediante la observación de material fresco y laminillas histológicas para diferenciar y entender su importancia en las adaptaciones para terminar el desarrollo de los organismos y su aplicación en el manejo de especies comerciales con una actitud responsable y de respeto.

MÉTODO

MATERIAL:

- Preparaciones fijas de órganos y embriones de diferentes especies.
- Un microscopio por persona.
- 1 estereoscopio por equipo.
- 1 estuche de disección.
- Portaobjetos excavados.

MÉTODO:

- 1.- Análisis microscópico de las preparaciones de los diferentes estadios de desarrollo embrionario.
- 2.- Identificación de estructuras.
- 3.- Elaboración de esquemas.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué tipo de membranas o anexos se encontraron en los embriones observados?
2. Explica la importancia de estas estructuras para el embrión.
3. Mediante la elaboración de esquemas, señala cada uno de los anexos.

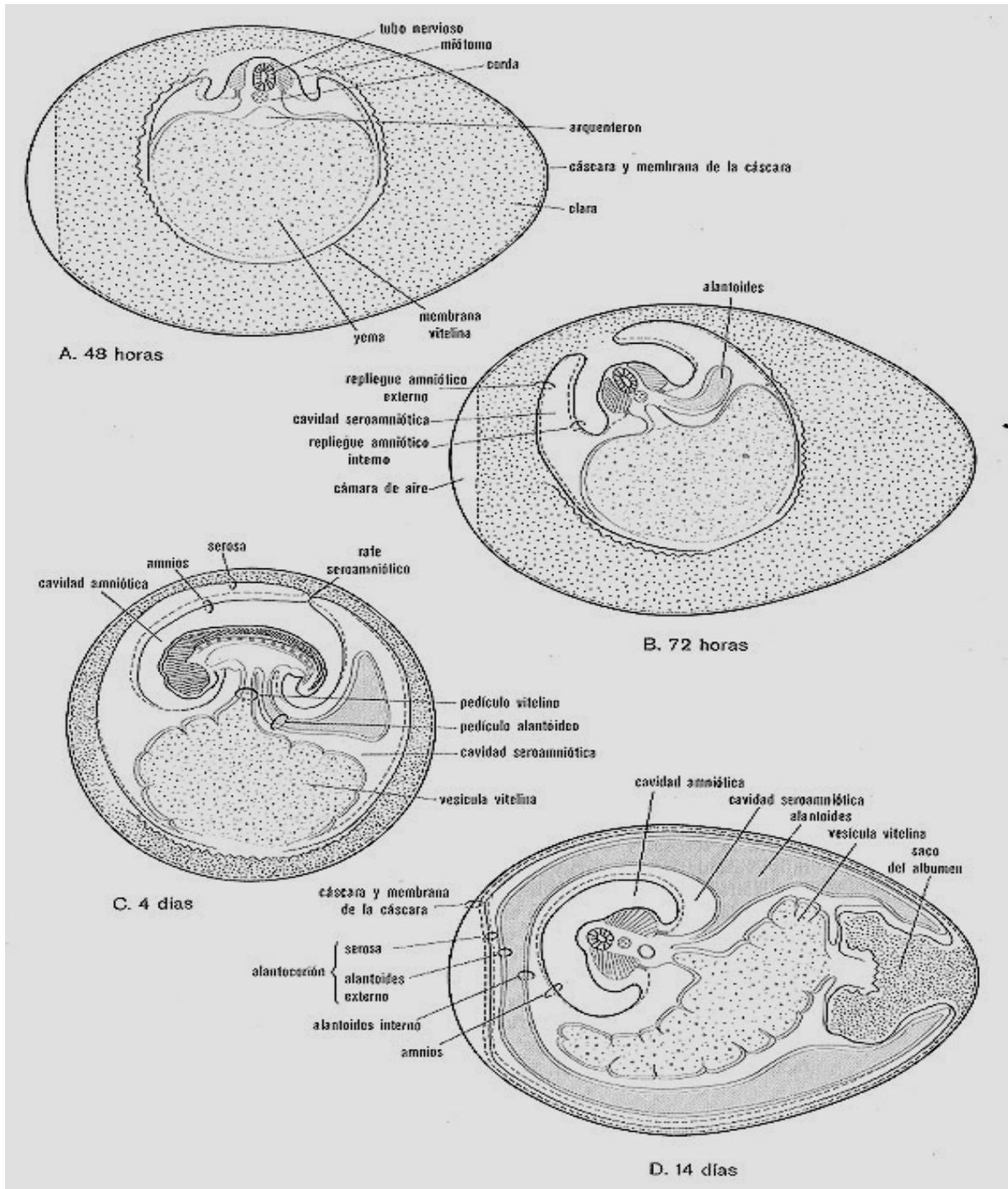


Fig. 30 Formación de las membranas extraembrionarias.

LITERATURA

Browder L. W, Ericsson, C.A. and Jeffery, W.R. (1991). *Developmental Biology* (3a edición). Saunder College Publishing, Filadelfia, Massachusetts, EEUU.

Crespo, X, y Curell, N. 1994. *Gran Atlas Visual de Anatomía*. Programa Educativo Visual. Barcelona, España.

Gilbert S.F. (1997). *Developmental Biology* (5a edición). Sinauer, Sunderland, Massachusetts, EEUU. (Existe una traducción al español de la 1ª Edición, publicada por Omega.)

Kalthoff, K. (1996). *Analysis of Biological Development* McGraw-Hill. Nueva York, EE.UU.

Müller W. A. (1997). *Developmental Biology*. Springer-Verlag, Nueva York, EE.UU.

Ruiz M.A. (1988) *Fundamento de embriología y fisiología de la reproducción*. Ed. Omega. México.

Shostak, S. 1991. *Embryology. An Introduction to Developmental Biology*. HarperCollins. Nueva York, EE.UU.

Slack J.M.W. (1991). *From egg to embryo. Regional specification in early development*. Cambridge University Press, Cambridge, Gran Bretaña.

Tapia-Vázquez, O.M.,J.J. Castro G., M.I. Montes P., E.A. Inda P. 1997. *Determinación de la Madurez y Fecundidad en Especies de Importancia Comercial*. Facultad de Ciencias.Centro Regional de Investigación Pesquera; Universidad Autónoma de Baja California. Ensenada, B.C.México.

Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P, Meyerowitz E. 1997. *Principles of development*. Current Biology/ Oxford University Press, Londres/Oxford, Gran Bretaña.