

ARTÍCULO ORIGINAL**Elaboración de material histológico didáctico en embriología con embriones de rata****Lina Fernanda Gamboa Latorre**

Magister en educación. Universidad del Bosque. Magister en morfología humana-
Universidad Nacional de Colombia
lfgamboal@unal.edu.co

**ELABORACIÓN DE MATERIAL HISTOLÓGICO DIDÁCTICO EN EMBRIOLOGÍA
CON EMBRIONES DE RATA.****RESUMEN**

Este artículo describe los procedimientos para la elaboración de material didáctico en embriología que ilustra las etapas del desarrollo embrionario con el fin de optimizar el aprendizaje de la biología del desarrollo de un ser vivo mamífero con material de propiedad de la Universidad Nacional de Colombia. Como recurso biológico se emplearon doce ratas gestantes con previo cálculo asertivo de la edad gestacional; para ello fue necesaria la programación de la cópula de las ratas progenitoras, en cuyo útero se encontrarían los embriones implantados. Los embriones fueron fijados *inutero* con paraformaldehído al 4% y tamponado; para lograr esto, cada rata progenitora previamente anestesiada y sacrificada fue perfundida en su totalidad con el medio fijador para su posterior disección, momento en el cual fue retirado cada útero gestante para deshidratación con concentraciones de etanol al 90%; para el procesamiento, se utilizaron segmentos de los cuernos uterinos gestantes sumergidos en parafina. Finalmente, se elaboraron láminas histológicas para visualización en microscopio de luz con evidencia de tejido embrionario desde el día séptimo de gestación, con resultados variables, digitalizables y óptimamente didácticos.

Palabras clave: Biología del desarrollo, embrión, embriología, estadios de Carnegie, rata, histotecnología, didáctica.

Introducción

Como parte de la formación en carreras de la salud, la biología del desarrollo y la embriología humana son disciplinas dentro de los currículos académicos; el profesional en formación debe estudiar y aprender el desarrollo intrauterino del humano para comprender conceptos de la morfología y de la evolución humana y, sobre alteraciones congénitas y genéticas de la formación, entre otros (García Peláez, Árteaga Martínez, & Alegría Baños, 2015).

Los elementos didácticos disponibles en embriología y en biología del desarrollo, se basan en esquemas e ilustraciones y, en segunda instancia, se emplean imágenes histológicas que tienen un amplio potencial didáctico. Las láminas histológicas son herramientas -en un principio, físicas-, que se adquieren de tejidos biológicos que son procesados, para ser visualizados al microscopio (Eynard, Valentich, & Rovasio, 2008).

Actualmente se dispone de tecnologías de información y comunicación (TIC), como estrategias didácticas innovadoras, que complementan la enseñanza y el aprendizaje de la embriología; gracias a estas, los docentes y estudiantes favorecen su enseñanza y aprendizaje en embriología. Las láminas histológicas, por ser una herramienta visual, son fácilmente adaptables a las TIC, siendo utilizadas también como contenidos digitales (Centro Nacional de Innovación Tecnológica, 2012).

Materiales y métodos

Se emplearon embriones de rata en estadios equiparables con el desarrollo

embrionario humano, usando como referencia los estadios de Carnegie. Fueron solicitados al bioterio de la facultad de veterinaria de la Universidad Nacional de Colombia 12 ratas con programación de cópula con el fin de lograr fecundación natural (Ver Figura No.1).

El género animal utilizado fue el *Rattus*, dentro de este género se utilizó la cepa Albina y dentro de esta cepa el grupo Wistar, este animal tiene un peso de 250 a 550 gramos, el cuerpo de 15 a 25 cm, y una cola de 15 a 20 cm de longitud con 1cm de diámetro en su raíz. Respecto a su capacidad reproductiva, la rata tiene un útero bicornio, con 2 cuernos uterinos, uno para cada cuerno, comunicados entre sí por una sola vagina; el útero puede contener entre 4 y 6 sacos gestacionales por cuerno, lo que significa que cada nidada puede producir hasta 12 crías. (Ver Figura No. 2).

La gestación dura alrededor de 23 días y una rata en edad reproductiva puede tener de 8 a 12 gestaciones por año. La placenta es ovalada. Los ovarios se mantienen activos durante la gestación, en ausencia de ellos en cualquier momento de la gestación, se producirá un aborto o la reabsorción de los fetos ya que la placenta no produce la suficiente progesterona para mantener la gestación. Además del material principal, es decir el biológico, se utilizaron elementos de espacio dentro de la Universidad Nacional de Colombia:

Morfología - Vol. 7 - No. 2 - Año 2015

- Bioterio, donde se realizó fecundación, seguimiento y entrega de las ratas progenitoras.
- Laboratorio de Fisiología, lugar donde se preparó la solución fijadora y en el cual se recibió la instrucción para anestesia y sacrificio.
- Laboratorio de Histotecnología, lugar en el cual se realizó la fijación de tejidos, la disección de útero y el procesamiento de embriones para la producción de láminas histológicas, también fue el lugar de análisis de las mismas.

Estadio de Carnegie			
		Días humano	
		Días rata	
		Ratas progenitoras solicitadas y datos del desarrollo	
1	1	1	Rata 1: Solicitada al primer día post-cópula, formación del cigoto unicelular y visualización de los restos de cuerpos polares.
2	2	2	Rata 2: Con gestación de 2 días, cigoto fecundado, con dos blastómeros (células) que se encuentra a nivel del oviducto, lo que implica inspeccionar ambas tubas uterinas.
	3	3	Rata 3: Gestación de 3 días, continúa la segmentación dependiendo de la hora de la cópula, el cigoto aún se encuentra en la tuba uterina a nivel del istmo, aproximándose al útero a medida que se divide. En este día también puede haber una mórula ya implantada en el endometrio
3	4	3.5	Rata 4: Solicitada al día 4 post-cópula, con el fin de buscar el blastocisto libre en el útero.
		3.75	
	4		
	5	5	
4	6		
5	7	6	Rata 5: Gestación de 6 días. La implantación ya fue llevada a cabo. Con los cortes se espera obtener estructuras asociadas a implantación como el citotrofoblasto y el blastocisto temprano dentro del útero.
	8	6.25	
	9	6.5	
	10	6.75	
	11	7	
6	12	7.25	Rata 6: Séptimo día de gestación. Comienza la formación de blastemas (vasos rudimentarios). Este período coincide con la tercera semana de gestación en el humano; idealmente se espera obtener láminas embrionarias del proceso de gastrulación.
	13	7.5	
	14	7.75	
	15	8	
7	16	8.5	Rata 7: Gestación de 9 días. Formación de la neurula presomita, fusión de los pliegues corioamnióticos con formación del tallo corioamniótico y formación de la placa neural. El embrión se inclina dorsalmente con el consecuente brote del tallo alantoideo
	17	9	
8	18	9.5	Rata 8: Décimo día de gestación. Se inicia la formación de los arcos faríngeos.
	19	10	
9	20	10.5	
	21		
10	22	11	Rata 9: Día 11 de gestación. En este período el embrión mide aproximadamente 3mm. Se espera obtener láminas en las que se aprecien estructuras en
	23		

11	24	11.5	desarrollo como vísceras, primordios de las extremidades, vestigio de la cola (neuroporo inferior) y de somitas.
12	25		
	26	11.75	
	27	11.875	
13	28	12	Rata 10: Día 12 de gestación. Embrión entre 5 y 7 mm de longitud, en el cual son distinguibles estructuras como los arcos faríngeos, procesos (prominencias) faciales, la línea mamaria, plexo braquial y la diferenciación de las placas de las manos.
		12.125	
	29	12.25	
		12.375	
	30	12.5	
	31	12.75	
14	32		
15	33	13	Rata 11: Corresponde al decimotercer día de gestación. El embrión (ya más desarrollado) mide entre 7 y 8 mm. Existe una mayor configuración de futuros elementos anatómicos, la condensación de las placas cartilagosas de las extremidades y el desarrollo del tubo digestivo
	34		
	35		
	36	13.5	
16	37		
	38		
	39		
	40	14	Rata 12: Se escoge una rata entre los días 14 y 15 de gestación; esto con el fin de observar los procesos finales del desarrollo del embrión y el paso al período fetal. Se espera encontrar el despliegue del cuerpo, el precartilago mandibular, la abertura del conducto auditivo externo y el cierre de importantes estructuras como las hendiduras faciales, el canal pleuroperitoneal y el diafragma.
17	41		
	42	14.5	
	43		
18	44	15	
	45		
	46		
	47		

Figura No. 1. *Categorización de estadios de Carnegie como referente comparativo del embrión humano y de rata.*

También se utilizaron elementos para el procesamiento; desde recipientes para la sumersión de los especímenes, hasta químicos para anestesia y fijación, de igual forma se utilizaron elementos para la fijación como equipos de goteo, jeringas, equipo de disección y utensilios de protección personal y de desecho de material biológico y/o contaminante. La investigación se rigió éticamente y responde a la nación según la Resolución

8430 de 1993. Institucionalmente existe la normatividad exigida por la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional, que coincide con parte de los decretos y leyes nacionales y que establece guías, pautas internacionales y principios éticos para la investigación a nivel mundial (Vicerrectoría de Investigación, Universidad Nacional de Colombia, 2014).

Previo a la fijación se hizo control del dolor con anestesia, se optó por el uso de Xilacina y Ketamina, aplicado de manera intramuscular con dosis calculadas según el peso. La comprobación de la sedación y analgesia se realizó pinzando la punta de la cola del animal, si no reacciona pero mantiene signos vitales normales, la sedación y analgesia es óptima. En cuanto al sacrificio del animal, una vez

anestesiado y sedado el espécimen, se abordó intracardiamente y se hizo un aclaramiento con solución salina y posterior fijación por la misma vía, lo que inevitablemente causa su deceso; es por esta razón que previamente se ha sedado, relajado y anestesiado con una verificación segura del efecto de los fármacos empleados (Montenegro, Gayol, & Tarrés, 2011).

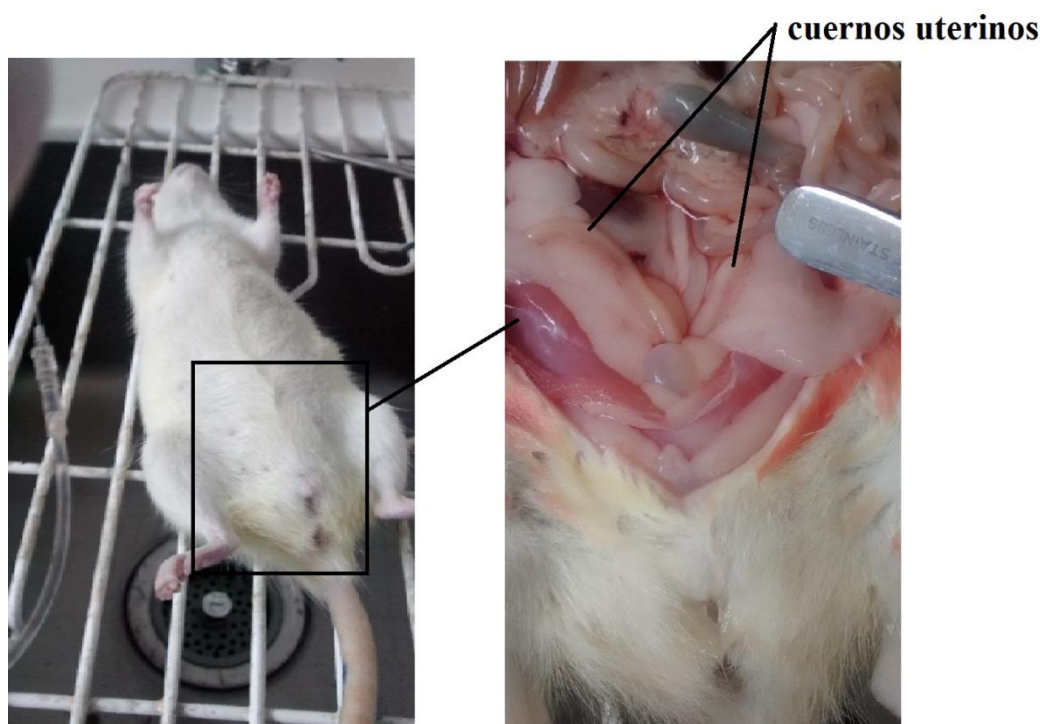


Figura No. 2. Útero de Rata Wistar.

La metodología fue descriptiva, basada en procesos teórico-prácticos, comenzó con una revisión sistemática de la bibliografía, centrada en la correlación de la manera más precisa de las etapas de desarrollo embrionario en ratas y en humanos y, se continuó con la producción y la revisión de placas histológicas de embriones de

rata para determinar patrones de crecimiento, migración, apoptosis y diferenciación celular, entre otros (Brandi Fernández, 2011).

Resultados

Los resultados se distribuyeron en dos grupos: embrionarios y asociados a la gestación.

Los resultados embrionarios se obtuvieron a partir del día 7 de gestación, en estadios más tempranos es necesario recurrir a métodos de fertilización invitro.

Día 7: La placa histológica se logra por medio de un corte transversal del cuerno uterino, obtenido de la rata en el séptimo día de gestación que equivale al estadio 5, en el cual se aprecia el disco bilaminar. En el corte se puede visualizar una capa gruesa de tejido decidual o endometrio grávido, abundante en estructuras lacunares y en la formación de tejido sincitotrofoblástico y citotrofoblástico. En todo su centro se visualiza en la luz endometrial, el tejido embrionario, que se caracteriza por ser especialmente basófilo. Periféricamente al tejido descrito, se encuentra la cavidad del blastocisto o

blastocelo, que a su vez está circunscrito por el trofoblasto adherido a la pared endometrial; superficial al endometrio, se visualiza parte del miometrio, dispuesto en diferentes orientaciones (Ver Figuras Nos. 3 y 4).

El día 10, acorde con el marco de referencia, debe coincidir con el estadio 9 de Carnegie. En el interior del embrión se observa la cavidad amniótica -o saco vitelino- y periféricamente el blastocelo. En este estadio se conoce que el tubo neural ya debe estar formado; en consideración con los hallazgos se asume que se trata de un estadio 7 de Carnegie puesto que se visualiza lo que parecen ser las tres capas embrionarias de la gastrulación y la formación del surco neural.

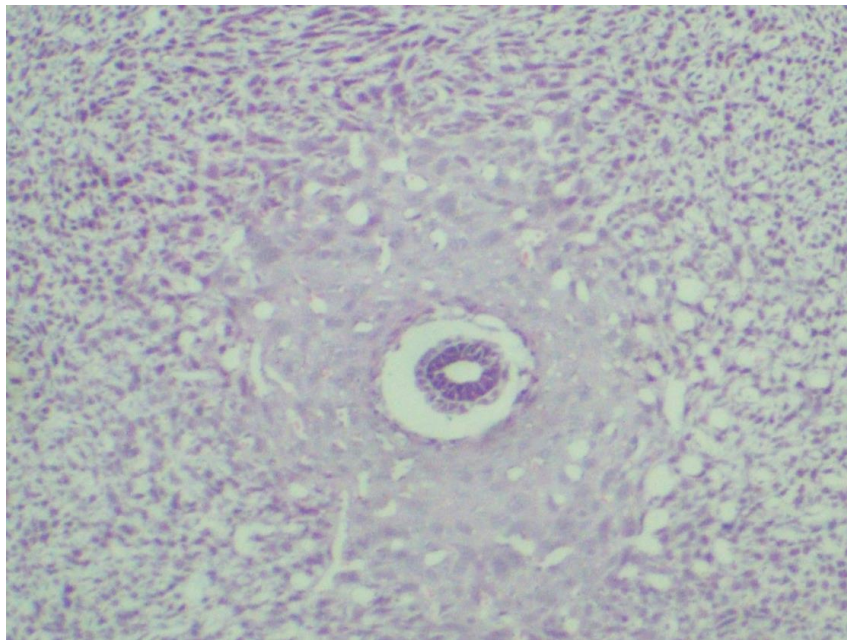


Figura No. 3. Embrión de 7 días que corresponde al estadio 5 de Carnegie, se observa endometrio gestante.

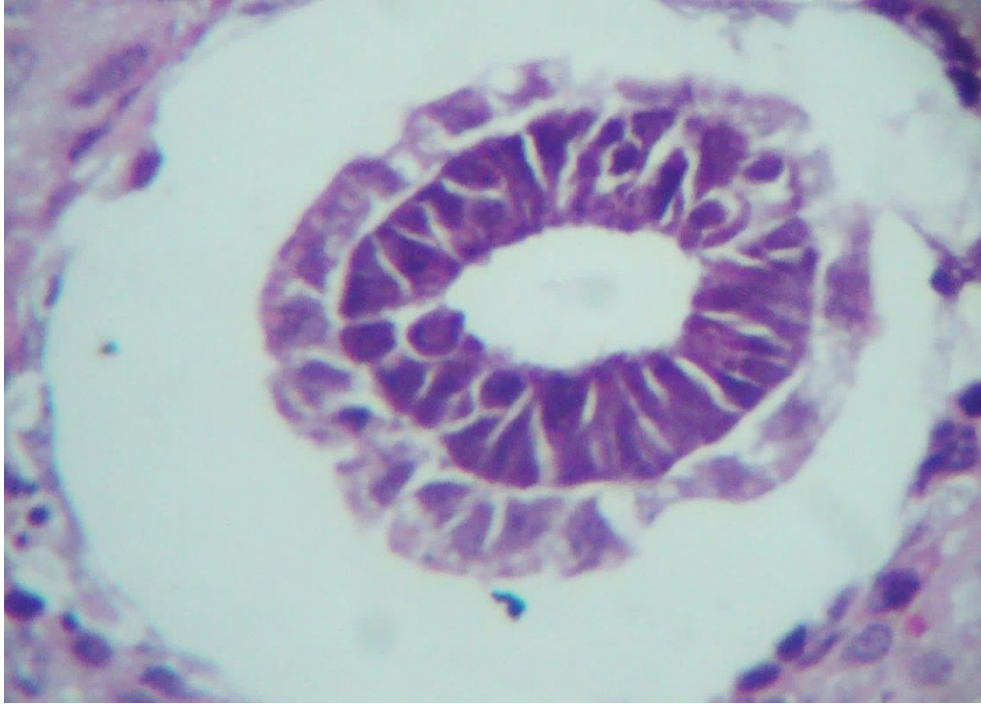


Figura No. 4. Detalle del embrión de 7 días.

La capa más externa corresponde al ectodermo que se caracteriza por estar constituida por células cilíndricas con un núcleo basal y gránulos apicales eosinófilos con contenido amarillento de características glucoproteicas. La superficie apical de las células parece tener microvellosidades (Ver figura No. 5).

La capa intermedia o mesodérmica tiene varias capas a su vez, el tamaño de cada célula es menor que el de las células del ectodermo y son de configuración poliédrica; también se caracteriza por tener menor cantidad de contenido

intracitoplasmático y de predominio basófilo (Langman, 2007).

La capa más basal y central está formada por una sola hilera de células cilíndricas, distribuidas de manera organizada rodeando la cavidad central -que se asume es la cavidad amniótica, aunque puede tratarse también del saco vitelino secundario-. El tejido correspondiente al pedículo de fijación se busca en los bloques de parafina y se encuentra en el día 12.

En la figura 6 se reconoce el modo en el que el amnios rodea a todo el embrión de 12 días desde y girando en torno al pedículo de fijación. De manera

descendente y lateral se constituyen en dos estructuras circulares, que por su localización, se presume que se trata del celoma intraembrionario y entre éste y la notocorda, se origina el somita. La cavidad que se aprecia en todo el centro embrionario corresponde al saco vitelino,

que se encuentra circunscrito por una capa intrínseca de endodermo y una extrínseca de ectodermo, entre estas dos se encuentra el mesodermo embrionario, que se encuentra especialmente concentrado a nivel dorsal en esta etapa del desarrollo.

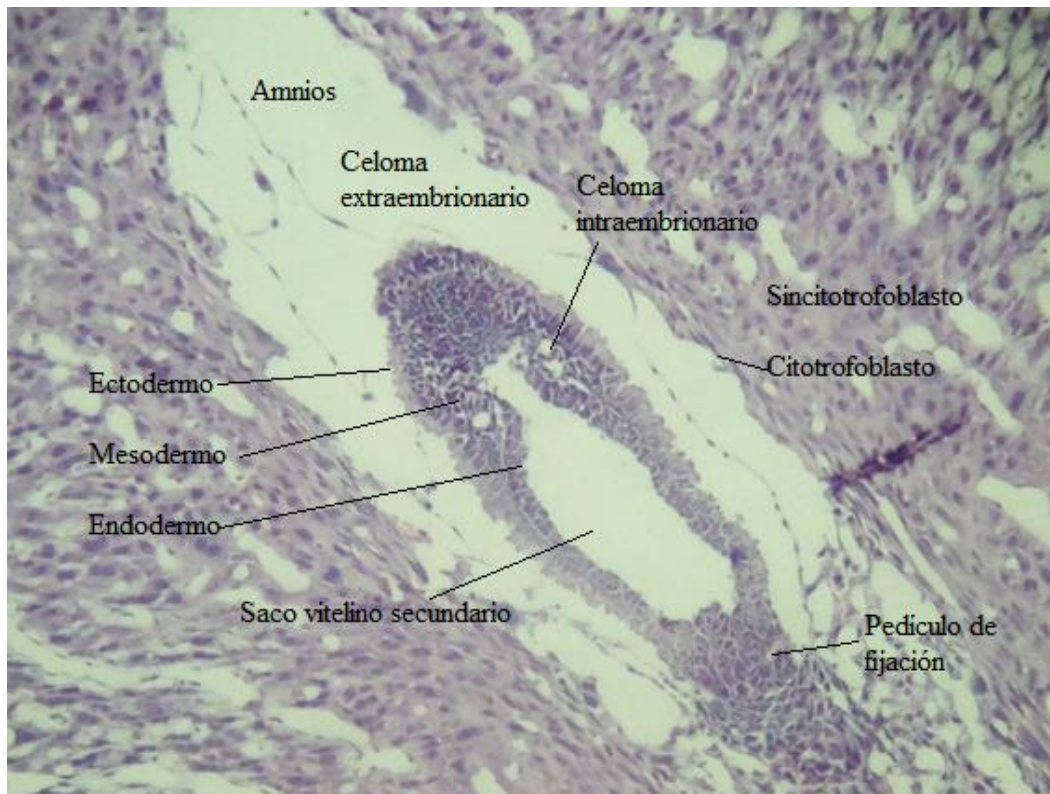


Figura No. 5. Embrión de 12 días, se aprecia pedículo de fijación

Los hallazgos del día 13 se caracterizan por ser los más provechosos a nivel didáctico; característicamente, se muestran suficientes hallazgos histológicos. En la figura 6, se presenta un corte transversal del embrión; en este nivel se perciben estructuras derivadas de la placa neural: las vesículas neuronales

secundarias: mesencéfalo, metencéfalo, mielencéfalo y por lo tanto, el tercero y cuarto ventrículos y los ventrículos laterales. En la figura 7 se observa con detalle el otocisto.

En este período, el neuroectodermo y sus derivados son puntos de reparo, ya que su configuración se puede reconocer en la

figura 8. Se observa parte del tubo neural en dos niveles, a nivel cervical y a nivel caudal; lateral a este tubo neural aparecen los ganglios de la raíz dorsal, y ventral al

tubo se visualiza la notocorda; lateral a la notocorda es visible un grupo celular que probablemente corresponde a los somitas.

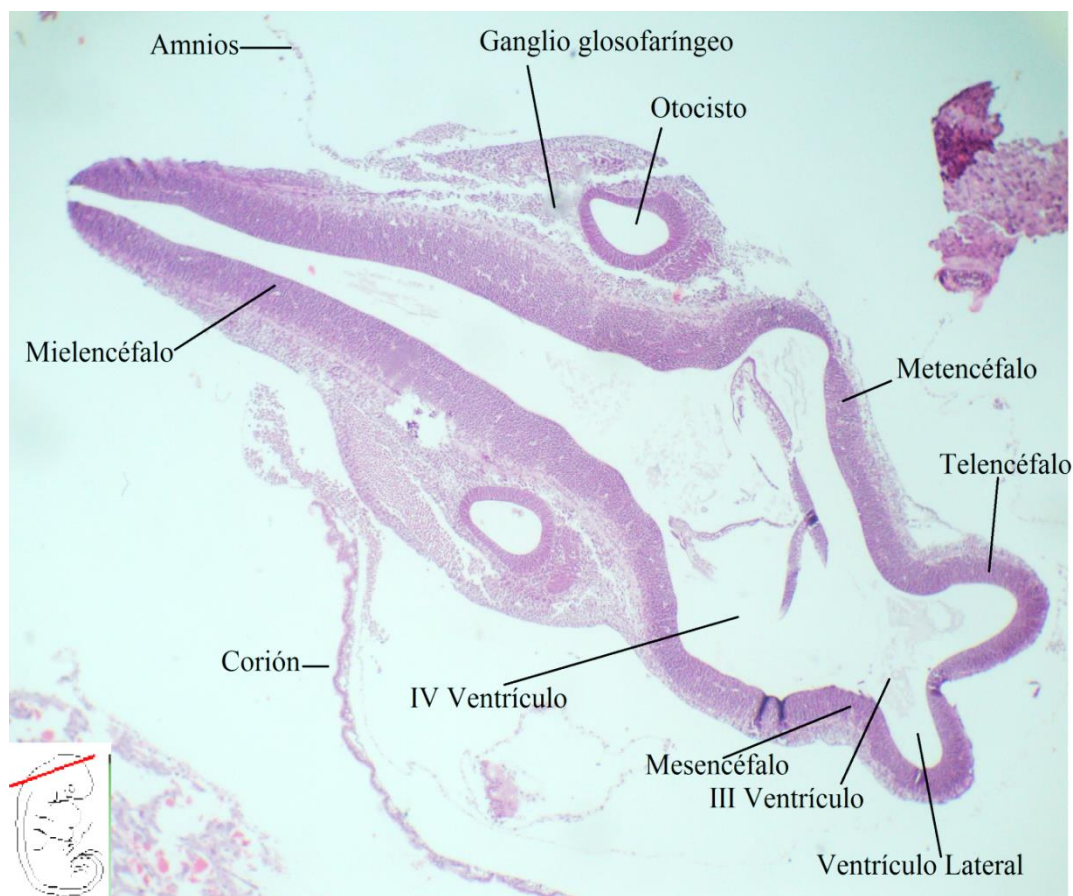


Figura No. 6. Embrión de 13 días

En la figura 9 se aprecia un corte a nivel del tórax; se observan los elementos torácicos del embrión y se incluyen los esbozos de los miembros superiores, parte del tejido embrionario hepático y los canales hepatocardiácos.

El día 15 se encontró tejido embrionario que se visualiza en las figuras 10 y 11, la primera corresponde a la vesícula óptica y la segunda a un corte parasagital de todo el embrión cuyos elementos morfológicos se encuentran enunciados dentro de la figura.

En cuanto a los hallazgos no embrionarios, se analizó tejido gestacional que se describe en las siguientes figuras. En la figura 12 se observan las tres capas uterinas con un aumento de tamaño del

endometrial, se muestran múltiples espacios lacunares asociados a vasos sanguíneos; este tejido es la decidua, que muestra un útero gestante.

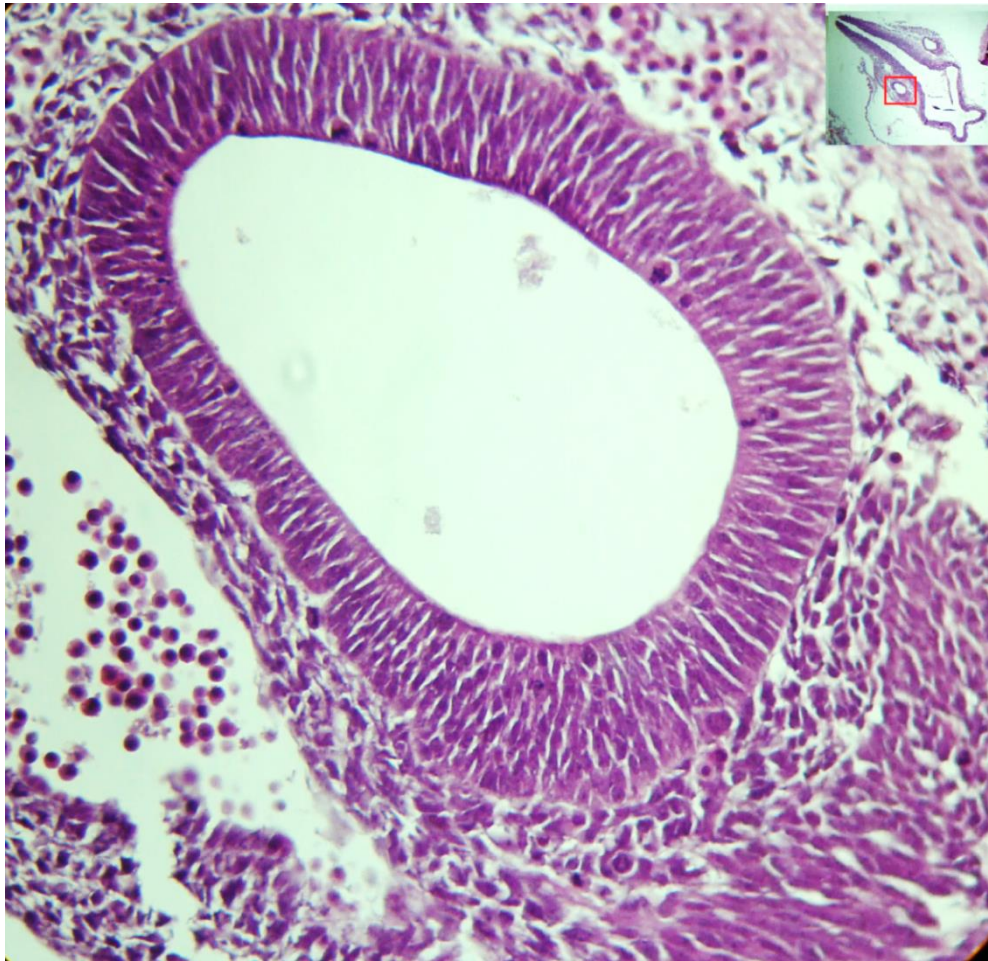


Figura No. 7. Embrión de 13 días, detalle del otocisto



Figura No. 8. Detalle del tubo neural y de la notocorda en un embrión de 13 días

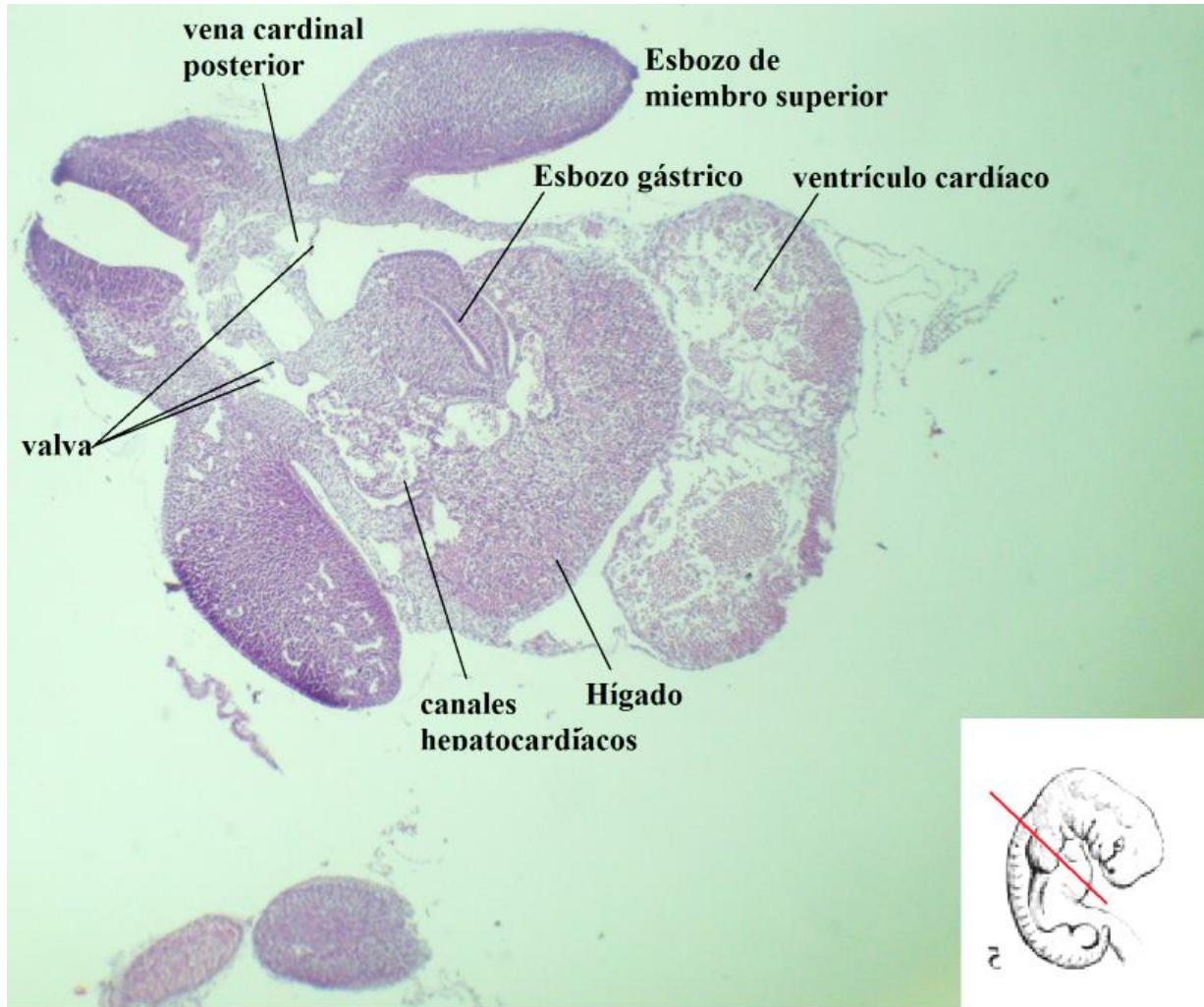


Figura No. 9. Embrión de 13 días, a nivel torácico se aprecian los primordios de las extremidades.

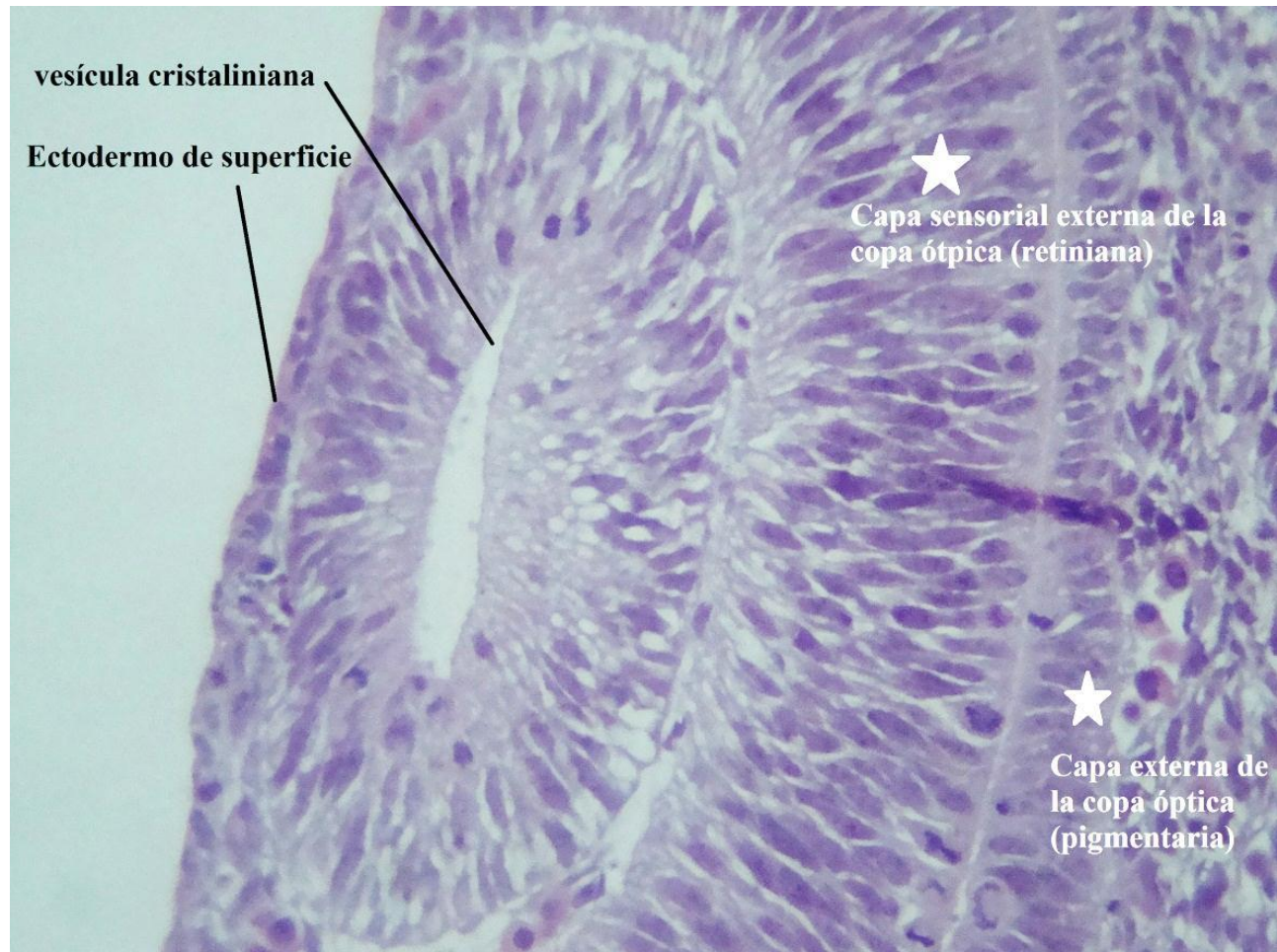


Figura No. 10. Embrión de 15 días, detalle de la vesícula óptica

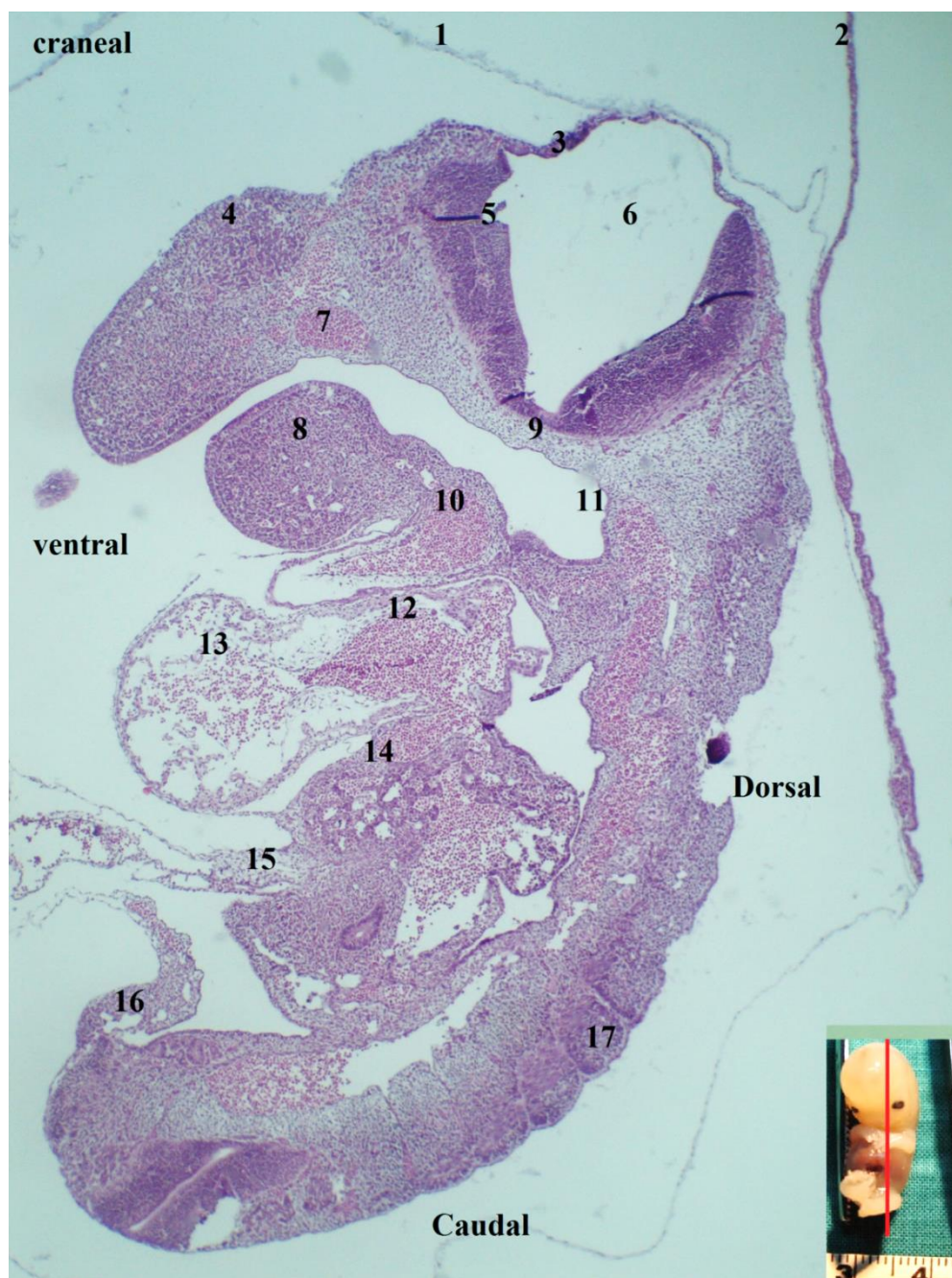


Figura No. 11. Embrión de 15 días, corte parasagital

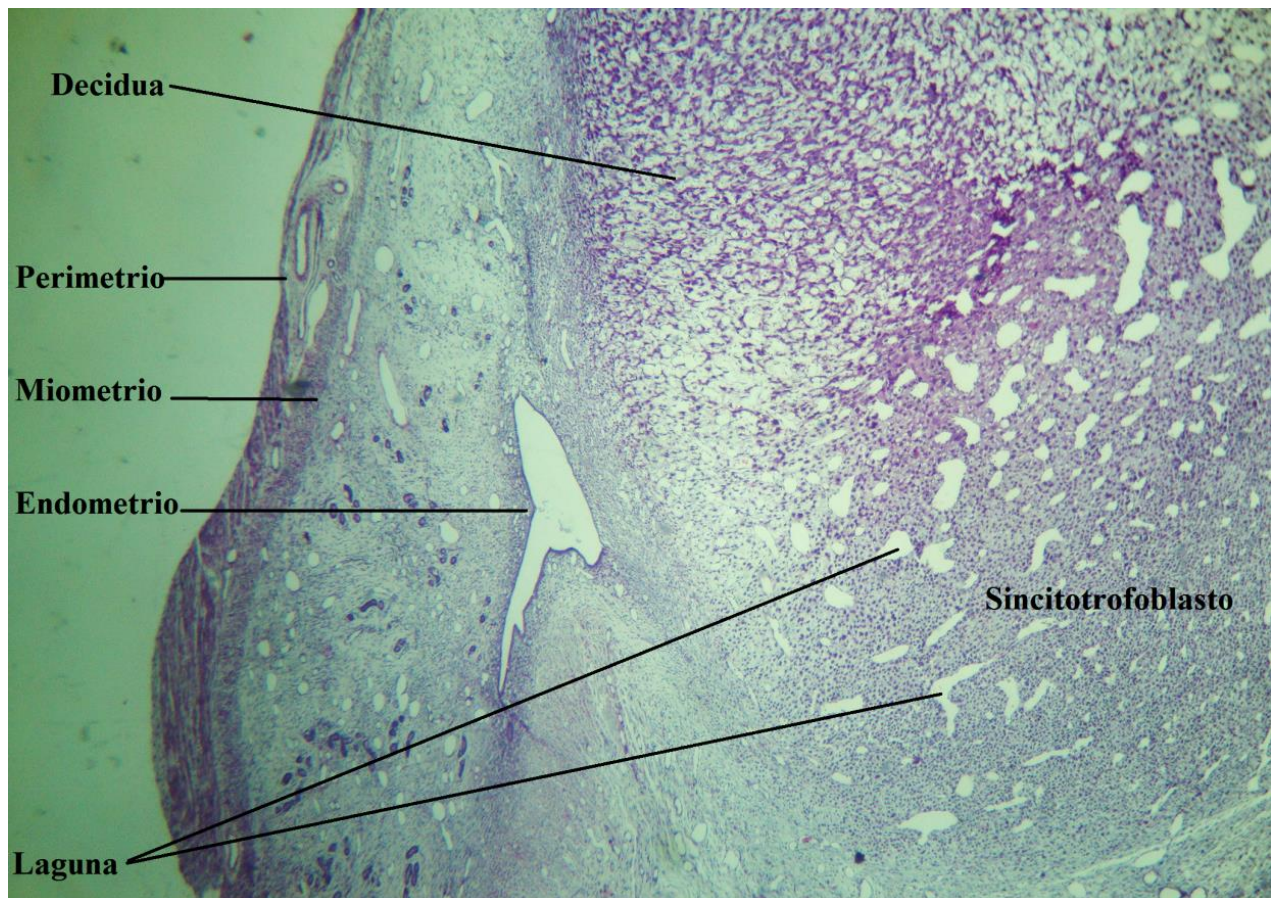


Figura No. 12. Útero grávido

En la figura 13 se observan tejidos derivados de la fecundación que dan formación a la placenta; el trofoblasto se diferencia en citotrofoblasto y en sincitotrofoblasto; el primero se caracteriza por formar una capa de células aplanadas más próximas al

embrión y el sincitotrofoblasto se adentra en el endometrio y tiene células binucleadas con núcleo hipocrómico. En la figura 14 se observa, además de los elementos ya mencionados, la relación con el embrión, con la nomenclatura respectiva.

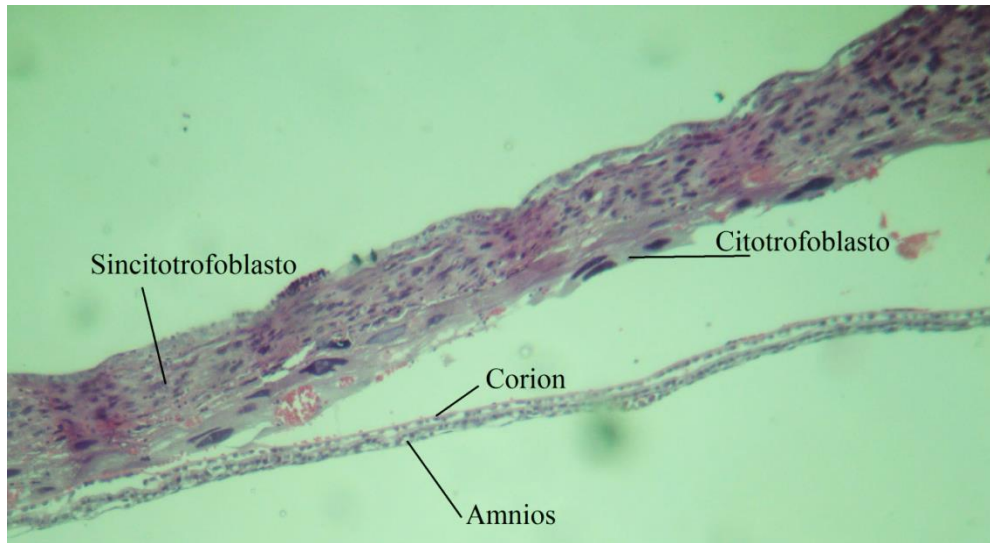


Figura No. 13. Trofoblasto, día 13

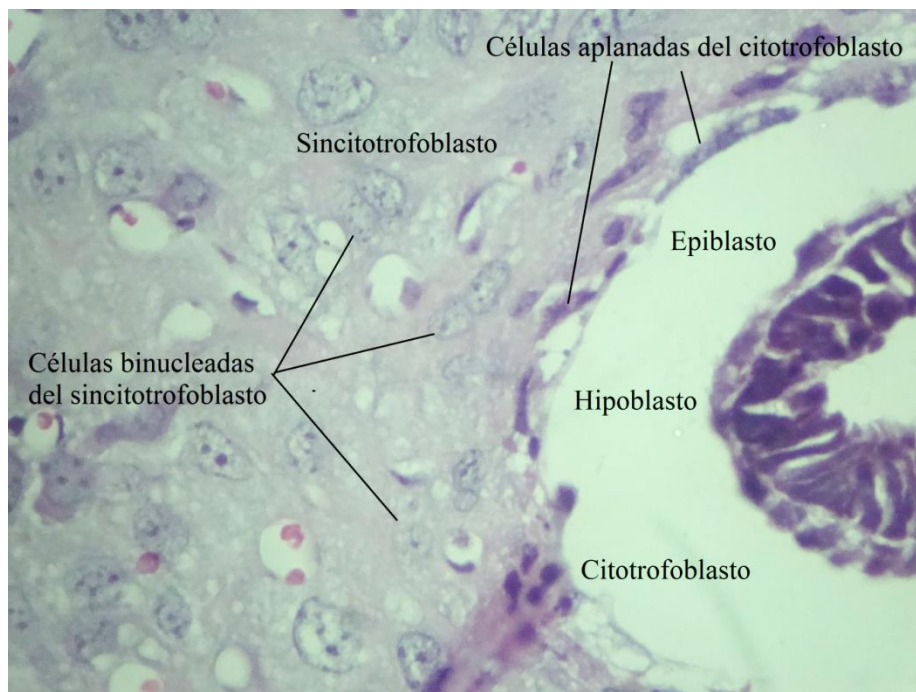


Figura No. 14. Transición de parte del blastocelo a trofoblasto, día 7 de gestación

Discusión

A pesar de que no fue sencillo, se logró la elaboración de las láminas histológicas a partir de embriones de rata a partir del día 7 de gestación; para obtener embriones en la primera semana de gestación es necesario que se ejecuten experimentos de fecundación invitro; invivo es un tejido bastante frágil y pequeño que, para lograr su obtención por la técnica convencional, implica múltiples intentos que, en su mayoría (sino es en todos) serán fallidos.

La calidad de la fijación de tejidos aumenta cuando se realiza de la manera más fisiológica posible y eso se comprobó en las dos fases de experimentación; sin embargo, la obtención del embrión fue mucho más compleja. Vale la pena observar, que aunque no se alcanzaron muchos de los resultados esperados, sí se consiguieron los suficientes y la experiencia fue significativa en cuanto a análisis y a didáctica.

Conclusiones

- Los resultados más satisfactorios se encontraron en los días 7, 10, 11, 12,13 y 15.
- El material didáctico está disponible para su consulta en físico en el laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia y de manera

digital como repositorio en la Biblioteca de la Universidad Nacional.

- También se logró la elaboración de láminas histológicas con tejidos adyacentes de la gestación que tienen relevancia didáctica.
- Las láminas histológicas obtenidas alcanzan un potencial didáctico para estudiantes de pregrado y posgrado y para docentes de ciencias biológicas.
- Es importante la continuación de trabajos de investigación que exploren la posibilidad de optimizar los procesos de fijación embrionaria.

Agradedimientos

- Al equipo técnico y docente del Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia
- Al morfológico Julio Franco Castillo, quien tuvo la idea original y contribuyó con la elaboración de las láminas embrionarias del día 13.
- A la Doctora Zulma Dueñas, docente del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brandi Fernández, A. (2011). Las TIC en el aula de ciencias de la naturaleza, para qué y cómo. *Investigación y didáctica para las aulas del siglo XXI* (págs. 31-39). Madrid: Santillana.
2. Centro Nacional de Innovación Tecnológica. (2012). *Catálogo de Contenidos Educativos*. Recuperado el 22 de Noviembre de 2013, de MCTI: http://portal.cenit.gob.ve/cenitcms/noticia_2575_1.html
3. Eynard, A. R., Valentich, M. A., & Rovasio, R. A. (2008). *Histología y Embriología del ser humano*. Córdoba: Médica Panamericana.
4. García Peláez, I., Árteaga Martínez, M., & Alegría Baños, J. A. (2015). *SOS Embriología Humana*. Recuperado el 11 de 05 de 2015, de Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza, de la Universidad Nacional Autónoma de México.: <http://sosembriologiahumana.blogspot.com/2010/12/desarrollo-del-oido.html>
5. Hill, M. (13 de 03 de 2014). *UNSW Embryology*. Recuperado el 23 de 02 de 2015, de 0.52: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Stage_13_image_052.jpg
6. Langman, S. (2007). *Embriología médica con orientación clínica*. Madrid: Panamericana.
7. Montenegro, S., Gayol, M., & Tarrés, M. C. (2011). Aspectos éticos de la investigación con animales. *Revista Medica Rosario*, 69-74.
8. Rey, R. (2001). DIFERENCIACIÓN SEXUAL EMBRIO-FETAL: DE LAS MOLÉCULAS A LA ANATOMÍA. *Revista chilena de Anatomía*.

9. Veeck, L., & Zaninovic, N. (2003). *Virtual Human Embryo*. Recuperado el 22 de 11 de 2014, de An atlas of human blastocysts: <https://www.ehd.org/virtual-human-embryo/figure.php?stage=2&figure=4>

 10. Vicerrectoría de Investigación, Universidad Nacional de Colombia. (2014). *Dirección de Investigación Sede Bogotá*. Recuperado el 27 de 06 de 2014, de Normatividad. Ética e Investigación: <http://www.dib.unal.edu.co/normas/etica.html>
-