



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Elaboración de material histológico didáctico en embriología con embriones de rata.

Lina Fernanda Gamboa Latorre

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Morfología Humana
Bogotá D.C., Colombia
2015

Elaboración de material histológico didáctico en embriología con embriones de rata.

Lina Fernanda Gamboa Latorre

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magíster en Morfología Humana

Director:

Médico Patólogo Dimas Denis Contreras

Codirectora:

Doctora Zulma Janeth Dueñas

Línea de

Investigación:

Biología del Desarrollo

Grupo de

Investigación:

Morfometría Humana

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de Morfología Humana
Bogotá D.C., Colombia
2015

*Al Espíritu Santo y a todos sus fieles.
Él por medio de sus dones hace que todo sea posible;
yo misma he sido testigo de su bendición, puesto que
Él ilumina todos los momentos de confusión y
desesperanza.*

Agradecimientos

Al Doctor Julio Franco Castillo, Magíster en Morfología Humana de la Universidad Nacional, cuya idea original motivó la realización de esta investigación.

A la planta docente y administrativa del departamento de Morfología y del anfiteatro que apoyan con convicción todos los eventos académicos e investigativos.

A mi director, el doctor Dimas Denis Contreras Villa, quien con paciencia resolvió inquietudes y orientó los procesos metodológicos, experimentales y analíticos de este trabajo.

Al licenciado en química Edwin Reyes quien actualmente se desempeña como auxiliar del Laboratorio de Histología que atento y servicialmente colaboró con el procesamiento de muestras.

A mi codirectora, la doctora Zulma Dueñas, adscrita al departamento de fisiología quien facilitó el acceso a la materia prima de este trabajo y además instruyó parte de la metodología; de igual manera, agradezco a la auxiliar Alba Rocío González, quien también asistió esta instrucción.

A las doce ratas sacrificadas, sin ellas este trabajo hubiera sido inviable

Resumen

Ante la falta de material histológico en Embriología de propiedad de la Universidad Nacional de Colombia, el departamento de Morfología de la Facultad de Medicina plantea un método de elaboración de este por medio del trabajo de grado de una de sus maestrantes. Dicho trabajo se enfocó en la producción de material didáctico, de utilidad para estudiantes y docentes del departamento o de otros departamentos o instituciones; es por esta razón, que el material resultante del trabajo está disponible de manera digital y en físico. Como recurso biológico se emplearon embriones de rata, para lo cual se solicitó la colaboración del personal del bioterio para la programación de la fecha de cópula y adquisición de los especímenes. Se utilizaron 12 especímenes fertilizados en diferente tiempo de gestación, con previa anestesia; se sacrificaron por medio del aclaramiento intracardiaco con solución salina y, por la misma vía, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se sumergieron por 48 horas en el fijador, para luego extraer satisfactoriamente el útero y los embriones. Una vez disecadas las piezas, se procesaron en parafina para la elaboración de láminas histológicas de embriología, material de análisis didáctico y digitalizable de este trabajo de investigación. Se obtuvieron láminas con evidencia de tejido embrionario desde el día séptimo de gestación, con resultados variables, óptimamente didácticos.

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

Abstract

In the absence of embryologic histological material, the morphology department of the National University of Colombia, raises a histologic material production methodology by the work of research of one of its Grandee. This work focuses on producing educational material to make it available for students and teachers of the department or other departments or institutions, it's because of that, that, the resulting material of this work will be available, both, digitally and physically. As biological resource, rat embryos are used, the date of copula is programmed with the collaboration of the vivarium to acquire specimens; we requested 12 specimens fertilized with different gestation time; then, they are anesthetized with approved drugs the National Association of Veterinary and following national ethical guidelines for euthanasia, intracardiac clearance is performed with saline solution and, by the same way, the rat embryo are fixed and then extracted to be processed for preparation of histological slides of embryos, material for didactic analysis and digitization of this research.

Keywords: Developmental biology, embryo, Carnegie stages, rat, histotechnology, didactics.

Contenido

Resumen.....	IX
Abstract.....	X
Contenido.....	1
Lista de Figuras.....	3
Lista de Láminas.....	4
Introducción.....	7
Capítulo 1: PLANTEAMIENTO.....	9
1.1 Problema.....	9
1.2 Objetivos.....	10
1.2.1 Objetivo principal.....	10
1.2.2 Objetivos específicos.....	10
Capítulo 2: MARCO DE REFERENCIA.....	11
2.1 Estadios de Carnegie.....	11
2.1.1 Semana 1.....	12
2.1.2 Semana 2.....	15
2.1.3 Semana 3 y 4.....	16
2.1.5 Semana 5.....	18
2.1.6 Semana 6 y 7.....	18
2.1.7 Semana 8.....	19
2.2 Anatomía comparada de la rata.....	19
Capítulo 3: METODOLOGÍA.....	21
3.1 Cronograma de Actividades.....	21
3.1.1 Primer mes.....	21
3.1.2 Segundo mes.....	21
3.1.3 Tercer mes.....	22
3.1.2 Cuarto mes.....	22
3.1.3 Quinto mes.....	23

3.2 Materiales y métodos	23
3.2.1 Material biológico	24
3.2.2 Materiales de espacio	26
3.2.3 Materiales de forma.....	27
3.3 Procedimiento	28
3.3.1 Preparación de la solución fijadora	28
3.3.2 Fijación.....	30
3.3.3 Disección.....	34
3.3.4 Preparación	35
3.3.5 Análisis.....	37
Capítulo 4: CONSIDERACIONES ÉTICAS	39
4.1 Bioética	39
4.1 Bioseguridad y declaración de impacto ambiental.....	40
CAPÍTULO 5: RESULTADOS.....	41
5. 1. Resultados embrionarios	42
5.1.1 Día 7.....	42
5.1.2 Día 10.....	44
5.1.3 Día 11	47
5.1.4 Día 12.....	49
5.1.5 Día 13	57
5.1.6 Día 15.....	71
5.2 Resultados extraembrionarios	78
CAPÍTULO 6: ANÁLISIS Y CONCLUSIONES	87
6.1 Limitaciones y recomendacioness.....	88
Bibliografía	91

Lista de Figuras

Figura 1. Ejes polares (Veeck & Zaninovic', 2003).	13
Figura 2. Esquema de embriones en rata Wistar (Le Vay, 1993)	20
Figura 3. Útero de Rata Wistar, disección	20
Figura 4. Rata Wistar tal como se recibe de bioterio	25
Figura 5. Bioterio, Universidad Nacional	26
Figura 6. Laboratorio de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia... ..	26
Figura 7. Laboratorio de Histotecnología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia.....	27
Figura 8. Solutos para preparación de Buffer. Cortesía Laboratorio de Fisiología, U. Nal	28
Figura 9. Preparación del soluto fijador	29
Figura 10. Disolución.....	29
Figura 11. Aplicación de anestesia.....	30
Figura 12. Preparación de la anestesia	30
Figura 13. Comprobación de anestesia efectiva.....	31
Figura 14. Posición para disección.....	31
Figura 15. Exposición mediastinal	32
Figura 16. Punción ventrículo izquierdo Figura 17. Ruptura aurícula derecha.....	32
Figura 18. Perfusión y aclaramiento con Solución salina	33
Figura 19. Comprobación de rigidez secundaria a formalización.....	33
Figura 20. Útero de Rata Wistar	34
Figura 21. Fijación	34
Figura 22. Seccionamiento previo a procesamiento.....	35
Figura 23. Bloque de parafina.....	35
Figura 24. Corte	36
Figura 25. Desparafinación	36
Figura 26. Coloración	37
Figura 27. Microscopio de luz	37
Figura 28, corte 1, día 13	57
Figura 29, corte día 13	62

Lista de Láminas

Lámina 1. Día 7, 10x.....	42
Lámina 2. Día 7, 40x.....	43
Lámina 3. Día 7, 40x. Trofoblasto y blastocisto	44
Lámina 4. Embrión inutero 10 días, 4x.....	45
Lámina 5. Embrión inutero 10 días, 10x.....	45
Lámina 6, Día 10, 40x.....	46
Lámina 7, Día 11, 4x.....	47
Lámina 8, Día 11, 20x.....	48
Lámina 9, Día 11, 40x.....	48
Lámina 10, Día 11, 40 x.....	49
Lámina 11, Día 12, 4x.....	50
Lámina 12, Día 12, 10x.....	51
Lámina 13, Día 12, 20x.....	51
Lámina 14, Día 12. 4x, Pedículo de fijación.....	52
Lámina 15, Día 12, 10x.....	53
Lámina 16, detalle de amnios y dorso de embrión de 12 días, 20x.....	54
Lámina 17, Dorso de embrión de 12 días, 40x	54
Lámina 18, detalle de capas embrionarias, 12días, 40x	56
Lámina 19, pedículo de fijación, día 12, 40x.....	56
Lámina 20, Día 13, 4x.....	58
Lámina 21. Día 13, énfasis en telencéfalo y ventrículo lateral	59
Lámina 22, Día 13 detalle de telencéfalo y mesencéfalo	59
Lámina 23, Día 13, énfasis en IV y III ventrículo.....	60
Lámina 24, Día 13, otocisto, 20x	61
Lámina 25, Día 13, 4x.....	63
Lámina 26, Día 13, detalle de notocorda y tejidos adyacentes	64
Lámina 27, Día 13, detalle central	65
Lámina 28, Día 13, detalle de ventrículos cardíacos.....	66
Lámina 29, Día 13, 4x.....	67
Lámina 30, detalle de surco neural	68
Lámina 31, Día 13, 4x.....	69
Lámina 32, día 15, 10x, esbozo de extremidad.....	70
Lámina 33, Lámina 34, día 15, 10x, esbozo de extremidad.....	70
Lámina 35, 15 días, 4x	71
Lámina 36, día 15, 4x.....	72
Lámina 37, 15 días, 10x, detalle de tubo neural u vesícula óptica.....	73

Lámina 38, día 15, detalle de vesícula óptica	73
Lámina 39, Vesícula óptica, día 15	74
Lámina 40, Prominencia maxilar	75
Lámina 41, Proceso mandibular.....	75
Lámina 42, Proceso hioideo y cola embrionaria	76
Lámina 43, Cresta urogenital, aorta dorsal y tubo neural	76
Lámina 44 15 días, 4x, corte parasagital.....	77
Lámina 45, Útero no grávido	79
Lámina 46, Útero grávido	80
Lámina 47, Ovario con los folículos en diferente grado de maduración	81
Lámina 48, ovario con los folículos y el oviducto anexo.....	81
Lámina 49, Trofoblasto, Día 13	82
Lámina 50, Trofoblasto y anexos detallados, Día 11	82
Lámina 53, Vista detallada del sincitotrofoblasto con células binucleadas, Día 7.....	84
Lámina 54, Inferiormente se visualiza parte de la decidua y superiormente el miometrio, Día 7 ...	85
Lámina 55, Superiormente se visualiza el perimetrio e inferiormente el miometrio	85

Introducción

Como parte de la formación en carreras de la Salud de la Universidad Nacional, la Biología del Desarrollo y la Embriología Humana son disciplinas indispensables dentro de los currículos académicos; esto se explica porque el profesional en formación debe estudiar y aprender el desarrollo intrauterino del humano para comprender posteriormente conceptos de la morfología y de la evolución humana, sobre alteraciones congénitas y genéticas de la formación, entre otros.

Los elementos didácticos, disponibles en Embriología para pregrado de Medicina y en Biología del Desarrollo para la maestría de Morfología Humana, se basan principalmente 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 de manera más precisa al microscopio. Actualmente se dispone de tecnologías de información y comunicación, 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.

Capítulo 1: PLANTEAMIENTO

El presente trabajo propone dar solución a la falta de material didáctico histológico de embriología en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Las herramientas actuales consisten en modelos digitales y representaciones conceptuadas, sin la disponibilidad de láminas histológicas y tampoco de contenidos digitales en Embriología, como recursos didácticos propios de la universidad.

La idea original es del Médico Morfólogo Julio César Franco Castillo, quien manifestó que en otras instituciones latinoamericanas sí se encuentra disponible este material didáctico y propuso la elaboración de las láminas como trabajo de investigación del departamento de Morfología de la Facultad.

El laboratorio de Histología de la Universidad sí cuenta con material de Biología del Desarrollo, pero este material básicamente muestra organogénesis, mas no procesos embrionarios pluripotenciales previos propios de la blastulación y de la gastrulación.

El aporte de la investigación es esencialmente didáctico y los resultados se obtienen de manera física, digital y cognoscitiva y, el medio para llegar a los mismos es teórico- práctico, es decir, que después de una fundamentada contextualización, basada en referentes teóricos y en el estado de la cuestión, se consolidan procesos prácticos para afianzar aprendizajes y para la elaboración de material de conocimiento.

Inicialmente se pensó en la obtención de muestras a partir de legrados de abortos espontáneos o de embarazos ectópicos, pero esta posibilidad se descartó por múltiples razones, principalmente por el estado patológico previo con el que vendrían dichas muestras y también por la inexactitud en la edad gestacional. Se optó entonces, por la planeación de la cópula, el seguimiento gestacional y la posterior fijación de embriones obtenidos de ratas, entre otras razones, porque la implantación del blastocisto del roedor es equiparable con la del humano.

1.1 Problema

Inexistencia de material didáctico propio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional que muestre las etapas embrionarias en cortes histológicos en físico y/o digital.

1.2 Objetivos

Para dar solución a la carencia de material histológico para Embriología se plantean los siguientes objetivos:

1.2.1 Objetivo principal

Elaborar cortes histológicos de embrión de rata que ilustren las etapas del desarrollo embrionario para ser implementados como material didáctico -físico y digital- disponible para estudiantes y profesores de la Universidad Nacional.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar las ventajas y las oportunidades que el empleo de embriones de rata aportan a la didáctica de la Biología del Desarrollo.
- Estandarizar la técnica para la disección y extracción de embriones de rata.
- Definir la técnica de fijación más adecuada para la preservación de la histología del embrión de rata.
- Elaborar material didáctico físico y digital para Embriología, de propiedad de la Universidad Nacional de Colombia.
- Describir morfológicamente las características de una parte de los grupos celulares que participan en el desarrollo embrionario.

Capítulo 2: MARCO DE REFERENCIA

El estudio de la Embriología Humana se ha realizado desde la antigüedad tomando patrones embriológicos de otras especies. El desarrollo embrionario de la rata en las primeras semanas de gestación es casi equivalente al del humano; esta equivalencia fue demostrada en la década del 50 por el doctor Robert Edwards, conocido por sus aportes sobre la fertilización invitro, fundamentos científicos y muestras de innovación que enseñan que un trabajo de investigación debe ser práctico. (Edwards, 1965).

El empleo de embriones de rata se justifica en este trabajo por la facilidad de vigilancia, cuidado y adquisición del espécimen en el bioterio dentro de la misma universidad, lo que aumenta la validez y fiabilidad de las muestras, puesto que es de suma importancia determinar el estadio de desarrollo embrionario de manera precisa.

La rata es un mamífero que mantiene un perfil de desarrollo embriológico temprano muy similar al del humano. Actualmente existen bases de datos digitales que permiten la correlación de etapas embrionarias de otras especies con la humana. Otra de las características del desarrollo embrionario del roedor es que al igual que el humano su blastocisto se implanta en el endometrio, lo que en un estudio histológico permite la búsqueda del embrión implantado en las paredes uterinas de manera más eficiente (Medical Research Council, 2014).

Este trabajo proyecta el mayor provecho didáctico de las preparaciones histológicas, principalmente en las primeras semanas del desarrollo embrionario, período en el que ocurre el mayor número de cambios morfológicos y de determinantes de organogénesis (Bedzhov & Zernicka-Goetz, 2014).

Las etapas evolutivas que se tienen como referentes comparativos son las propuestas por Carnegie, ya que las bases de datos y la bibliografía, actualmente disponibles en Embriología, toman como referente estas etapas que sirven como punto de conversión de los días embriológicos en la rata a extrapolar en el humano. (Gasser, Cork, & Noe, 2015) (Tabla 1 y 2)

2.1 Estadios de Carnegie

Con el fin de establecer la equivalencia de la edad gestacional de los embriones de rata respecto a la del humano, se siguen los estadios de Carnegie que comparan los eventos a nivel embrionario entre los dos grupos. El nombre de "etapas Carnegie" es derivado del Instituto Carnegie en Washington (Fribourg & Laussane, 2011).

Los estadios de Carnegie determinan características embrionarias clasificadas en 23 etapas que permiten hacer la equivalencia; otra clasificación válida, tomada de Emil Witschi, será mencionada ocasionalmente. Sin embargo, esta investigación se basa principalmente en la clasificación de Carnegie, en razón de que es la más completa y por lo tanto, la más respaldada bibliográficamente (Gasser, Cork, & Noe, 2015).

Otra de las razones por las que se opta por la clasificación de Carnegie es porque comprende aspectos intraembrionarios y extraembrionarios del desarrollo morfológico, útiles para el análisis de las láminas histológicas; dichos aspectos no son directamente dependientes de cualquier edad o tamaño. Los estadios de Carnegie ilustran los primeros 60 días de desarrollo; en el día 60 el embrión humano pasa a llamarse feto humano (Fribourg & Laussane, 2011).

La correlación entre la edad, la morfología y el tamaño embrionarios sirve para caracterizar los estadios de Carnegie. La secuenciación en la aparición de características de diferenciación y migración celular es algo que permanece constante y se efectúa de manera más precisa si se evalúan y comparan sus características intrínsecas y superficiales.

El desarrollo embrionario humano se toma en cuenta desde el momento de la fecundación, cuando se inicia la primera semana de gestación que equivale a la tercera semana clínicamente aceptada, ya que clínicamente la primera semana inicia con el primer día de ovulación.

2.1.1 Semana 1

En la primera semana se cuentan los 5 primeros estadios de Carnegie que, como se dijo previamente, equivale a la tercera semana clínica y se inicia desde el momento de la fecundación. Para el humano abarca los 7 primeros días y para la rata los 6 primeros días de gestación:

- Estadio 1: Existe un cigoto unicelular que contiene material genético único totipotencial. Es el comienzo de la vida embrionaria y el desarrollo ontogenético que comienza cuando un ovocito, detenido en la metafase de la meiosis II, es penetrado por un espermatozoide. Este es el primer evento después de la fertilización, que finaliza con la formación del segundo cuerpo polar. El embrión de la rata mide aproximadamente 0.07mm y el del humano 0.12mm con un peso de 0.004mg.

La búsqueda del embrión durante la etapa procedimental se hace en el oviducto, debido a que aún no ha ocurrido la implantación.

- Estadio 2: Se inicia con la segmentación del cigoto en varias células y finaliza con la aparición del blastocele, primera cavidad formada dentro de la blástula; en ese momento, el número de células (blastómeras) es de aproximadamente 16, lo que indica que se estiman 4 momentos de segmentación celular; no se percibe aún un crecimiento en el volumen protoplasmático, pero sí existe una efectiva replicación del material genético nuclear.

Este proceso ocurre entre los días 2 y 3 de desarrollo, tanto para la rata como para el humano; la mórula -antes cigoto- aún se encuentra en el oviducto y el tamaño se mantiene constante debido al poco o nulo aumento de volumen intracelular, ya expuesto (Gasser, Cork, & Noe, 2015). Se calculan al tercer día, 8 blastómeras formadas.

Los hallazgos invitro muestran que el clivaje sucede siguiendo el plano del cuerpo polar, inicialmente dividiéndose el cigoto en una célula posterior y otra anterior, el plano “coronal” está determinado por el cuerpo polar; de igual modo la segunda segmentación toma un plano perpendicular al anterior y tiene como referencia el segundo cuerpo polar (Figura 1).

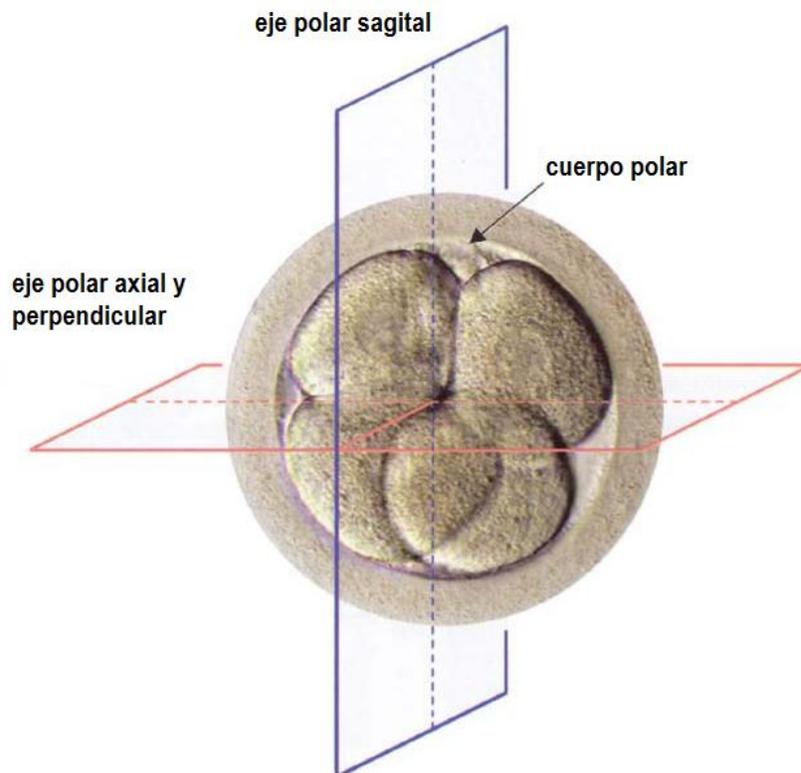


Figura 1. Ejes polares (Veeck & Zaninovic', 2003).

En el estadio 2 ocurre el proceso de compactación que consiste en una aproximación cada vez más estrecha entre las blastómeras y explica también por qué el tamaño de la blástula no cambia mucho de un día para otro. El proceso está descrito en 6 fases:

1. Iniciación.
 2. Contacto celular moderado.
 3. Amplio contacto celular.
 4. Yuxtaposición de membranas celulares.
 5. Aparente desaparición de membranas celulares.
 6. Aparente invisibilidad de membranas celulares.
- Estadio 3: Se calcula en el comienzo del día 4 y se inicia con la formación del blastocele, una cavidad dentro de la blástula (o mórula), la que a partir de este momento se denomina blastocisto libre, el cual con su implantación en la pared endometrial y disolución de la zona pelúcida, finaliza el estadio 3.

La formación del blastocele se conoce como cavitación. Las células adyacentes o blastómeros se diferencian en células trofoblásticas que se dirigen a la periferia y centralmente queda la masa celular interna o embrioblasto. La cavitación resulta inicialmente por la acumulación de líquido o producto metabólico de los blastómeros e implica la formación de una ranura primordial entre los espacios extracelulares de los blastómeros que gradualmente se amplía llenándose de líquido blastomérico. Al principio las diferencias morfológicas entre los dos grupos celulares no son evidentes, pero al final de la cavitación, las células periféricas, ahora llamadas trofoblásticas, son aplanadas y están acopladas entre sí por uniones tipo gap. Las células que constituyen la masa celular interna tienen una forma más redondeada y de mayor altura.

En este punto es relevante mencionar que la localización de la masa celular interna establece el polo embrionario, es decir, donde se forma el embrión y por lo tanto el polo que se va orientar hacia el endometrio; es por esta razón que al final del estadio esta masa celular interna se denomina embrioblasto.

Dentro de los eventos que ocurren en el estadio 3 se encuentra la eclosión o salida del blastocisto de la zona pelúcida, que hace posible posteriormente que el blastocisto entre en contacto con el endometrio y se expanda aumentando de tamaño. El blastocisto en el humano mide aproximadamente 0.2mm y en la rata 0.08mm de diámetro.

- Estadio 4: En el caso del humano abarca el inicio del día 6 y en la rata el día 5, lo que indica que comparativamente el estadio 3 dura dos días en el humano y uno en la rata.

Durante el estadio 4 ocurre la implantación endometrial del blastocisto, que se inicia con el primer contacto de las células trofoblásticas con las células endometriales.

La capa trofoblástica tiene múltiples áreas de unión al epitelio endometrial. Y se diferencia progresivamente en sincitotrofoblasto y citotrofoblasto, quedando zonas de contacto del primero que disuelven el epitelio endometrial, siendo el sincitotrofoblasto la estructura más periférica.

Se crean células amniogénicas para separar el trofoblasto y se distinguen de la masa celular interna o embrioblasto que a su vez sufre una diferenciación en una capa superior o epiblastica y una capa inferior o hipoblastica.

2.1.2 Semana 2

En la segunda semana ocurren los eventos de transformación del disco embrionario bilaminar y comprende los estadios 5 y 6 de Carnegie.

- Estadio 5: Comienza el día 7 en el humano, el día 6 en la rata y finaliza al concluir el día 12 en el humano y a mediados del séptimo día en la rata. En este estadio se aprecia que, como consecuencia de la implantación, el blastocele tiende a colapsarse y el mayor diámetro que alcanza es 0.5 mm en el humano y 0.25 mm en el embrión de la rata.

A lo largo de la cara interna del trofoblasto se comienzan a formar las primeras células mesoblásticas; el embrioblasto es ahora un disco embrionario de casi 0.1mm.

A nivel endometrial, se forman capilares maternos que se fusionan con parte del sincitotrofoblasto; de igual manera, se encuentran lagunas dentro del citoplasma de las células del sincitotrofoblasto que entran en contacto con las lagunas de células adyacentes. Al finalizar el estadio estas lagunas parecen formar círculos sanguíneos discontinuos en la superficie endometrial.

Llegando el día 8 la cavidad amniótica es más notoria. En el embrioblasto, la capa superior está formada por un epitelio columnar pseudoestratificado y la capa inferior está formada por un complejo de células poliédricas cuyo volumen está en su mayoría ocupado por el núcleo.

A partir del epiblasto se forman las tres hojas embrionarias. Del hipoblasto se forma una capa celular migratoria llamada endodermo extraembrionario que tapiza la cara interna del citotrofoblasto, dejando circunscrita una cavidad exocelómica que posteriormente se denomina saco vitelino primario. Entre los días 9 y 10 esa membrana formada por endodermo extraembrionario llamada membrana exocelómica, se desprende del citotrofoblasto dejando un tejido conectivo laxo entre ambas capas llamado mesodermo extraembrionario, el cual por su localización se va a dividir en dos porciones, una, el mesodermo somático, que está en contacto con el trofoblasto y el amnios; y otra, el mesodermo esplácnico que está en contacto con el saco vitelino.

Al final del día 12 la totalidad del contenido blastocístico está inmersa en el endometrio y tapizada por endometrio regenerado.

- Estadio 6: Abarca del día 13 al día 15 en el humano y en la rata desde la mitad del día 7 hasta la mitad del día 8, en este momento, el disco embrionario humano tiene un ancho de 0.22 mm, 0.25mm de longitud y 0.04mm de grosor.

Dentro del mesodermo extraembrionario se forman espacios que reciben el nombre de celoma extraembrionario, espacios que se expanden y fusionan formando la cavidad coriónica y el quiste exocelómico. Hacia un extremo del disco embrionario se desarrolla un engrosamiento denominado placa procordal que posteriormente forma la membrana bucofaríngea; dicho engrosamiento referencia el polo cefálico del embrión.

2.1.3 Semana 3 y 4

La semana 3 se caracteriza por ser fácilmente asimilada en la comunidad académica, ya que sucede el proceso de gastrulación o formación de las tres capas embrionarias, -en especial de la capa mesodérmica- que darán formación a los tejidos maduros. Comienza desde el final del estadio 6:

- Fin del estadio 6: Incluye el transcurso entre los días 14 y 15. El disco bilaminar, visto desde la cavidad amniótica, muestra el dorso embrionario. Esta superficie, en su porción caudal, presenta un engrosamiento longitudinal llamado línea primitiva que termina hacia el polo cefálico en el nódulo primitivo.
- Estadio 7: Incluye para el embrión humano los días 16 y 17 y para la rata desde la segunda mitad del día 8 hasta la primera mitad del día 9. Tanto la línea primitiva como el nódulo primitivo se deprimen en su centro formando el surco primitivo para la línea y la fosita primitiva para el nódulo.

A través del surco primitivo ingresan células provenientes de la periferia del epiblasto las cuales se ubican entre las células del hipoblasto a las que reemplazan, formando el endodermo intraembrionario. Luego otras células, también del epiblasto, ingresan por el surco primitivo y se acomodan entre el epiblasto y el endodermo intraembrionario formando la capa del mesodermo intraembrionario. El epiblasto restante se queda para formar el ectodermo, y de esta manera es como se forman las tres capas intraembrionarias.

Concluyendo este estadio se forma la placa neural y un primordio alantoide., quedando el embrión levemente dorsalizado. Este disco trilaminar en humanos tiene una dimensión aproximada de 0.6 mm de longitud.

- Estadio 8: Se inicia con la formación de los somitas occipitales el día 18 en el humano y en la segunda mitad del día 9 en el embrión de la rata. Se continúa alargando la línea primitiva y la placa neural se pliega, anunciando el comienzo del tubo neural primario, que es dorsal a la notocorda que se ha formado a partir de la diferenciación de blastos que migraron del epiblasto. En este momento existe una primera localización cefálica y caudal embrionaria. El embrión continúa doblándose dorsalmente, permitiendo la formación del primer arco faríngeo.

El quiste exocelómico se colapsa y se integra a los futuros elementos placentarios; el saco vitelino y la membrana exocelómica comienzan una regresión periférica.

- Estadio 9: Continúa la formación de somitas a nivel cervicotorácico. El día 20 en el humano se forma el segundo arco faríngeo, se reconocen las vesículas primitivas proscencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo entre los pliegues neurales y aparece la cavidad pericárdica y la aorta dorsal, así como los vasos del arco aórtico y umbilicales; también se reconocen el intestino anterior, el medio y el posterior y las membranas bucofaríngea y cloacal. Este estadio abarca en el humano los días 20 y 21 y en la rata la segunda mitad del décimo día (Hill, 2013).
- Estadio 10: El embrión humano ya ha alcanzado una longitud aproximada de 2mm; comprende los días 22 y 23 y en la rata hasta la mitad del día 11. El tubo neural tiene ahora 5 vesículas entre sus pliegues y en una placa quiasmática, sobre la línea media, exhibe el surco óptico y los neuroporos rostral y caudal. También se forma la primera bolsa faríngea, que se orienta cerca de la placoda ótica. La membrana bucofaríngea pasa a formar el estomodeo, de igual manera, se forma un primordio de glándula tiroideas y una placa hepática. Lateral a los somitas se identifica una vía nefrogénica, la gónada primitiva y el mesodermo intermedio.

2.1.5 Semana 5

- Estadio 11: En la rata, es sólo unas horas del día 11; en el humano, comprende el día 24 post-fertilización. Se forman pares de somitas lumbares y esclerotomas ubicados ventromedialmente. El neuroporo se cierra ventralmente y se establecen los arcos faríngeos restantes. En el surco óptico se forma la vesícula óptica al mismo nivel de la formación del diencéfalo, lo que hace que la placoda ótica quede al nivel del rombencéfalo. En este estadio se crea una adenohipófisis primitiva. A nivel gastrointestinal se nota el divertículo hepatocístico.
- Estadio 12: En el humano comprende del día 25 al 27 y en la rata el resto del día 11. Se forma el resto de las somitas en el humano y en la rata la formación de somitas es más prolongada. Se identifican la cresta neural, la configuración de los 4 arcos faríngeos resultantes, las bolsas y las hendiduras faríngeas; se abre el paso sinoauricular y, a nivel hepático, se visualizan los futuros sinusoides hepáticos que están formados por tejido hematocitopoyético. El conducto mesonéfrico desemboca en la cloaca.
- Estadio 13: Comprende en el humano del día 28 al 31 y en la rata, $\frac{3}{4}$ partes del día 12. En el humano mide alrededor de 5mm. Se identifica parte de la retina y el disco del lente óptico, se cierra el neuroporo caudal y comienzan a formarse los esbozos de las extremidades y los esbozos bronquiales. A nivel gastrointestinal el estómago y la hernia umbilical se hacen presentes.

2.1.6 Semana 6 y 7

A partir de esta semana los cambios a nivel de somitas – especialmente en el número- son variables en las dos especies, sin embargo, la organogénesis es estable y equiparable.

- Estadio 14: En la rata se completa el día 13 y en el humano implica el día 32. Se aprecian los procesos maxilares, frontonasales y mandibulares, también, la vascularización en procesos de extremidades. Comienza la formación de la pared abdominal, los hemisferios cerebrales, la unión esófago-gástrica, el saco pulmonar, los primordios del hipotálamo y de la tráquea.
- Estadios 15-17: Abarca el día 13 en la rata y en el humano de los días 33 al 43. Los eventos muestran el desarrollo de las prominencias faciales y hendiduras, mayor proyección nasobucal, aumento de la hernia umbilical, formación del conducto auditivo

externo y las condensaciones precartilaginosas para los primordios de las manos.

- Estadios 18-19: Día 14 y 15 en la rata y en el humano del día 44 al 50. En el estadio se cierran las hendiduras faciales y el canal pleuroperitoneal y se completa el diafragma.

2.1.7 Semana 8

Del estadio 19 al 23 la organogénesis de las dos especies difiere lo suficiente como para disminuir su utilidad didáctica. Los eventos principales que suceden son la formación del pabellón auricular, el aumento de tamaño de la hernia umbilical y el establecimiento de los factores parenquimatosos y estromales de la organogénesis.

2.2 Anatomía comparada de la rata

En este apartado se hace mención de los hallazgos - especialmente los genitales femeninos- durante la disección de la rata, que bien difieren o se asemejan a los del ser humano.

El género animal utilizado es 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, cuerpo de 15 a 25 cm, 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 (Figura2).

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 (Figura3).

El abultamiento abdominal es perceptible en la mitad de la gestación, los embriones se disponen de manera uniforme en ambos cuernos uterinos y se separan por una distancia razonable para permitir el desarrollo individual de cada uno. Cada cuerno uterino tiene una longitud de 4 a 5 cm y un diámetro de más o menos 3 mm, el oviducto es corto y tiene dos milímetros de longitud (Liu, Hewett, Braun, Hyde, Jensen, & Lee, 2015).

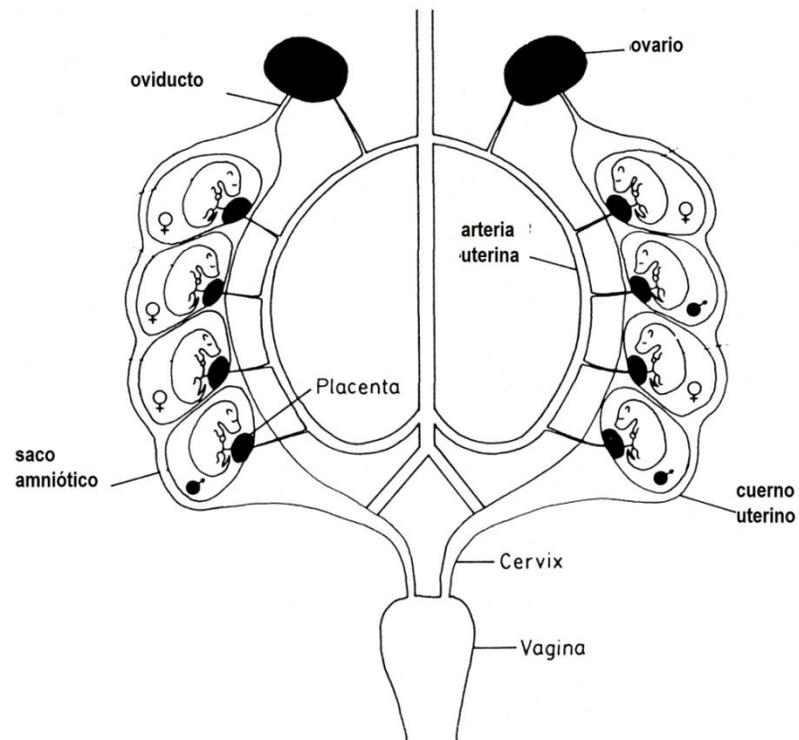


Figura 2. Esquema de embriones en rata Wistar (Le Vay, 1993)

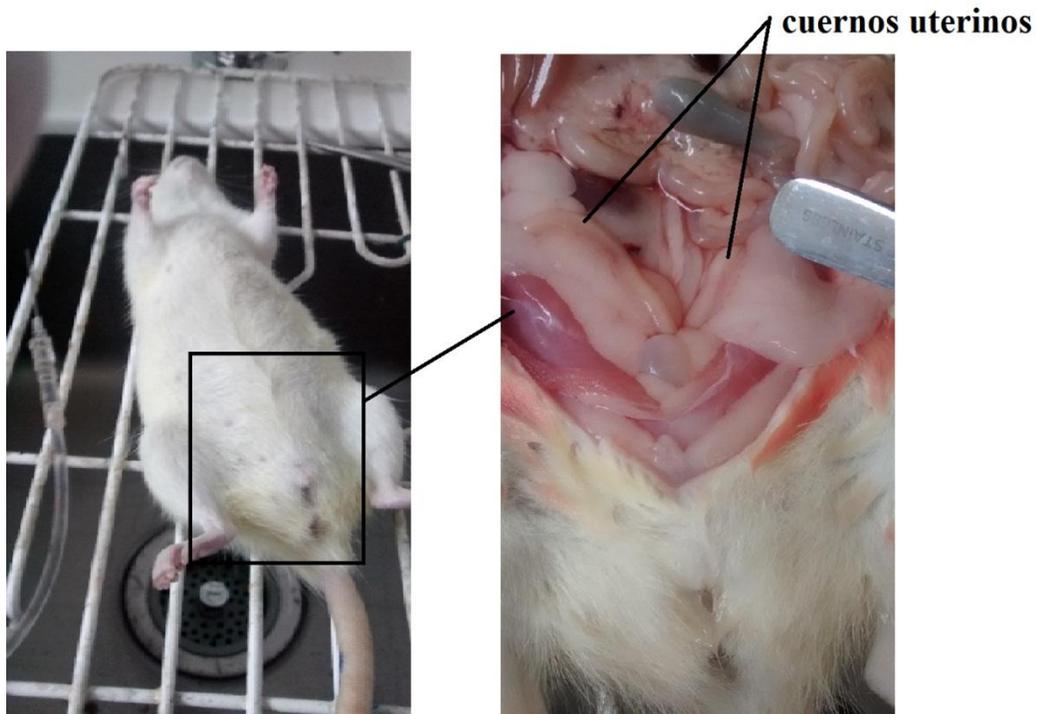


Figura 3. Útero de Rata Wistar, disección

Capítulo 3: METODOLOGÍA

Como se describió en la introducción, el aporte de la investigación es principalmente académico y los resultados se obtienen de manera física, digital y cognoscitiva. Los medios para llegar a los mismos son teórico-prácticos, es decir, que después de una rigurosa investigación respaldada por referentes teóricos, se siguen procedimientos prácticos para afianzar aprendizajes y elaborar material de conocimiento.

La metodología que sigue el trabajo es descriptiva, basada en procesos teórico-prácticos porque comienza 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 continúa 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.

3.1 Cronograma de Actividades

El procedimiento fue planeado para llevarse a cabo a lo largo de 5 meses, de la siguiente manera:

3.1.1 Primer mes

- Planeación: Durante el primer mes se proyectaron los procedimientos que se llevarían a cabo: cronograma de actividades, contacto con personal capacitado o interesado en hacer parte de la investigación.
- Cálculo de gasto y presupuesto: Se elaboró un documento en el que se estima el gasto en recursos (humano y material), tiempo y espacio; esto, con el fin de evaluar la viabilidad del trabajo de investigación y por lo tanto, de los resultados posiblemente obtenidos; así como del cálculo del índice costo-beneficio.

3.1.2 Segundo mes

- Construcción de fundamentos teóricos y estado del arte: Fue necesario una ilustración y contextualización lo más amplia posible sobre el material de estudio y el ámbito en el que sucederían los hechos, para lo cual se inició con una profunda revisión bibliográfica con el fin de determinar todos los procesos morfológicos normales, paso por paso, de los períodos de desarrollo intrauterino desde la fecundación hasta el nacimiento; en principio para el humano y luego para la rata.

- Correlación de los procesos de desarrollo del humano y de la rata, con el fin de una correcta y proporcionada interpretación a futuro de los resultados en las placas histológicas.
- Consideraciones bioéticas: Una vez definido el marco teórico disciplinar, se procedió a identificar y apropiar las implicaciones éticas de los procedimientos contemplando estándares institucionales, nacionales y mundiales. Anexo a este documento, se encuentra la aprobación del Comité de Ética institucional con fecha de 26 de marzo de 2015.

3.1.3 Tercer mes

- Solicitud de insumos y reactivos necesarios para el procesamiento de los tejidos: Para el procesamiento de los embriones fue necesario contar con insumos quirúrgicos, de laboratorio, de desecho y biológicos principalmente, así como de apoyo técnico humano y tecnológico.
- Capacitación: Se hicieron capacitaciones en el bioterio para calcular los días post-cópula de los especímenes a diseccionar, también se aprendieron las normas de anestesia y sacrificio.
- Disección de especímenes y fijación: Posterior a la capacitación en el bioterio, se estandarizó la técnica de disección y corte de la muestra y se fijaron los tejidos en diferentes medios de fijación, para luego, en su visualización, poder determinar la fórmula más adecuada de preservación del tejido embrionario.

3.1.2 Cuarto mes

- Corte: Los tejidos fijados se utilizaron para el corte en diferentes planos anatómicos y se prepararon las láminas histológicas según las normas técnicas del laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.
- Selección: Se evaluó la totalidad de las placas histológicas para definir el medio de fijación más adecuado, cumpliendo así uno de los objetivos del proyecto de investigación. Para la evaluación de la calidad se acordaron criterios validados por los docentes de Histología y de Embriología de la Facultad fundamentados en referentes teóricos.

- Elaboración del material didáctico: Los cortes seleccionados son presentados en físico y de manera digital; el material queda a disposición del departamento de Morfología Humana para su evaluación y valoración didáctica en la utilización por parte de docentes y estudiantes de la Facultad.

3.1.3 Quinto mes

- Entrega de resultados: Se realiza formalmente un simposio con entrada libre, dentro de las instalaciones de la Universidad Nacional de Colombia, para presentar los objetivos propuestos y logros alcanzados y exponer el material didáctico correspondiente, dirigido a continuar y ampliar los procesos de investigación.
- Propuestas de socialización: A nivel de congresos nacionales e internacionales y movilización.

3.2 Materiales y métodos

La muestra principal consiste en embriones de rata en estadios equiparables con el desarrollo embrionario humano. Se utilizan principalmente embriones en las primeras etapas de desarrollo por su semejanza y pautas evolutivas.

Para el acceso a la muestra es fundamental la colaboración del equipo de profesionales y tecnólogos del bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional a quienes se les comunica la necesidad del recurso biológico para ser estudiado, en este caso, se requiere la obtención de ratas preñadas siguiendo un cronograma y con criterios de inclusión como:

- Rata fisiológicamente sana.
- Sexo femenino.
- Post-púberes.
- Encontrarse en determinados días post-cópula, descritos en detalle a continuación:

Las ratas se seleccionan por presunción de días de gestación de la siguiente manera: se selecciona un espécimen gestante por cada etapa de Carnegie del período embrionario hasta completar el embrión antes de la formación de los somitas de la cola de rata, característica que marca la diferencia con el embrión humano.

El criterio de exclusión es el no cumplimiento de los criterios de inclusión.

3.2.1 Material biológico

El material principal de estudio es el embrión de rata, pero para llegar al mismo es necesaria la adquisición de ratas preñadas con previa cópula programada cronológicamente:

Observación: Recordar que las tres primeras ratas solicitadas tienen en común que sus embriones se encuentran en el oviducto.

- Rata 1:** Solicitada al primer día post-cópula, formación del cigoto unicelular y visualización de los restos de cuerpos polares.
- 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.
- 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.

Búsqueda de embriones en útero bicornio:

- Rata 4:** Solicitada al día 4 post-cópula, con el fin de buscar el blastocisto libre en el útero.
- 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.
- 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.
- 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 (Figura 4).
- Rata 8:** Décimo día de gestación. Se inicia la formación de los arcos faríngeos.

- **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 desarrollo como vísceras, primordios de las extremidades, vestigio de la cola (neuroporo inferior) y de somitas.
- **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.
- **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.
- **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.



anillos en la cola que indican días postcópula
(edad gestacional)

Figura 4. Rata Wistar tal como se recibe de bioterio

Para la disección se requieren materiales de espacio, de tiempo, de forma y humanos:

3.2.2 Materiales de espacio

- Bioterio: Lugar donde es llevada a cabo la producción y cuidado de material orgánico de origen animal, útil en investigación para suministro de especímenes con las edades gestacionales indicadas (Figura 5).



Figura 5. Bioterio Universidad Nacional

- Laboratorio de Fisiología: Donde se dispone de elementos para eutanasia, sacrificio de las ratas y para la preparación de solución fijadora (Figura 6).



Figura 6. Laboratorio de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

- Laboratorio de Histotecnología: Para disección de piezas anatómicas, elaboración y análisis de las láminas. Este es el principal espacio, pues la mayoría de labores prácticas se llevan a cabo en este lugar (Figura 7).



Figura 7. Laboratorio de Histotecnología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia

El tiempo fue descrito en la sección de cronograma.

3.2.3 Materiales de forma

En este grupo se incluyen todos los implementos que se utilizan para los procedimientos de la práctica, dentro de estos materiales se encuentran múltiples categorías:

- Insumos de laboratorio: Guantes, equipo de disección, paraformaldehído al 10% (500 a 1000 cc por espécimen), frascos para guardar el material, cuchillas de bisturí, tabla fijadora, clavos para extremidades, guillotina, agua a chorro, porta objetos y cubre objetos, lugol, xylol, alcohol en diferentes concentraciones, procesador, micrótopo, parafina para fundir a 60°C., paños secantes, toallas desechables, tapabocas, batas, canastas y casetes, cámara fotográfica y de vídeo, computador y microscopio trióptico.
- Bibliografía: Libros y revistas indexadas especializadas en histología, ginecología, veterinaria, embriología, anatomía y biología del desarrollo.
- Software: Herramientas digitales para la elaboración del material didáctico, manipulación de imágenes y producción de material intelectual, entre otros.

3.3 Procedimiento

Se describen a continuación los procedimientos de fijación y disección, en ese orden y de la siguiente manera:

3.3.1 Preparación de la solución fijadora

Inicialmente se prepara una solución con PBS (del inglés, *Phosphate Buffered Saline*) o tampón fosfato salino que se utiliza para neutralizar el pH de la solución fijadora (Figura 8).

Para crear un PBS a una concentración 0,1 Molar en 1000 cc de solución se utilizan los siguientes solutos:

- Fosfato de sodio monobásico: A una concentración de 1 Molar presenta un peso molecular de 137,99 gr/mol, por lo tanto si se requiere una concentración de 0,1 Molar para una solución de 1000 cc, se utilizarán 13,799 gr/0,1 mol.
- Fosfato de sodio dibásico: con un peso molecular de 141,96 gr/mol que a una concentración de 0,1 Molar equivale a 14,190 gr/0,1 mol.
- Cloruro de sodio (NaCl): para una concentración de 0,1 Molar se requieren 5,844 gramos puesto que su peso a una concentración de 1 Molar es de 58,44 gr/mol.

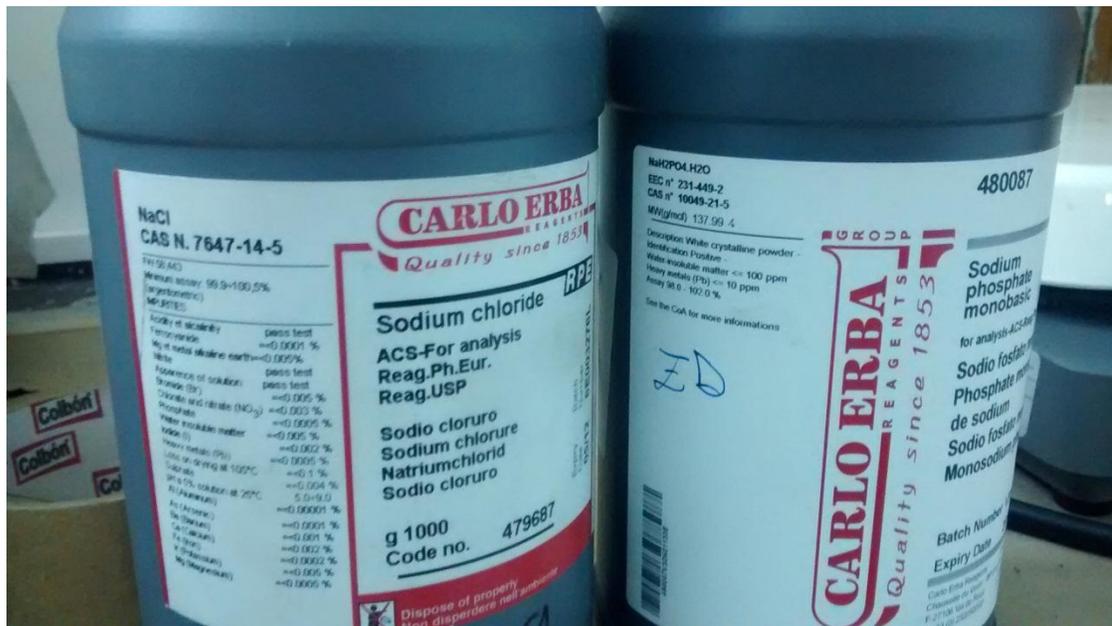


Figura 8. Solutos para preparación de Buffer. Cortesía Laboratorio de Fisiología, U. Nacional

Posteriormente, se agrega el soluto fijador: Paraformaldehído, del cual se espera obtener una concentración de 4%, por lo cual, se agregan 40 gramos del soluto a la solución de 1000 cc (Figura 9).

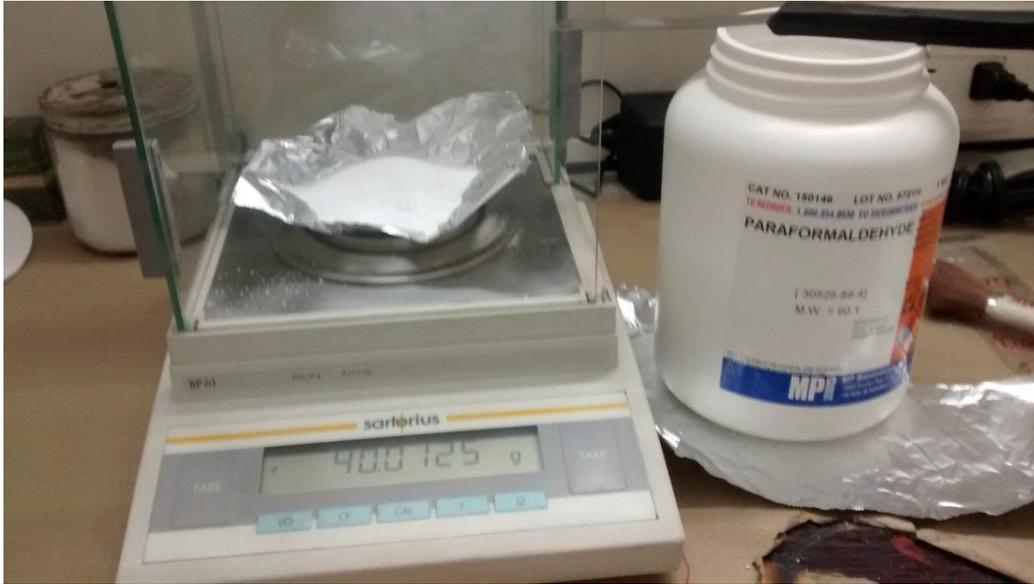


Figura 9. Preparación del soluto fijador

A continuación, los solutos anteriores se disuelven en agua destilada que se calientan a 200°C y 700 revoluciones por minuto hasta disolución completa del soluto en la solución de 1000 cc (1 litro). Al enfriarse se comprueba el pH, el cual debe estar en un rango entre 6 y 8. La solución fijadora ahora está lista para usarse (Figura10).



Figura 10. Disolución

3.3.2 Fijación

Cada una de las ratas en gestación se fija siguiendo normas lo más fisiológicas posibles:

1. Se selecciona la rata, previamente pesada y marcada según su periodo gestacional. Con la mano no dominante se inmoviliza el animal sosteniendo el cuello y el cráneo entre el segundo y tercer dedo del disector (Figura11).



Figura 11. Aplicación de anestesia

2. Se expone el abdomen y con la mano dominante se inyectan en una sola punción ketamina (70 mg/kg) y xilacina (15 mg/kg). 70 mg/kg equivale a 70 mcg/gramo. Cada ml viene con 100 mg, aplicándose entre 0.2ml a 0.5 ml de ketamina. Con la xilacina los 15 mg/kg equivale a 15 mcg/gramo y viene a la misma concentración de 100 mg por cada 1 ml, por lo cual, según el peso de la rata, se aplica alrededor de 0.1 ml de xilacina (15 mg/kg) (Figura 12). (Mudarra Fraguas, 2011).



Figura 12. Preparación de la anestesia

3. Pasados unos minutos, se comprueba la sedación pinzando el extremo distal de la cola; en caso de ser efectiva, el animal no reaccionará ante el dolor (Figura 13).



Figura 13. Comprobación de anestesia efectiva

4. La rata se posiciona en decúbito supino sobre una rejilla que drenará el material biológico (sangre principalmente) para su posterior desecho (Figura 14).



Figura 14. Posición para disección

5. Para la exposición mediastinal, se palpa el esternón como punto de referencia; con tijera curva se realiza un corte paraesternal a ambos lados hasta 1 cm de la punta esternal, se asciende seccionando costal y lateralmente, se pinza el esternón y se retrae ventral y superiormente para exposición del mediastino, en el cual se encuentra el corazón latiendo del roedor (Figura15) (Ávila Martínez, 2010).



Figura 15. Exposición mediastinal

6. Con la aguja del equipo de goteo y asegurando que la llave se encuentre despendiendo solución salina se punciona el ventrículo izquierdo y se abre la orejuela auricular derecha que expulsará el fluido hemático (Figuras 16 y 17).



Figura 16. Punción ventrículo izquierdo



Figura 17. Ruptura aurícula derecha

El goteo se mantiene hasta los hallazgos que indiquen reemplazo de la sangre por la solución salina en su totalidad:

- a. Decoloración del cristalino, pulmones, palmas y plantas de extremidades tornándose de rojas o rosadas a hialinas.
- b. Salida de líquido claro por la auriculilla derecha.
- c. Este proceso implica aproximadamente un gasto de 250 cc de solución salina, por lo cual, dicho proceso se concluirá una vez que por el espécimen haya circulado esta cantidad de solución salina para aclarar tejidos (Figura 18).



Figura 18. Perforación y aclaramiento con solución salina

7. Una vez concluido el aclaramiento se procede a la formalización, para lo cual es primordial el cambio de recolección de líquido que se encuentra inferior a la rejilla, ya que, el paraformaldehído debe ser neutralizado con químicos para su posterior eliminación.
8. Para la formalización se gira la llave del equipo de goteo bloqueando la salida de solución salina y permitiendo el flujo del paraformaldehído, para ello se utilizan aproximadamente 250ml. El disector comprueba una eficiente formalización en el momento en que la rata se pone rígida y presenta fasciculaciones (Figura 19).



Figura 19. Comprobación de rigidez secundaria a formalización

9. Se procede a dejar las extremidades en aducción sujetas a una superficie dura y asegurándose que el vientre se estire y se exponga a la solución fijadora para facilitar su posterior disección.
10. Se sumerge la totalidad del animal en la misma solución fijadora por mínimo 48 horas.
11. Se recolectan los líquidos biológicos para su eliminación y el paraformaldehído para su neutralización en recipientes individuales.

3.3.3 Disección

Una vez concluido el tiempo de fijación recomendado, se procede a la disección del espécimen.

1. Con el peritoneo expuesto se busca el útero bicornio cuyos extremos apendiculares tienden a posteriorizarse, se desprenden con cuidado y se secciona a partir del cuello uterino dejando libre la vagina del animal (Figura 20).

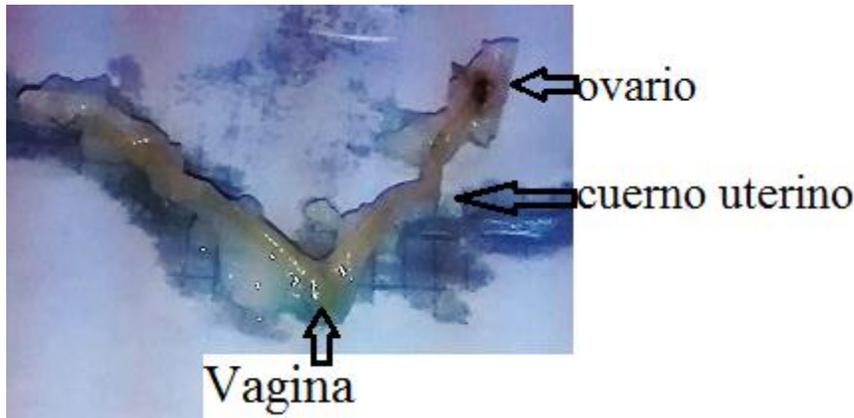


Figura 20. Útero de Rata Wistar

2. El aparato reproductor femenino se incluye en solución fijadora y se deja mínimo por 48 horas para completar su proceso de fijación (Figura 21).



Figura 21. Fijación

3.3.4 Preparación

1. Los úteros bicornios ya fijados se seccionan delimitando los espacios embrionarios dentro de cada cuerno uterino (Figura 22).



Figura 22. Seccionamiento previo a procesamiento

2. Las porciones pasan a formar bloques de parafina por medio de un casete (Figura 23).



Figura 23. Bloque de parafina

3. Una vez el bloque quede listo, se procede a cortar con el micrótopo a 5 micrómetros en pequeñas hojas que serán puestas en el portaobjetos. En ese momento se debe quitar el exceso de parafina para lo cual se lleva a temperatura de 60°C (Figuras 24 y 25).



Figura 24. Corte



Figura 25. Desparafinación

4. La lámina queda lista para ser coloreada con hematoxilina y eosina (Figura 26).



Figura 26. Coloración

5. Las láminas teñidas se cubren con laminilla y una vez se sequen quedan listas para su visualización al microscopio (Figura 27).



Figura 27. Microscopio de luz

3.3.5 Análisis

Cada una de las láminas será detalladamente analizada para lograr la descripción de cada uno de los grupos celulares embriológicos. Debido a que el análisis se realiza una vez obtenidas las láminas, existe un capítulo exclusivo para el análisis de resultados.

Capítulo 4: CONSIDERACIONES ÉTICAS

4.1 Bioética

El hecho de trabajar con material biológico implica consideraciones éticas que deben estar explícitas para desarrollar procesos investigativos justificables. Los avances científicos abren más posibilidades cada día y por lo tanto, mayores compromisos de los cuales el investigador se hace responsable. En este trabajo están definidos los propósitos de análisis y la utilidad didáctica que el espécimen aporta lo que legitima el uso de los embriones.

La investigación se rige éticamente y responde a la nación según la Resolución 8430 de 1993 “por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”. El Título V, Artículo 87, expone las condiciones que el equipo investigador debe seguir al emplear animales como material de investigación, y el Artículo 88 del mismo Título contempla la necesidad de una justificación ante el uso de animales como herramienta didáctica en las instituciones educativas: “El uso de animales en la investigación, enseñanza y ensayos es aceptado solamente cuando promete contribuir a la comprensión y avance del conocimiento de los principios fundamentales biológicos o al desarrollo de mejores medios para la protección de la salud y el bienestar tanto del hombre como del animal” (Ministerio de Salud, República de Colombia, 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).

Es necesario ejercer un control sobre los niveles de dolor que se producen, asegurando condiciones óptimas de cuidado. Toda forma de vida deber ser respetada y protegida; el respeto hacia los animales, en trabajos como esta investigación, no es incompatible desde el punto de vista bioético con el valor del conocimiento, “teniendo claro que respetar no es no tocar: es valorar, comprender y estimar lo que se toca y sobre todo, hacerse responsable de todo lo que se toca” (Montenegro, Gayol, & Tarrés, 2011).

Para lograr la anestesia se utiliza una combinación de sedante, analgésico y relajante muscular, fármacos aprobados por la Asociación Colombiana de Veterinarios y Zootecnistas (ACOVEZ) y cuya eficacia ha sido previamente comprobada. En este trabajo se opta por el uso aprobado de Xilacina y Ketamina, aplicado de manera intramuscular con dosis calculadas según el peso.

La comprobación de la sedación y analgesia se realiza pinzando la punta de la cola del animal, si no reacciona pero mantiene signos vitales normales, la sedación y analgesia es óptima.

En cuanto a la eutanasia del animal, una vez anestesiado y sedado el espécimen, se aborda intracardiamente y se hace 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.

Dentro de la Resolución 8430 de 1993 se considera lo establecido en el artículo 87, en su enunciado g, que explica que todo tipo de dolor debe ser evitado con una analgesia comprobada, y en su enunciado ante el fallecimiento inminente del animal, el investigador debe asegurarse de que el mismo sea sin dolor.

De igual manera, la ley 84 de 1989 del Congreso de Colombia, establece en su capítulo V, artículo 17, los casos en los cuales se permite el sacrificio de un animal no destinado para el consumo humano, para este caso con fines investigativos o científicos (Congreso de Colombia, 1989).

En vista de que el proyecto no incluye investigación sobre seres humanos, recibe una calificación tipo A de riesgo inherente a la investigación, según lo establecido en el artículo 11 de la Resolución 8430 de 1993. Se trata de una investigación sin riesgo para el ser humano ya que el estudio no incluye la participación de seres humanos como objeto de estudio.

4.1 Bioseguridad y declaración de impacto ambiental

Una vez se ha hecho uso al máximo del material biológico, los desechos deben disponerse en bolsa roja para su posterior incineración. En cuanto a los reactivos utilizados, el principal desecho es el sobrante de la solución fijadora, compuesta por formol, solución salina y buffer fosfato; la cantidad estimada para ser neutralizada se calcula entre 3 a 5 litros que van a ser cuantificados y envasados en recipientes de plástico para ser neutralizados con agentes químicos, según lo establecido por el protocolo de bioseguridad del laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

Las ratas disecadas serán utilizadas para obtención de más material útil en histología y futuros proyectos. Una vez utilizado este material biológico, se desechará en bolsa roja.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS

La preparación de las láminas fue realizada por lotes para seleccionar los mejores métodos de corte y de fijación. Por sugerencia del patólogo Dimas Contreras, las muestras fueron deshidratadas en alcohol etílico al 90% para mejorar la calidad del procesamiento; este paso no fue descrito en metodología puesto que se realizó luego de procesar las primeras muestras.

Como se describe en la introducción, previamente se inició un trabajo del cual solo se obtuvieron embriones del día 13 que son útiles didácticamente, por lo cual, se describen y analizan esas láminas histológicas.

En este apartado es oportuno mencionar el tipo de disecciones hechas. Tal como se observa en la figura 2, la superficie ventral del embrión queda anclada a la pared interna del cuerno uterino, por lo cual se opta por disecar segmentos de la trompa uterina en los cuales se observa aumento del diámetro, o bien, se estima que puede haber un embrión en crecimiento. Estos segmentos se obtienen haciendo cortes transversales y espaciados a lo largo del cuerno uterino.

Los segmentos disecados a su vez son orientados en tres posiciones en el casete previo a su procesamiento, para lograr los cortes coronal, transversal y parasagital de los embriones. A continuación se explican de manera detallada:

1. Corte coronal: Se orienta el segmento del cuerno uterino de manera que sus superficies mediales y laterales queden en contacto con la rejilla del casete. Para ubicar la superficie interna se debe reconocer la arteria uterina; de esta manera las superficies del segmento, donde hay corte transversal, quedan libres dentro del casete.
2. Corte transversal: Se sigue el mismo sentido de corte de la segmentación; las superficies de corte transversal quedan en contacto con las rejillas del casete, dejando libres las superficies uterinas (mediales, laterales, posteriores y anteriores).
3. Corte parasagital: Se coloca el segmento orientando el borde medial, es decir, el arterial, libremente dentro del casete, al igual que las superficies de corte transversal para segmentación, quedando entonces en contacto con la rejilla la superficie posterior y anterior del cuerno uterino.

Los resultados concluyentes, en los cuales se logra ubicar el tejido embrionario, se describen:

5. 1. Resultados embrionarios

5.1.1 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 blastocele, 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 (Lámina número 1).

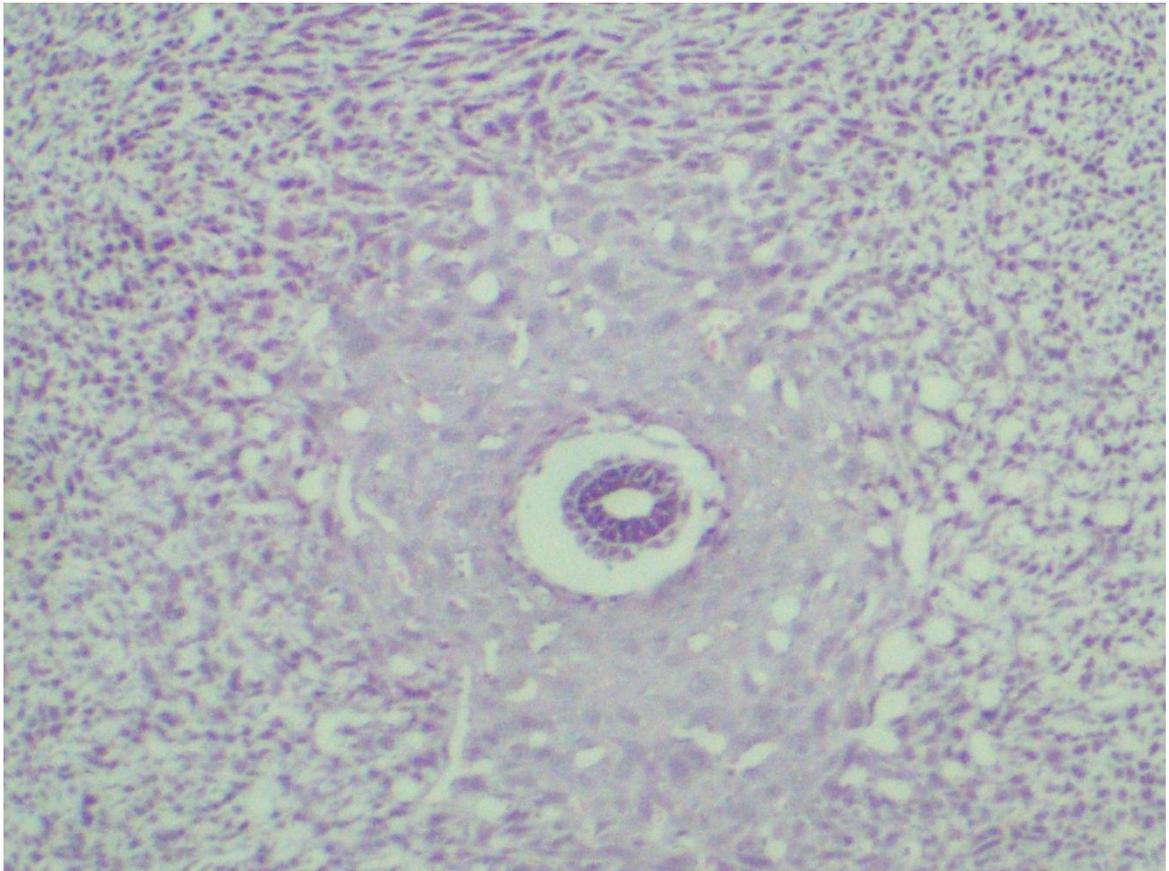


Lámina 1. Día 7, 10x

En la siguiente lámina se observa un acercamiento de la placa histológica anterior, para examinar de manera detallada los tejidos embrionarios y tejidos adyacentes. Se muestran dos capas de tejido embrionario; una externa cuboide simple y eosinófila, con gran cantidad de gránulos de contenido hialino y una capa interna que configura un epitelio primitivo pseudoestratificado más basófilo. Se presume, según los hallazgos, que la capa epitelial externa corresponde al epiblasto y la interna al hipoblasto, entre ellas ocurre una distribución y diferenciación para formar la capa amniótica y el disco bilaminar, por lo cual, el espacio comprendido en el interior se identifica como la cavidad amniótica o el saco vitelino primario.

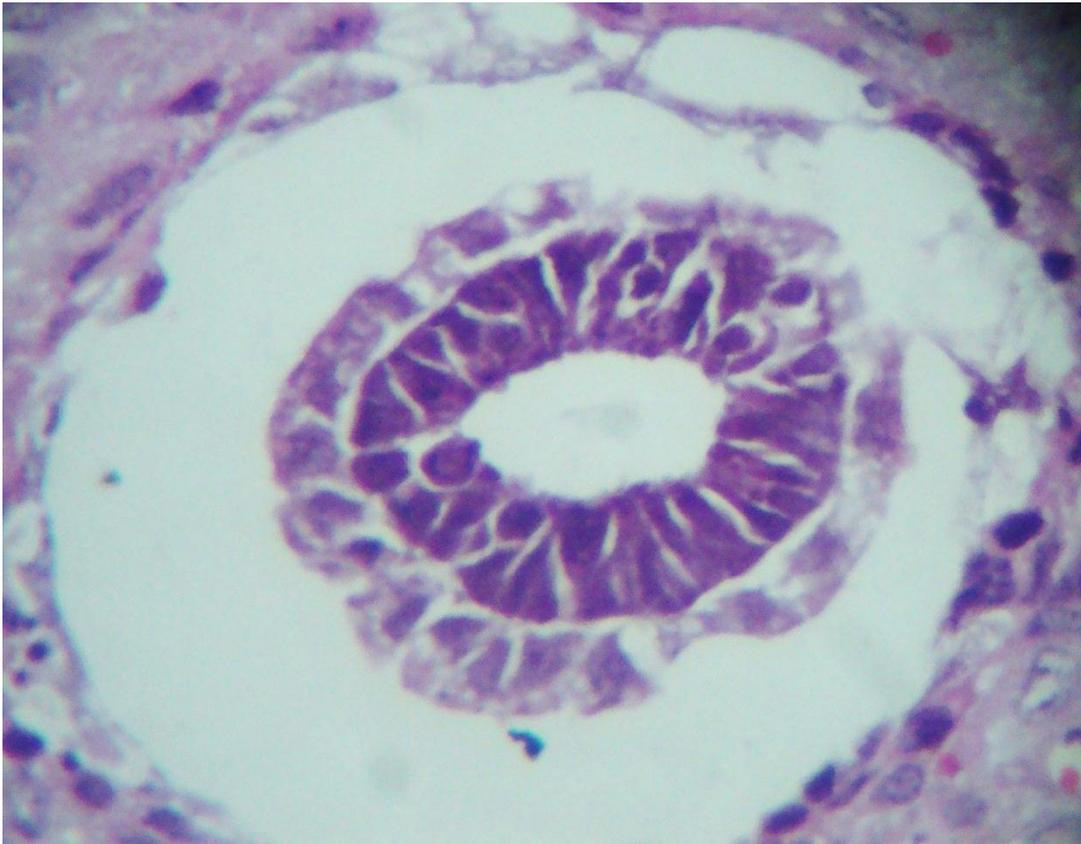


Lámina 2. Día 7, 40x

Periféricamente a este tejido embrionario, se encuentra un espacio identificado como el blastocele, circunscrito por tejido trofoblástico.

El trofoblasto se forma por dos tipos de grupos celulares: el citotrofoblasto, que tapiza la superficie interna del blastocele y se caracteriza por estar formado por células aplanadas formando una monocapa de tejido. En su periferia se encuentra un tejido conformado por el sincitotrofoblasto mucho más grueso que el anterior y que se adentra a la decidua. En la lámina 3 se señalan las características celulares pertenecientes al disco embrionario y al trofoblasto en la transición que sucede del estadio 4 al 5.

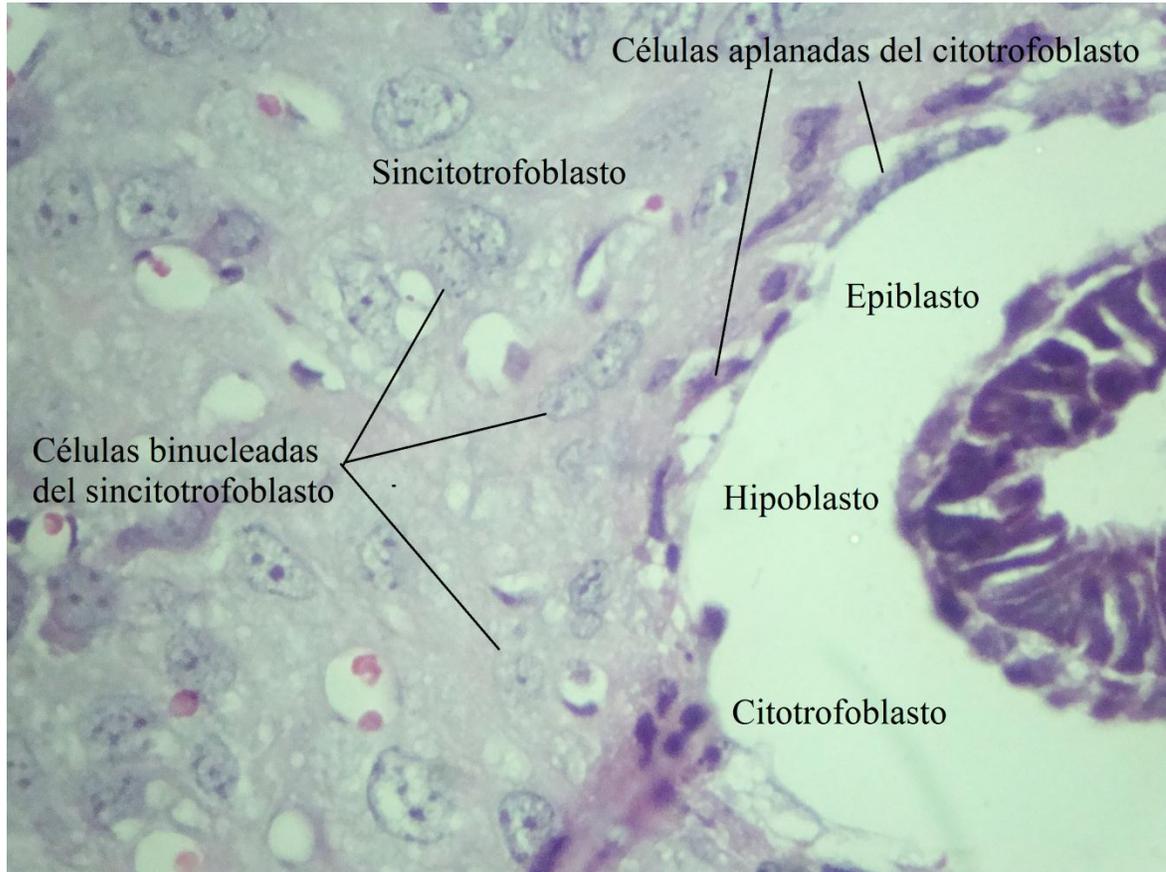


Lámina 3. Día 7, 40x. Trofoblasto y blastocisto

5.1.2 Día 10

Se obtiene nuevamente un embrión en el útero de la rata hasta el décimo día de gestación, el cual se puede visualizar en la lámina 4. Gracias a un corte coronal del útero, se observa abundante tejido endometrial grávido y tejidos que van a conformar la placenta y en el centro, la estructura embrionaria.

Las estructuras que se representan en la imagen, del centro a la superficie, son: en todo su centro una cavidad amniótica rodeada por las tres capas embrionarias propios del período de gastrulación. Esta estructura embrionaria, a su vez, se encuentra circunscrita por el blastocele que está tapizado por una capa de células del citotrofoblasto y por un tejido más grueso o sincitotrofoblasto. Periféricamente se encuentra la decidua del útero de la rata. Acercándose a la pared del mismo se encuentra el miometrio y superficialmente el perimetrio.

De manera más detallada se observa un acercamiento del tejido central en la lámina 5.

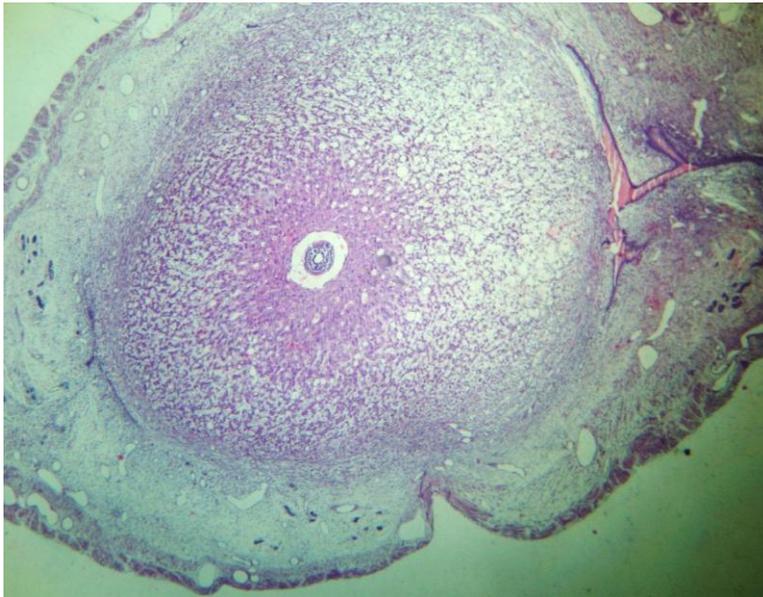


Lámina 4. Embrión in utero 10 días, 4x.

En la lámina 5 se visualizan con mayor detalle, las estructuras propias de la gestación. A nivel embrionario, intrínsecamente se observan tres capas circunscritas, rodeadas por el blastocele y hacia la periferia, el tejido trofoblástico que se divide en citotrofoblasto y sincitotrofoblasto. Esta última capa se encuentra en contacto íntimo con el endometrio.

En el trofoblasto se enseña la formación de capilares que se caracterizan por un contenido hemático; las células que configuran el tejido se caracterizan además, porque sus células centrales son eosinófilas y las periféricas se tornan más hialinas.

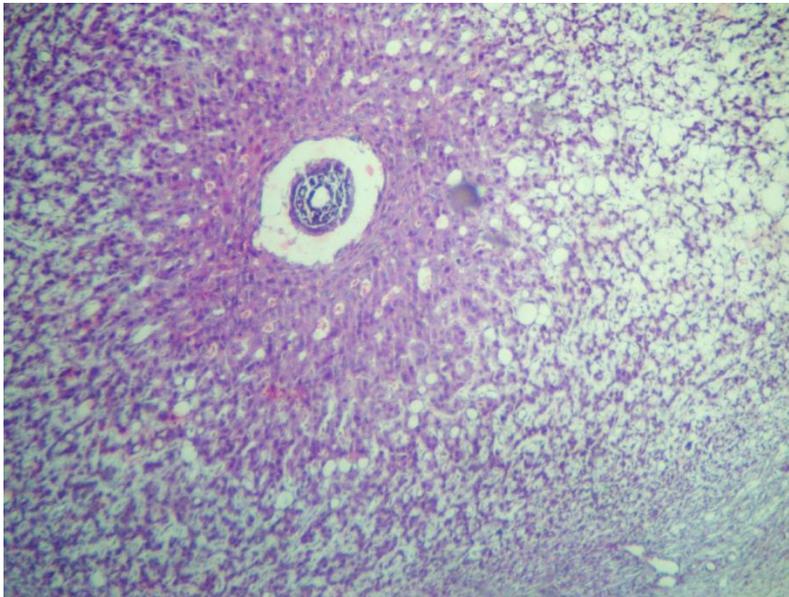


Lámina 5. Embrión in utero 10 días, 10x.

En la siguiente lámina se observa un acercamiento al embrión de la placa anterior. Vale la pena resaltar que los tejidos trofoblásticos no presentan mayores cambios respecto a los ya descritos en el día 7 y que se ven de modo más detallado en el apartado 5.2.

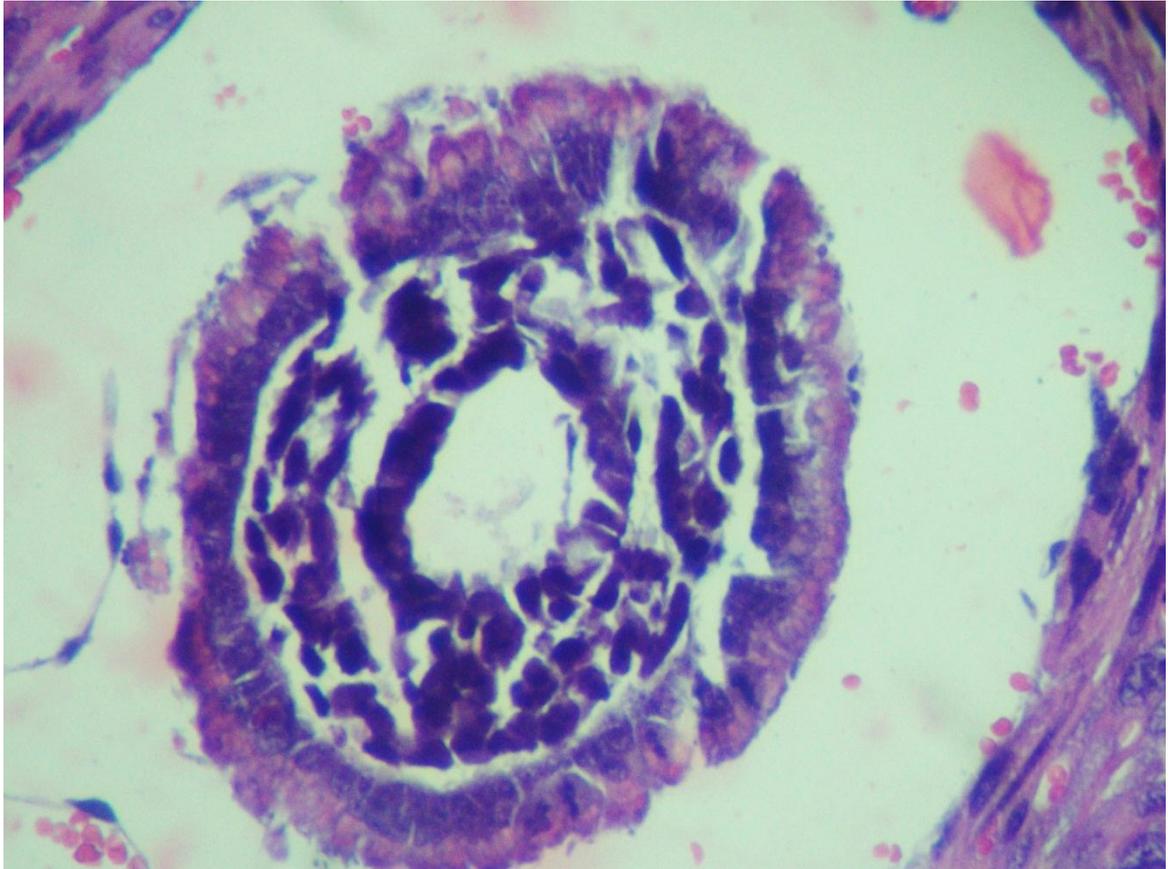


Lámina 6, Día 10, 40x

En este caso, se ven las características de los grupos celulares de cada una de las tres capas del disco embrionario -aun no formado-. 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 blastocele. 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.

La capa más externa corresponde al ectodermo que se caracteriza por estar constituido 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.

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.

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.

5.1.3 Día 11

En el día 11 de gestación se encuentra un consecuente aplanamiento del tejido embrionario que previamente se vio de forma circular. El aplanamiento se distingue en las láminas de la 7 a la 10 y cada una corresponde a acercamientos cada vez más próximos. Las características celulares son similares a las del día 10, con la diferencia de un aplanamiento visible.

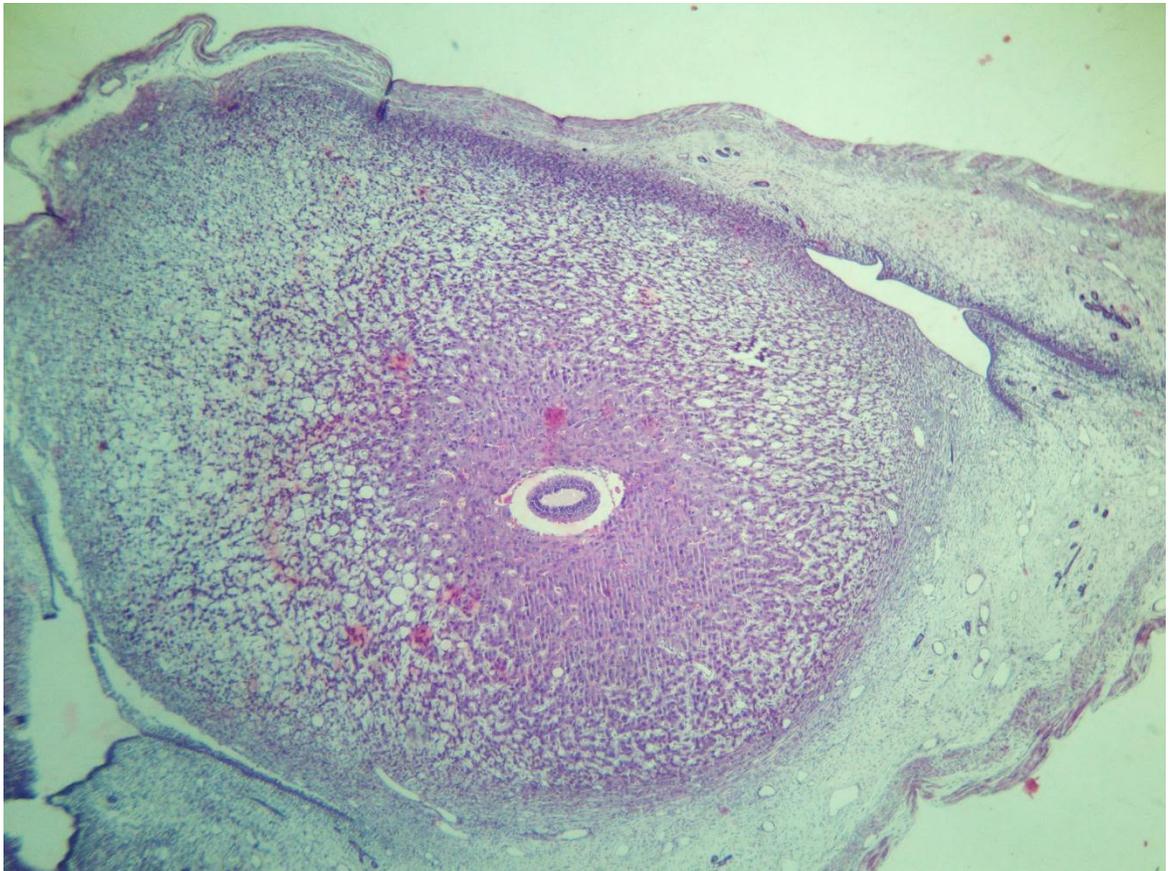


Lámina 7, Día 11, 4x

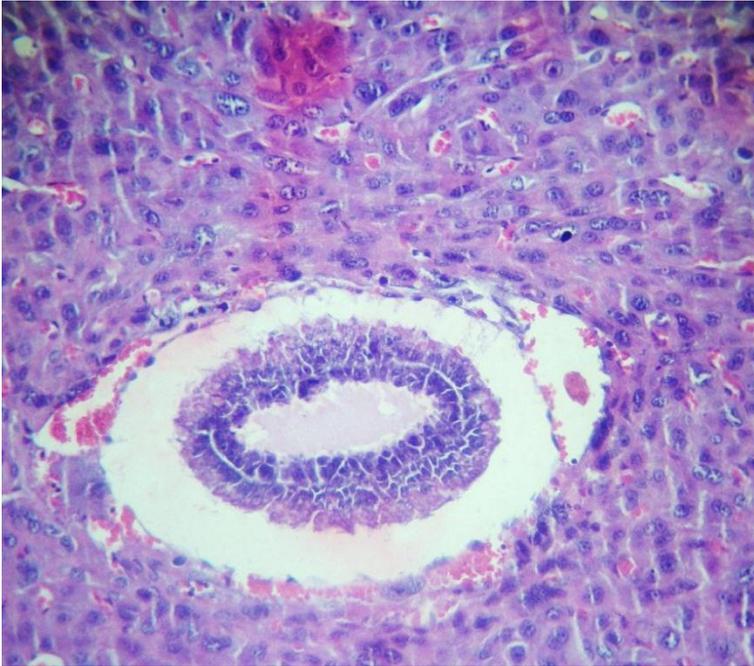


Lámina 8, Día 11, 20x

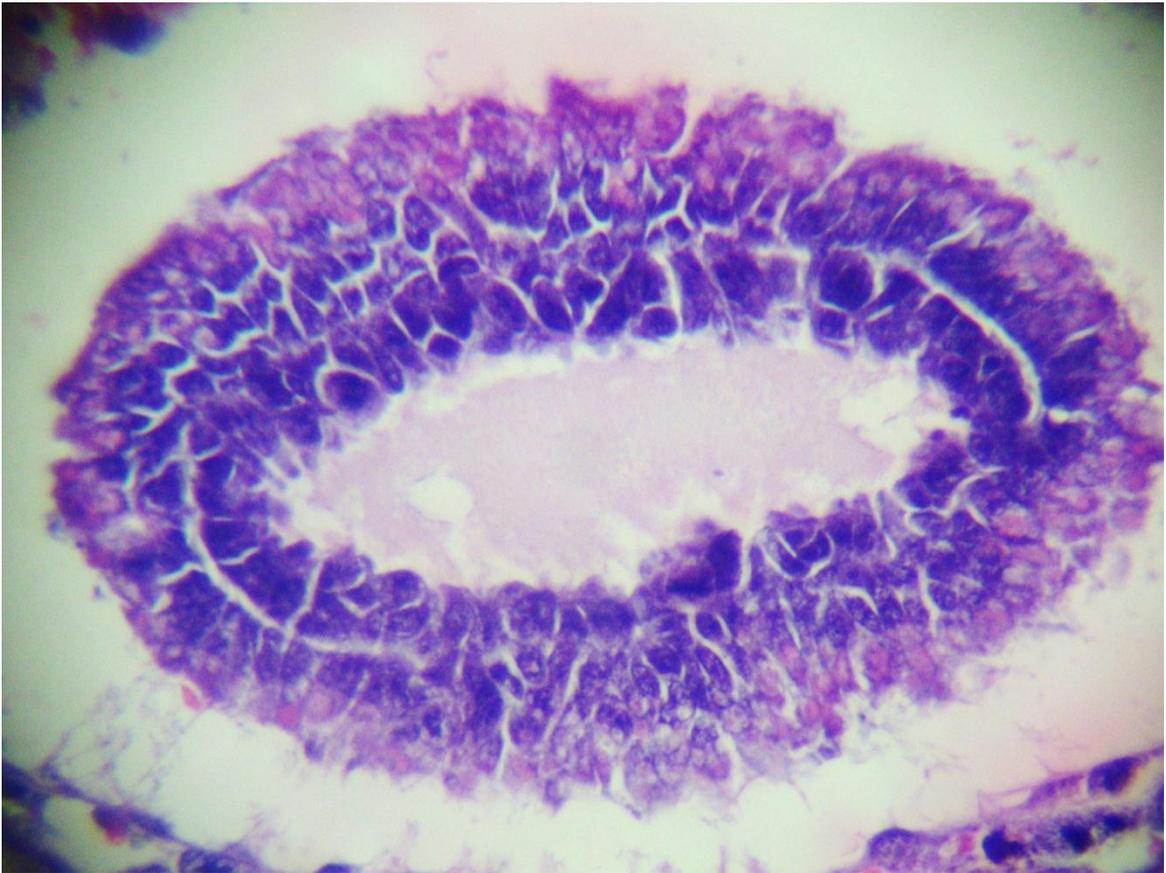


Lámina 9, Día 11, 40x

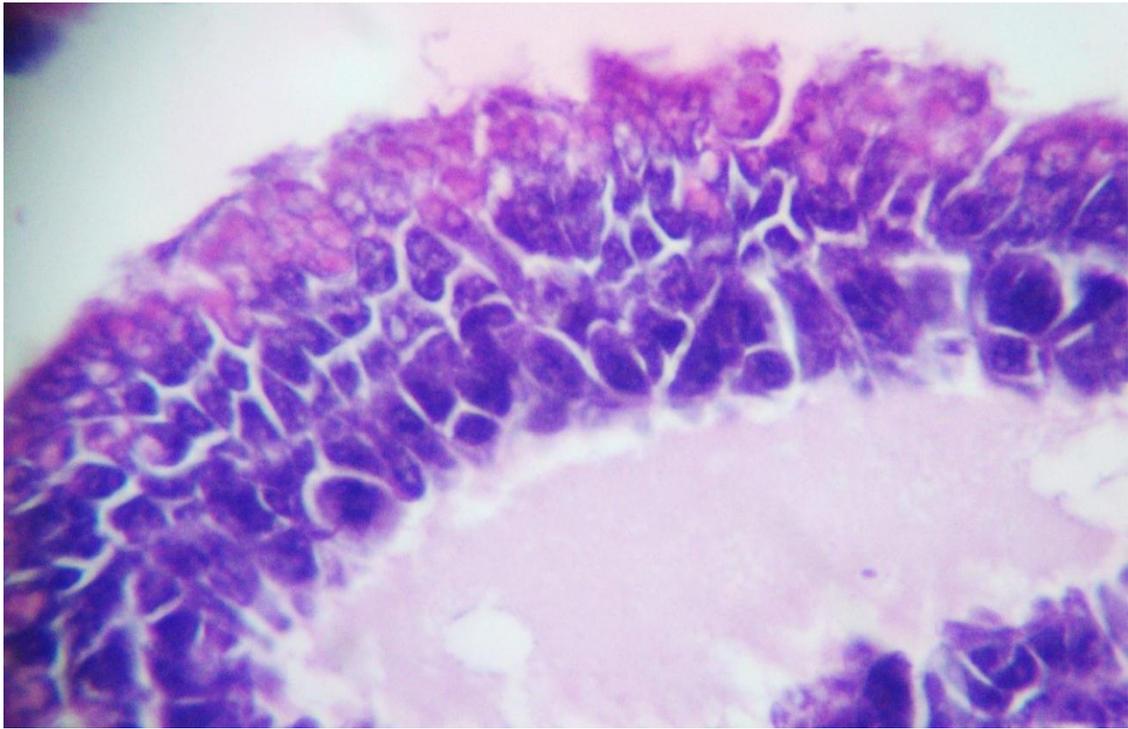


Lámina 10, Día 11, 40 x

En esta última lámina se visualiza en detalle cada uno de los grupos de hileras celulares que se definen como las capas embrionarias de la gastrulación.

La más periférica, el ectodermo, se caracteriza por ser una monocapa pseudoestratificada de células cilíndricas, que en su superficie apical tiene pliegues similares a microvellosidades e intracitoplasmáticamente se observan vesículas repletas de material eosinófilo-anaranjado que como se anunció previamente, puede tratarse de gránulos con contenido glucoproteico.

5.1.4 Día 12

En algunos cortes del día 12, se encontró tejido adherido a la pared endometrial por medio de unas células aplanadas (similares al amnios) y nutrido con abundantes vasos sanguíneos, tal como se puede apreciar en la lámina 11, por lo cual, se optó por profundizar especialmente en este bloque histológico.

En las láminas 12 y 13 se hace énfasis en el tejido que forma el pedículo de fijación embrionario. Además se evidencia un tejido compuesto por células blásticas aplanadas y un gran contenido de islotes sanguíneos. Una de las estructuras más evidentes es el amnios.

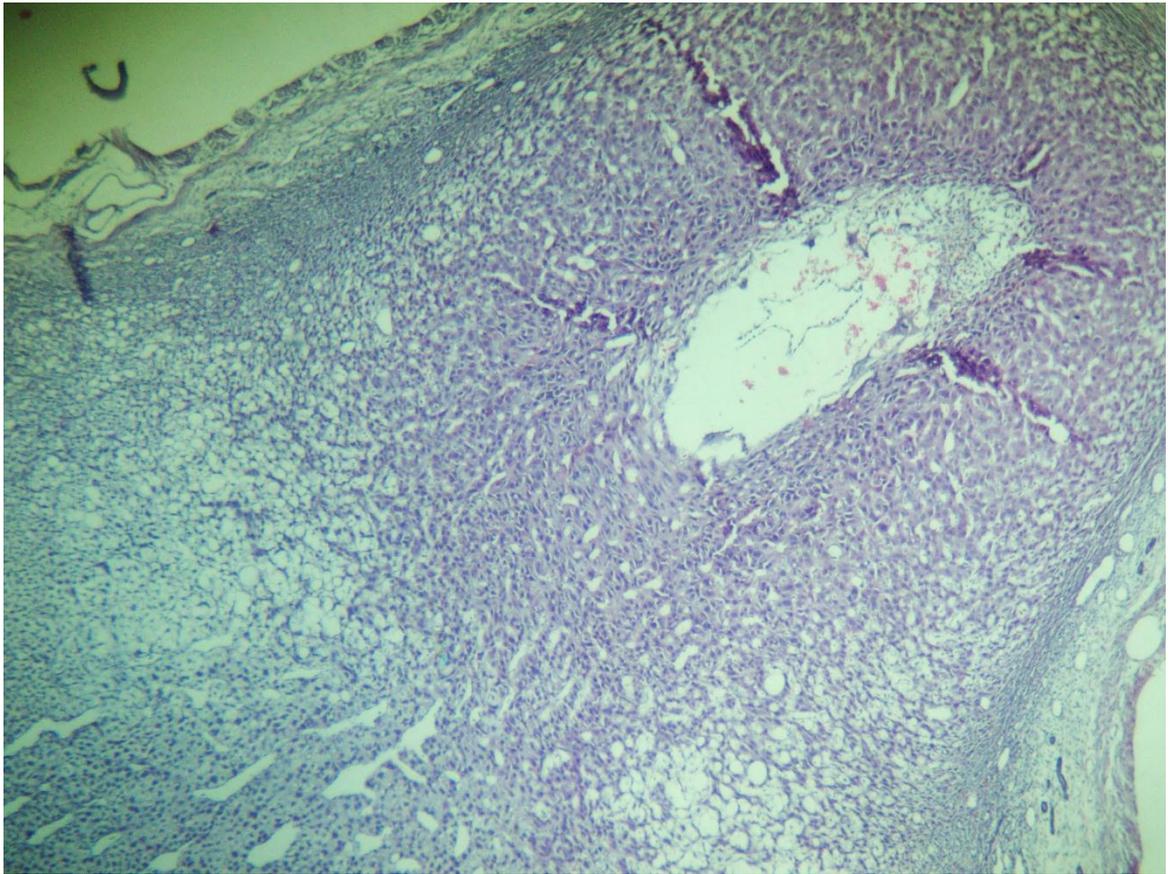


Lámina 11, Día 12, 4x

El amnios se encuentra conformado por una capa simple celular plana con núcleos elevados y de poco contenido intracitoplasmático; esta capa rodea un espacio que in vivo se encuentra llena de líquido amniótico en formación. La membrana amniótica primitiva se encuentra rodeada por un espacio identificado como el celoma extraembrionario, donde se encuentra parte de las células trofoblásticas e islotes sanguíneos libres propios del procedimiento de fijación.

Al seguir el recorrido de la membrana amniótica, aparece un punto de intersección pedicular, donde se encuentra un grupo celular blástico formando capas celulares poco organizadas. Cada célula presenta un aspecto mesenquimatoso; algunas formas celulares son fusiformes y otras poligonales, todas con contenido hialino intracitoplasmático y con una orientación de anclaje endometrial.

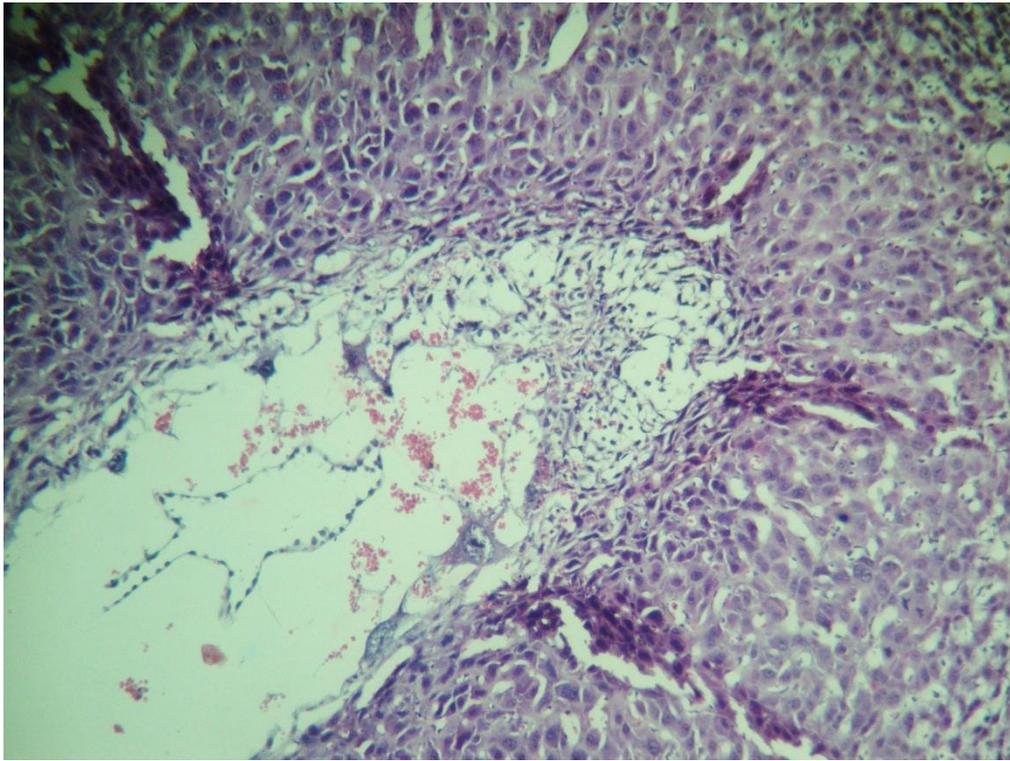


Lámina 12, Día 12, 10x

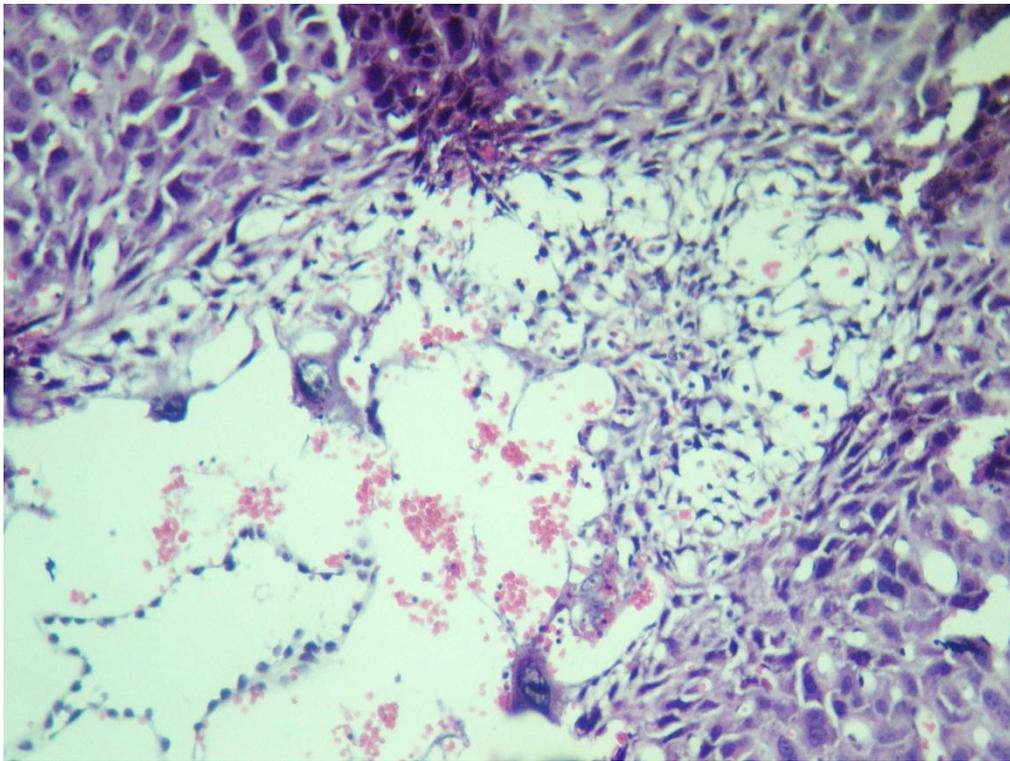


Lámina 13, Día 12, 20x

Con el fin de fortalecer la utilidad didáctica del tejido, se realizan cortes más profundos del bloque hasta encontrar estructuras con mayor grado de diferenciación tisular.

En la lámina 14 se presenta un embrión con su pedículo de fijación, rodeado por la cavidad amniótica y esta, a su vez, por el celoma extraembrionario. Gran amplitud del espacio uterino está ocupada por el trofoblasto y la decidua.

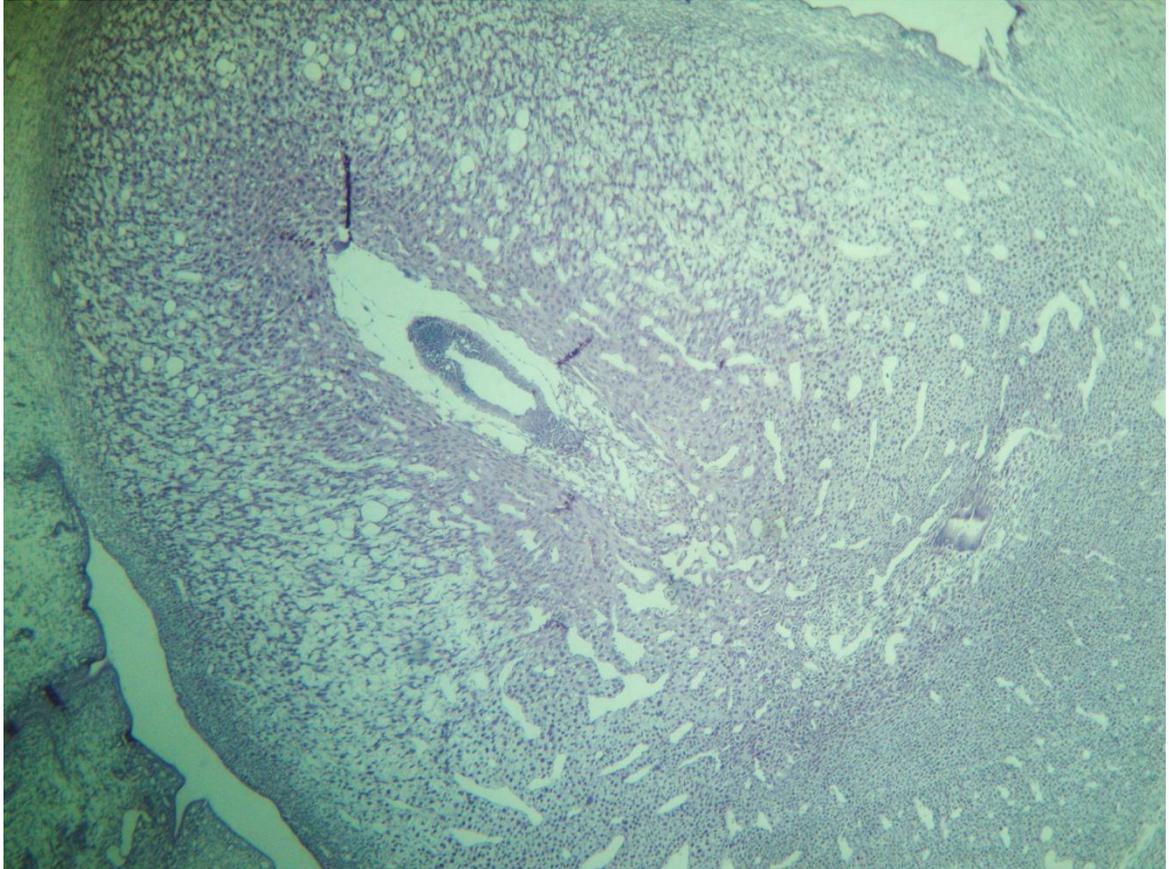


Lámina 14, Día 12. 4x, Pedículo de fijación

Con un acercamiento al embrión de la lámina 15 se reconoce el modo en el que el amnios rodea todo el embrión desde y girado en torno al pedículo de fijación.

Se presume que el corte se realiza de manera axial, porque hacia el dorso se nota la notocorda y el neuroectodermo; sin embargo la luz del tubo neural no es visible, a pesar de que ya se haya formado.

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

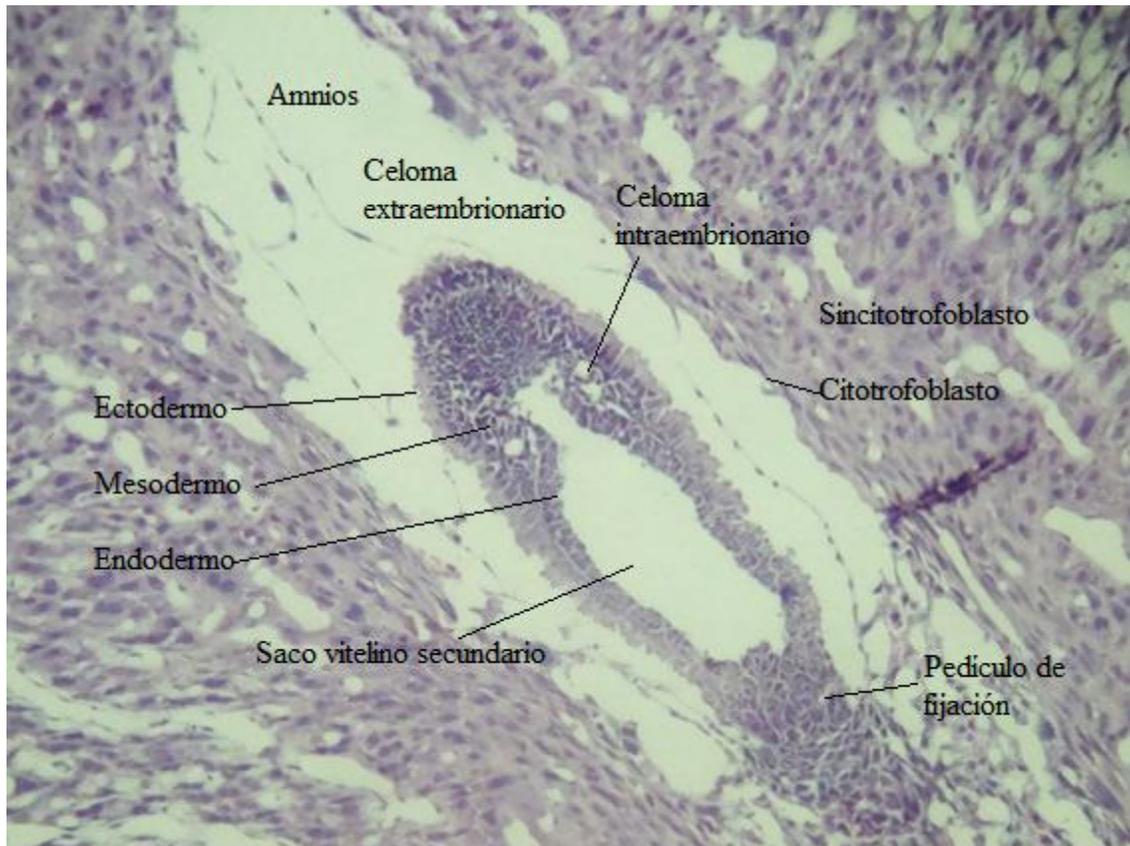


Lámina 15, Día 12, 10x

El saco vitelino queda 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.

En la lámina 16 se identifican las estructuras comprendidas entre el trofoblasto y el embrión. Periféricamente figura parte de la decidua y del sincitotrofoblasto. Hacia la luz se encuentra la capa de citotrofoblasto y en contacto con esta, el celoma extraembrionario. Se distinguen una capa de amnios y finalmente la porción dorsal del embrión que se puede identificar con un mayor acercamiento en la lámina.

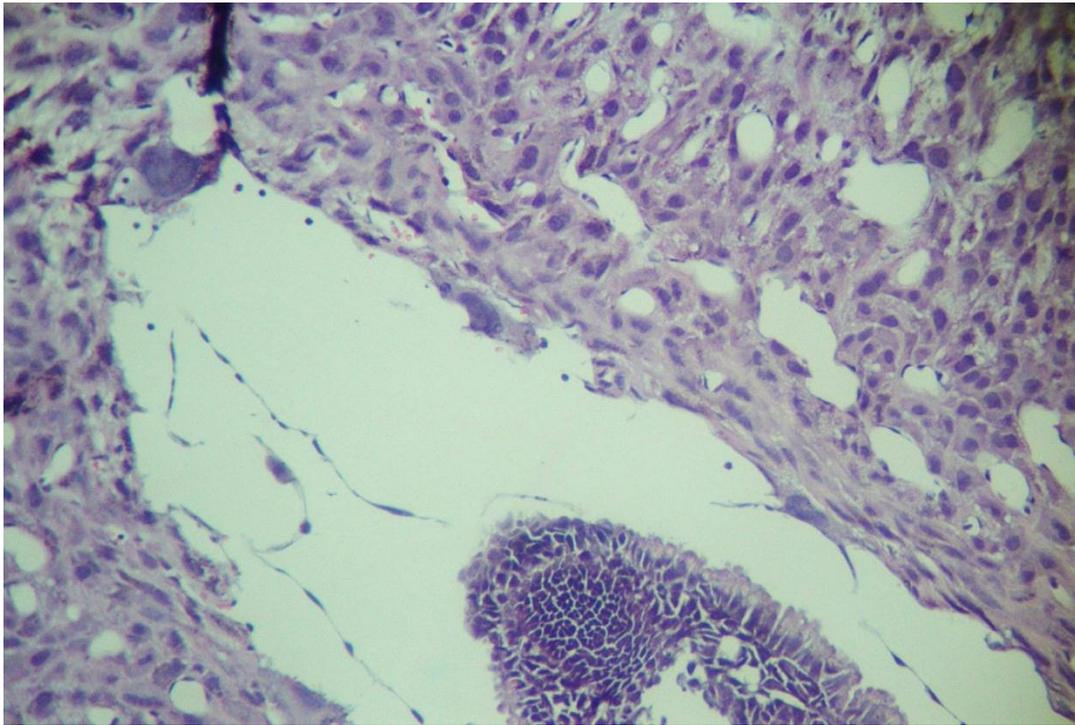


Lámina 16, detalle de amnios y dorso de embrión de 12 días, 20x

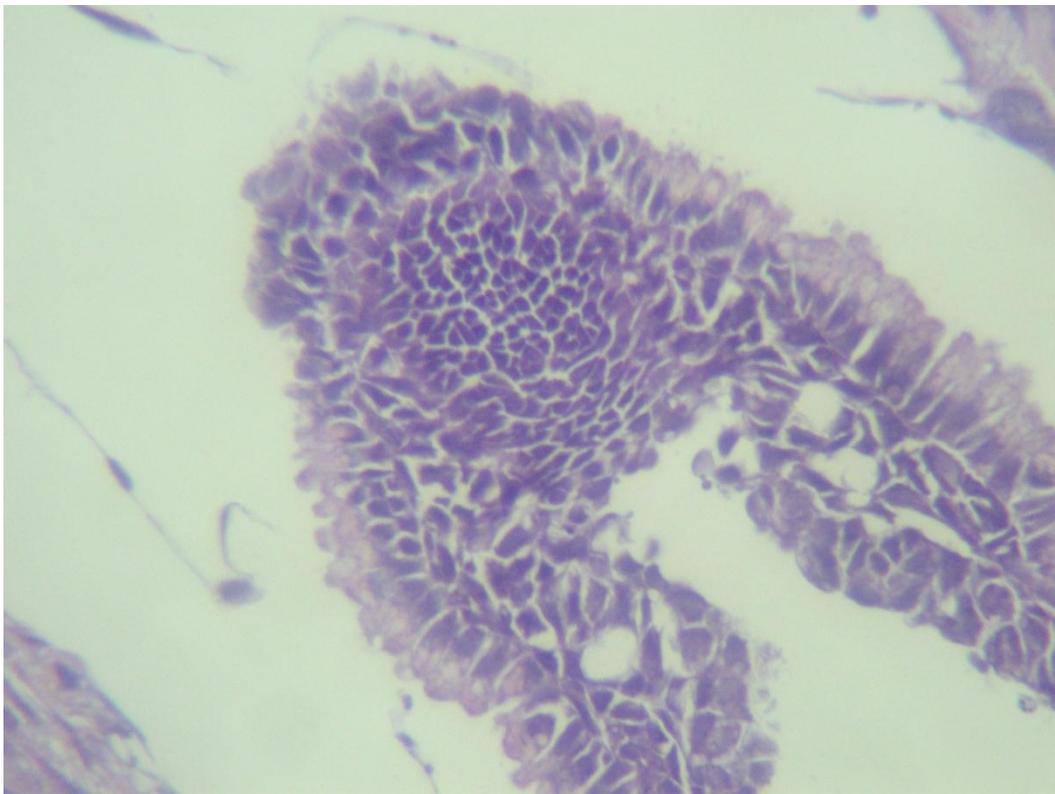


Lámina 17, Dorso de embrión de 12 días, 40x

La lámina 17 muestra un grupo de células centrales que conforman la notocorda; periféricamente se encuentra el neuroectodermo, el cual se distingue de los otros tejidos por ser mayormente basófilo. Lateralmente y sobre la superficie se visualiza una línea de células similares a las descritas en el epiblasto, línea que mantiene sus características para la formación del ectodermo de superficie, descrita en la siguiente lámina.

Con mayor definición se ven a lo largo del embrión las capas embrionarias en la lámina 18 y en la lámina 19 se observa un acercamiento al pedículo de fijación embrionario:

En la lámina 18 se distinguen dos capas celulares, una superficial, descrita como el ectodermo de superficie, formada por células cilíndricas, cuyo ápice parece tener vellosidades e intracelularmente gránulos con contenido eosinófilo y anaranjado. La segunda capa está en contacto con la cavidad central del embrión o saco vitelino, caracterizada por sus células poliédricas y de menor tamaño. Entre estas dos capas hay dos espacios a cada lado, que conforman el celoma intraembrionario. El grupo celular adyacente es el mesodermo migratorio, razón por la cual, sus células se ven más fusiformes que las de las demás capas embrionarias.

Teóricamente se sabe que el mesodermo cercano a la notocorda y al celoma intraembrionario se dispone de medial a lateral en tres grupos celulares: el mesodermo paraxial, el intermedio y el lateral, tomando como eje la localización de la notocorda; sin embargo no se reconocen con exactitud.

Anotación específica del día 12

Es necesario explicar que las descripciones de las estructuras de las láminas de este trabajo se hacen partiendo de las referencias bibliográficas, por esto, el espacio bilateral que se ha descrito como el celoma intraembrionario, puede tratarse de la vesícula ótica (García Peláez, Árteaga Martínez, & Alegría Baños, 2015).

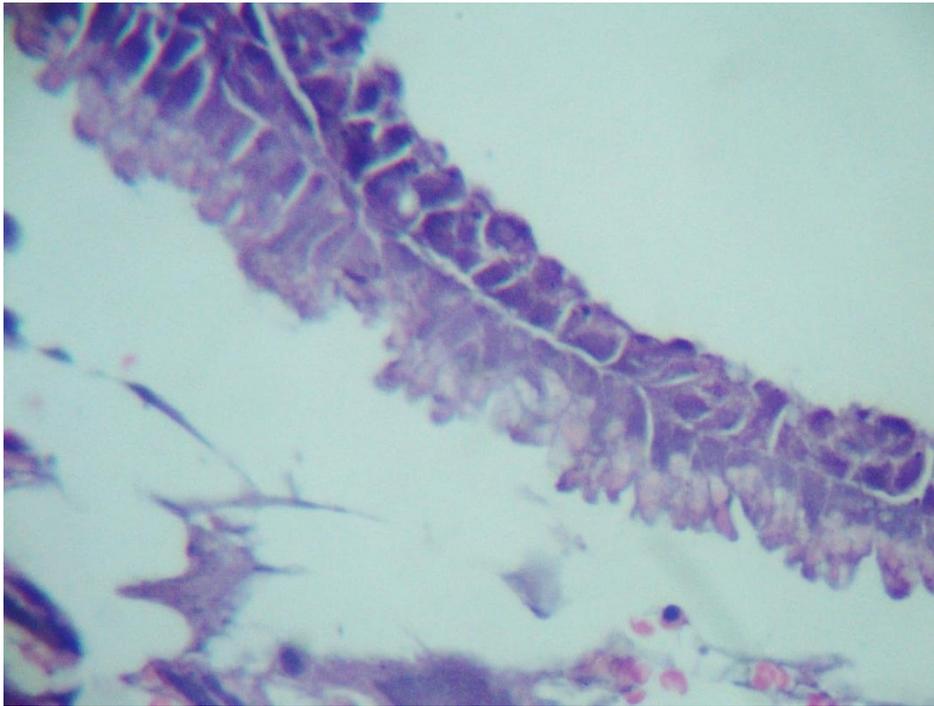


Lámina 18, detalle de capas embrionarias, 12días, 40x

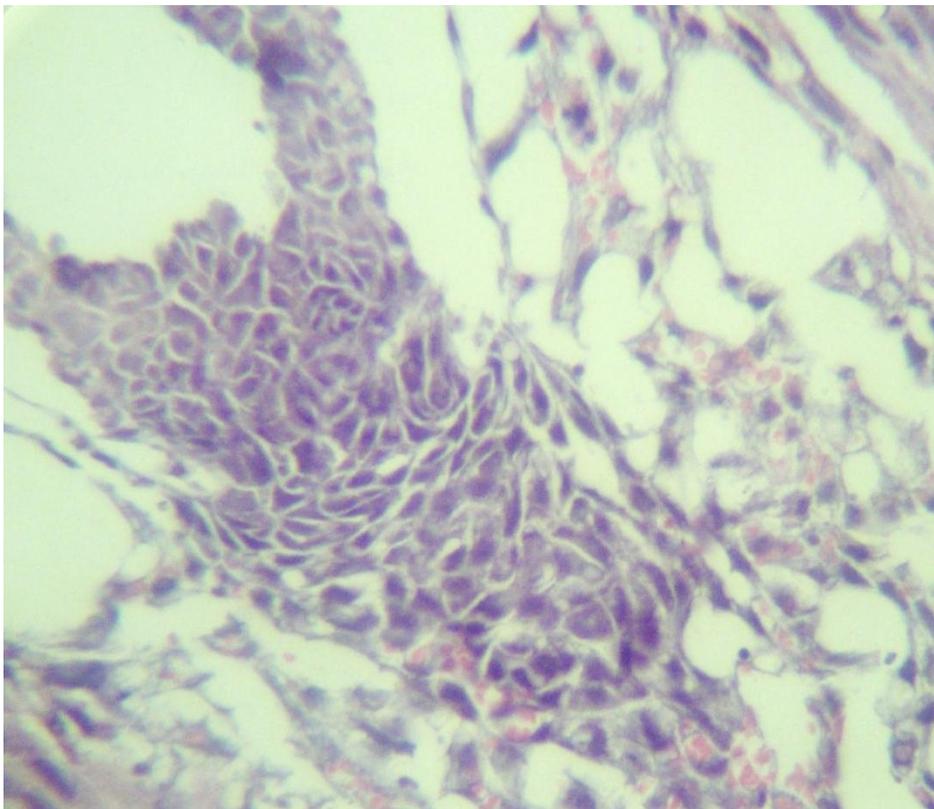


Lámina 19, pedículo de fijación, día 12, 40x

5.1.5 Día 13

Los hallazgos del día 13 se caracterizan por ser los más provechosos a nivel didáctico; característicamente, se muestran suficientes hallazgos histológicos y casualmente la literatura muestra, según datos experimentales de otras entidades, que el día 13 de gestación es el día embrionario que mayor documentación aporta.

A continuación se describen corte por corte los elementos embriológicos hallados:

Corte 1

Este corte es el más superior de los múltiples cortes del día 13. Los elementos embriológicos visibles se nombran en cada lámina. Son evidentes principalmente el neuroectodermo, el tubo neural, algunos ganglios y las vesículas cerebrales en desarrollo. El corte estimado se representa en la figura número 28, adaptación de la obra “embrión de 4 semanas” de la artista Corina Chirila (Chirila) y en la lámina 20.



Figura 28, corte 1, día 13

En la lámina 20 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.

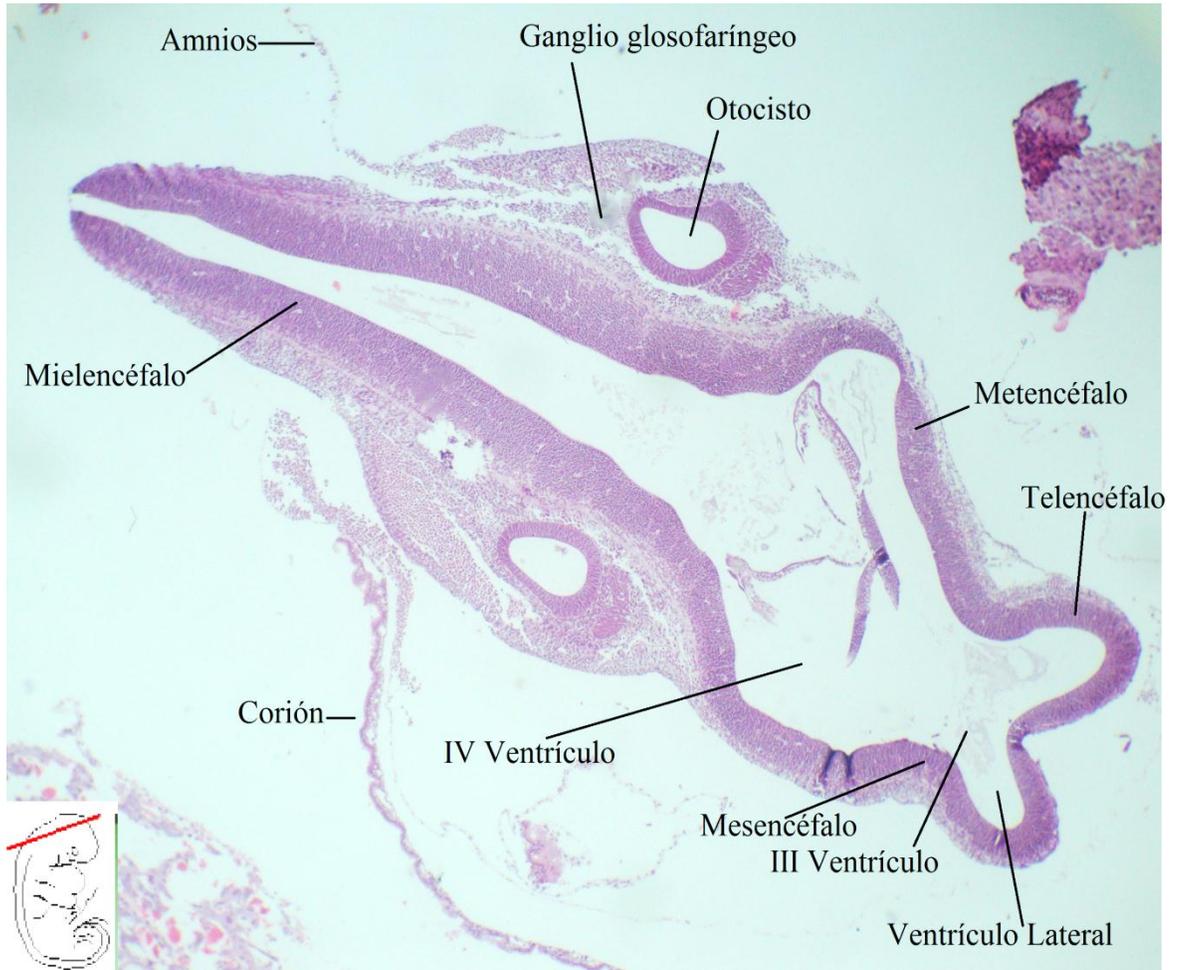


Lámina 20, Día 13, 4x

En las láminas, de la 21a la 24, se describe cuidadosamente cada tejido de la lámina 20.

La lámina 21 es un acercamiento al telencéfalo (del prosencéfalo) que rodea uno de los ventrículos laterales. Se observa además una parte del mesencéfalo y del cuarto ventrículo, y en la lámina 22, los mismos elementos del neuroeje, enfocados en el ventrículo contralateral.



Lámina 21. Día 13, énfasis en telencéfalo y ventrículo lateral

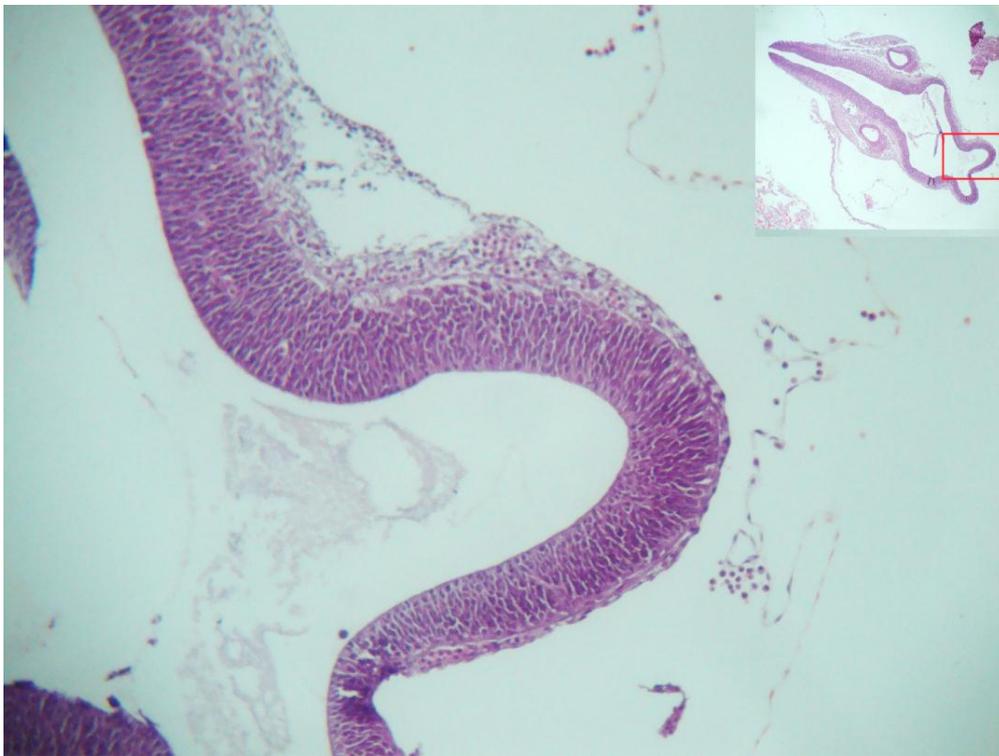


Lámina 22, Día 13 detalle de telencéfalo y mesencéfalo

En la siguiente lámina, la número 23, se amplía el panorama para ilustrar el cuarto y tercer ventrículos y las vesículas del tubo neural que los rodean: diencefalo, mesencéfalo y metencéfalo. Parte de la membrana amniótica -exterior al embrión- se presenta en la misma lámina.



Lámina 23, Día 13, énfasis en IV y III ventrículo.

Este corte histológico y las láminas obtenidas, se caracterizan por su aplicación didáctica al mostrar la morfología del tubo neural y las vesículas cerebrales derivadas; además de reconocer la disposición de las células formando una capa estratificada de células cilíndricas derivadas del neuroectodermo, característica que persiste en la vesícula óptica en la lámina 24.

En el siguiente acercamiento se evidencian detalles del otocisto:

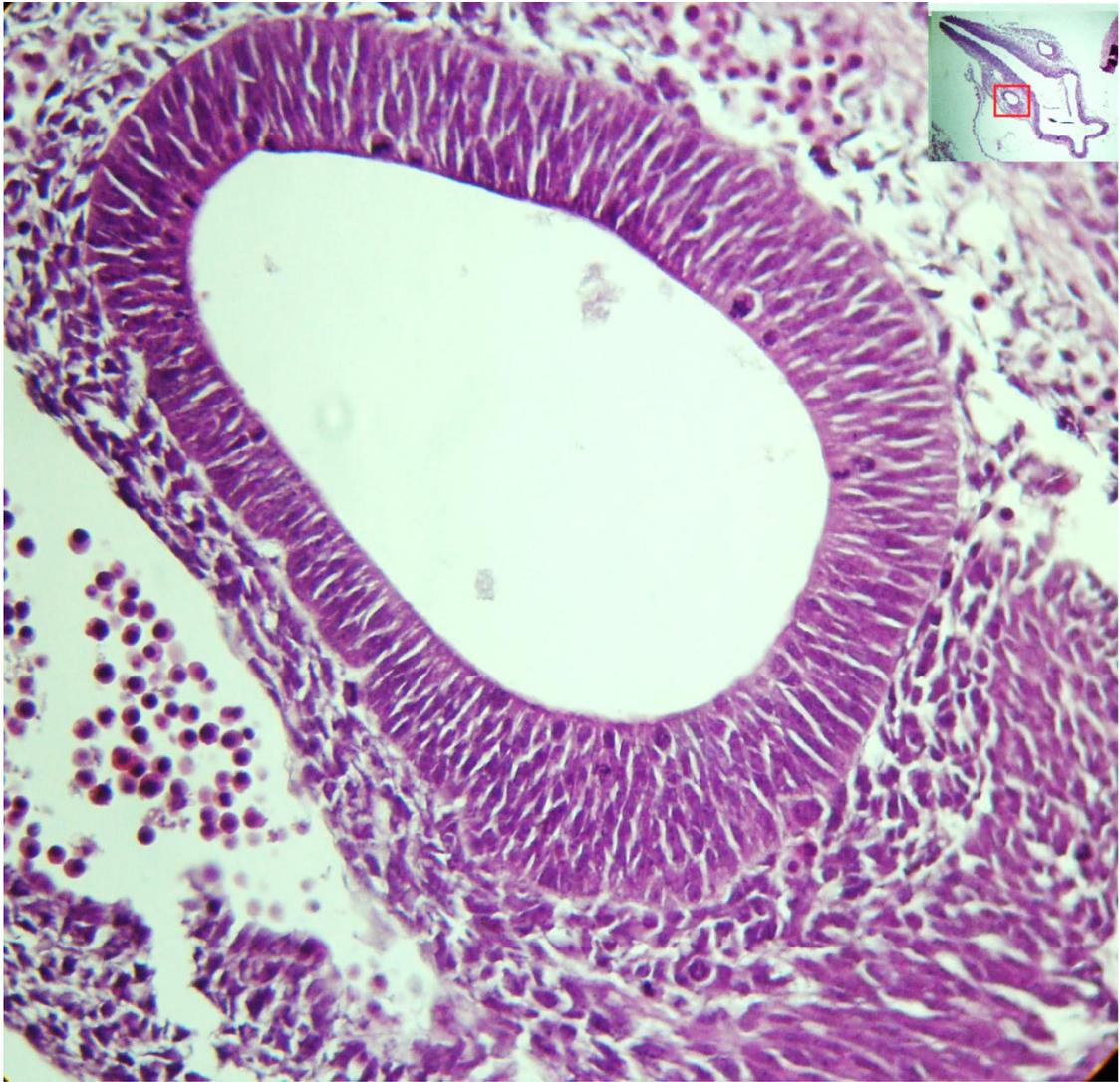


Lámina 24, Día 13, otocisto, 20x

El fundamento teórico imagenológico comparativo se hizo con las láminas del proyecto embriológico humano de la Universidad de Nuevas Gales del Sur de Australia. Las láminas se pueden visitar en el vínculo virtual:

https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_stage_13_-_serial_sections, referenciado en la bibliografía.

Para este corte se utilizaron de vínculo, las láminas 51, 52 y 53. (Hill, UNSW Embriology, 2014).

Corte 2

El marco comparativo se obtuvo con base en las láminas del proyecto embriológico humano de la Universidad de Nuevas Gales del Sur de Australia. Para este corte se utilizaron del proyecto, las láminas de la 66 a la 70 (Hill, UNSW Embriology, 2014).

A continuación, se presenta un esquema que muestra el corte axial del embrión:

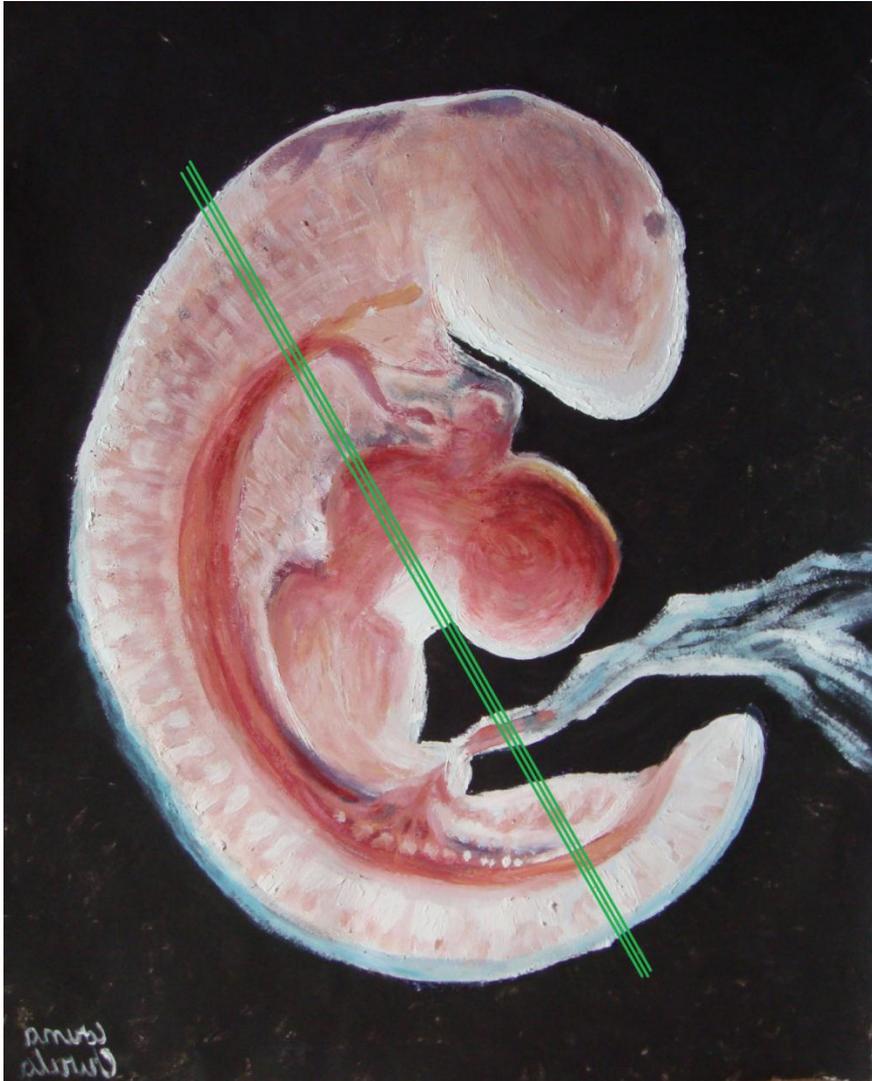


Figura 29, corte Día 13

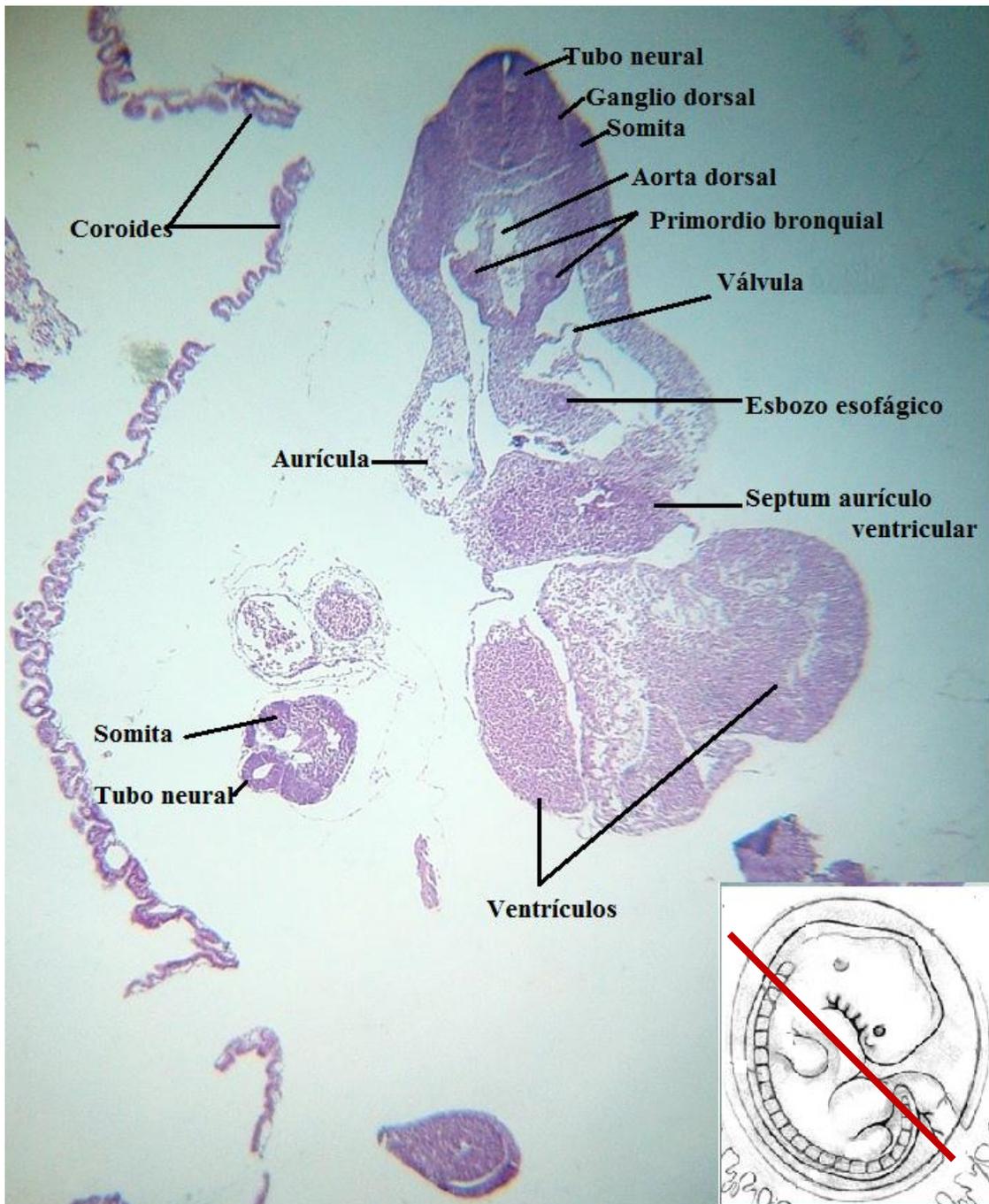


Lámina 25, Día 13, 4x

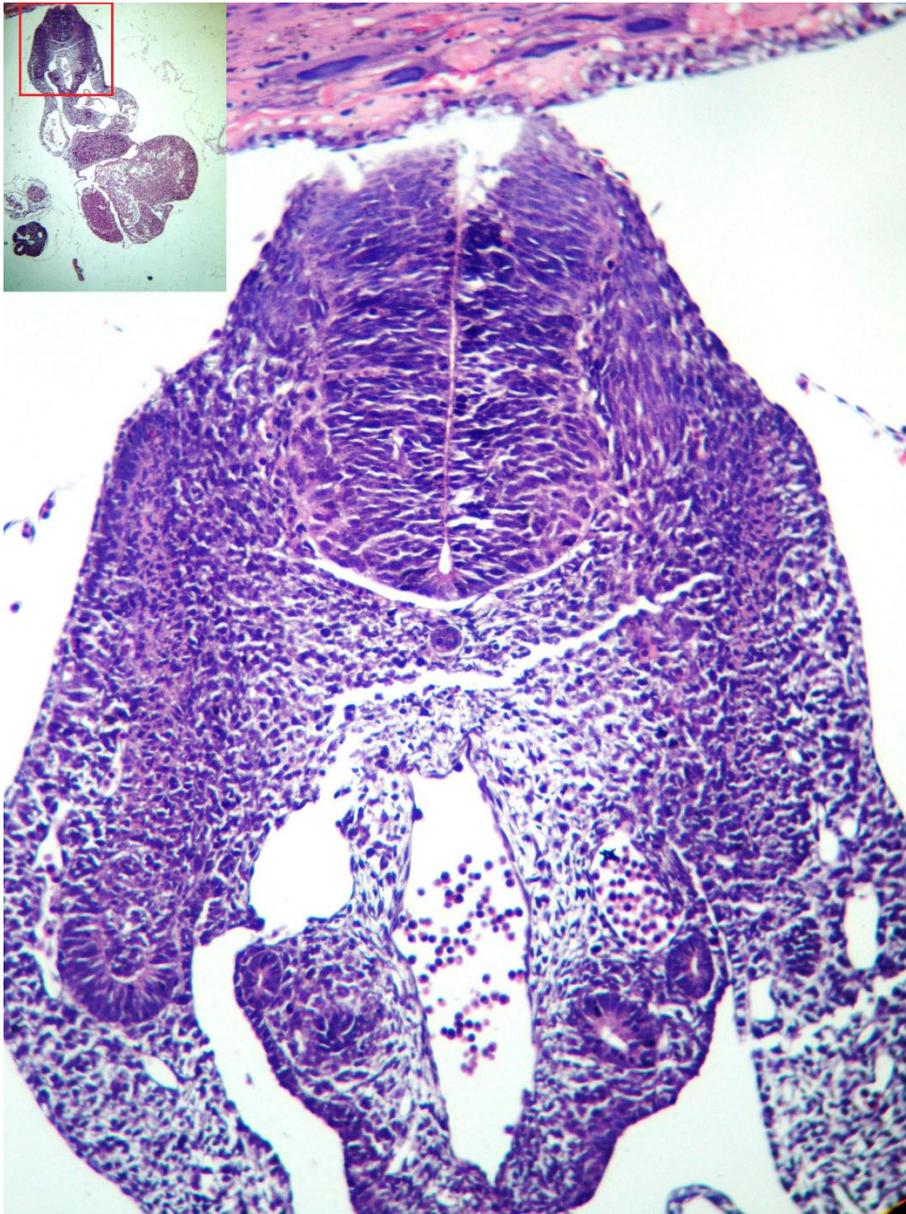


Lámina 26, Día 13, detalle de notocorda y tejidos adyacentes

En el corte 2, se obtuvo la lámina 25, que ilustra parte de la organogénesis. En este período, el neuroectodermo y sus derivados son puntos de reparo, ya que su configuración se puede reconocer en la placa. 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. En la lámina 26 se hace un acercamiento de este segmento del embrión y se ven las estructuras derivadas del somita, de superficial a profundo: dermatoma, miotoma y esclerotoma.

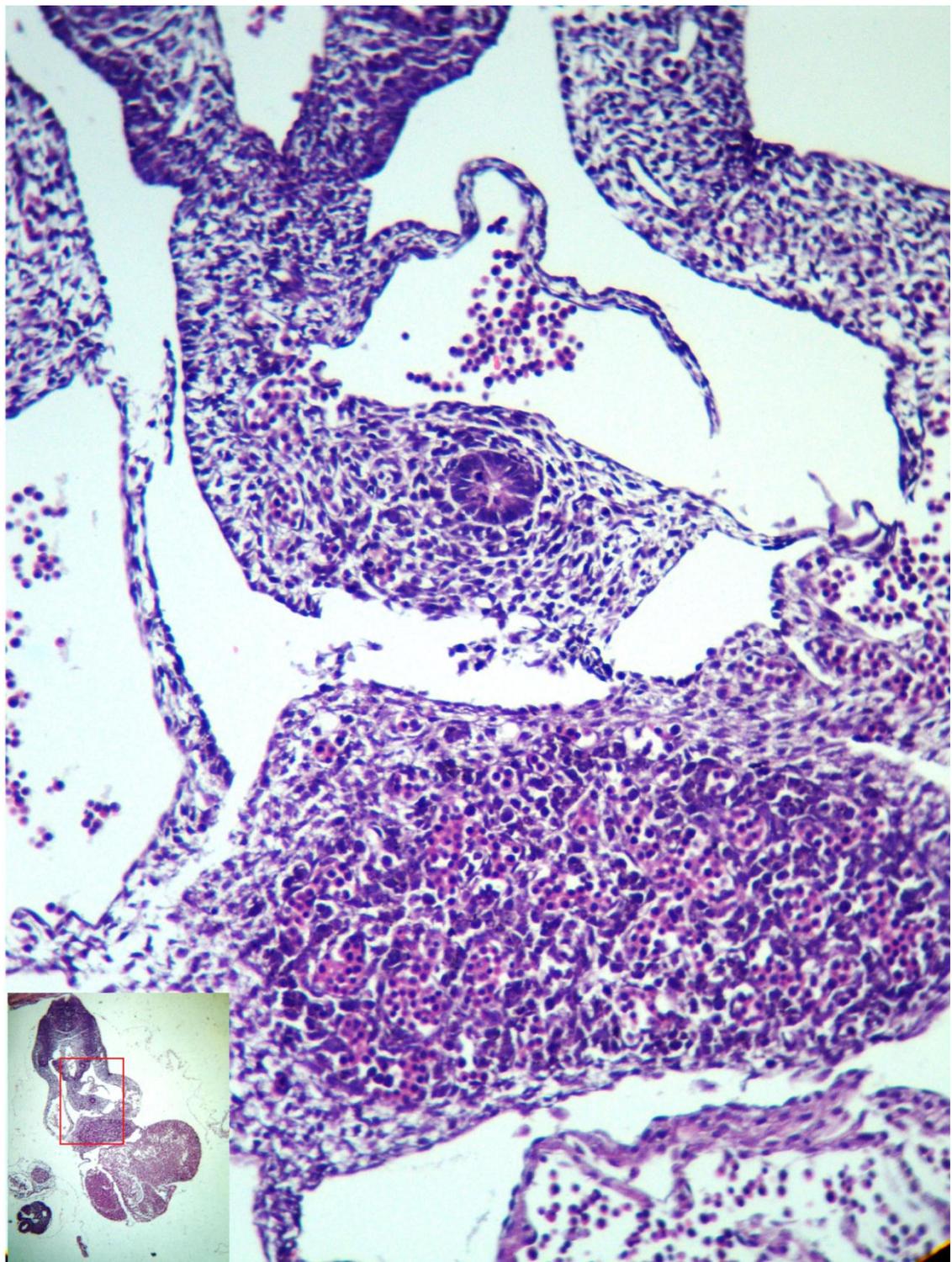


Lámina 27, Día 13, detalle central

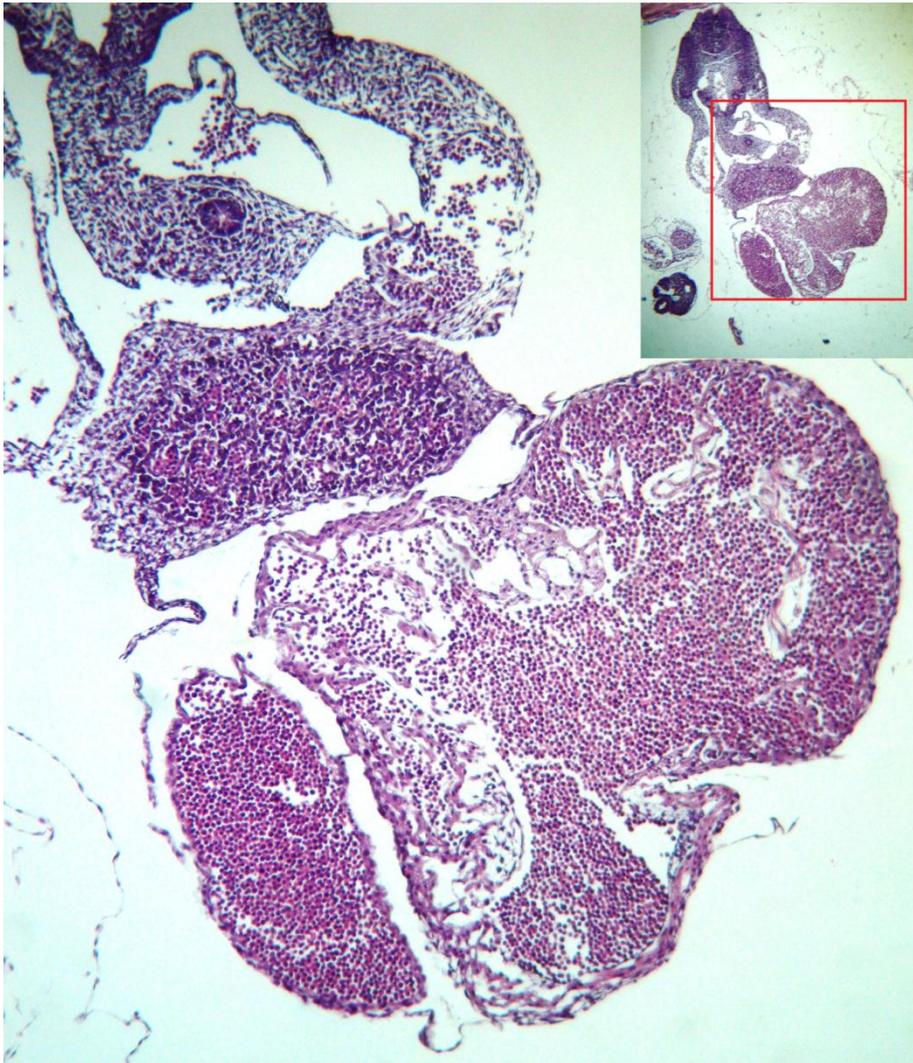


Lámina 28, Día 13, detalle de ventrículos cardíacos

Siguiendo una dirección ventral, se encuentra un espacio que puede tratarse de la aorta dorsal, lateral a ambos lados de ese tubo se encuentran dos conductos que por su localización y configuración corresponden a los primordios bronquiales, y lateral a cada uno de ellos se encuentra un espacio con circulación de células eritroblásticas, que confluyen en un esbozo auricular. Aparece en el centro un tejido mesenquimatoso rodeando un túbulo con endotelio que se identifica como el esbozo gastro-esofágico. Se pueden identificar algunas valvas, parte de las cámaras cardíacas, el septo aurículo ventricular y el septo interauricular (septum primum) (Langman, 2007). Todo lo anterior se puede ver en las láminas 26, 27 y 28; esta última en especial, muestra las características histológicas ventriculares.

En la lámina 28 se visualiza tejido mioblástico y el tabique interventricular con sus porciones muscular y membranosa.

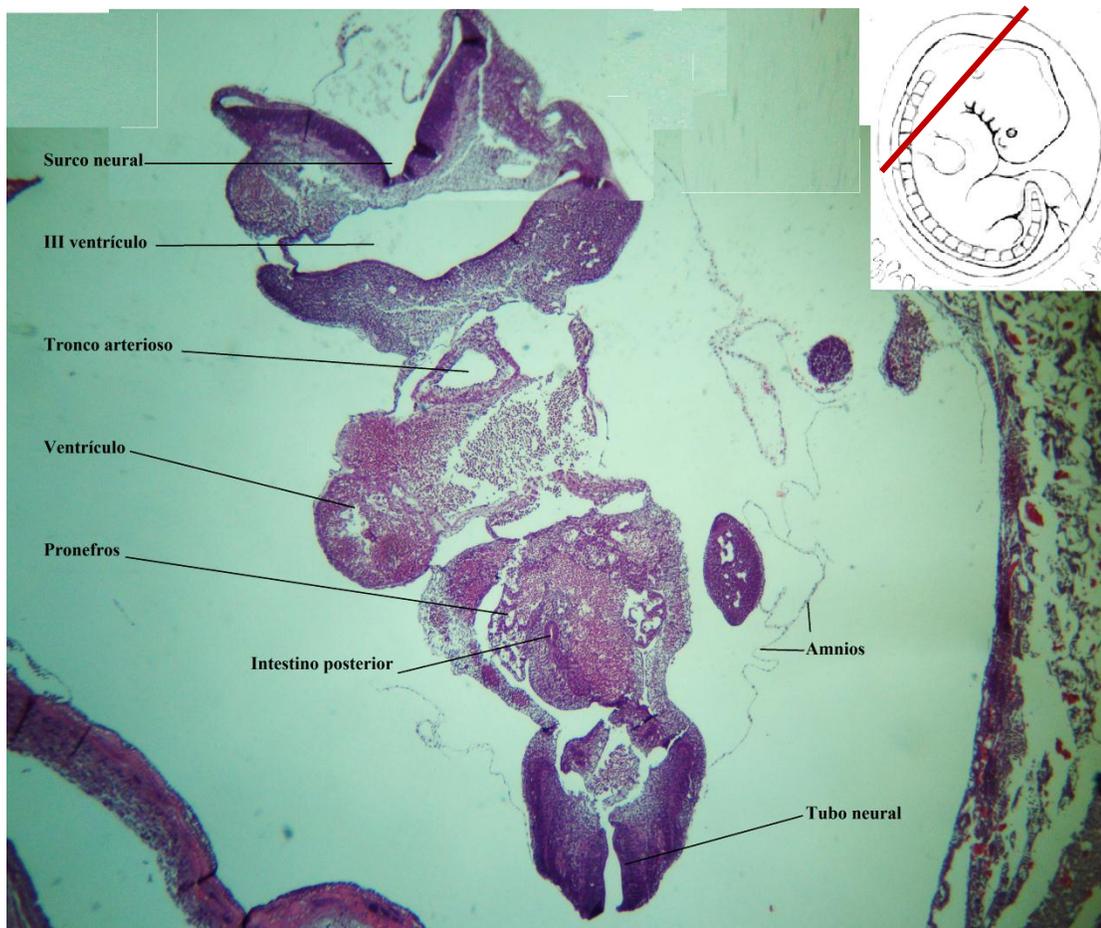
Corte 3

Lámina 29, Día 13, 4x

En el siguiente corte se distinguen las estructuras embrionarias del tronco y de la cabeza, ya descritas en las láminas previas, además, el tronco arterioso, esbozos renales como el pronefros (o tal vez puede tratarse del esbozo del pulmón), parte del corazón embrionario, el tubo neural y elementos extraembrionarios como el amnios y el trofoblasto adyacente (Lámina 29).

La referenciación se hizo comparativamente con las bases de datos del proyecto de embrión humano de Laussana, en el hipervínculo: <https://www.ehd.org/virtual-human-embryo/slide.php?stage=8> anotado en la bibliografía.

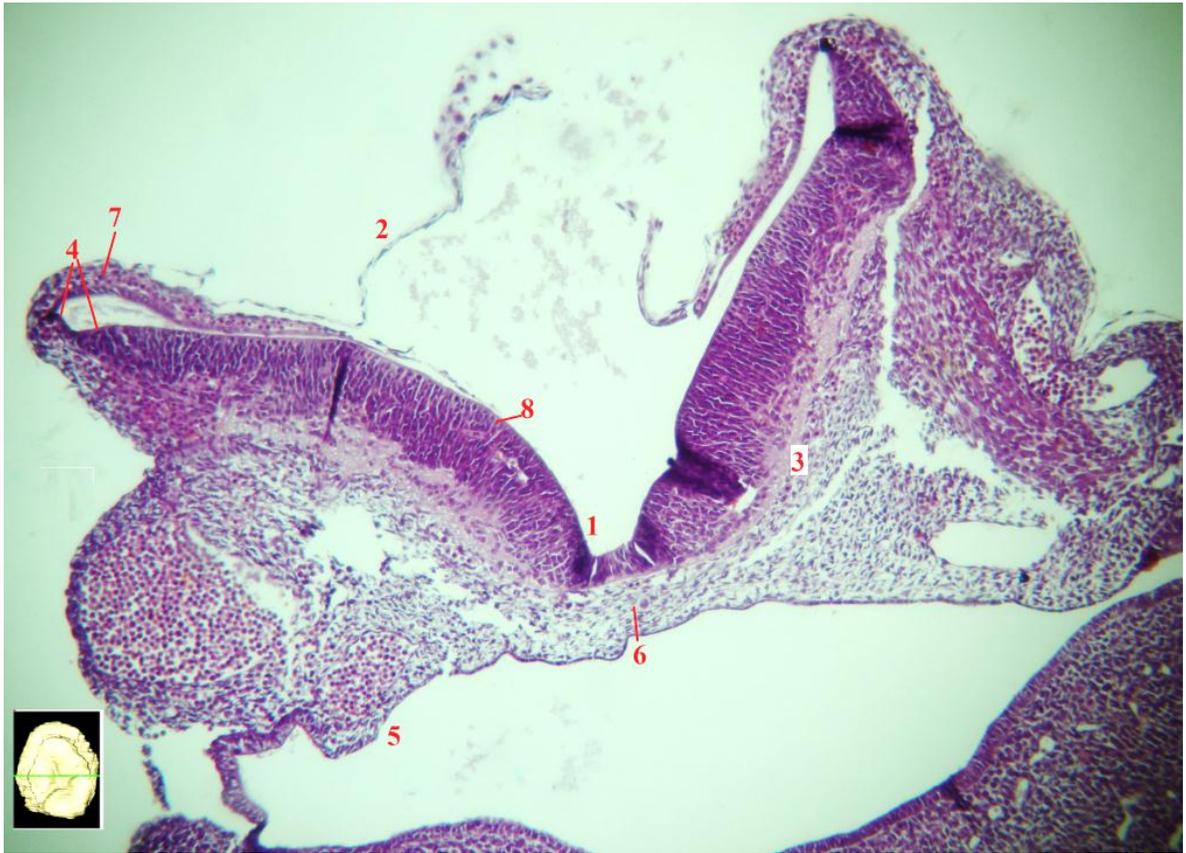


Lámina 30, detalle de surco neural

Llaman la atención las estructuras neuroectodérmicas de la lámina 30, en la que se ven detalladamente el surco neural y los elementos mesenquimatosos adyacentes, nombrados en la lámina:

1. Surco neural
2. Amnios
3. Mesénquima
4. Ectodermo extraembrionario
5. Endodermo embriónico
6. Notocorda
7. Mesodermo extraembrionario
8. Ectodermo neural

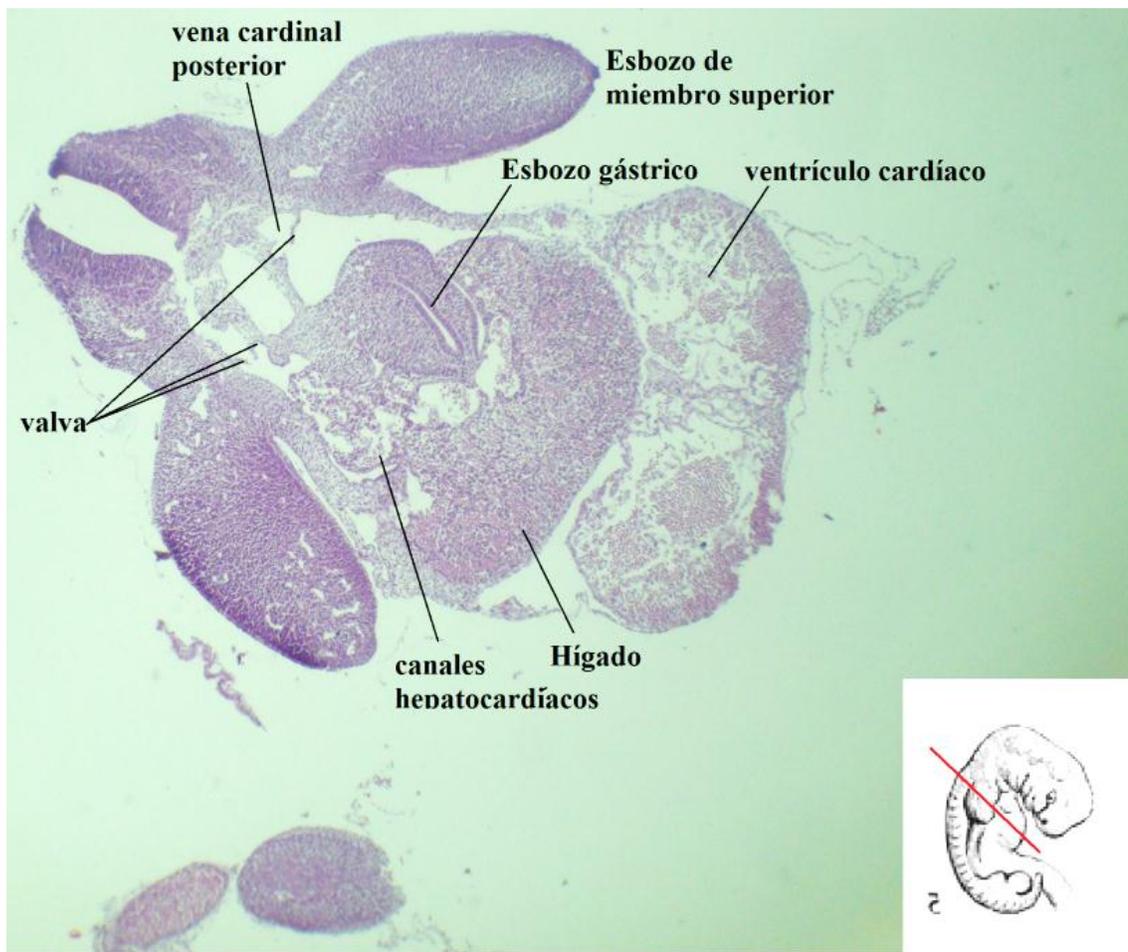
Corte 4

Lámina 31, Día 13, 4x

En este corte 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.

La referencia comparativa se obtuvo del hipervínculo australiano sobre embriología:

https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/File:Stage_13_image_073.jpg,

En las láminas 32 y 33 se observan acercamientos de la lámina 31, que muestran el esbozo de un miembro superior y la morfología celular derivada del somita:

- Una capa externa o dermatoma
- Una capa intermedia o miotoma
- Una capa interna o esclerotoma

También se identifican los capilares embrionarios de la extremidad con células hemáticas embrionarias.



Lámina 32, día 15, 10x, esbozo de extremidad

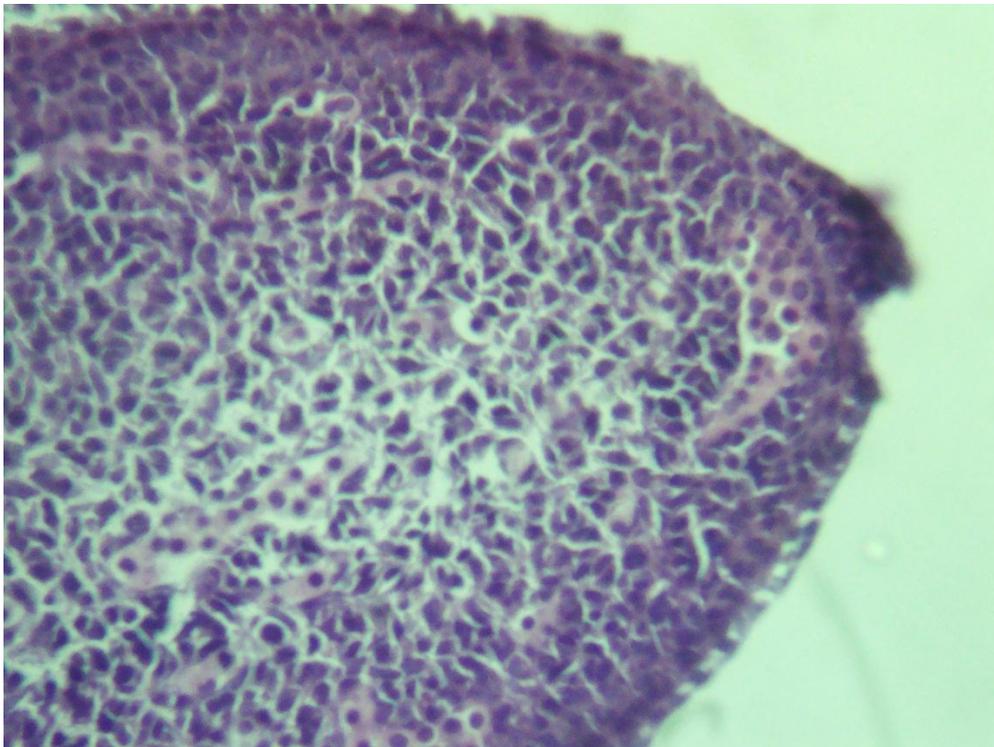


Lámina 33, Lámina 34, día 15, 10x, esbozo de extremidad

5.1.6 Día 15

Desafortunadamente del día 14 no se obtuvo embrión durante las preparaciones histológicas, por lo cual, se salta al siguiente día, el día 15 de desarrollo, último período de desarrollo solicitado en este proyecto.

Se disecaron dos tipos de piezas debido a su tamaño, los primeros cortes son de un embrión - solo- que se logró obtener del saco gestacional, y los siguientes se obtuvieron disecando porciones del útero gestante.

Corte 1



Lámina 35, 15 días, 4x

La lámina 35 presenta un corte axial lo suficientemente cerca al dorso nuczal, como para visualizar parte del recorrido longitudinal del tubo neural, por lo tanto, hacia la luz se visualiza la capa de neuroectodermo. Periférica a esta capa, se encuentra la capa mesodérmica en diferenciación y, superficial a esta, se encuentra la capa de ectodermo superficial. Lateralmente se visualiza un elemento redondeado con capilares y tejido mesenquimatoso, este elemento se presume que se trata del saco vitelino.

La lámina 36 da cuenta de un corte más caudal que continúa mostrando longitudinalmente el tubo neural, además de las estructuras derivadas de los arcos faríngeos como el proceso maxilar y mandibular y el arco hioideo, entre otras estructuras ya nombradas en la lámina.

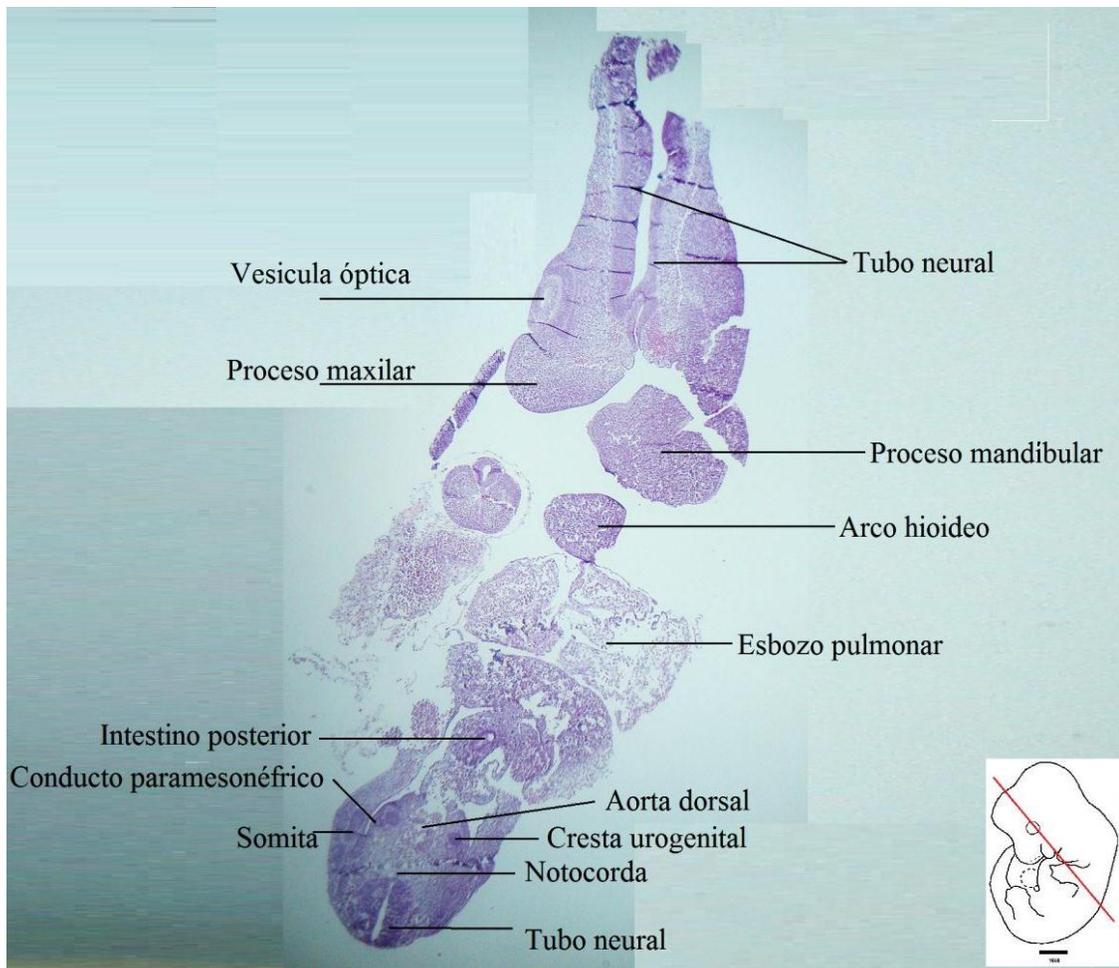


Lámina 36, día 15, 4x

En las láminas siguientes, se puede ver la morfología celular de cada estructura embrionaria, por medio de aumentos de la lámina 36.

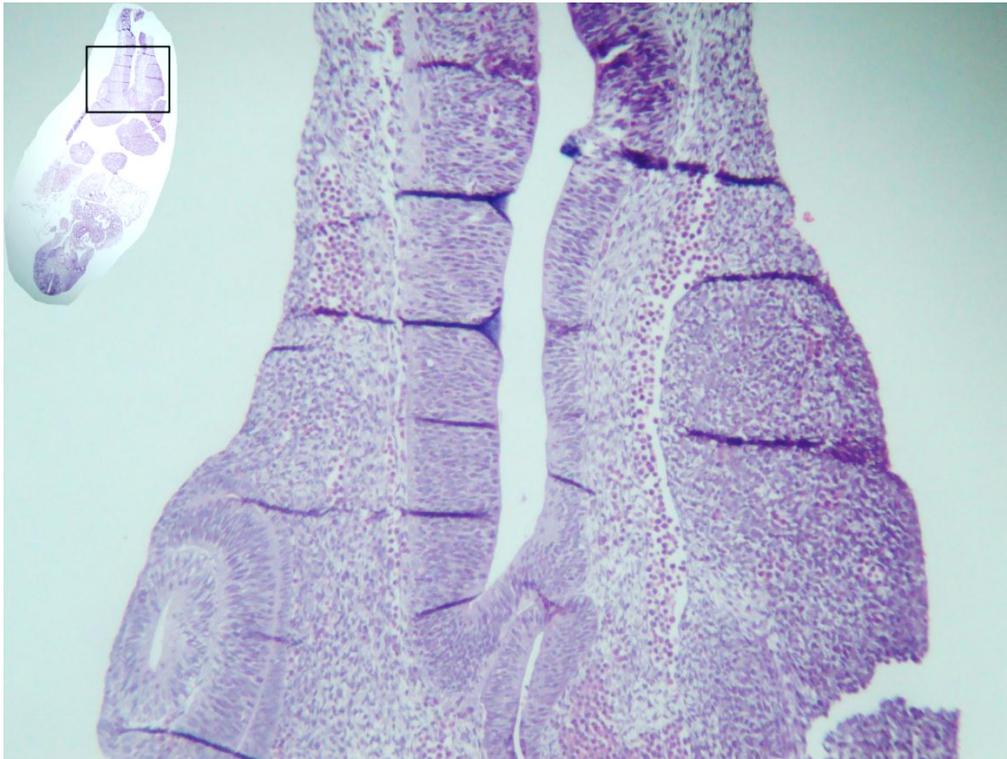


Lámina 37, 15 días, 10x, detalle de tubo neural u vesícula óptica

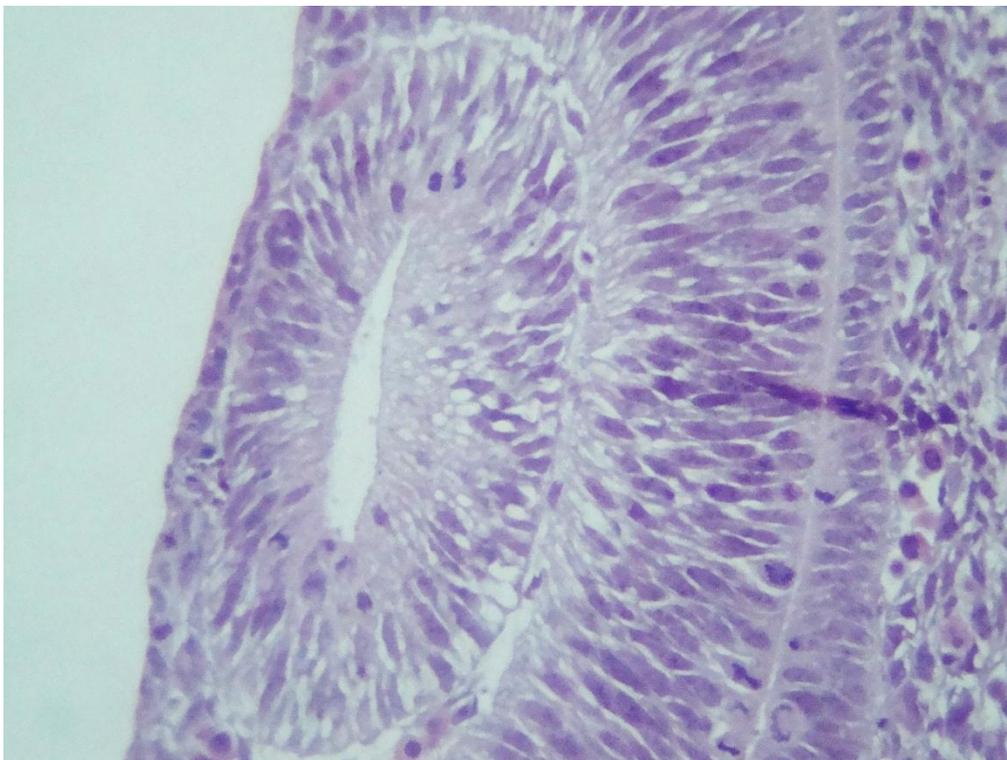


Lámina 38, día 15, detalle de vesícula óptica

Particularmente el ojo es un órgano que se deriva de varias capas embrionarias. Del ectodermo se deriva la retina (más precisamente del neuroectodermo); la córnea y el cristalino se derivan del ectodermo de superficie; los músculos y los tejidos conjuntivos oculares, del mesodermo. El desarrollo del ojo comienza en la cuarta semana, lo que corresponde al estadio 8 de Carnegie.

En la lámina 38 se observa en detalle la morfología del desarrollo de la retina, formada a partir de una invaginación del prosencéfalo, luego protruye dejando dos capas externas para formar los lentes oculares y, hacia esta zona migran células epiteliales con melanina que provienen también del neuroectodermo. Las células que darán formación a la retina y al epitelio pigmentario se anclan al tallo óptico profundamente, formando la capa interna y externa de la copa óptica respectivamente. La capa interna consta de un epitelio cilíndrico organizado, mientras que la capa externa es más delgada.

El ectodermo superficial, que se encuentra en contacto con la parte anterior de la copa óptica, se engrosa para formar la placa cristaliniana, que se invagina y da origen a la vesícula cristaliniana. Una semana después, esta vesícula se separa del resto del ectodermo de superficie. Este ectodermo vuelve a engrosarse para formar la córnea. (Langman, 2007)

Debido a su valor didáctico, la misma imagen se repite en la lámina 39 con nomencladores:



Lámina 39, Vesícula óptica, día 15

Las siguientes cuatro láminas son acercamientos de la lámina 36 que especifican la morfología celular de cada tejido en desarrollo.

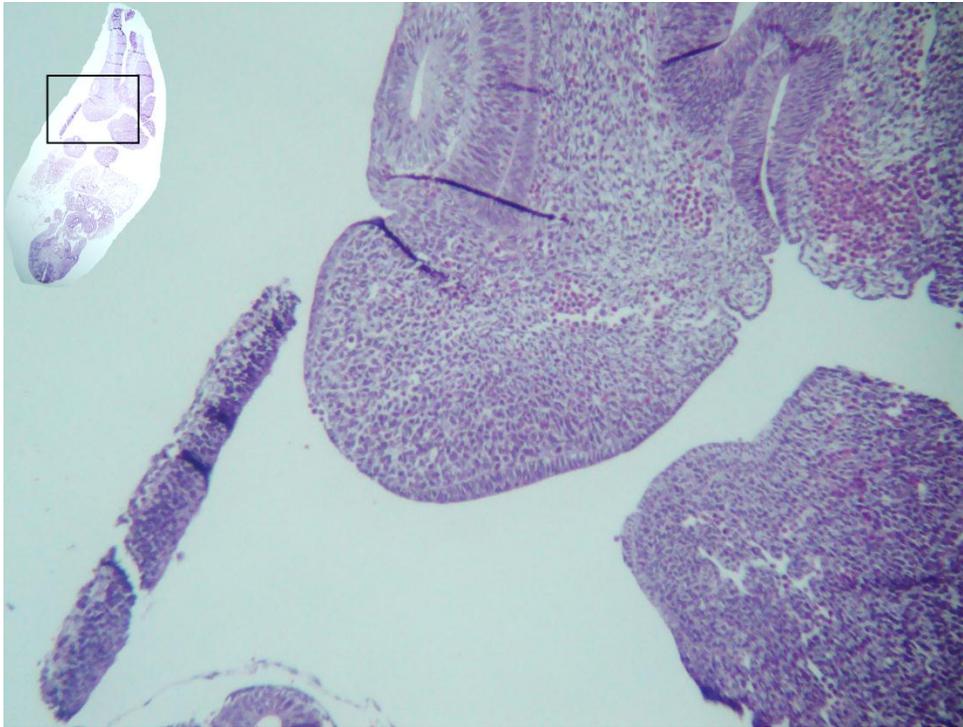


Lámina 40, Prominencia maxilar

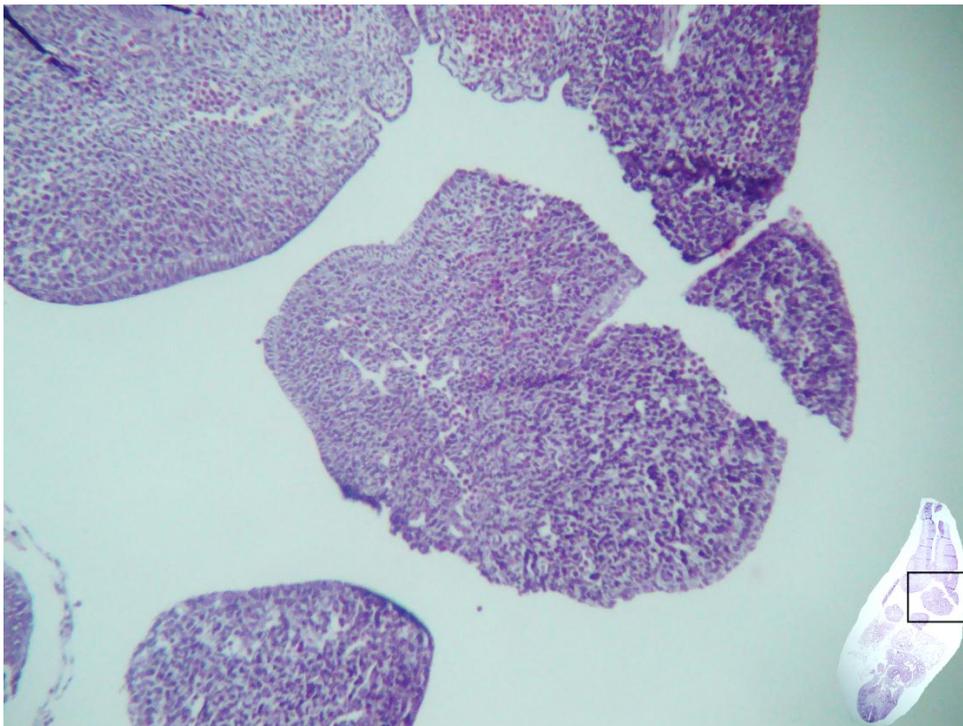


Lámina 41, Proceso mandibular

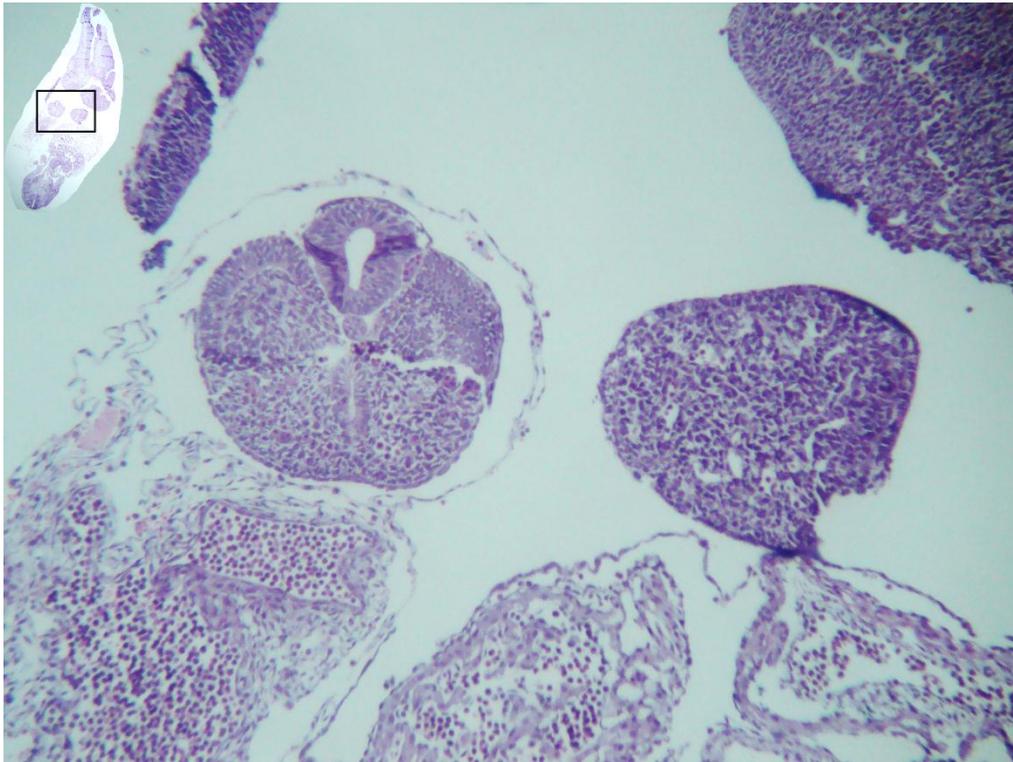


Lámina 42, Proceso hioideo y cola embrionaria

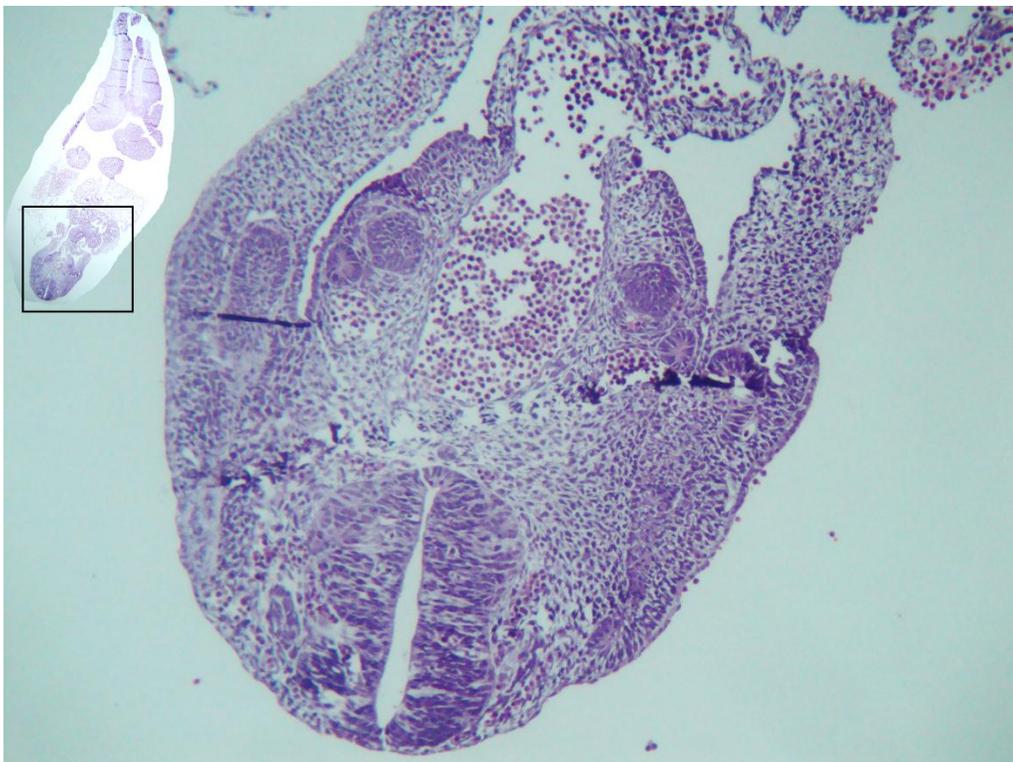


Lámina 43, Cresta urogenital, aorta dorsal y tubo neural

Corte 2

A continuación, se aprecia una lámina obtenida por un corte parasagital del embrión. Aunque con dificultad, exitosamente se logró.

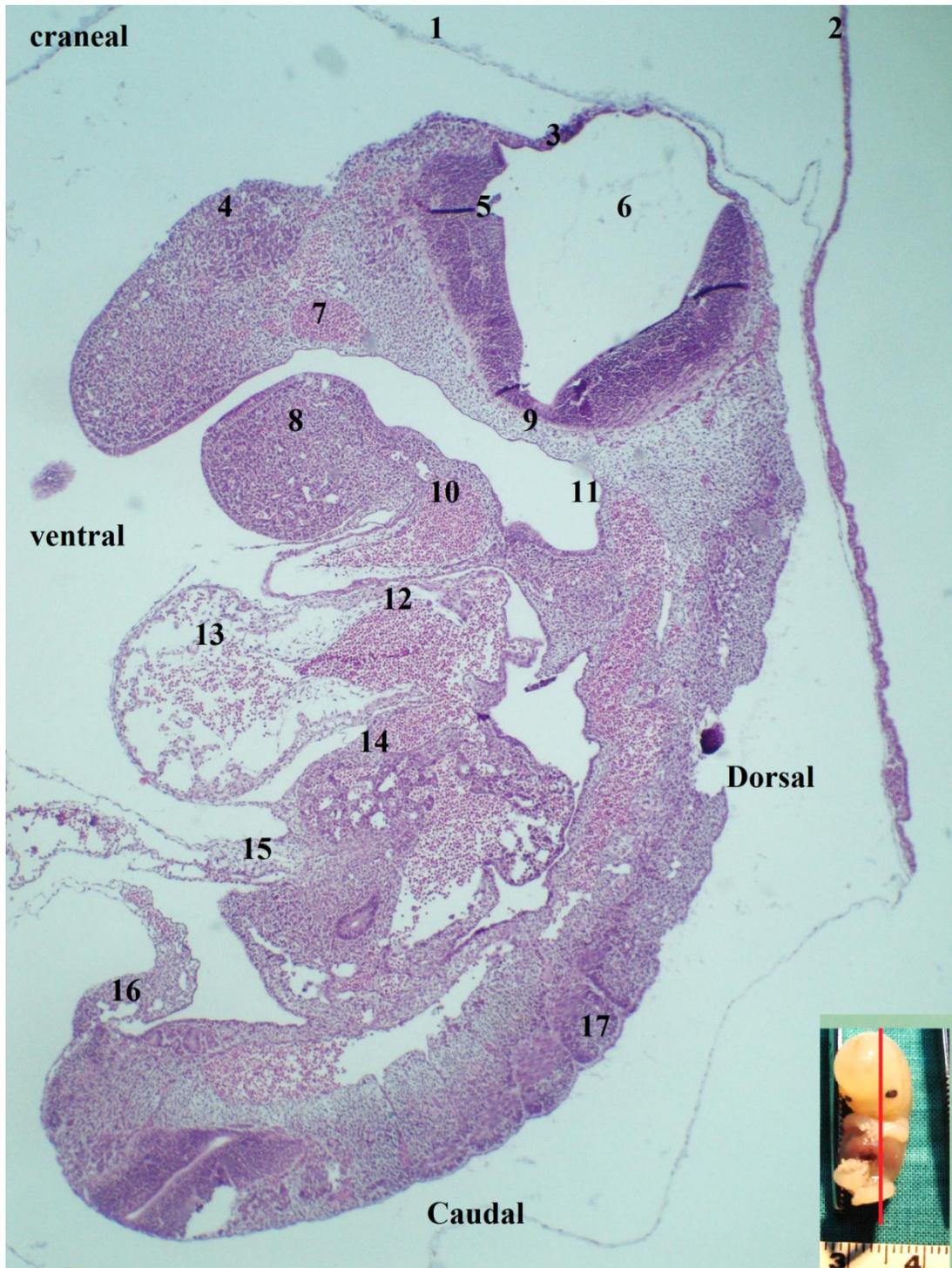


Lámina 44 15 días, 4x, corte parasagital

La lámina 44, única en su presentación, se caracteriza por ser la más completa en información. Se realizó un corte para-sagital del embrión, lo que permite mostrar de craneal a caudal:

1. Amnios
2. Trofoblasto
3. Placa alar
4. Vesícula óptica
5. Placa basal
6. IV ventrículo
7. Fóvea nasal
8. Proceso mandibular
9. Notocorda
10. Corazón
11. Estomodeo
12. Hígado
13. Plexo vascular vitelino
14. Mesonefros
15. Vasos umbilicales
16. Alantoides
17. Somita
18. Intestino primitivo

5.2 Resultados extraembrionarios

Como se ha ilustrado en este capítulo y en el apartado de resultados propios del embrión, en este punto también habrá alternancia en las láminas, algunas con nomenclatura y otras sin elementos o notas aclaratorias dentro de la misma. Vale la pena enfatizar que el departamento de Morfología cuenta con la totalidad de imágenes que se produjeron para este trabajo, con y sin nomenclatura, en digital y en físico, al servicio de la enseñanza y aprendizaje de la Morfología y Fisiología embrionaria. Es decir, el recurso didáctico con y sin nomenclatura, está a disposición del usuario. Aquí se enseñan las dos alternativas.

Este trabajo rescata el valor didáctico de estructuras adyacentes no embrionarias con potencial didáctico, como los estadios foliculares ováricos, el oviducto, la decidua y otros tejidos endometriales grávidos y no grávidos que se muestran a continuación:

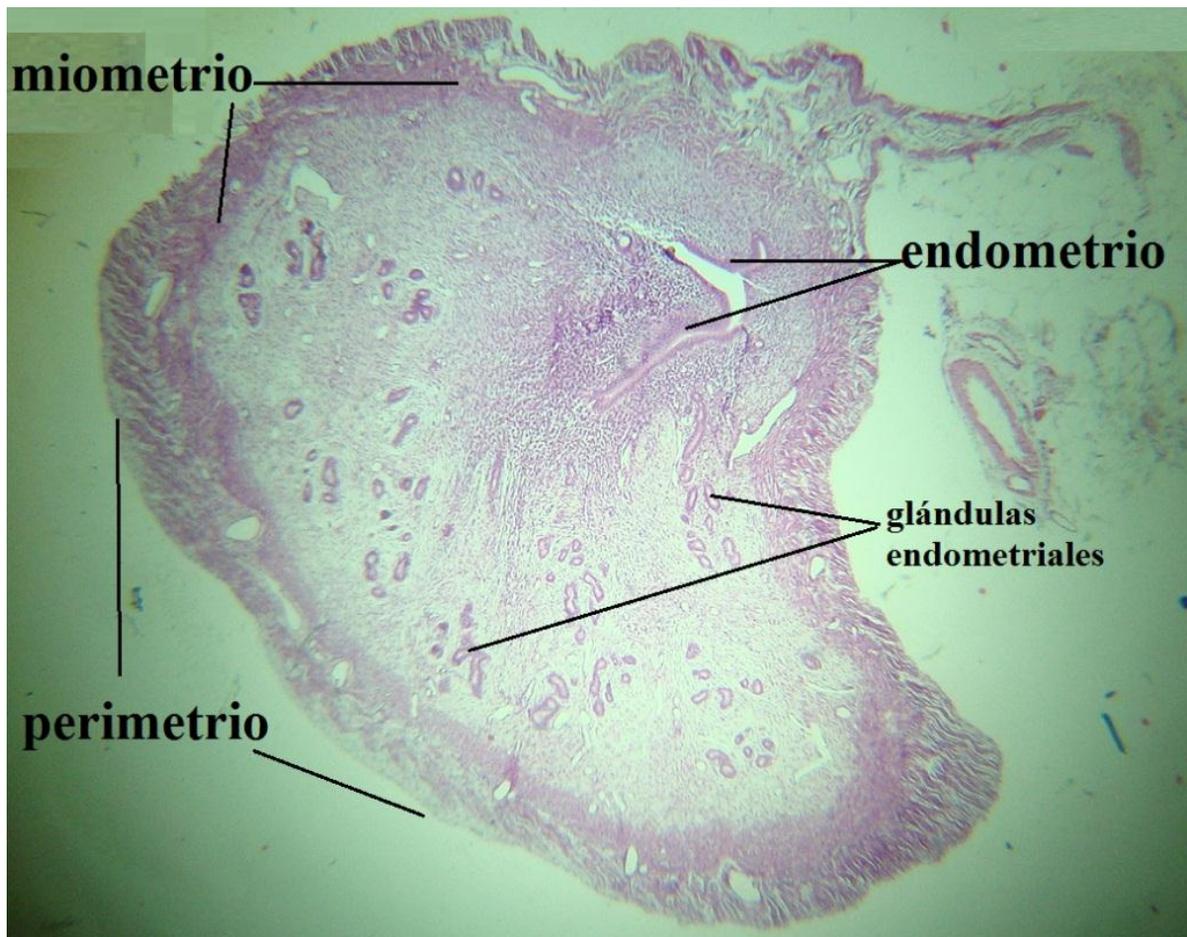


Lámina 45, Útero no grávido

Las dos primeras láminas de este apartado son del útero; debido a su dimensión, la utilidad didáctica de las láminas es que la totalidad de las capas del útero se pueden visualizar en una sola placa, por ejemplo, en la lámina 45 se aprecia una capa externa de tejido conjuntivo laxo o perimetrio, está asociado y tapizado por epitelio; periféricamente, se aprecian adipocitos peritoneales adyacentes. El miometrio, capa que le sigue en profundidad, está constituida por leiomiocitos y se caracteriza por ser más densa y eosinófila. El endometrio, capa que va hacia la luz, es la más gruesa y se caracteriza por ser hipocrómica y estar llena de glándulas propias de esta mucosa.

En la lámina 46 se presenta otro corte del útero. Se observan las mismas capas, pero además, se nota un aumento de tamaño a nivel endometrial y se muestran múltiples espacios lacunares asociados a vasos sanguíneos; este tejido es la decidua, que muestra un útero gestante, y en este caso -como en muchos- no logró obtenerse el embrión en los cortes.

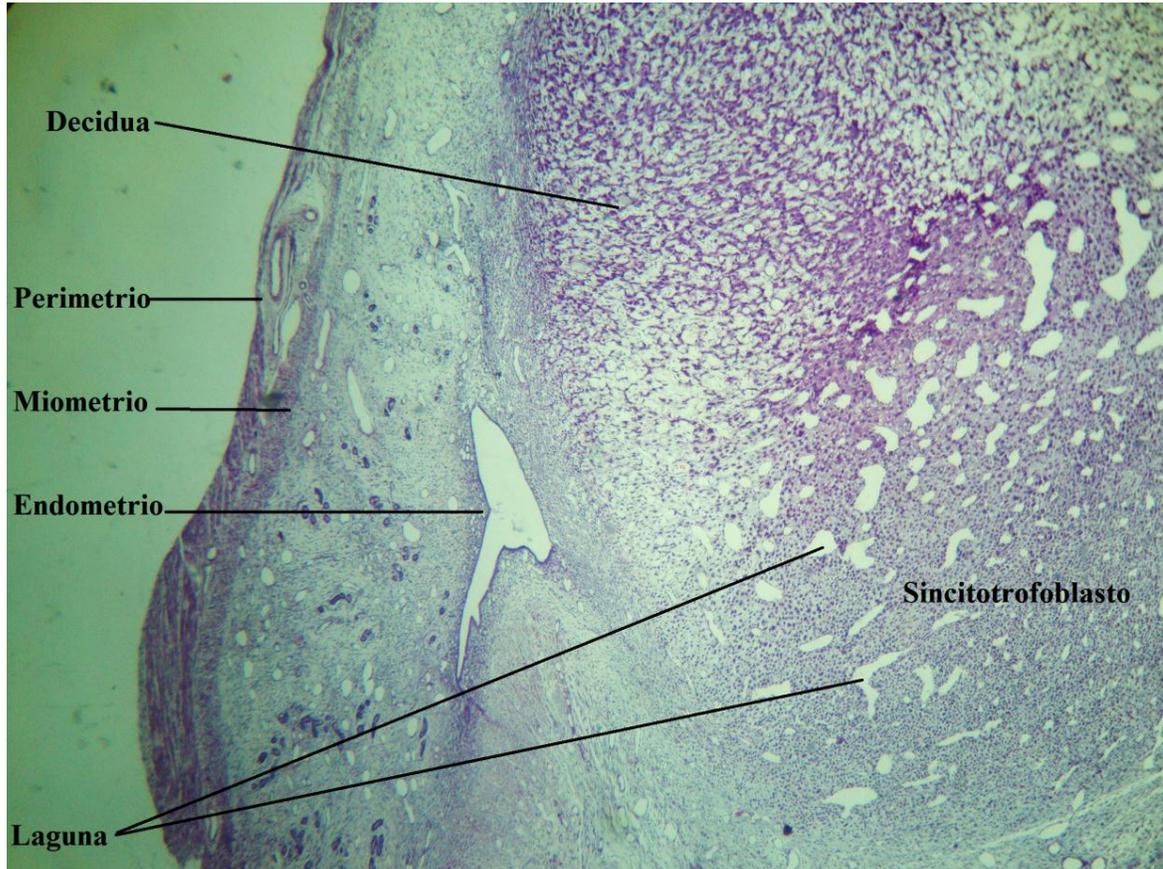


Lámina 46, Útero grávido

Las láminas 47 y 48 muestran un ovario. Al igual que sucede con el tejido del útero, el ovario por su tamaño y su perímetro, cabe en una sola placa histológica.

Ambas láminas muestran los diferentes estadios fisiológicos de maduración ovárica: los folículos primordial, primario y secundario, el cuerpo lúteo y el cuerpo atresico. Igualmente se visualiza el estroma ovárico constituido por el hilio, la médula ovárica, las células intersticiales, los vasos sanguíneos y una cápsula albugínea propia de las gónadas.

La lámina 48 muestra un corte trasversal del oviducto, que se caracteriza por tener una mucosa que forma repliegues; la mucosa está formado por un tejido conectivo basal, tapizado por epitelio cilíndrico simple que está constituido por dos tipos de células: secretoras y ciliadas. La pared del oviducto tiene una delgada capa muscular de miocitos lisos y una cubierta serosa formada por un mesotelio de tejido conectivo vascularizado.

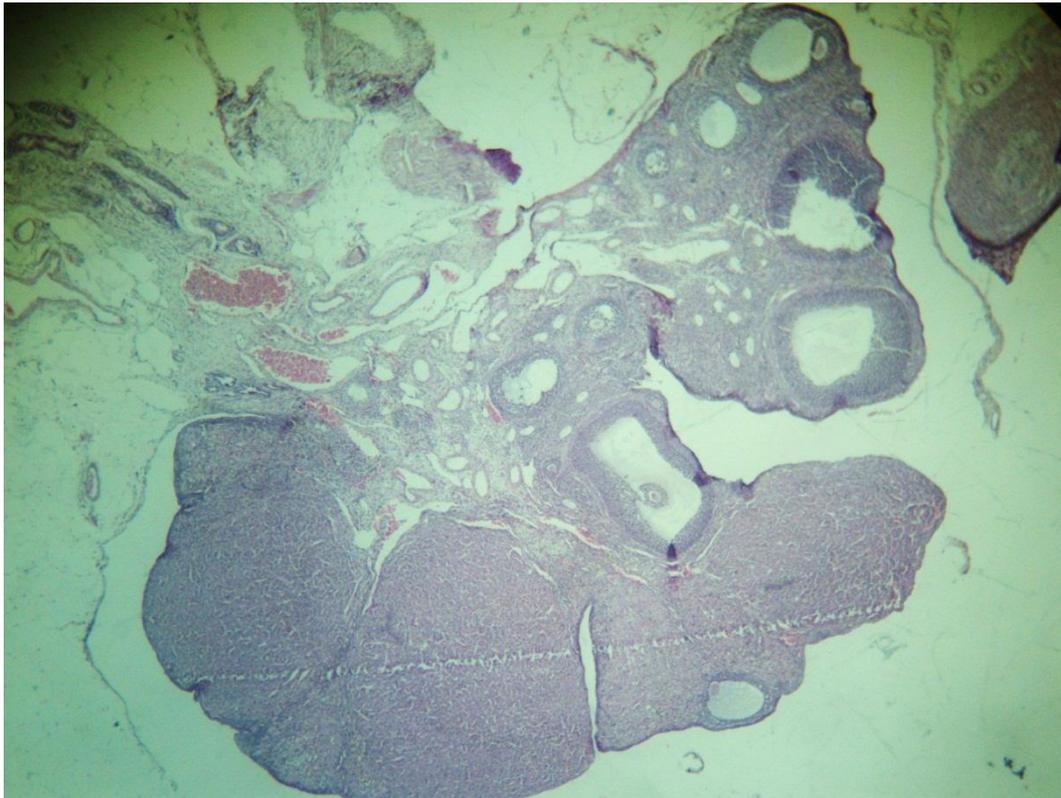


Lámina 47, Ovario con los folículos en diferente grado de maduración

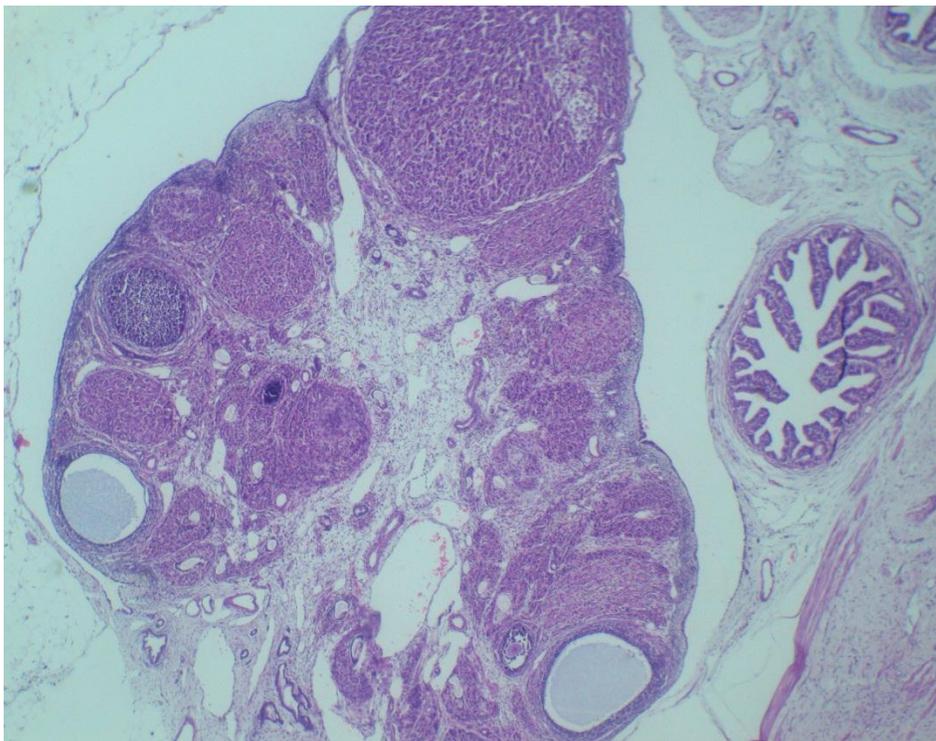


Lámina 48, ovario con los folículos y el oviducto anexo

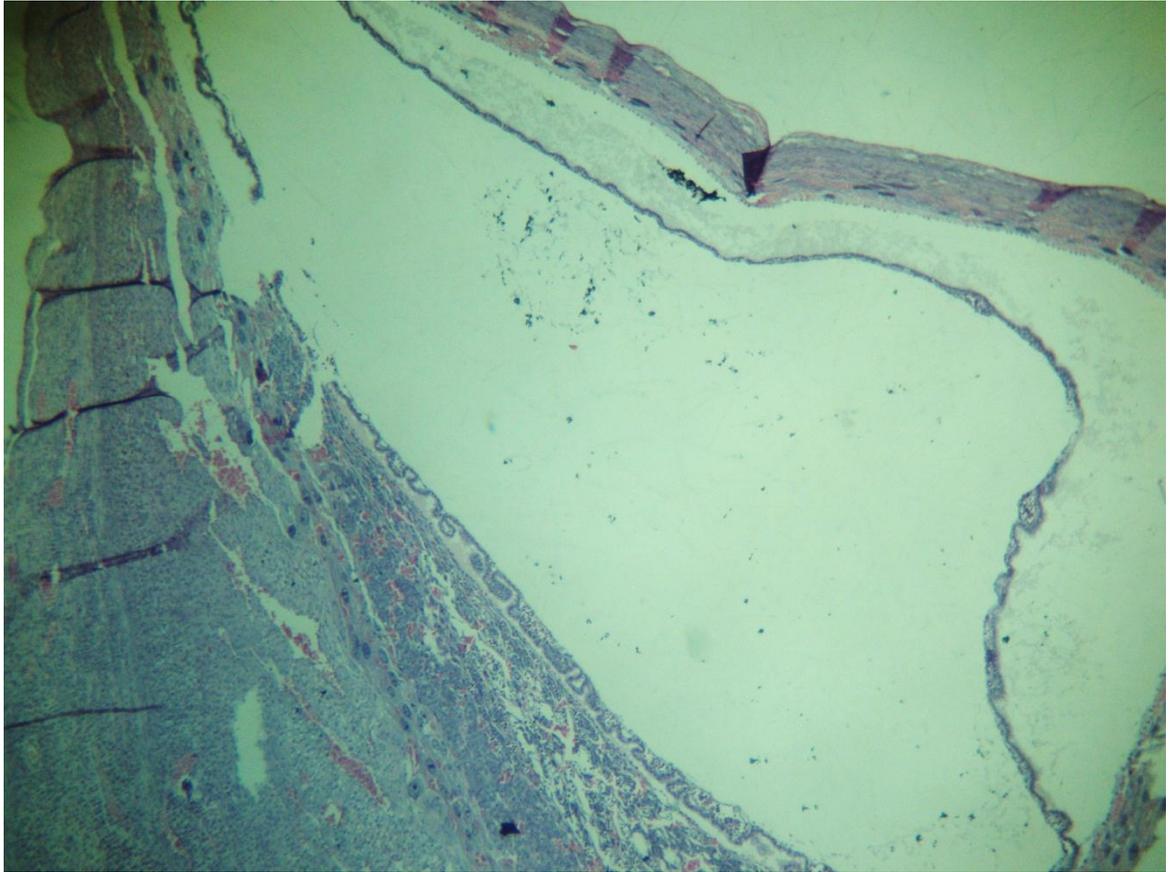


Lámina 49, Trofoblasto, Día 13

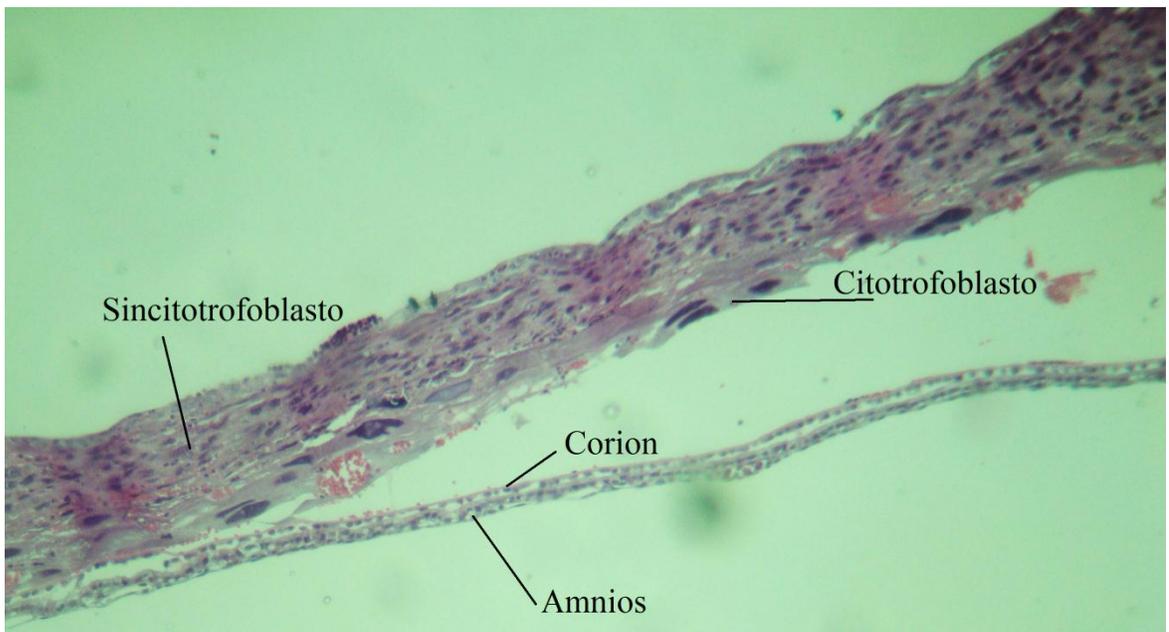


Lámina 50, Trofoblasto y anexos detallados, Día 11

En las láminas 49 y 50 se observan tejidos derivados de la fecundación que dan formación a la placenta. El trofoblasto se diferencia en el citotrofoblasto y el 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. La lámina 50 muestra el corion y el amnios.

En la lámina 51 se observa, además de los elementos ya mencionados, la relación con el embrión, con la nomenclatura respectiva.

Las láminas 52, 53, 54, 55 son acercamientos de este tejido uterino gestante.

La lámina 52 muestra gran contenido de las células hemáticas maternas que nutren el tejido que da origen a la placenta.

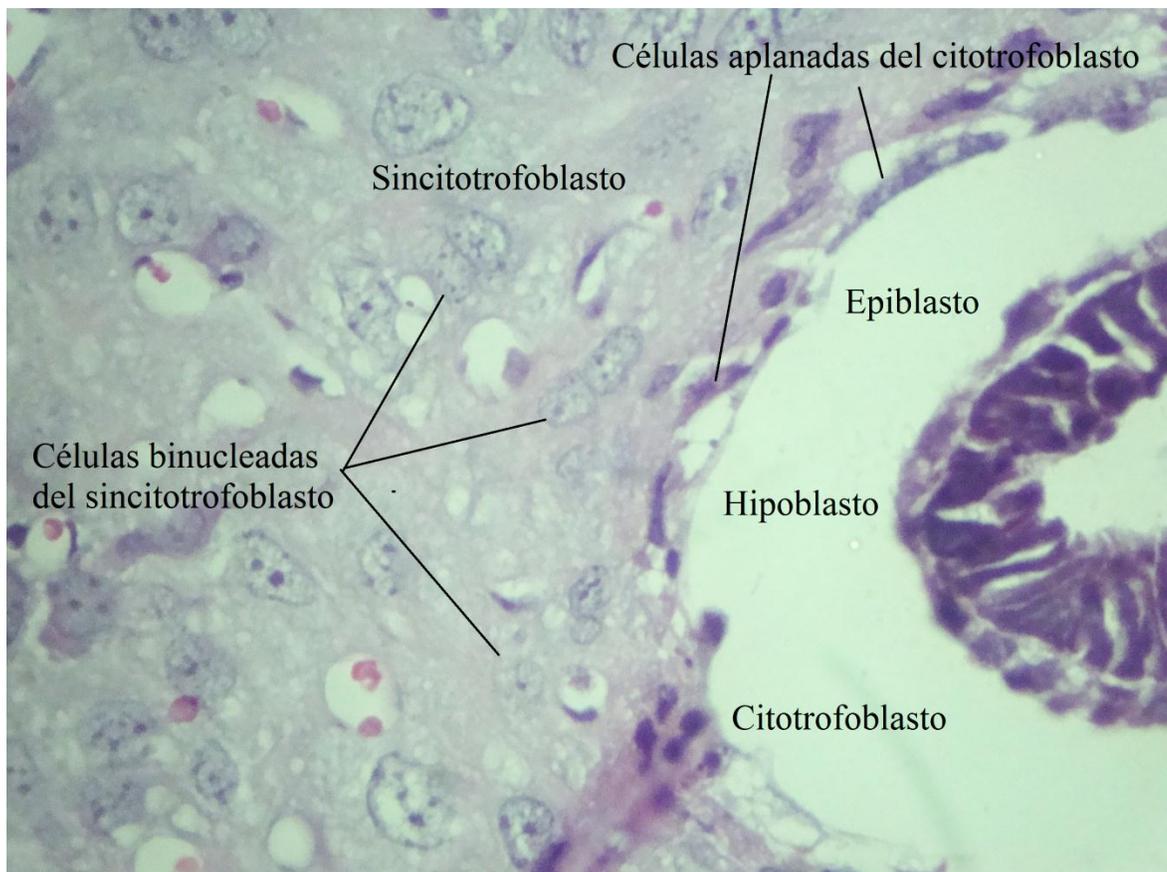


Lámina 51, Transición de parte del blastocele a trofoblasto

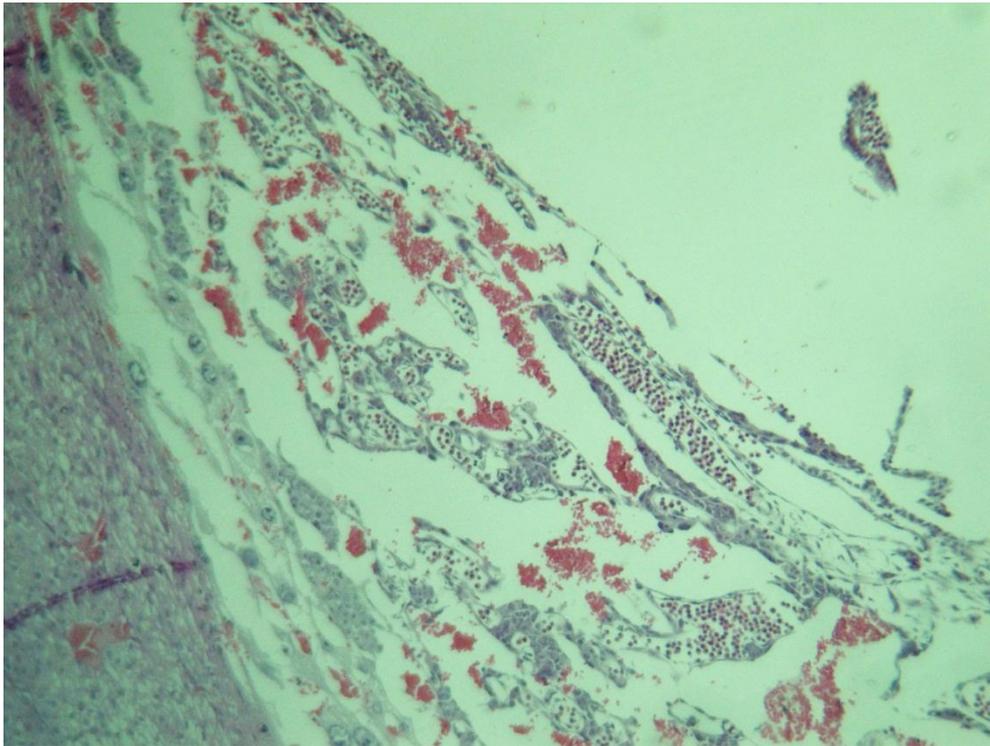


Lámina 52, Islotes sanguíneos deciduales, Día 14

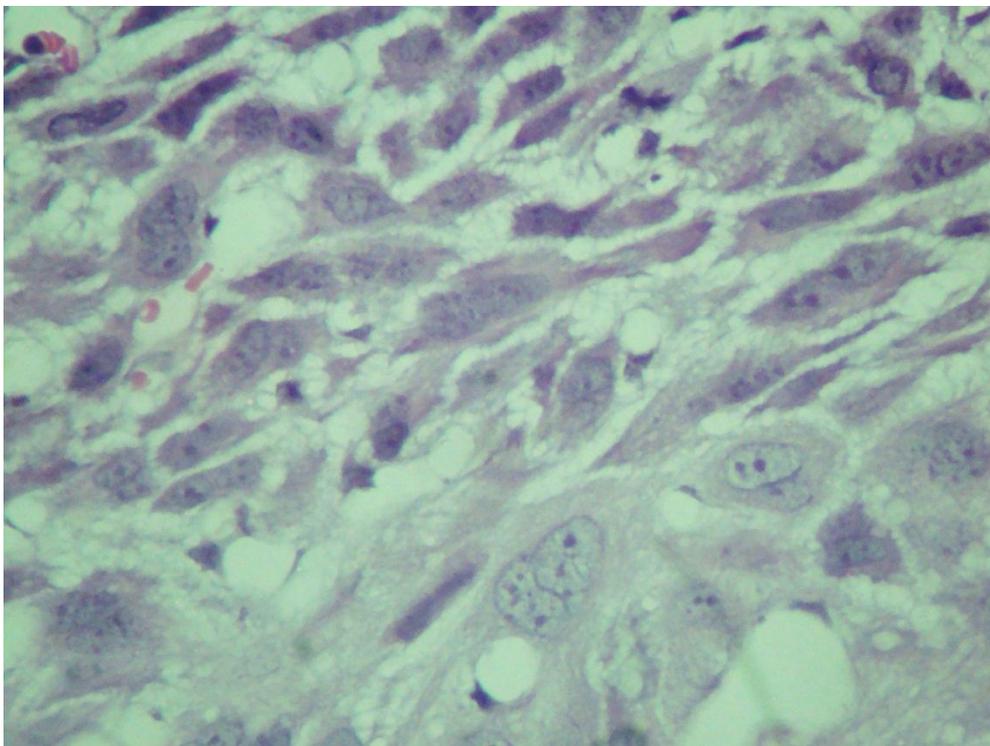


Lámina 51, Vista detallada del sincitiotrofoblasto con células binucleadas, Día 7

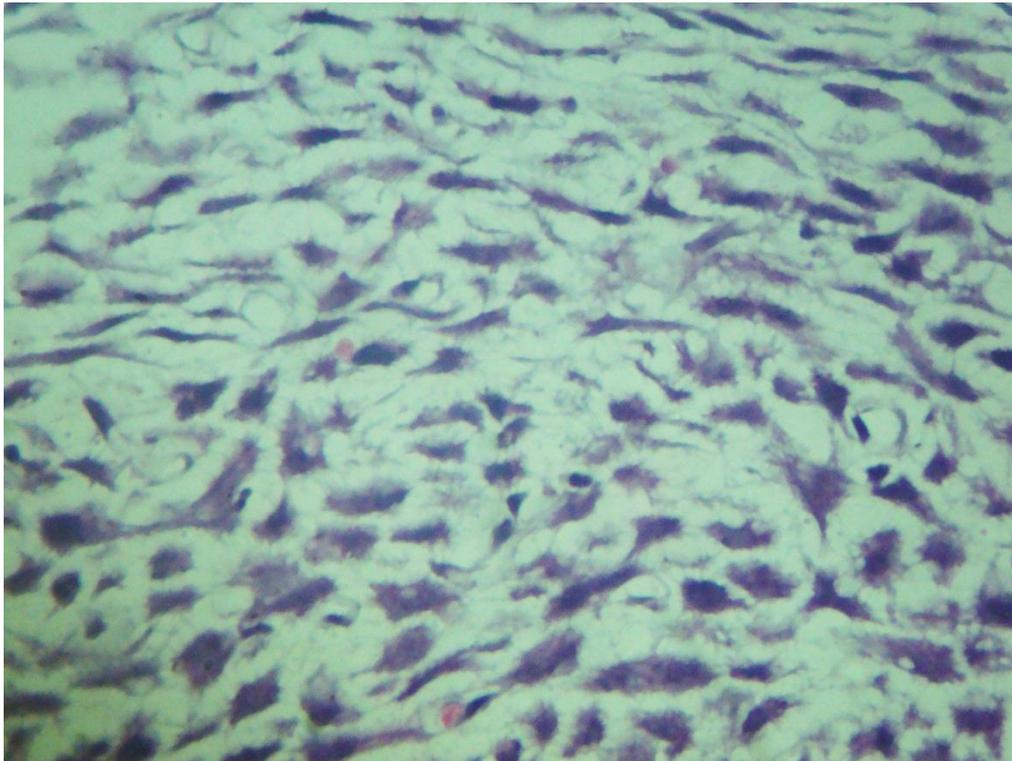


Lámina 52, Inferiormente se visualiza parte de la decidua y superiormente el miometrio

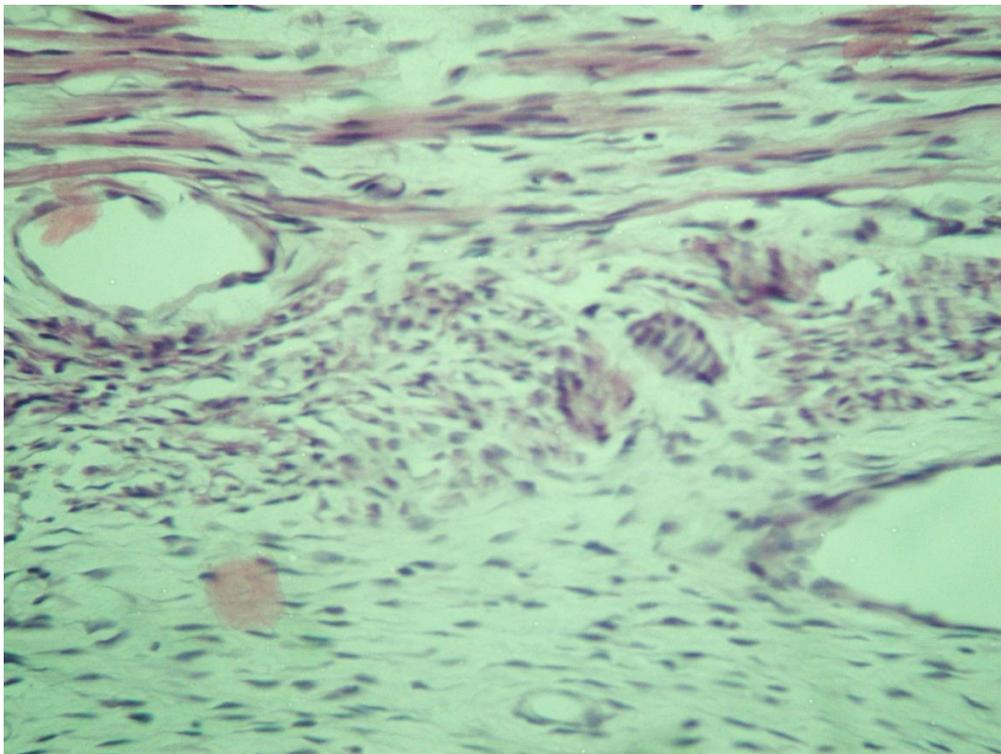


Lámina 53, Superiormente se visualiza el perimetrio e inferiormente el miometrio

CAPÍTULO 6: ANÁLISIS Y CONCLUSIONES

Una óptima elaboración de material didáctico como láminas histológicas de embriología es posible; para ello, se requiere del compromiso de un equipo de trabajo en el que participen expertos en procedimientos de Histología y de Embriología.

Como sucede con todos los trabajos experimentales, gran parte del tiempo debe invertirse en la búsqueda de resultados y en muchas ocasiones se debe comenzar de nuevo para plantear alternativas o soluciones a los problemas que se van presentando.

Con este trabajo, se lograron los objetivos propuestos: la elaboración del material histológico en embriología propio de la Universidad Nacional. Los resultados más satisfactorios se encontraron en los días 7, 10, 11, 12, 13 y 15. Y no sólo se logró la elaboración de láminas con embrión, sino también de láminas histológicas con tejidos adyacentes de la gestación que también tienen relevancia didáctica.

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.

Diferentes hipótesis surgieron al no encontrar embriones después del día 7, por ejemplo, que la rata hiciera un aborto endógeno y reabsorbiera los restos embrionarios como consecuencia del estrés previo a la anestesia.

Para obtener embriones en la primera semana de gestación es necesario que se ejecuten experimentos de fecundación invitro; in vivo 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.

Uno de los aportes de este trabajo es que al realizar la fijación completa de la rata gestante, el resto de la rata es utilizable para producción de láminas histológicas con otros fines investigativos, de propiedad de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. Entre las láminas posibles estarían: médula espinal, encéfalo, miología, tracto digestivo, urinario, respiratorio, hueso, etc.

El potencial didáctico que las láminas ofrecen es considerable. El material se encuentra en dos presentaciones, tal como se vio en el capítulo de resultados (5). Las láminas en físico se encuentran listas para su observación directa al microscopio y en forma digital. Se recolectaron suficientes fotografías que quedan anexas a este trabajo; de estas, algunas se encuentran con nomenclatura y otras se encuentran sin nombres según el interés del consultante.

Así mismo, los bloques de parafina con mejor calidad y de los cuales se obtuvieron los óptimos hallazgos, quedan disponibles para los docentes y los estudiantes que quieran producir nuevas láminas de Histología embrionaria.

6.1 Limitaciones y recomendaciones

Durante el procedimiento del trabajo se encontraron interrogantes que, con una intensiva y constante búsqueda bibliográfica y el análisis de resultados, fueron poco a poco solucionados.

La parte experimental del trabajo, tal como se explicó en el capítulo 3, sobre la metodología, se llevó a cabo en los siguientes sitios:

- El bioterio para cópula, cuidado y vigilancia de ratas en o para gestación.
- El laboratorio de fisiología para preparación de soluciones fijadoras e instrucción de sacrificio de ratas.
- El anfiteatro para sacrificio de especímenes, disección y primera fase de fijación.
- El laboratorio de histología donde se terminó la fijación, se disecaron piezas y se procesaron para la elaboración de láminas histológicas. Gran parte de las fotografías se tomaron dentro del laboratorio de Histología.

De estos cuatro espacios, el último fue el que mayor tiempo se utilizó para la elaboración del material didáctico, pero fue allí donde presentaron los siguientes inconvenientes:

1. En el momento en que las piezas uterinas grávidas ya estaban fijadas y listas para ser procesadas (octubre de 2014) el laboratorio estaba en mantenimiento e inventario, por lo cual se debió esperar hasta el siguiente período académico (febrero de 2015) para el procesamiento de las piezas, lo cual retrasó un trimestre del período experimental.
2. La Universidad Nacional de Colombia durante el primer semestre de 2015 entró en un paro administrativo que duró aproximadamente un mes, lo cual aplazó el último período de procesamiento, debido a que los bloques de parafina se utilizaban para buscar a profundidad los embriones.

Todo el trabajo en su parte experimental se hizo de manera metódica, siempre procurando la fijación del embrión, se produjeron muchos bloques de parafina que a pesar de mostrar un endometrio efectivamente grávido no se logró obtener tejido embrionario. Entre los métodos utilizados, se adoptó el sugerido por los directores que consistió en la fijación completa del espécimen (la rata gestante) y, de manera fisiológica, por medio de la perfusión intracardiaca. Otro de los métodos utilizados fue el uso de etanol a mayor concentración para una adecuada deshidratación del tejido, de hecho las láminas analizadas, es decir, las que mostraron resultados, se obtuvieron con esta técnica. Por último, se adoptaron métodos físicos: se amarraron los extremos de los cuernos uterinos y las piezas se rodearon con papel de filtro para colocar en el casete antes de su preparación.

Bibliografía

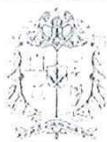
- Ávila Martínez, I. (2010). *Neuromorfología*. Recuperado el 13 de 06 de 2014, de Perfusión intracárdica: http://avila-costa.com/Neuromorphology/Link_de_la_Publicaciones.html
- Bedzhov, I., & Zernicka-Goetz, M. (2014). Self-Organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation. *Cell*, 1032-1044.
- Chirila, C. *Embrion 4 saptamani pictura*. Independiente, Bucarest.
- Congreso de Colombia. (1989). *Ley 84 de 1989*.
- Edwards, R. G. (1965). Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature*, 50-67.
- Eynard, A. R., Valentich, M. A., & Rovasio, R. A. (2008). *Histología y Embriología del ser humano*. Córdoba: Médica Panamericana.
- Fribourg, U., & Laussane, U. (2011). *Human Embryology*. Recuperado el 13 de 10 de 2014, de <http://www.embryology.ch/anglais/iperiodembry/carnegie01.html>
- García Peláez, I., Áртеaga 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>
- Gasser, R. F., Cork, J., & Noe, A. (2015). *The Virtual Human Embryo*. Recuperado el 02 de 02 de 2015, de <https://www.ehd.org/virtual-human-embryo/intro.php?stage=2>
- Hill, M. (2013). *UNSW Embryology*. Recuperado el 07 de 05 de 2014, de Embryology online education and research website: https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Main_Page
- 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
- Langman, S. (2007). *Embriología médica con orientación clínica*. Madrid: Panamericana.
- Le Vay, S. (1993). *The Sexual Brain*. Cambridge: MIT Press., 54-58.
- Liu, E. T., Hewett, C. E., Braun, R., Hyde, M. E., Jensen, L., & Lee, C. (24 de 03 de 2015). *Jackson Laboratory*. Recuperado el 28 de 03 de 2015, de Adult Mouse Anatomy: <http://www.informatics.jax.org/searches/AMA.cgi?id=MA:0002737>
- Medical Research Council. (2014). *EMAP*. Recuperado el 25 de 06 de 2014, de e-Mouse Atlas Project: <http://www.emouseatlas.org/emap/ema/home.html>
- Ministerio de Salud, República de Colombia. (1993). Resolución N° 008430 de 1993.

Montenegro, S., Gayol, M., & Tarrés, M. C. (2011). Aspectos éticos de la investigación con animales. *Revista Medica Rosario*, 69-74.

Mudarra Fraguas, I. (2011). *Guía analgesia y anestesia en ratas*. Madrid: Unidad SEA-ELX.

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>

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>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 005- 027-15

Fecha: 26 de marzo de 2015

Nombre completo del proyecto: "ESTRATEGIAS PARA ELABORACIÓN E MATERIAL HISTOLÓGICO DIDÁCTICO EN EMBRIOLOGÍA CON EMBRIONES DE RATA".

Versión número: 01

Sometido por: la estudiante Lina Fernanda Gamboa Latorre

Presentado por: el profesor Jaime Alfonso Beltrán Guerras, Coordinador

Departamento o Sección: Maestría en Morfología de la Facultad de Medicina

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 26 de marzo de 2015

EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996 actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

El Comité de Ética de la Facultad de Medicina certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo)
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación,
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

- | | | |
|---|--------------------------------|--|
| 1 | Amador Luis Roberto | Departamento de Patología |
| 2 | Arteaga Díaz Clara Eugenia | Departamento de Obstetricia y Ginecología |
| 3 | Duarte Gutiérrez Liz Marcela | Asesora Jurídica Facultad de Medicina |
| 4 | Guerrero Fonseca Carlos Arturo | Presidente Comité de Ética / Departamento de Ciencias Fisiológicas |
| 5 | Parra Pineda Mario Orlando | Departamento de Obstetricia y Ginecología |

3. El Comité consideró que el presente estudio:

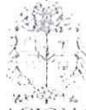
Etb/. Jeannette P. AL-

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401

Teléfono: (57-1) 316 5251 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 – 15008

Correo electrónico: eticasalud_fmbog@unal.edu.co

Bogotá, Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

a. Es válido desde el punto de vista ético.

b. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger animales experimentales son adecuadas.

4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales

- a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:

- a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité.
- c. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.

7. El Investigador principal deberá:

- a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética), de acuerdo con la normalidad que el INVIMA a generado a este respecto.
- d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
- g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance integrado.
- h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

8. Observaciones:

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite Concepto Aprobatorio.

Nombre: CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA
Título: PhD Doctorado en Bioquímica, MSc. en Farmacología y MSc. en Genética Humana
Cargo: Presidente Comité de Ética

Esp. Jeannette P. A.

