



FACULTAD DE
CIENCIAS
UDELAR | fcien.edu.uy



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

CURSO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO 2014

Práctico: “Métodos de cultivo y manipulación de embriones tempranos de vertebrado”

Docente responsable: **Flavio Zolessi**
Ayudante: **Gonzalo Aparicio**

Introducción:

El embrión de pollo presenta muchas ventajas cuando interesa estudiar las etapas más tempranas del desarrollo del sistema nervioso. Los procesos morfogenéticos tempranos son muy similares a los de los mamíferos (dado que pertenecen al mismo grupo de los Amniotas), pero casi todo el desarrollo ocurre fuera del cuerpo de la madre. Es posible, por lo tanto, observar y manipular el desarrollo temprano sin necesidad de métodos demasiado complejos o costosos de cultivo embrionario. El método más sencillo consiste en generar una “ventana” en la cubierta exterior del huevo, a través de la cual se puede observar y manipular el embrión. Como esta aproximación puede tener algunas limitaciones, sobre todo en cuanto al acceso mediante microscopía, también se han desarrollado distintos métodos de mantenimiento de los embriones de pollo fuera de la cáscara. En este práctico aprenderemos a realizar dos de ellos, muy relacionados: el cultivo de New y el cultivo EC (que en inglés suena igual que “easy”, fácil). El primero requiere algo más de materiales especializados que el segundo, y es especialmente indicado para las etapas más tempranas, desde la gastrulación hasta el inicio de la morfogénesis del tubo neural y vesículas encefálicas. El segundo suele ser mejor para estudiar embriones desde el comienzo de la neurulación hasta etapas más avanzadas de la morfogénesis del tubo neural.

Además, utilizaremos distintas técnicas de marcado celular en embriones vivos o fijados, comparando embriones de pollo con embriones de zebrafish. Para esto, marcaremos embriones de pollo vivos con sondas fluorescentes lipofílicas (como el DiI) o mediante la expresión de proteínas fluorescentes (como GFP). Observaremos embriones de zebrafish transgénicos que expresan proteínas fluorescentes en distintas estructuras o tipos celulares. Embriones fijados de ambas especies serán además coloreados con marcadores fluorescentes subcelulares, como faloidina conjugada a rodamina, o el colorante de ADN Hoechst 33342.

Esquema del práctico:

Día 1 – Martes 30/9 – 12:30-15:30 – Salón 304

- Introducción teórica a los métodos de cultivos de embriones.
- Preparación de placas con agar-albúmina para cultivo EC.

Día 2 – Miércoles 1/10 – 13:00-18:00 – Salón 304

- Extracción de embriones para cultivos de New y EC, e inicio de los cultivos.
- Datación de embriones de pollo según Hamburger-Hamilton.
- Marcado de territorios embrionarios presuntivos con trazadores lipofílicos fluorescentes (DiI).
- Electroporación de ADN plasmídico.

Día 3 – Jueves 2/10 – 14:00-16:00 – Salón 306

- Observación y fijación de embriones en cultivo.
- Extracción y fijación de embriones “control” (incubados dentro de la cáscara).
- Técnica de “ventana” para acceder a embriones dentro de la cáscara.
- Decoración y fijación de embriones de zebrafish.

Día 4 – Lunes 6/10 – 15:00-19:00 – Piso 7N

- Lavados y comienzo de coloración de embriones enteros fijados de pollo y zebrafish con faloidina-rodamina y Hoechst 33342.
- Lavados, crioprotección y comienzo de inclusión en gelatina de embriones de pollo para cortar.

Día 5 – Martes 7/10 – 15:00-18:00 – Piso 7N

- Lavados y montaje de embriones in toto.
- Preparación de embriones para bloques de gelatina.

Día 6 – Miércoles 8/10 – 4 turnos: 9-10:30; 10:30-12; 13:30-15, 15-16:30 - Piso 7N

- Cortes a congelación de embriones de pollo.

Día 7 – Jueves 9/10 – 13:00-18:00 Piso - 7N

- Inmunofluorescencia en cortes de embriones de pollo

Día 8 – Viernes 10/10 – 13:00-17:00 en turnos – Piso 7N

- Observación de embriones en microscopio.

Bibliografía básica:

- Stern CD, Holland PWH (eds.) – 1993 - “Essential developmental biology, a practical approach”, IRL Press, Oxford University Press.
- New DAT – 1955 – “A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro”. J. Embryol. Exp. Morphol. 3: 326.
- Hamburger V, Hamilton HL – 1951 – “A series of normal stages in the development of the chick embryo”. J. Morphol. 88: 49-92.
- Chapman SC, Collignon J, Schoenwolf GC, Lumsden A – 2001 – “Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier”. Devl. Dynamics 220: 284-289.