



Universidad de la República
Facultad de Ciencias
Uruguay



Curso Práctico de Biología Celular
Prácticos 7 al 14

Guía del estudiante

2016

Indice

Módulo Práctico IV: Morfología subcelular

Práctico 7: Elementos de organización subcelular

Módulo Práctico V: Adquisición de Multicelularidad

Práctico 8: Ciclo Celular

Módulo Práctico VI: Células Diferenciadas

Práctico 14: Células Musculares

Práctico 11: Células Epiteliales

Práctico 12: Células Conjuntivas

Práctico 13: Células Nerviosas

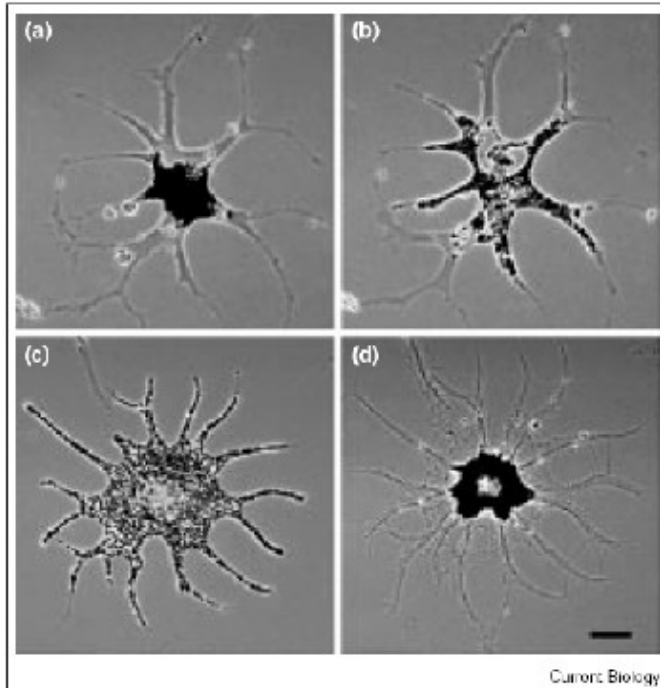
Módulo Práctico VII: Desarrollo embrionario

Práctico 9: Desarrollo embrionario temprano de equinodermos, anfibios y mamíferos

Práctico 10: Desarrollo embrionario temprano en aves

Cuestionario guía

1.- La figura muestra resultados de trabajos científicos que intentan discriminar cuál es la contribución relativa de cada uno de los componentes del citoesqueleto en el movimiento de agregación/dispersión de los melanosomas. En esta figura se observan melanóforos *in vitro* observados por microscopía óptica de contraste de fases y *time lapse* (se muestra el mismo melanóforo en el estado inicial -a y c- y luego de 60 min de tratamiento -b y d-).



Imágenes de microscopía óptica de contraste de fases y *time lapse* (videomicroscopía), en los que se observa:

a) y b) tratamiento con melatonina y nocodazol 10 mg/mL. En a) se muestra la vista inicial y en b) luego de 60 min de tratamiento con nocodazol.

c) y d) tratamiento con MSH (hormona estimuladora de los melanocitos) y 5 mM latrunculina A o 20 mg/mL citocalasina B. En c) se muestra la vista inicial y en d) luego de 60 min de tratamiento. La barra de calibración indica 10 µm

(Tomado de Rogers S.L. & Gelfand V.I., Current Biology, 1998, 8:161–164).

a) ¿Qué efecto provocan las hormonas utilizadas en este trabajo sobre la organización de los melanosomas?

b) ¿Cómo afectó el nocodazol a la distribución de los melanosomas en las imágenes a y b?

c) ¿Cómo afectó la droga latrunculina a la distribución de los melanosomas en las imágenes c y d?

2.- Indique cuáles son los motores moleculares relacionados al citoesqueleto de actina y de microtúbulos, su direccionalidad y qué tipo de cargas pueden transportar.

3.- Proponga un abordaje experimental para evidenciar el fenómeno de inestabilidad dinámica de los microtúbulos.

4.- ¿Qué función cumplen los filamentos intermedios? ¿Qué proteína los compone en células musculares, epiteliales y neuronas? ¿y en los núcleos celulares?

5.- Mencione la vía de biosíntesis de una proteína de secreción desde el gen hasta su destino final. Considere los organelos por los que transita y los procesos que ocurren en cada uno de ellos.

6.- ¿Qué función cumplen los lisosomas? ¿y los peroxisomas?

7. Describa el aparato de Golgi a nivel ultraestructural.

Drogas que afectan los filamentos de actina y microtúbulos

Drogas específicas de actina	Función
Faloidina	Se une y estabiliza los filamentos
Citocalasina	Inhibe polimerización
Latrunculina	Inhibe polimerización
Swinholide	Inhibe polimerización
Drogas específicas de microtúbulos	
Taxol	Se une y estabiliza los microtúbulos
Colchicina	Inhibe polimerización
Colcemida	Inhibe polimerización
Vinblastina	Inhibe polimerización
Vincristina	Inhibe polimerización
Nocodazol	Inhibe polimerización

ANÁLISIS DEL MOVIMIENTO DE MELANOSOMAS

Introducción:

Los vertebrados poseen células pigmentarias especializadas derivadas de la cresta neural. En peces y anfibios se ubican en la dermis y se las denomina melanóforos, mientras que en mamíferos se llaman melanocitos y se las encuentra en la epidermis. El pigmento (melanina) es producido y almacenado en organelos relacionados a los lisosomas, denominados melanosomas (Figura 1). El grado de pigmentación está dado, no por el número de melanosomas, sino por su redistribución en la célula entre dos estados alternativos: agregado y disperso (Figura 1). Estos procesos están regulados por estímulos extracelulares, que en peces están mediados por neurotransmisores, mientras que en anfibios por hormonas. En ambos casos, este mecanismo le permite al animal cambiar su coloración, lo cual es importante en la respuesta de camuflaje y la interacción social. Por otro lado, en mamíferos, los melanocitos epidérmicos extienden prolongaciones que contactan alrededor de 30 queratinocitos subyacentes. La redistribución de los melanosomas en este caso se desencadena a raíz de otros estímulos, por ejemplo la exposición a radiación ultravioleta, y una vez que alcanzan la periferia de la célula, el pigmento es exocitado hacia los queratinocitos, lo que refuerza la fotoprotección (Ref 2).

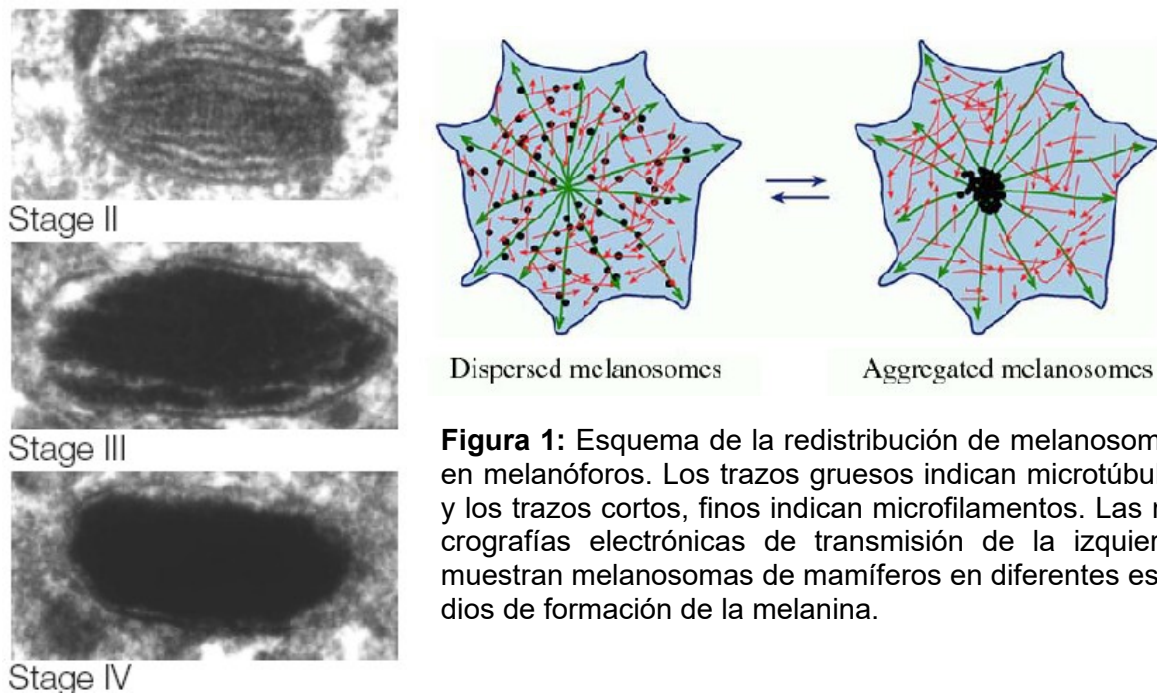


Figura 1: Esquema de la redistribución de melanosomas en melanóforos. Los trazos gruesos indican microtúbulos y los trazos cortos, finos indican microfilamentos. Las micrografías electrónicas de transmisión de la izquierda muestran melanosomas de mamíferos en diferentes estadios de formación de la melanina.

Los melanosomas constituyen un modelo de estudio de la biología de organelos relacionados a lisosomas y además, es uno de los modelos más utilizados para el estudio del movimiento de organelos en función de señales extracelulares. Algunas de las hormonas que influyen sobre la localización de los melanosomas incluyen a la melanotonina, que induce la agregación mientras que la hormona estimulante de melanocitos (MSH) promueve la dispersión. Hasta el momento se sabe que, a nivel intracelular, la dispersión de los melanosomas está mediada por una elevación del nivel de AMP cíclico, mientras que, la agregación se da por una disminución en su concentración. Sin embargo no se conoce que otros intermediarios están relacionados con este fenómeno. Los dos principales sistemas de transporte de

organelos y vesículas son los microtúbulos para el transporte a grandes distancias y los filamentos de actina para desplazamientos cortos y/o para el posicionamiento. Los primeros estudios sobre el transporte de pigmento en melanóforos establecieron que los microtúbulos participan en el transporte de melanosomas, por medio de experimentos en los que se reconstituía el movimiento de los mismos *in vitro*. Estos experimentos demostraron que existían dos actividades motoras de polaridad opuesta involucradas en este movimiento: kinesina II es la responsable del movimiento de dispersión de los melanosomas, mientras que la dineína citoplásmica es la responsable del movimiento de agregación. Estas moléculas también están involucradas en el movimiento de otros organelos en la célula. Los melanosomas también pueden ser transportados a lo largo de microfilamentos, identificándose a la proteína motora miosina V como relacionada a este movimiento. La dispersión de los melanosomas depende de un mecanismo compartido entre el transporte asociado a microtúbulos y microfilamentos, mientras que el movimiento de agregación es dependiente únicamente del transporte por microtúbulos, con mecanismos moleculares conservados entre vertebrados. Este mecanismo podría extenderse a otros organelos en la célula, el que puede darse por la cooperación entre el transporte asociado a microtúbulos y microfilamentos (Ref 2).

Referencias

1. Marks M.S., Seabra M.C. (2001) The melanosome: membrane dynamics in Black and White. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:738
2. Tomado de <http://www.proweb.org/kinesin/Melanophore.html> en una contribución de V. Gelfand and S. Rogers

Análisis de algunos parámetros del ciclo celular

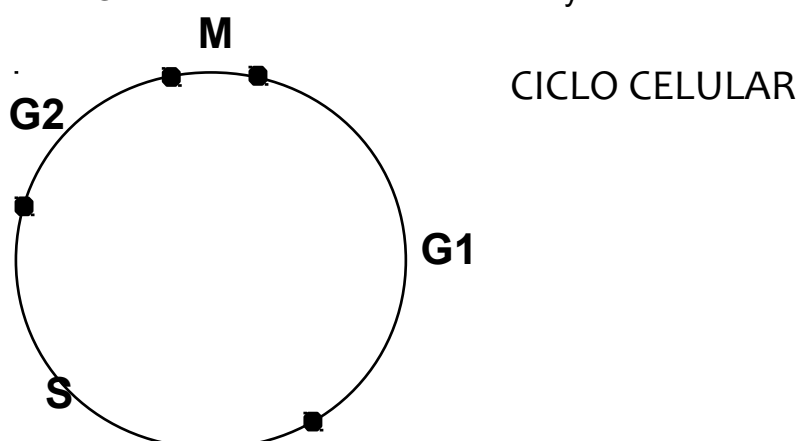
Objetivos:

- Reconocimiento al microscopio de luz de células en interfase y en las distintas etapas de la mitosis. Estimación del índice mitótico de una población celular.
- Estimación de la duración de las fases del ciclo celular en base a datos tomados de la literatura, obtenidos mediante la técnica de autorradiografía.

Introducción:

Parte 1

El ciclo de vida de la célula, visto al microscopio, se divide en dos grandes fases, la interfase y la fase M, etapa de división compuesta por la mitosis (división nuclear) y la citocinesis (división del citoplasma). A su vez, la interfase se subdivide típicamente en las fases G1, S y G2. La fase S corresponde a la etapa de duplicación del ADN; la fase G1 es el intervalo entre la salida de la fase M y la entrada en fase S; y la fase G2 es el intervalo entre la fase S y una nueva fase M:



La duración de estas fases es variable y depende de distintos factores, en particular de la duración de G1.

Al microscopio, las células en interfase se reconocen por la presencia de un núcleo que se tiñe difusamente, sin que sea posible individualizar cromosomas, aunque sí puede observarse dentro del núcleo un punto oscuro, el nucléolo.

Por otra parte, la **mitosis** también se subdivide en etapas, claramente distinguibles al microscopio:

Profase. La cromatina en el núcleo comienza a condensarse en cromosomas bien definidos, visibles al microscopio. Cada cromosoma se ha duplicado y consiste en dos cromátidas hermanas. Cada una de ellas posee una región especializada, el centrómero, y ambos centrómeros las mantienen apareadas. Hacia el fin de la profase los microtúbulos citoplasmáticos se desensamblan y reensamblan para formar el huso mitótico.

Prometafase. La prometafase comienza con el desensamblaje de la envoltura nuclear. Los microtúbulos del huso mitótico pueden entrar ahora a la región nuclear. En los centrómeros, comienzan a formarse complejos proteicos denominados cinetocoros. A ellos se adhieren parte de los microtúbulos del huso, y permiten que los cromosomas empiecen a moverse. Estos microtúbulos reciben el nombre de microtúbulos cinetocóricos, mientras que los restantes microtúbulos del huso mitótico se denominan microtúbulos polares (los que crecen alejando los centros polares) y astrales (que interactúan mediante proteínas con la envoltura tirando de los centros polares).

Metafase. Los microtúbulos cinetocóricos desplazan a los cromosomas a lo largo del huso y terminan por alinearlos en la línea media del huso mitótico, la placa metafásica. Esta organización ayuda a asegurar que en la próxima fase, cuando los cromosomas se separan, cada nuevo núcleo recibirá una copia de cada cromosoma.

Anafase. La anafase comienza cuando los cinetocoros en cada cromosoma se separan, permitiendo que las dos cromátidas hermanas se desaparezcan y se desplacen hacia polos opuestos. A partir de este momento cada cromátida pasa a ser considerada un cromosoma. El movimiento de los cromosomas se divide en dos etapas. Durante la anafase A, los microtúbulos cinetocóricos se acortan, acercando los cromosomas a los polos del huso mitótico. Durante la anafase B, los microtúbulos polares se alargan, aumentando la separación entre los polos.

La citocinesis usualmente comienza en esta fase y luego continúa durante la telofase.

Telofase. Una nueva envoltura nuclear se forma alrededor de cada grupo de cromosomas hijos, que vuelven a descondensarse y dejan de ser visibles al microscopio óptico. En células vegetales, se puede observar en esta fase una estructura denominada fragmoplasto en el espacio entre ambos núcleos, y es el precursor de la nueva pared celular que va a separar a las células hijas.

Una población de células que se dividen activamente puede clasificarse en:

- **Población sincrónica**, en que las células van atravesando las distintas etapas del ciclo a la vez, y en particular se dividen al mismo tiempo. Las células de los embriones tempranos de la mayoría de los animales son un ejemplo de población sincrónica.
- **Población asincrónica**, las células atraviesan el ciclo desfasadamente, y a cada momento pueden encontrarse células en todas las etapas del ciclo celular.

Estrategia experimental

El análisis de los parámetros de la cinética celular ha sido objeto de intenso estudio, principalmente debido a sus implicaciones en el desarrollo de terapias para el cáncer. En esta actividad práctica introduciremos algunos conceptos clave para el análisis de estos parámetros.

El **índice mitótico** de una población celular es la proporción de células en mitosis

que hay en esta población:

$$I_M = n^\circ \text{ de células en mitosis} / n^\circ \text{ de células totales.}$$

En una población asincrónica, el número de células en mitosis va a depender de la proporción que ocupe la mitosis dentro de la duración del ciclo celular. Por ejemplo, si para cierta población celular la mitosis ocupa un 5 % del total del ciclo celular, cabría esperar, por probabilidad, que aproximadamente un 5 % de las células estuviera en mitosis en un momento dado. A la inversa, al obtener el índice mitótico de una población celular asincrónica, se obtiene la proporción que ocupa la mitosis dentro del ciclo celular para esa población. Además, puesto que en la mayoría de las células la mitosis dura aproximadamente una hora, conocer el índice mitótico permite calcular la duración total aproximada del ciclo celular. En el ejemplo anterior, el ciclo celular duraría 20 horas (1 hora * 100/5).

*La población celular que utilizaremos en la parte 1 es un **meristemo de raíz de cebolla**. Un meristemo es un tejido vegetal no diferenciado, en el cual las células se dividen activamente para luego diferenciarse, y por lo tanto es ideal para reconocer células en interfase y en distintas etapas de la mitosis, así como para calcular el índice mitótico.*

Parte 2

La autorradiografía es una técnica que permite localizar en tejidos y células un isótopo radiactivo, que puede haberse incorporado de diversas maneras. Consiste en cubrir al tejido o células que contienen al isótopo radiactivo con una delgada capa de emulsión fotográfica, dejándolo en oscuridad por un cierto tiempo, para que la emulsión quede expuesta a la radiación emitida por el espécimen. La emulsión que se encuentra exactamente arriba de las zonas que poseen radiactividad va a velarse, y luego del revelado se van a ver al microscopio como granos oscuros.

En la **tabla I** del protocolo de actividades prácticas, se muestran datos obtenidos mediante autorradiografía.

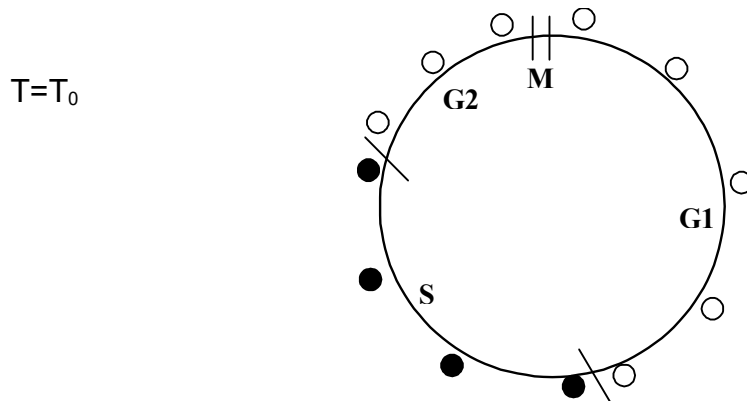
Un cultivo de células de mamífero en crecimiento rápido fue incubado por 30 minutos con ³H-timidina. La timidina es la base timina unida a desoxirribosa, y es un precursor del ADN. La ³H-timidina contiene tritio, el isótopo radiactivo del hidrógeno. La ³H-timidina va a incorporarse al ADN de las células, pero sólo al de las células que estén en la fase de síntesis de ADN, es decir en la fase S del ciclo celular.

Luego de la incubación, la ³H-timidina fue removida del medio de cultivo y se extrajeron muestras a intervalos regulares de 3 horas, que fueron procesadas para autorradiografía. Posteriormente, las muestras fueron teñidas con hematoxilina, para visualizar los núcleos de las células que no incorporaron timidina marcada. En cada muestra, se contó el número de células mitóticas, y se las clasificó en marcadas y no marcadas, calculándose el porcentaje de mitosis marcadas sobre mitosis totales, tal como aparece en la tabla. Por último, se graficó este porcentaje en función del tiempo.

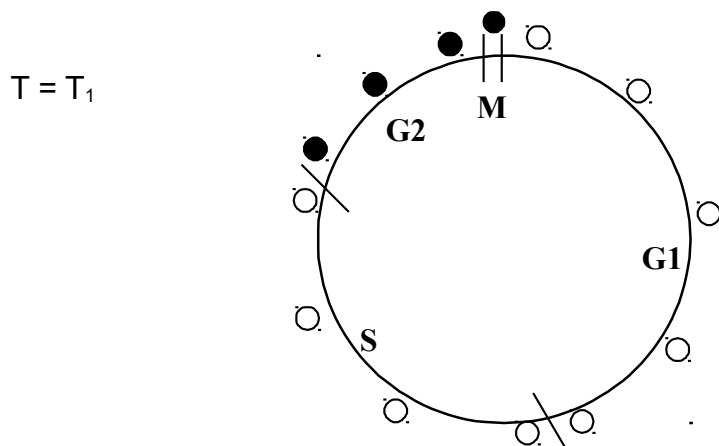
Para entender cómo puede obtenerse la duración de las fases del ciclo celular a partir de este tipo de gráfico, consideraremos una situación simplificada.

Un cultivo celular típico es una población asincrónica, en la que las células entran y salen de la fase M a distintos tiempos. Más aún, la duración de cada fase, en particular G1, va a ser distinta para cada célula. Para hacer más sencillo el análisis, consideraremos una población asincrónica, pero en la cual las fases del ciclo celular duran lo mismo para todas las células. También asumiremos que la fase M es tan corta comparada con las demás fases que puede tomarse como instantánea. La pregunta a resolver es: ¿qué forma tendría una gráfica de mitosis marcadas sobre mitosis totales en función del tiempo, en esta situación?

Veamos en primer lugar como se distribuyen las células a T_0 , o sea al final del pulso de ^3H -timidina:



A este tiempo, las células marcadas están todas en fase S, porque sólo las células que sintetizan ADN pueden incorporar ^3H -timidina y marcarse. Por lo tanto, a T_0 el porcentaje de mitosis marcadas será igual a 0. Cuando las primeras células marcadas lleguen a la fase M, a $T = T_1$, la distribución será la siguiente:

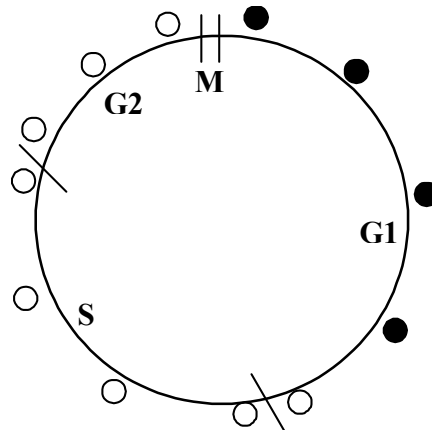


Como las células atraviesan el ciclo a la misma velocidad (porque la duración de cada fase es igual para todas), cuando las células marcadas llegan a fase M, las células que a T_0 estaban en G2 ya pasaron la fase M y ahora están en G1. Por lo tanto, a T_1 , en fase M solo hay células marcadas, y el porcentaje de mitosis marcadas es 100%. A medida que vayan llegando células marcadas a fase M, el porcentaje de mitosis marcadas se mantendrá en 100%.

Cuando la última célula marcada salga de fase M, a $T = T_2$, el porcentaje de mitosis marcadas volverá a caer a 0. Eventualmente, a $T = T_3$, las células marcadas

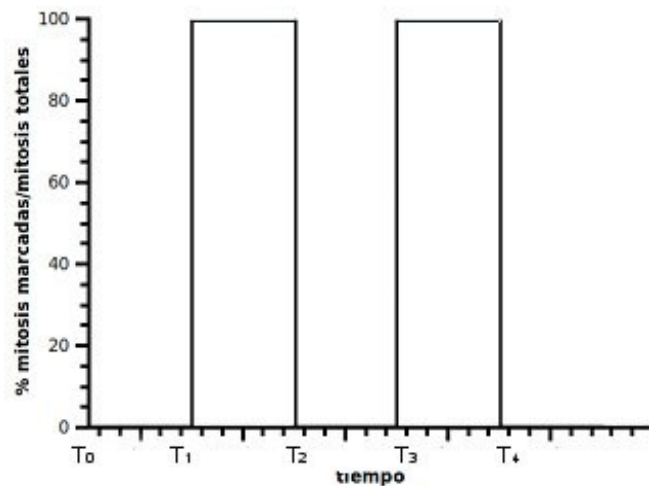
volverán a llegar a fase M, repitiéndose el esquema correspondiente a T_1 .

$T = T_2$



Por lo tanto, la gráfica de mitosis marcadas sobre mitosis totales en función del tiempo, para esta situación, tendrá la siguiente forma:

Una serie de picos regulares...



El 100% de mitosis marcadas se alcanza a T_1 , cuando las primeras células marcadas llegan a fase M. A su vez, las primeras células marcadas en llegar a fase M son células que a T_0 estaban al final de la fase S, y por ende sólo les queda recorrer G2 para llegar a fase M (ver esquema a $T = T_0$). Por lo tanto, en este gráfico, $T_1 - T_0$ es igual a G2.

El 100% de mitosis marcadas se mantiene hasta que llegan a fase M las últimas células marcadas. Estas son células que a T_0 estaban al comienzo de S. Por lo tanto, el tiempo que transcurre entre que llegan a fase M las primeras y las últimas células marcadas es igual a la duración de la fase S. Este tiempo es igual a $T_2 - T_1$.

Por último, el tiempo entre T_1 y T_3 es igual a la duración total del ciclo celular, ya que es el tiempo entre dos fases M para las mismas células.

En suma, de esta gráfica se obtienen la duración de G2, de S y del total del ciclo celular. Si conocemos la duración de la fase M (en general igual a 1 hora), podemos además obtener la duración de G1.

En resumen, la idea básica es usar la mitosis como una ventana y observar a la cohorte de células marcadas con timidina tritiada pasar por ella.

El análisis de la gráfica obtenida con los datos de la tabla I es muy similar, pero debe considerarse el efecto de la variación del ciclo celular y sus fases dentro de la población celular. El efecto gráfico que produce esta consideración es una curva suavizada de una oscilación amortiguada. El problema biomatemático que se suscita es cómo obtener información de los parámetros celulares a partir de éste gráfico. El propio Henry Quastler, pionero en el análisis autorradiográfico del ciclo celular también fue el padre del concepto de utilizar las intersecciones de la curva con el 50% de las mitosis marcadas/mitosis totales como un estimador de las duraciones medias de las fases del ciclo. Este es el método que se utilizará en clase. Sin perjuicio de ello, debe saberse que en los casos en que el segundo pico no alcanza al 50% se debe recurrir a modelos matemáticos complejos que están fuera de la órbita de este curso.

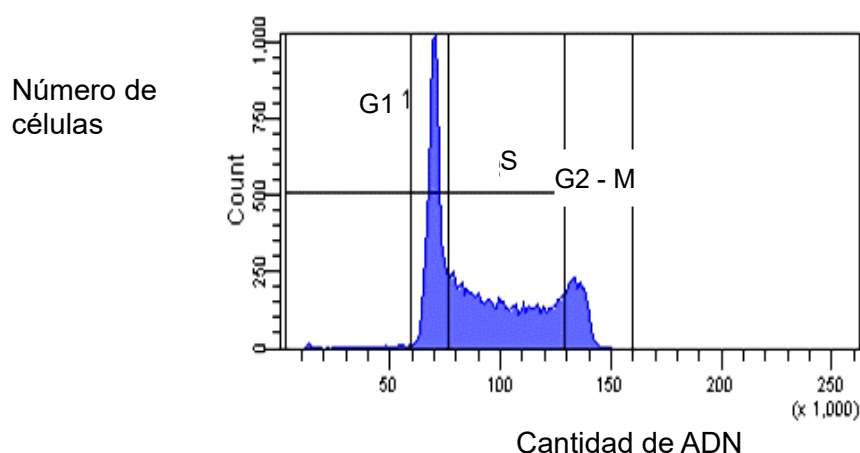
Como verán en la parte práctica, para poder obtener una curva de la que se puedan estimar los tiempos de las etapas del ciclo celular se deberá, previamente, sincronizar la población celular. Hablamos de sincronizar una población asincrónica cuando logramos que todas las células se encuentren en la fase M en un determinado momento.

Parte 3

Análisis de parámetros del ciclo celular mediante citometría de flujo

Cuantificación de ADN

Para determinar rápidamente parámetros del ciclo de una población celular puede utilizarse citometría de flujo. Un método clásico consiste en incubar a las células (vivas o fijadas y previamente permeabilizadas) con yoduro de propidio (PI), un agente que se intercala en el ADN de forma estequiométrica y emite fluorescencia cuando es excitado con una determinada longitud de onda. El material teñido es entonces medido en el citómetro de flujo, y la señal fluorescente genera un pulso electrónico en los detectores con una altura (amplitud) que es proporcional a la emisión de fluorescencia total de la célula. La clave para esta interpretación es que la célula incorpora una cantidad de colorante proporcional a su contenido de ADN. Utilizando estándares adecuados, con contenidos diploides conocidos, como eritrocitos de pollo, se puede determinar la ploidía de las células de interés.



Determinación de parámetros cinéticos del ciclo celular (análisis multivariado)

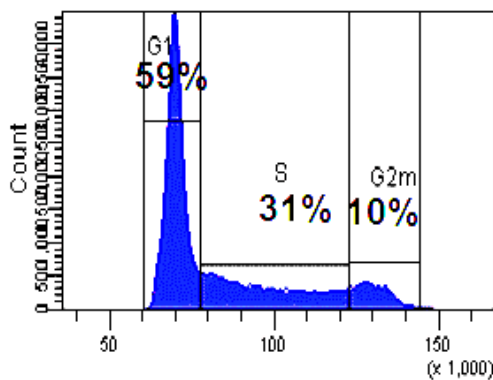
El análisis cuantitativo de ADN es ampliamente utilizado para estimar la distribución de las fases del ciclo celular. Sin embargo, este tipo de análisis no aporta información citodinámica como la duración del ciclo o el tiempo de tránsito entre las fases. Estos parámetros pueden determinarse utilizando autorradiografía y determinando la cantidad de mitosis marcadas, o mediante técnicas más modernas de marcaje de células que están sintetizando ADN.

Fase S

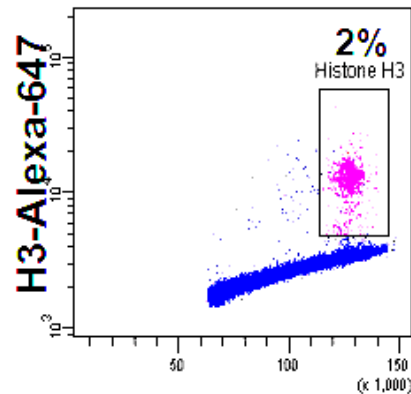
Uno de los abordajes más utilizados es la incorporación en el medio de cultivo de un nucleótido no radiactivo, la bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo de timidina que puede ser identificado mediante el uso de anticuerpos anti-BrdU conjugados a una molécula fluorescente. La citometría de flujo permite la medición simultánea de la cantidad de BrdU incorporado y del contenido de ADN en cada célula, permitiendo realizar el seguimiento de un grupo de células a través del ciclo.

Fase M

La histona H3 es fosforilada durante la mitosis entre la profase y la anafase tanto mitótica como meiótica, y por tanto su fosforilación puede ser utilizada para determinar la cantidad de células que se encuentran en fase M. Para ello se utiliza un anticuerpo conjugado a un fluorocromo (en el ejemplo, Alexa-647) capaz de unirse sólo a la forma fosforilada de la histona H3. Combinando esta técnica con la tinción de ADN, es posible discriminar las células que se encuentran en fase M de la región G2M, y por consecuencia también aquellas que se encuentran en G2, como se muestra en las siguientes gráficas.



contenido de ADN



contenido de ADN

CÉLULAS EPITELIALES

Objetivos:

- Comprender las características estructurales y ultraestructurales de las células epiteliales relacionándolas con sus funciones particulares.

Descripción básica

Las células epiteliales cubren la superficie externa del cuerpo y tapizan espacios y tubos dentro de él. Forman tejidos constituidos por células contiguas entre las que existe poca o ninguna matriz extracelular. La matriz extracelular de los epitelios se denomina lámina basal y separa al epitelio del tejido conjuntivo subyacente. Las células epiteliales presentan distintos tipos de uniones entre ellas (herméticas, cinturones en banda, desmosomas y comunicantes) y entre las células y la matriz celular (hemidesmosomas y contactos focales). Presentan especializaciones de membrana en su superficie apical involucradas en las funciones de absorción (microvellosidades) y transporte (cilias).

Las células epiteliales presentan polaridad a nivel estructural y funcional. Esta característica está relacionada con sus funciones vectoriales.

Los diferentes tipos celulares presentes en los epitelios diferirán según su función y la del órgano que forman.

- **Clasificación de los epitelios según:**

-Número de capas: simple (incluye epitelios pseudoestratificados), estratificado, transicional.

-Función: absorción, secreción, revestimiento.

-Forma de las células: plano o escamoso, cúbico, cilíndrico.

-Especializaciones de membrana: ciliado, estriado (con microvellosidades)

Epitelio simple: en este epitelio todas las células hacen contacto con la lámina basal, se considera una única capa de células. La forma de las células determina su función. La forma plana se relaciona a la función de revestimiento, las formas cúbicas y cilíndricas se vinculan a funciones excretorias, secretorias y de absorción. Cuando algunas células son más altas que las demás y parece haber dos o más capas de núcleos, el epitelio se denomina, por su apariencia, pseudoestratificado. De hecho todas las células descansan sobre la lámina basal.

Epitelio estratificado: presenta dos o más capas de células epiteliales. Únicamente la capa basal toma contacto con la lámina basal. Este epitelio se clasifica en base a la forma que presentan las células de la capa superficial.

Epitelio transicional: su denominación se debe a que cambia su número de capas aparente entre estados de relajación y tensión. Cubre las superficies de la vejiga, uréteres y parte de la uretra.

CÉLULAS CONJUNTIVAS

Objetivos:

- Comprender las características estructurales de las células conjuntivas.
- Identificar y comprender la estructura y función del colágeno.

Las células conjuntivas derivan del mesénquima embrionario. El mesénquima es un tejido conectivo laxo formado en etapas tempranas del desarrollo embrionario, a partir del mesodermo y cresta neural. Los miembros de la familia de las células conjuntivas están relacionados y en algunos casos pueden ser interconvertibles. Esta familia incluye a los fibroblastos, células del cartílago y células del hueso; todas se especializan en la secreción de la matriz extracelular y se caracterizan por no presentar uniones estables entre sí. Esta familia también incluye a los adipocitos, cuya función es el almacenaje de lípidos. Las células conjuntivas juegan un papel central en el soporte y reparación de casi todo tejido y órgano, y la adaptabilidad de su carácter diferenciado es un rasgo importante para responder a diferentes tipos de daños.

La función de sostén del tejido conjuntivo depende en gran parte de las propiedades de la matriz. Los elementos proteicos (fibras, proteoglicanos, glucoproteínas adhesivas) son responsables de su resistencia a la tensión y compresión, así como de su elasticidad, y la fase acuosa es el medio a través del cual todas las sustancias nutritivas y productos de desecho deben pasar entre la sangre y los tejidos.

CÉLULAS NERVIOSAS

Objetivos:

- Identificar y analizar al microscopio óptico y en micrografías electrónicas los diversos tipos de células nerviosas.
- Comprender las características estructurales de las células nerviosas.

El tejido nervioso, especializado en la transmisión y almacenamiento de información, está compuesto por neuronas, células responsables de la generación y propagación de impulsos nerviosos, y por células de soporte de distintas clases, que forman la neuroglía. Las neuronas exhiben una gran diversidad de morfologías, pero en casi todas ellas existen dos tipos de prolongaciones: dendritas, de número variable, y un único axón. Las dendritas forman la mayor parte de la superficie receptora de impulsos de la neurona, mientras que el axón conduce el impulso generado en la neurona. La región ensanchada de la neurona, que contiene al núcleo y de donde nacen sus prolongaciones, se denomina soma. La región de citoplasma que rodea al núcleo es el pericarion.

La gran complejidad del tejido nervioso hace difícil su estudio microscópico solamente mediante técnicas de coloración convencionales (ej.: Hematoxilina y Eosina). Por esa razón, estudiaremos cortes de diferentes regiones del sistema nervioso de mamíferos coloreados mediante varios métodos, cada uno de los cuales nos provee una información parcial acerca de la estructura y disposición de las células nerviosas.

CÉLULAS MUSCULARES

Objetivos:

- Identificar y analizar al microscopio óptico y en micrografías electrónicas los diversos tipos de células musculares.

Las células musculares, altamente especializadas en la contracción, se pueden clasificar en dos grandes categorías: **lisas y estriadas**. Las células musculares estriadas, a su vez se subdividen en **esqueléticas**, asociadas al esqueleto y responsables del movimiento voluntario, y **cardíacas**, responsables de la contracción rítmica e involuntaria del corazón (Figura 1). Las células del músculo estriado poseen en su citoplasma gran cantidad de miofibrillas paralelas, transversalmente estriadas. Las células musculares lisas, como su nombre lo indica, carecen de esta estriación transversal.

Las *miofibrillas* están constituidas por *miofilamentos* que se disponen en el sarcoplasma de manera tal que se observa un patrón bandeado transversal característico a lo largo de toda la fibra (figura 3). Los dos grupos principales de *miofilamentos* que se solapan e interdigitan son: los filamentos de actina o filamentos delgados y los filamentos de miosina o filamentos gruesos. Estos filamentos, así como otras proteínas accesorias se organizan formando la unidad contráctil del músculo: **el sarcómero**. En él pueden distinguirse una serie de bandas: las bandas claras también son denominadas bandas I (isotrópicas) que corresponden a la región del sarcómero donde se encuentran los filamentos de actina; las bandas oscuras o bandas A (anisotrópicas) corresponden a la región del sarcómero donde se solapan los filamentos de actina y miosina. En el centro de la banda A se localiza una zona más pálida denominada banda H, región donde sólo se encuentran los filamentos de miosina. Los filamentos de actina se unen entre sí en la línea Z, y los de miosina se relacionan en el centro del sarcómero, en la línea M.

El músculo se contrae debido al deslizamiento de los miofilamentos entre sí (figura 2). Durante la contracción hay una reducción en la longitud de las bandas I y H, mientras que las bandas A mantienen una longitud constante. La señal de contracción es un potencial de acción propagado a lo largo de la superficie de la membrana plasmática. La rápida respuesta es debida a la liberación de calcio a partir de un sistema membranoso denominado **retículo sarcoplásmico**, que yace entre las miofibrillas y se extiende longitudinalmente sobre los sarcómeros.

El retículo sarcoplásmico se vincula con la superficie mediante los **túbulos transversos (T)**, éstos son invaginaciones de la membrana que corren entre y alrededor de las miofibrillas

Células musculares

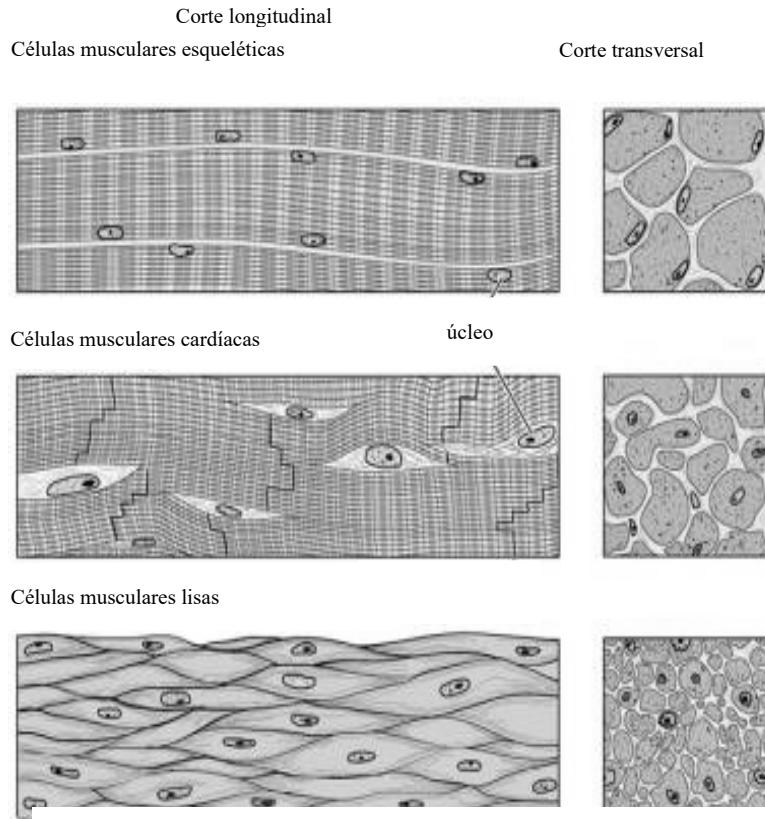


Figura 1: Esquema de los distintos tipos de células musculares.

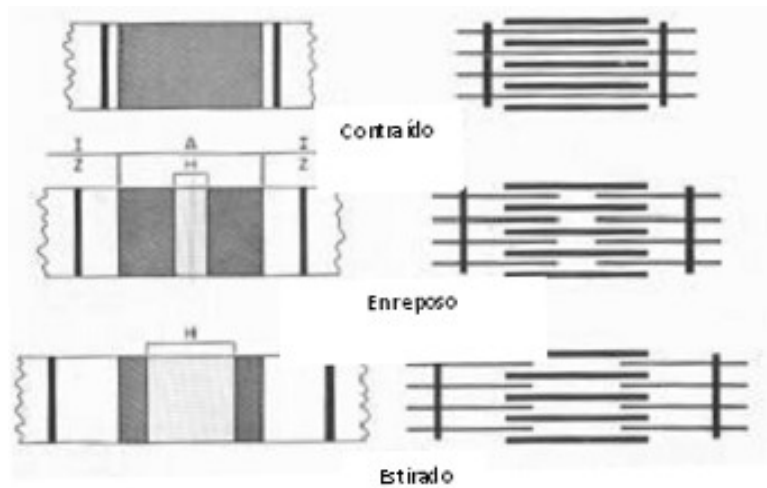


Figura 2: Esquema de las variaciones en las estrías transversales durante distintos estados de la contracción muscular. (figura tomada de Tratado de Histología. Bloom Fawcett. Interamericana McGraw-Hill.)

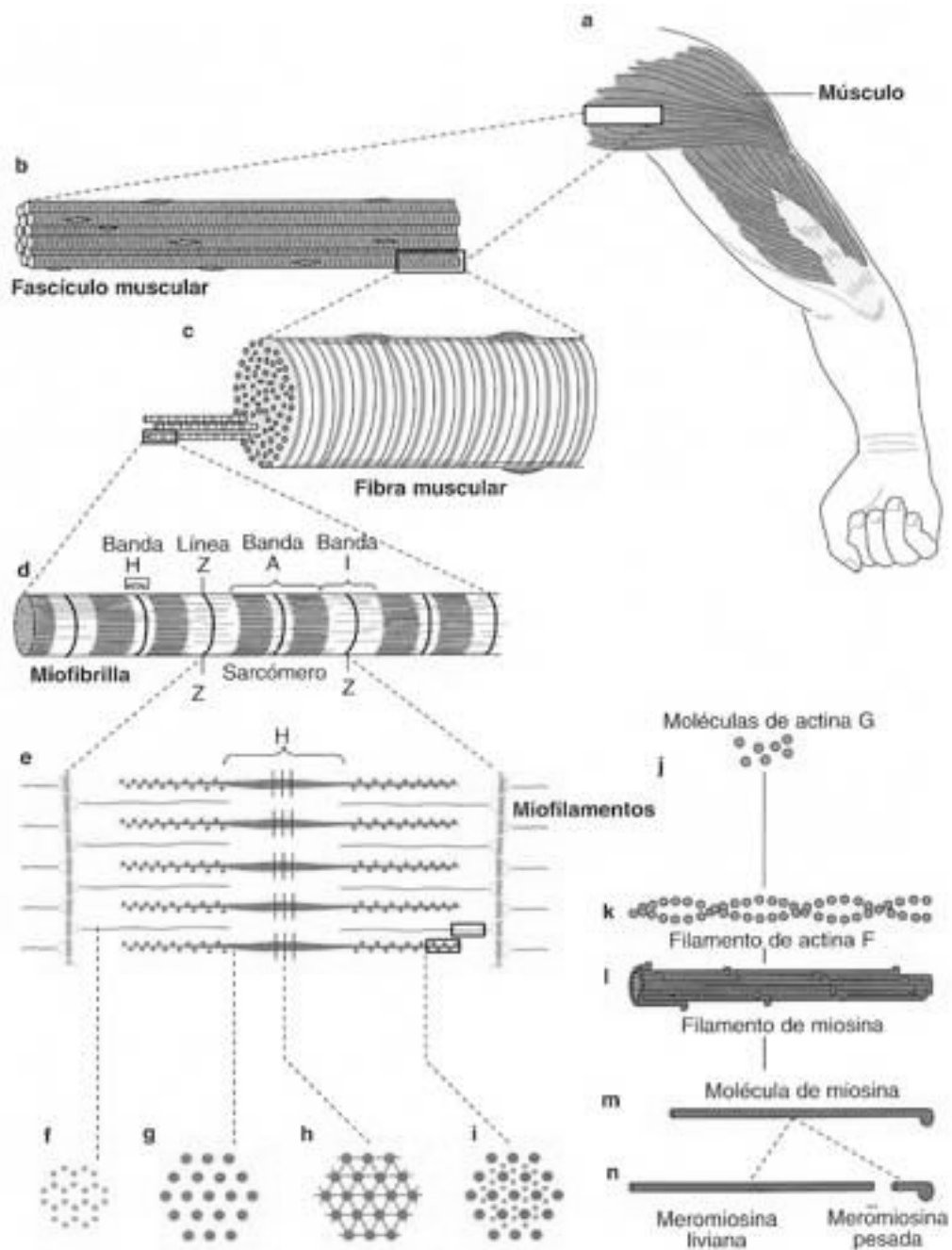


Figura 2: Músculo esquelético desde el nivel macroscópico al molecular. a) músculo, b) fascículo muscular, c) fibra muscular, d) miofibrillas, e) miofilamentos, f-i) cortes a distintos niveles del sarcómero, j-n) moléculas que componen el sarcómero (imagen modificada de Tratado de Histología. Bloom Fawcett. Interamericana McGraw-Hill)

Desarrollo embrionario temprano de equinodermos, anfibios y mamíferos.

Objetivo:

- Introducción al estudio de algunas etapas del desarrollo embrionario temprano y análisis comparado de tipos de ovocitos, patrones de segmentación y gastrulación en los distintos modelos.
- Integración de conceptos de estructura y dinámica celular utilizando como modelo el desarrollo.
- Introducción al análisis de problemas fundamentales de la biología del desarrollo.

Introducción:

Segmentación:

El desarrollo de un organismo multicelular, luego de la fecundación, ocurre mediante un proceso denominado **clivaje** o **segmentación** (serie de divisiones mitóticas que dividen al citoplasma del cigoto en numerosas células más pequeñas, las **blastómeras**). El patrón de segmentación embrionaria está determinado principalmente por 2 parámetros: 1) factores genéticos que establecen el ángulo y momento de formación del huso mitótico y 2) la cantidad y distribución del vitelo.

En general, el vitelo inhibe la segmentación; el **polo animal** del embrión se encuentra relativamente libre de vitelo y su opuesto, el **polo vegetal**, es rico en éste. De acuerdo a la cantidad de vitelo que presentan, los ovocitos se clasifican en: **oligolecitos** (poca cantidad de vitelo, generalmente con distribución homogénea (isolecito)), **mesolecitos** (cantidad moderada de vitelo distribuido hacia el polo vegetal) y **telolecitos** (abundante cantidad de vitelo que ocupa prácticamente todo el volumen ovocitario). El patrón de segmentación en embriones provenientes de ovocitos isolecitos y mesolecitos es **holoblástico** o **total** y en embriones provenientes de ovocitos telolecitos es **meroblástico** o **parcial**.

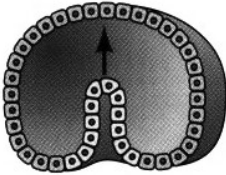
Hacia el final de esta primera etapa del desarrollo embrionario ocurre la formación de una cavidad dentro de la masa de blastómeras en división denominada **blastocoele**. El embrión resultante se conoce como **blástula**.

Gastrulación

Es un proceso de movimiento celular que involucra a todo el embrión y resulta en la organización de las 3 hojas embrionarias: **ectodermo** (capa celular externa), **mesodermo** (capa celular intermedia) y **endodermo** (capa celular interna).

Aunque el patrón de gastrulación es variable dependiendo de la especie, usualmente involucra una combinación de los siguientes tipos de movimientos básicos:

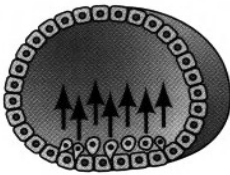
- **invaginación:** plegamiento de una capa de células hacia el interior del embrión.



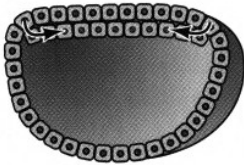
- **invaginación:** movimiento de una capa de células utilizando otra como sustrato hacia el interior del embrión.



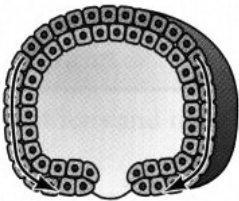
- **ingresión:** migración de células individuales hacia el interior del embrión.



- **delaminación:** generación de una capa de células que se desprende a partir de otra capa celular.



- **epibolia:** expansión de una capa celular sobre otras células o capas.



El comienzo de esta etapa del desarrollo se identifica por la aparición de ciertas estructuras características de cada grupo de organismos: **invaginación de la placa vegetal** (equinodermos), formación del **labio dorsal del blastoporo** (anfibios), **escudo embrionario (peces)** o **línea primitiva** (aves y mamíferos).

*Esquemas modificados de Developmental Biology. Gilbert. 6^{ta} Ed.

ANÁLISIS DE PREPARACIONES HISTOLÓGICAS DE LAS PRIMERAS ETAPAS DEL DESARROLLO DE AVES.

Objetivos:

- Estudio de las primeras etapas del desarrollo embrionario temprano en aves.

Introducción:

Neurulación:

El **tubo neural** se forma a partir del plegamiento y cierre de la **placa neural**. Durante el proceso de neurulación, existe un gradiente de madurez, esto significa que las porciones anteriores se desarrollan más temprano que las porciones posteriores. En el desarrollo del Sistema Nervioso primero se forman tres vesículas: **prosencefalo** (cerebro anterior), **mesencefalo** (cerebro medio), **romboencefalo** (cerebro posterior). Más adelante el prosencefalo y el romboencefalo se subdividen en otras cavidades.

Derivados del Mesodermo:

Durante el estadio de néurula, el mesodermo embrionario puede dividirse en cinco regiones. La primera región es el **cordomesodermo** o mesodermo axial. Este tejido forma la **notocorda**, órgano transitorio cuya principal función es la inducción de la formación del tubo neural y el establecimiento del eje corporal antero-posterior. La segunda región es el **mesodermo paraxial** o somítico. Las células de esta región forman los **somites**, que se disponen a ambos lados del tubo neural. De éstas estructuras derivan la mayoría de los tejidos conectivos (hueso, cartílago, dermis), y músculo, de la región axial. La tercera región, el **mesodermo intermedio**, forma el sistema urogenital. Hacia los sectores más laterales del embrión se encuentran el mesodermo **de la placa lateral**, éste se despliega en dos hojas, una parietal y otra visceral. De este mesodermo derivan las siguientes estructuras: corazón, vasos sanguíneos y cubierta de las cavidades corporales. También dará lugar a una serie de membranas extraembrionarias importantes para el transporte de nutrientes hacia el embrión. Las hojas parietal y visceral del mesodermo lateral tapizan una cavidad denominada **celoma**. Finalmente la quinta región, el **mesodermo de la cabeza**, contribuye a la formación de los tejidos conectivos y musculatura de la cara.

Anexos Extraembrionarios:

A medida que el embrión crece y se extiende, se forman una serie de pliegues membranosos que cumplen diferentes funciones (nutrición, intercambio gaseoso, remoción de materiales residuales, protección). Estos pliegues se forman por extensión del epitelio ectodérmico y endodérmico que subyace al mesodermo lateral. La combinación de ectodermo y hoja parietal del mesodermo lateral (**somatopleura**) forma el **amnios** y el **corion**. La combinación de endodermo y hoja visceral del mesodermo lateral (esplacnopleura) forma el **saco vitelino** y el **alantoides**.