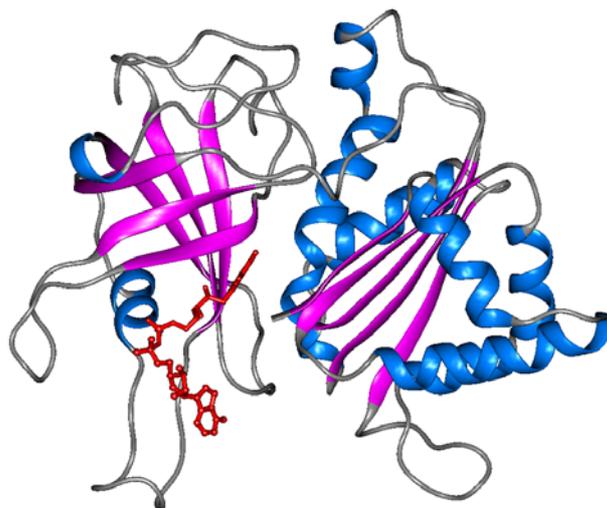


UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**



GUION DE PRÁCTICAS

**FUNDAMENTOS DE METODOLOGÍA BIOQUÍMICA
(Área Bioquímica)**

CURSO 2004/2005

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA

La utilización, tanto de productos químicos como de material biológico entraña ciertos riesgos, que en este curso se han tratado de reducir al mínimo. Un laboratorio de Bioquímica es un lugar convenientemente habilitado donde se pueden manejar y examinar distintos aspectos de un sistema biológico. Este tipo de trabajo debe ser llevado a cabo con una buena técnica aséptica, y por tanto requiere un ambiente limpio y ordenado. Cuando manejemos cualquier tipo de muestra debemos evitar que muestras ajenas y presentes en el ambiente se introduzcan en ellas contaminándolas. Para ello, el alumno deberá seguir las siguientes normas básicas:

- 0 Es importante vestir una bata adecuada para proteger las ropas y especialmente el cuerpo. Al iniciar y finalizar el trabajo, lavarse las manos con agua y jabón.
- 1 Está estrictamente prohibido fumar y comer en el laboratorio. Cuando se manipulan microorganismos hay que evitar llevarse las manos a la boca, nariz, ojos, etc...
- 2 En los trabajos en los que se use luz ultravioleta debe tenerse en cuenta que la exposición a este tipo de radiación es peligrosa, ya que tiene poder mutagénico. Por tanto, nunca se debe mirar directamente el foco emisor. Hay que protegerse los ojos y cualquier zona de la piel expuesta a la radiación (gafas, guantes, máscaras, etc...)
- 3 Mantener el área de trabajo limpia, y el laboratorio en general. No dejar basura sobre las mesas, fregaderas o áreas comunes (puntas de micropipeta utilizadas, resto de soluciones, papeles,...) todo el material descartable debe ir inmediatamente a la papelera (general o vidrio) o al fregadero (según su consistencia y la indicación del profesor). Dejar el laboratorio y el material limpio (con jabón y pasado por agua destilada) antes de dejar el laboratorio.
- 4 Antes de utilizar por primera vez cualquier producto químico, leer las indicaciones del bote. Si es necesario, utilizar guantes o mascarilla durante la manipulación. En caso de duda, preguntar al profesor.
- 5 Nunca se debe pipetear con la boca: utilizar las peras o las micropipetas disponibles en el laboratorio. En el caso de disoluciones volátiles o tóxicas, trabajar en campana extractora. Es esencial utilizar etiquetas y rotuladores. Marcar bien las disoluciones que se preparen, y no utilizar nunca botellas "sospechosas" ni soluciones o reactivos sin etiquetar. El saber que es cada cosa y que contiene cada frasco es el mejor sistema para evitar confusiones y accidentes innecesarios.
- 6 No deben dejarse botellas de disolventes volátiles (éter, acetona, isopropanol...) abiertas sobre la mesa. Tampoco deben exponerse al sol o a las proximidades de alguna llama.
- 7 No utilizar ningún aparato eléctrico por primera vez sin atender a las indicaciones previas del profesor. Si un aparato eléctrico da señales de comportamiento anormal, avisar inmediatamente al profesor. Dicho aparato deberá ser desconectado inmediatamente hasta que sea revisado y reparado. Debe tenerse cuidado con el derrame de soluciones conductoras de la electricidad, que son la mayoría, especialmente si están en contacto con enchufes o cables; en caso de que así ocurra, debe desconectarse primero la corriente, limpiar la solución vertida, lavar la zona afectada con abundante agua destilada y secarla bien.
- 8 Las células y los microorganismos deben manejarse siempre alrededor de la llama o en campana de flujo laminar. Se deben evitar los desplazamientos innecesarios por el laboratorio, ya que pueden crear corrientes que originen contaminaciones o producir accidentes.
- 9 Libros, carpetas, abrigos y cualquier otro material que no se utilice en la realización del experimento deben estar apartados del lugar de trabajo.
- 10 Seguir las indicaciones del profesor para deshacerse del material biológico o contaminado. Para tal fin utilizaremos los recipientes adecuados. Estos recipientes serán esterilizados posteriormente. **NUNCA SE DEBEN TIRAR MICROORGANISMOS POR LA FREGADERA O A LA BASURA COMÚN. BAJO NINGÚN CONCEPTO SE DEBE SACAR UNA MUESTRA CONTAMINADA DEL LABORATORIO.**

Area: Bioquímica y Biología Molecular (60 horas)

PROGRAMA DE FUNDAMENTOS DE METODOLOGIA BIOQUIMICA

7. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE PROTEINAS

INTRODUCCION.

La purificación de proteínas, una de las técnicas bioquímicas más comunes, es una primera etapa esencial para el estudio de las propiedades físicas y biológicas de las mismas. Para conseguir la purificación de una determinada proteína, ésta debe ser liberada en primer lugar de la matriz biológica en la que se encuentra y luego separada selectivamente de otras proteínas mediante un procedimiento de fraccionamiento apropiado.

Los métodos de separación se basan en diferentes características de las proteínas, tales como la solubilidad (fraccionamiento por adición de sales, fraccionamiento con solventes orgánicos ó precipitación isoelectrica), la carga (cromatografía de intercambio iónico, técnicas electroforéticas), el tamaño molecular (cromatografía de exclusión), las interacciones bioespecíficas (cromatografía de afinidad), etc. En los procedimientos de aislamiento generalmente las técnicas de alta capacidad, es decir aquellas que se pueden aplicar a grandes volúmenes o elevadas concentraciones de proteínas como, por ejemplo, la precipitación con sulfato amónico, preceden a otras, como la cromatografía de exclusión, que por tener menor capacidad son utilizadas en las etapas finales de los mismos.

-*Estructura de Proteínas*. C. Gómez-Moreno and J. Sancho. Ariel. Barcelona. (2003)

-M.T. Bes, J. Sancho, M.L. Peleato, M. Medina, C. Gómez-Moreno and M.F. Fillat. Purification of coloured photosynthetic proteins for understanding protein isolation principles. *Biochemistry and Molecular Biology Education* 31, 119-122 (2003)

PURIFICACION PARCIAL DE LA FERREDOXINA-NADP⁺ REDUCTASA DE ESPINACA

La proteína ferredoxina-NADP⁺ reductasa (FNR) está localizada en la cara estromática de los tilacoides en los cloroplastos de las células eucariotas, o en la del citosol de cianobacterias. Su función es llevar a cabo la fotorreducción del NADP⁺, utilizando electrones bombeados por el fotosistema I como consecuencia de las reacciones fotoquímicas y la consiguiente lisis del H₂O. Se trata de una flavoproteína que contiene como centro rédox un grupo de FAD unido de forma no covalente. Su peso molecular es de 36.000 Da y su punto isoelectrico cercano a 5.

Para el aislamiento de la FNR se va a utilizar un procedimiento que consta de tres etapas principales: la primera, es un fraccionamiento con acetona; la segunda, una cromatografía de intercambio iónico en columna de DEAE-celulosa y la tercera, una cromatografía de afinidad en Azul de cibacrón insolubilizado en Sepharosa. Este procedimiento permitirá, al mismo tiempo, la obtención como subproducto de la ferredoxina (Fd), que es una proteína que está también asociada con el fotosistema I.

La FNR tiene capacidad para transferir electrones desde el NADPH a diversos substratos artificiales como el diclorofenol-indofenol (DCPIP) o el ferricianuro. Esta actividad, que se conoce como actividad diaforasa, es de gran utilidad para el seguimiento del procedimiento de purificación y para realizar una Tabla de purificación.

I -Preparación del extracto crudo

Generalmente, la primera etapa de los procedimientos de aislamiento de proteínas es la obtención del llamado extracto crudo, ya sea procedente de la ruptura total de un tejido, de un solo tipo de células o de algún orgánulo subcelular previamente aislado. Este extracto crudo es una mezcla compleja de proteínas entre las que se encuentra, en mayor o menor proporción, la proteína de interés.

Un aspecto muy importante es disponer de un método de identificación inequívoco de la proteína que se pretende aislar, para poder detectarla en cada etapa de la purificación. En nuestro caso, aprovecharemos la actividad diaforasa de la FNR frente a aceptores artificiales adecuados para detectarla con facilidad durante el procedimiento de aislamiento.

Para elaborar una Tabla de Purificación, que nos dará idea del enriquecimiento en FNR logrado en cada etapa, se tomarán pequeñas alícuotas de las distintas preparaciones obtenidas durante el procedimiento de aislamiento. Antes de tomar cada alícuota es preciso medir el volumen total de la solución.

PROCEDIMIENTO.

Añadir a 75 gr de espinacas, previamente despeciadas, 110 ml. de tampón TRIS-HCl 50 mM, pH 8,0 y triturar en frío (baño de hielo) con una batidora durante 2 minutos. Filtrar el homogeneizado resultante a través de una doble capa de gasa, con la ayuda de un embudo, para eliminar los residuos insolubles. La solución verde resultante se considerará como el EXTRACTO CRUDO (E.C.) del que se guardará una fracción de 1 ml (**alícuota 1**), que será inmediatamente introducida en el frigorífico o congelador. El volumen total de E.C. se medirá antes de pasar a la siguiente etapa.

II- Fraccionamiento con acetona

El fraccionamiento con solventes orgánicos está basado en las diferencias de solubilidad que presentan las proteínas en soluciones acuosas de solventes orgánicos como el etanol, acetona, etc. Los solventes orgánicos disminuyen la constante dieléctrica del medio, lo que provoca un aumento de las atracciones electrostáticas entre las moléculas proteicas cargadas y una disminución de sus interacciones con el agua. Como consecuencia de ello, la solubilidad de las proteínas desciende. Los solventes orgánicos pueden producir la desnaturalización de las proteínas. Por esta razón es conveniente realizar las etapas de fraccionamiento con solventes a bajas temperaturas (entre -10 y -20 °C) y cada fracción debe ser redisolta con tampón frío antes de que llegue a alcanzar la temperatura ambiente.

PROCEDIMIENTO.

Verter el E.C. en un vaso de precipitados situado en un baño de hielo. Añadir, lentamente y con suave agitación, acetona preenfriada (a -15°C) hasta alcanzar el 35% (v/v) de la disolución. El volumen (en ml) de acetona que deberá añadirse es el siguiente:

$$\text{Vol. A} = [35/(100-35)] \times \text{Vol. E.C.}$$

Dejar reposar unos minutos, centrifugar 10 minutos a 5000 r.p.m. a 4 °C. Trasvasar el sobrenadante a un vaso de precipitados limpio y descartar el precipitado.

A continuación añadir acetona como antes hasta alcanzar una proporción del 75% (v/v). El volumen de acetona que deberá añadirse es el siguiente:

$$\text{Vol. B} = [(75-35)/(100-75)] \times \text{Vol. actual}$$

Dejar reposar el precipitado hasta el día siguiente. Eliminar por decantación la mayor parte de la acetona y centrifugar en frío (4 °C) a 5000 r.p.m. durante 10 minutos. Descartar el sobrenadante y dejar secar el precipitado al aire. Redisolver el precipitado en el mínimo volumen posible (10-20 ml.) de tampón TRIS-HCl 5 mM, pH 8,0. Dializar frente a 5 litros de este mismo tampón.

III. Cromatografía en DEAE (dietil-aminoetil)-celulosa.

La cromatografía en DEAE-celulosa está basada en la atracción electrostática entre partículas opuestamente cargadas. Muchos materiales biológicos, como por ejemplo los aminoácidos y las proteínas, tienen grupos ionizables y el hecho de que

puedan tener cargas positivas o negativas puede ser aprovechado para la separación de mezclas de estos componentes. La carga neta que presentan estos compuestos depende de los pKas de sus grupos ionizables y del pH del medio. La DEAE-celulosa es un intercambiador aniónico que presenta grupos dietil-aminoetil $[-CH_2-CH_2-NH^+-(CH_2-CH_3)_2]$ positivamente cargados. La elución de los iones fijados puede lograrse cambiando el pH y/o incrementando la concentración iónica.

PROCEDIMIENTO:

Preparación columna de DEAE-celulosa

Para la preparación de la columna de DEAE-celulosa vamos a utilizar un tubo de vidrio ó metacrilato, al que acoplaremos dos tapones de goma previamente perforados y conectados a tubos de goma con una punta de micropipeta.

Sobre uno de los tapones de goma, el que hará de base, se coloca un disco de papel de filtro, de forma que encaje lo mejor posible y el orificio de salida quede cerrado. La columna, con el tapón base perfectamente encajada, se coloca sujeta con pinzas en un soporte con pie. Es importante que la columna quede lo más vertical posible. A la cánula de salida, se le acopla tubo de goma del diámetro adecuado provisto de una pinza tipo Hoffman que permitirá cerrar la columna y regular su flujo.

Con la columna cerrada añadir aproximadamente un tercio de su volumen con tampón TRIS-HCl 50 mM pH 8,0 y llenar el resto con DEAE-celulosa, previamente equilibrada y suspendida en el mismo tampón. Dejar sedimentar unos minutos y abrir la pinza permitiendo un flujo suave a través de la columna. Si es necesario, continuar con adiciones de la DEAE-celulosa hasta que el lecho compactado alcance la altura deseada, aproximadamente un tercio de la columna.

Equilibrado de la columna.

Siempre es necesario adecuar el lecho cromatográfico a las condiciones de pH y fuerza iónica idóneas para llevar a cabo la separación. Para asegurar el equilibrado de la DEAE-Celulosa es conveniente hacer pasar por la columna una cantidad del tampón de cromatografía (en nuestro caso, TRIS-HCl 50 mM pH 8.0) igual a unas 3-5 veces el volumen de la columna empaquetada. Todo este proceso se realizará a temperatura ambiente por razones de comodidad y espacio. Habitualmente, todas estas operaciones se realizan en cámara fría (a 4 °C).

Cromatografía en DEAE-celulosa

Clarificar la solución obtenida tras la precipitación con acetona por centrifugación en frío (a 4 °C) a 14000 r.p.m. durante 10 minutos. Medir el volumen obtenido y guardar una fracción de 1 ml (**alícuota 2**) a -20°C .

Aplicar cuidadosamente la solución anterior en la parte superior de la columna de DEAE-celulosa. Las proteínas aniónicas se fijan en la parte superior que adquiere una coloración marrón. Una vez aplicada toda la muestra, lavar la columna, hasta que desaparezcan las impurezas no fijadas y que resultan visibles, con (al menos 15 ml) tampón TRIS-HCl 50 mM, pH 8.0. El líquido eluido de la columna, que contiene las proteínas que no se fijan al intercambiador, se descarta. Seguidamente, la FNR es eluida de la columna haciendo pasar por la misma 30 ml del tampón TRIS-HCl 50 mM, 0.15 M de NaCl, pH 8.0. Recoger el eluido de la columna en varios tubos de ensayo. Las fracciones que contiene la proteína se juntan. Medir el volumen y tomar una alícuota de 0.5 ml (**alícuota 3**). Diluir un tercio la preparación de FNR con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 8.0.

La Fd debería estar todavía fijada a la columna de DEAE-celulosa formando una banda rojiza en la parte superior de la misma. Para obtener esta proteína, eluir con 20 ml de tampón TRIS 50 mM, 0.5 M NaCl, pH 8.0. La recogida de la Fd esta facilitada en este caso ya que su elución de la columna de DEAE-celulosa puede seguirse visualmente.

IV. Cromatografía de Afinidad en columna de Azul de Cibacrón- Sepharosa.

La purificación por técnicas de cromatografía de afinidad, a diferencia de otras técnicas cromatográficas o de técnicas como la electroforesis y la centrifugación, no depende de las propiedades físicas de las moléculas a separar. En vez de eso, explota las propiedades poco comunes de interacciones biológicas altamente específicas para conseguir la separación. Como consecuencia, la cromatografía de afinidad es teóricamente capaz de proporcionar una purificación total en una sola etapa, incluso a partir de mezclas complejas. Las técnicas de cromatografía de afinidad fueron desarrolladas en principio para la purificación de enzimas, pero se extendieron pronto a sistemas inmunoquímicos (antígenos / anticuerpos), a nucleótidos, a ácidos nucleicos, a receptores de membrana, e incluso a células enteras o fragmentos de células. Estas técnicas requieren que el material que se pretende aislar pueda fijarse reversiblemente a un ligando específico que está unido a una matriz insoluble.

Para el aislamiento de la FNR vamos a utilizar el colorante azul de cibacron unido a la matriz Sepharose 4B. Este colorante puede fijar reversiblemente a enzimas que requieren nucleótidos, a factores de coagulación, y algunas proteínas séricas como la albúmina.

PROCEDIMIENTO.

Con el derivado Azul de Cibacron-Sepharosa, que ha sido preparado en nuestro laboratorio con anterioridad, montar en una columna sobre un soporte de vidrio con unos 9 ml de derivado empaquetado, de forma similar a la utilizada para la preparación de la columna de DEAE-celulosa. Equilibrar la columna haciendo pasar 5 volúmenes del tampón TRIS-HCl 50 mM, pH 8.0.

Aplicar la preparación de FNR obtenida después de la cromatografía en DEAE-celulosa, previamente dializada o diluida para reducir la concentración salina. Lavar la columna con 15 ml del tampón TRIS de equilibrado. Todas las proteínas que no tengan afinidad por el azul de cibacron pasarán libremente por la columna de afinidad.

La FNR, que quedará fijada en la columna, es eluida con 30 ml de tampón TRIS-HCl 50 mM, 0.5 M NaCl, pH 8.0. Recoger el eluido en tubos con unos 2 ml cada uno. Medir la absorbancia a 280 nm de las fracciones y representar el perfil de elución de la cromatografía (absorbancia en ordenadas frente número de fracción en abscisas). En este caso los tubos centrales de la cromatografía tendrán un color amarillento debido a la FNR. Reunir las fracciones correspondientes al pico principal. Medir el volumen de FNR obtenido y guardar toda la proteína (**alícuota 4**).

BIBLIOGRAFIA:

Naval, J., Calvo, M., Lampreave F. y Piñeiro, A. (1983). *Biochemical Education* **11**, 5-8.

V. Caracterización espectroscópica de las preparaciones de FNR y Fd.

Ambas proteínas presentan una absorción en la zona del visible y del UV característica que pueden servir como criterio de pureza de las preparaciones obtenidas. Para ello efectuaremos un espectro de absorción entre 250 nm y 800 nm de las dos preparaciones.

El espectro de la FNR debería presentar un pico de absorción a 274-280 nm, característico de todas las proteínas, y otros picos de absorción en la zona del visible típicos de las flavoproteínas (FAD en nuestro caso, 390 y 458 nm).

La relación entre la absorbancia a 280 nm y la obtenida a una determinada longitud de onda del visible, puede servir como criterio de pureza de ambas proteínas:

Para la FNR de espinaca (pura), la relación entre la $A_{274 \text{ nm}} / A_{458 \text{ nm}} = 8.0$

Para la Fd de espinaca (pura), la relación entre la $A_{274 \text{ nm}} / A_{420 \text{ nm}} = 2.04$

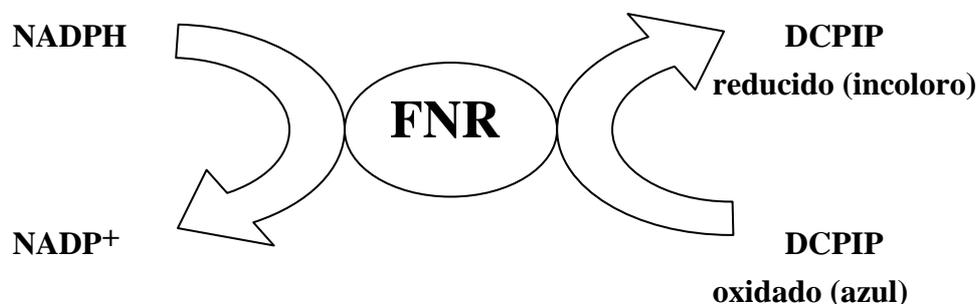
El espectro, permite también la cuantificación de cada proteína, en caso de estar puras, si se conoce su coeficiente de extinción molar a una determinada longitud de onda.

Para la FNR de espinaca (pura), $\epsilon_{458 \text{ nm}} = 9.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Para la Fd de espinaca (pura), $\epsilon_{420 \text{ nm}} = 9.4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

VI. Medida de la actividad diaforasa de la FNR

Se conoce como actividad diaforasa a la capacidad que tiene la enzima FNR para transferir electrones desde el NADPH a diversos substratos artificiales como el diclorofenol-indofenol (DCPIP) o el ferricianuro.



PROCEDIMIENTO.

Se medirá (por duplicado) la actividad diaforasa de las diferentes alícuotas obtenidas durante el procedimiento de aislamiento. Las cantidades que deberá utilizarse (valores orientativos) son las siguientes:

Alícuota 1 (E.C.), sin diluir

Alícuota 2 (fraccionamiento acetona), dilución 1/4

Alícuota 3 (cromatografía DEAE-celulosa), dilución 1/4

Alícuota 4 (cromatografía Azul-cibacrón-sepharose), dilución 1/4

Para diluir las muestras y preparar todos los reactivos se utilizará tampón TRIS-HCl 50 mM, pH 8.0.

	cubeta ref:	cubeta muestra:
TRIS 50 mM, pH 8	800 μ l	390 μ l
DCPIP 0.19 mM	200 μ l	500 μ l
NADPH 0.5 mM	-----	100 μ l
muestra	-----	10 μ l

Medir variación de absorbancia con el tiempo a 620 nm. Con este dato y el coeficiente de extinción molar del DCPIP (ϵ) se calcula la velocidad enzimática en UI / ml (μ moles de sustrato transformados por minuto y ml)

$$\epsilon \text{ DCPIP } 620 \text{ nm} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

VII. Determinación de proteínas por el método de Lowry

El procedimiento de Lowry permite la determinación del contenido total de proteínas de una solución. El grupo fenólico de los residuos de tirosina de proteínas produce una coloración azul-púrpura, con un máximo de absorbancia a 660 nm, con el reactivo de Folin-Ciocalteu, que consta de tungtato, molibdato y fosfato sódico. Este método tiene una sensibilidad por debajo de 10 µg/ml y es probablemente el método de determinación de proteínas más utilizado a pesar de que es un método relativo, en el que pueden interferir el TRIS, tampones zwitteriónicos como Pipes y Hepes y el EDTA, y el tiempo de incubación es crítico para obtener resultados reproducibles. La reacción depende también del pH por lo que es esencial trabajar a un pH entre 10.0 y 10.5.

El procedimiento de Lowry se utilizará para determinar la concentración de proteínas en las 4 alícuotas obtenidas (E.C., la obtenida después del fraccionamiento con acetona, la obtenida después de la DEAE-celulosa, la FNR eluida del cibacron) y la preparación de Fd.

Reactivos:

- 1) CO_3Na_2 al 3% en NaOH, 0.1M
- 2) $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 2%
- 3) Tartrato sódico al 4%
- 4) Reactivo de Folin-Ciocalteu (comercial)

En el momento de llevar a cabo la medida se preparan los siguientes reactivos:

Reactivo A: Mezcla 1 ml de reactivo 2 + 1 ml de reactivo 3 + 98 ml de reactivo 1

Reactivo B: reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/2 con H_2O (por ejemplo 4 ml. reactivo de Folin-Ciocalteu más 4 ml H_2O).

PROCEDIMIENTO.

Añadir en tubos de ensayo distintas cantidades de las muestras a valorar y de patrones de albúmina bovina estándar como se indica a continuación, y completar hasta 0.5 ml con agua. Al tubo que servirá de referencia se añade agua.

Patrones. Se utilizará una solución de albúmina bovina estándar de 0.5 mg/ml, de la que se añadirá las siguientes cantidades a tubos de ensayo:

<u>Tubo</u>	<u>Albúmina (0.5 mg/ml.)</u>	<u>Vol. Agua</u>
P1	0.5 ml	0.0 ml
P2	0.3 ml	0.2 ml
P3	0.2 ml	0.3ml
P4	0.1 ml	0.4 ml
P5	0.05 ml	0.45 ml
blanco	0.0 ml	0.5 ml

Muestras. Para determinar la concentración de proteínas en las diferentes preparaciones obtenidas se tomarán en tubos de ensayo las siguientes cantidades:

<u>Tubo</u>	<u>Vol.(ml)</u>	<u>Vol. (ml)</u>
1. Alícuota 1 (E.C.)	0.005	0.495
2. Alícuota 1 (E.C.)	0.01	0.49
3. Alícuota 2 (fraccionamiento acetona)	0.01	0.49
4. Alícuota 2 (fraccionamiento acetona)	0.025	0.475
5. Alícuota 3 (cromatog. DEAE-celulosa)	0.01	0.49
6. Alícuota 3 (cromatog. DEAE-celulosa)	0.025	0.475
7. Alícuota 4 (cromatog. Azul-cibacrón-sepharose)	0.05	0.45
8. Alícuota 4 (cromatog. Azul-cibacrón-sepharose)	0.1	0.4
9. Fd1 (ferredoxina)	0.025	0.475
10. Fd2 (ferredoxina)	0.05	0.45

Añadir a cada tubo 2.5 ml del reactivo A y mezclar cuidadosamente. Después de dejar 10 minutos a temperatura ambiente, añadir 0.25 ml. del reactivo B a cada tubo y agitar inmediatamente. Al blanco se añadirá doble cantidad de los reactivos A y B. Dejar los tubos a temperatura ambiente 30 minutos y medir la absorbancia a 750 nm de los tubos frente al blanco. Construir una recta de calibrado con los resultados de los patrones de albúmina bovina y determinar sobre ella la concentración de proteínas de las diferentes muestras analizadas.

BIBLIOGRAFIA:

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J.,Farr, A.I., Randall, R.J. (1951). *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.

VIII. Tabla de purificación

Con los datos obtenidos, completar la siguiente Tabla de purificación:

FRACCION	E.C	Frac. Acetona	DEAE-Cel.	Cibacrón
Volumen total (ml)				
Proteína total (mg)				
Actividad enzimática (Total UI)				
Actividad enzimática específica (UI/mg)				
Rendimiento (%)				
Purificación (nº veces)				

Para calcular el rendimiento y el número de purificaciones, utilizaremos las siguientes relaciones:

-Rendimiento = $100 \times \text{Actividad enzimática de una determinada preparación} / \text{Actividad enzimática E.C.}$

-Purificación = $\text{Actividad específica de una determinada preparación} / \text{Actividad específica E.C.}$

MATERIALES Y REACTIVOS:

Cada grupo:

- Gradilla con 20-25 tubos de ensayo.
- Columna de vidrio fina con sus tapones y gomas thygon.
- Columna de jeringa de plástico de 10 ml con sus gomas thygon.
- 2 pinzas Hoffman.
- 1 vaso de 100 ml.
- 1 vaso de 1l.
- 1 erlenmeyer de 250 ml, 1 erlenmeyer de 100 ml.
- 1 tubo centrifuga de 250 ml, 1 tubo centrifuga de 50 ml.
- 1 embudo tamaño mediano.
- Un soporte. 2 nueces y dos pinzas.
- Juego variado de pipetas (5, 10, 1 y 0.5 ml.)

General:

- 3 vasos de 5 l. - Batidora
- 3 vasos de 2 l.
- Cubetas de plástico.
- Cubetas de cuarzo (2).
- Gel cromatográfico: Azul de Cibacron y DEAE-celulosa.
- Espinacas
- Acetona preenfriada.
- Gasas.
- Micropipetas.
- Puntas de micropipetas.
- Tijeras.
- Balanza y Granatario.
- Reactivos Lowry, 1, 2 ,3 y Folin.
- DCPIP 0.19 mM
- NADPH 0.5 mM.
- Tripas de Diálisis.
- 2 Espectrofotómetros.
- Tris/HCl 50 mM pH 8

IX.ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

INTRODUCCION

El término *electroforesis* define el fenómeno por el cual una molécula con una carga neta se desplazará en un campo eléctrico. La *electroforesis*, por tanto, ofrece un método poderoso para separar las proteínas y otras macromoléculas, tales como el DNA y el RNA.

Las separaciones electroforéticas se realizan casi siempre sobre geles. Los geles de poliacrilamida son los soportes de elección para la electroforesis, porque son químicamente inertes y se forman con facilidad mediante polimerización de la acrilamida. Además, escogiendo distintas cantidades de acrilamida y metilen-bisacrilamida (un reactivo que realiza enlaces cruzados) y, variando los tiempos de polimerización, se pueden conseguir tamaños de poro controlados, que servirán como tamices moleculares que potencian la separación.

$\text{H}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2 + (\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-)_2\text{CH}_2$ ----- gel de poliacrilamida*

acrilamida

bis-acrilamida

*Para que ocurra la polimerización a temperatura ambiente, es precisa la presencia de un catalizador (persulfato amónico) y un cocatalizador (T.E.M.E.D.)

Las **proteínas** pueden separarse muy bien, según sus masas moleculares, utilizando electroforesis sobre geles verticales de poliacrilamida-SDS, en condiciones desnaturizantes. La mezcla de proteínas se disuelve primero en un medio con dodecil sulfato sódico (SDS), un detergente aniónico capaz de romper todas las interacciones no covalentes en las proteínas nativas. También se añade 2β-mercaptoetanol para reducir los puentes disulfuro. Los aniones de SDS se unen a la cadena principal a razón de un SDS por cada dos aminoácidos, lo que da al complejo SDS-proteína desnaturizada una carga negativa aproximadamente proporcional a la masa de la proteína. Por tanto, la movilidad electroforética en un gel tridimensional depende fundamentalmente del peso molecular de la proteína. El procedimiento permite la determinación de pesos moleculares en relación con unos patrones de proteínas conocidos.

La electroforesis sobre gel de poliacrilamida-SDS es rápida, sensible y de alta resolución. Cuando se tiñen las proteínas con azul de Coomassie, bastan 0.1 µg para dar una banda diferenciada. Por ello y porque tiene validez general, esta técnica es la más ampliamente utilizada como criterio de pureza de proteínas.

MATERIALES Y REACTIVOS:

- Equipo y fuente de electroforesis.
- Vidrios, separadores y peines
- Puntas de micropipetas
- Tubos eppendorf y gradillas
- Pipetas Pasteur y Pipetas de vidrio graduadas
- Estándares de peso molecular (Sigma).
- Agitador magnético, matraces.

SOLUCIONES:

- Acrilamida 30% (p/v)-bis-acrilamida 0.8% (p/v) en agua destilada
- SDS, 10%
- TRIS/HCl, 1 M, pH 6.8
- TRIS/HCl, 1.5 M, pH 8.8
- TRIS/HCl, 2 M, pH 6.8.
- Persulfato amónico 10% (p/v). Prepararlo nuevo cada vez.
- T.E.M.E.D. (comercial)
- Solución desnaturalizante (x2): Para tratamiento de las muestras. La concentración (x2) de los reactivos que la componen es la siguiente:
 - TRIS/HCl 0.2 M, pH 6.8; SDS 5% (p/v); glicerol 20% (v/v);
 - azul de bromofenol 0.04% (p/v); 2-mercaptoetanol 10% (v/v).
- TRIS/HCl 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 1%, pH 8.3.
- Solución colorante **stock** concentrada, que contiene:
 - 1,25 g de Azul de Coomassie
 - 250 ml de metanol
 - 50 ml de ácido acético glacial
 - 200 ml de agua
- Solución colorante diluida, que contiene:
 - 100 ml de solución stock concentrada
 - 400 ml de metanol
 - 50 ml de ácido acético glacial
 - 450 ml de agua
- Solución decolorante, que contiene:
 - 200 ml de metanol
 - 50 ml de ácido acético
 - 20 ml de glicerina (opcional)
 - Agua destilada hasta completar 1 litro.

PROCEDIMIENTO:

Preparación de los geles de poliacrilamida.

Los geles de poliacrilamida utilizados, de 1.5 mm de espesor, constan de dos partes y se preparan sobre moldes verticales de vidrio. El gel superior (gel concentrador o "stacking gel") tiene alrededor de 2 cm de longitud y los pocillos para aplicar las muestras. El gel inferior (gel separador o "running gel") tiene un recorrido de unos 6 cm. La composición química de los mismos es la siguiente:

Reactivos	gel concentra dor 4% (ml)	gel separador 10% (ml)
acril./bis-acril 30:0.8	1.3	6.6
TRIS/HCl 1 M pH 6.8	1.4	--
TRIS/HCl 1.5 M pH 8.8	--	5.1
SDS, 10%	0.1	0.2
agua destilada	7.1	8.0
persulfato amónico 10%	0.1	0.1
T.E.M.E.D.	5 μ l	10 μ l
Volumen total	10	20

Preparación y aplicación de las muestras.

Las muestras (por ejemplo 10 μ l) se mezclan con un volumen igual de la solución desnaturante y se mantienen durante 5 minutos en baño de agua hirviendo. A continuación, se aplican con cuidado 10 μ l de cada muestra en los pocillos rectangulares de la parte superior del gel concentrador, y sumergidos en el tampón de electroforesis TRIS-HCl 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 1%, pH 8.3. En cada recorrido electroforético debe incluirse un solución patrón con varias proteínas de peso

molecular conocido. La preparación de estos patrones de pesos moleculares se realiza siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Recorrido electroforético

La electroforesis se desarrolla hasta que el azul de bromofenol alcanza el extremo inferior del gel separador (alrededor de una hora), a unos 120 V y unos 40 mA (para geles de un tamaño de 10 x 8 x 1.5 cm).

Tinción de proteínas.

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se coloca en una caja de plástico de fondo plano y se sumerge con una solución de Azul de Coomassie (diluida). Se mantienen en posición horizontal y agitación suave durante 2 h. A continuación se retira el colorante y se lava el gel con la solución decolorante de Coomassie, cambiándola varias veces hasta obtener la claridad de fondo deseada.

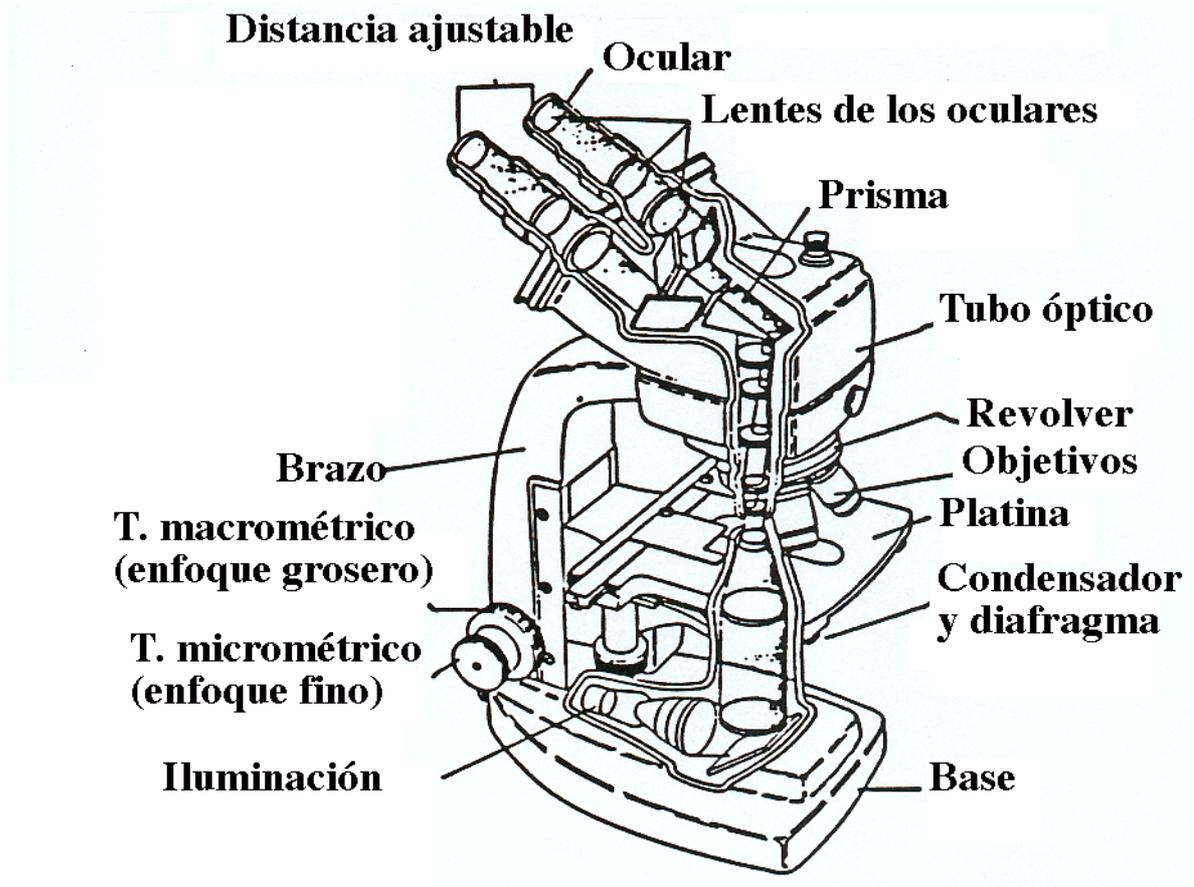
BIBLIOGRAFIA:

Laemmli, U.K. (1970). *Nature* **227**, 680-685.

8. FUNDAMENTOS DE MICROSCOPIA.

- MANEJO DEL MICROSCOPIO OPTICO (RECORDATORIO)

1. DESCRIPCION DEL MICROSCOPIO



SOPORTE MECÁNICO

- UN PIE PESADO o base, que da estabilidad al microscopio.
- UN BRAZO, que articula con:
 - EL TUBO OPTICO: lleva las lentes oculares en la parte superior, y objetivos, en la pieza giratoria o revolver en la parte inferior.
 - LA PLATINA: es la plataforma sobre la que se colocan las preparaciones. Lleva un carro móvil que permite desplazamientos transversales y en sentido vertical.

La distancia entre el tubo óptico y la platina puede variar, lo que permite el **enfoque**. La variación de distancia entre estos, puede hacerse con el tornillo macrométrico, cuyo

giro da lugar a una gran variación de distancia (enfoque grosero) y con el tornillo micrométrico cuyo giro corresponde a pequeñísimas variaciones de distancia (enfoque fino).

PARTE OPTICA

- OCULARES Puede haber dos lentes oculares (microscopio binocular) o una sola (microscopio monocular). En muchos modelos, puede ajustarse la distancia entre ellos (binóculos) para adaptarse a la distancia interpupilar de cada usuario. El aumento está indicado en ellos (X10, X12... etc). En el ocular puede incluirse una escala micrométrica para medir objetos.

- OBJETIVOS: se encuentran situados en la base de una pieza giratoria llamada revolver. Cada microscopio lleva un juego de diversos objetivos, que permite trabajar con diferentes aumentos. Los aumentos están indicados en la lente (por ejemplo: 40 x = 40 aumentos).

- SISTEMA DE ILUMINACION: pueden tener el sistema de iluminación incorporado en la base, o captar mediante un espejo, luz procedente de una lamparita o luz solar. Usar la parte cóncava para luz artificial, y la parte plana para luz solar.

- DIAFRAGMA: regula la cantidad de luz que pasa a través del espécimen y a través de las lentes del microscopio. La posición del diafragma debe de ser adaptada a cada muestra y a cada aumento utilizado. Permite el contraste de la muestra con el medio que lo rodea.

- CONDENSADOR: consiste en una lente o serie de lentes que dirigen la luz hacia el espécimen. El condensador puede colocarse a diferentes distancias en algunos microscopios.

Estas piezas son variables según el modelo de microscopio.

2. USO DEL MICROSCOPIO

- Los aumentos totales, con cada juego de objetivos se obtienen de multiplicar los aumentos del objetivo x los aumentos del ocular.

- ENFOQUE:

- Colocar la preparación en la platina, sujetarla con las pinzas de presión lateral y centrarla mediante los tornillos situados a la derecha. Cerciorarse de que la posición de la preparación es: portaobjetos abajo y cubreobjetos arriba.

- Colocar el objetivo girando el revolver, tras levantar ligeramente el tubo óptico (los objetivos de mayores aumentos suelen ser más largos).

- Aproximar, mirando por fuera, el tubo óptico y la preparación. (tornillo macrométrico).

- Mirando por el ocular, **girar muy despacio**, alejando el tubo óptico con el tornillo macrométrico. Los aumentos de un objetivo son inversamente proporcionales a la distancia focal, por lo que dependiendo del objetivo, el plano de enfoque va a estar más o menos próximo a la preparación.

- Tras obtener el máximo de nitidez con el tornillo macrométrico, afinar el enfoque con el micrométrico. Observar que pueden verse nítidos diferentes planos de nuestra muestra. Adaptar la iluminación usando las diferentes posiciones del condensador, y la apertura del diafragma. Cada muestra y cada aumento usado requieren la adaptación de la iluminación.

- Tras realizar el enfoque con un objetivo de poco aumento, centrar la muestra en el campo, y girando el revolver colocar el objetivo de mayor aumento, repitiendo el proceso de enfoque.

9. TECNICAS DE CULTIVO CELULAR.

CULTIVO DE CÉLULAS PROCARIOTAS: Crecimiento de la Célula Bacteriana.

OBJETIVO DE ESTA PRACTICA:

Describir y comprender las técnicas para el crecimiento de cultivos axénicos de microorganismos en medios de cultivo que les proporcionen sus necesidades nutritivas. Tener conocimiento de la existencia de distintos medios de cultivo utilizados en Microbiología, así como de los factores físicos y químicos que afectan al crecimiento bacteriano.

RESUMEN TEORICO DE LA PRÁCTICA

**Requerimientos nutricionales de los microorganismos.*

Para satisfacer los requerimientos nutricionales de un microorganismo el medio de cultivo debe proporcionar una fuente de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, sales, oligoelementos y, si se requiere, factores orgánicos de crecimiento. Algunos microorganismos crecen en medios de cultivo químicamente definidos, mientras que otros requieren complejos medios que contienen vitaminas, aminoácidos y otros factores de crecimiento. Todos los organismos requieren una fuente de carbono; los quimioheterótrofos utilizan moléculas orgánicas y los quimioautótrofos compuestos inorgánicos, fundamentalmente CO₂.

**Cultivos axénicos o puros.*

Un cultivo axénico es aquel que contiene una única cepa de microbios donde todas las células proceden de una única célula madre. Un cultivo es axénico si únicamente un tipo morfológico de colonia crece sucesivamente en dos placas de *Petri*. El método de siembra en estría se utiliza para aislar cultivos puros y permitir que crezcan en forma de colonias individuales. Para transferir estos cultivos se deben emplear técnicas asépticas o estériles.

**Conservación de cultivos bacterianos*

Se pueden mantener cultivos axénicos de muchos microbios a 4 °C tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas. Los cultivos almacenados en nitrógeno líquido o liofilizados retienen la viabilidad durante largos periodos de tiempo. Muchas bacterias pueden conservarse a temperaturas inferiores a -50 °C en glicerol al 20% durante meses.

**Medios de crecimiento microbianos.*

Los medios definidos químicamente se componen de cantidades conocidas de productos químicos puros. Los medios complejos son químicamente indefinidos, debido a que utilizan

fuentes de nutrientes complejas como la peptona, la triptona, el extracto de levadura e incluso la sangre.

**Aislamiento y cultivo de microorganismos.*

El enriquecimiento selectivo permite a un microbio o grupo de microorganismos crecer más que al resto, siendo esta técnica utilizada para aislar microorganismos de un inóculo no puro. Las propiedades físicas y químicas de un medio de crecimiento pueden ser manipuladas para enriquecer el cultivo en una especie específica. Los colorantes, los quelantes de metales y los antibióticos inhiben el crecimiento de microbios no deseados.

**Factores físico-químicos que afectan al crecimiento.*

La composición química del medio, el pH, el contenido en oxígeno, la osmolaridad y la temperatura son factores físico-químicos importantes que afectan al crecimiento del cultivo bacteriano. Los tampones naturales como sales de fosfato y aminoácidos estabilizan el pH de los medios de cultivo. La mayor parte de las bacterias crecen mejor a un pH entre 6.5 y 7.5.

El aire es la fuente de oxígeno para la mayoría de los organismos aeróbicos. Los organismos anaeróbicos han de cultivarse en incubadores anaeróbicos o en jarras anaeróbicas donde el oxígeno ha sido extraído y reemplazado por una atmósfera de CO₂ u otro gas inerte.

Los microorganismos crecen en un amplio margen de temperaturas, pero cada especie tiene una temperatura óptima y unas temperaturas límite de crecimiento. Los termófilos tienen una temperatura óptima de crecimiento por encima de 50 °C, los psicrófilos por debajo de 20 °C y los mesófilos entre 20 °C y 50 °C.

En una solución hipertónica los microorganismos sufren plasmólisis, los halófilos y osmófilos requieren altas concentraciones de sales para su crecimiento.

**Dinámica del crecimiento bacteriano.*

El crecimiento microbiano es el aumento ordenado en constituyentes celulares que resulta en un crecimiento exponencial del número de células. Las bacterias no pueden crecer sin límite sin agotar los nutrientes disponibles y sin crear productos tóxicos.

Los cultivos bacterianos que crecen en un ambiente cerrado discurren a través de una secuencia de fases: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. La fase de latencia precede a la fase exponencial, donde las células muestran su mayor velocidad de crecimiento. Cuando el cultivo agota los nutrientes disponibles entra en la fase estacionaria, caracterizada porque no se observa cambio en el tamaño de la población. Finalmente, las células mueren cuando no son capaces de mantener sus funciones fisiológicas esenciales.

**Ecuaciones matemáticas para el crecimiento exponencial.*

La expresión matemática del crecimiento bacteriano es utilizada para calcular el tiempo de generación (g) a partir del número de bacterias presentes en el cultivo a dos tiempos diferentes. El tiempo de generación es el tiempo requerido para duplicar la masa o número de bacterias.

$$g = [0.3018(t - t_0)] / [\log B_t - \log B_0]$$

g , tiempo de generación; B_0 , número de bacterias a tiempo cero; B_t , número de bacterias a tiempo t ; t_0 , tiempo cero; t , cualquier tiempo después de t_0 ; n , número de generación. $B_t = B_0 \cdot 2^n$

**Métodos de medida del crecimiento.*

El número total de células en un cultivo líquido puede determinarse mediante el microscopio con una cámara Neubauer o con un contador de partículas electrónico. La masa celular puede medirse por dispersión de luz en un espectrofotómetro.

Cultivo de *Escherichia coli*

Cultivo en medio sólido

Medio complejo: Se disuelven 23.5 g de *Plate count agar (DIFCO)* en un litro de agua desionizada y se esteriliza en autoclave (Autotester 437-G de *Selecta*). Se enfría la disolución a 55 °C (en baño termostatizado) y se añade antibiótico si procede. Se vierte el medio en placas de *Petri* y se deja solidificar con las placas un poco abiertas para evitar la condensación en la cámara de flujo laminar, bajo luz ultravioleta germicida.

Las placas se inoculan con un asa de platino o vidrio a partir de otras placas o cultivos líquidos y se dejan crecer en una estufa a 37 °C durante toda la noche.

Medio químicamente definido: Al medio mínimo líquido SV, preparado como se describe posteriormente, pero doblemente concentrado, se le añade un volumen igual de agar-agar al 3%. Tras esterilización en autoclave, la mezcla se enfría en baño de agua a 55 °C y se añade la glucosa, la tiamina y la Ampicilina (SV⁺⁺). A continuación se vierte en placas *Petri* y se deja solidificar.

Cultivo en medio líquido

El medio líquido de cultivo de *E. coli* utilizado es el de *Luria-Bertani (LB)*:

Triptona (<i>DIFCO</i>)	10 g L ⁻¹
Extracto de levadura (<i>DIFCO</i>)	5 g L ⁻¹
NaCl (<i>Panreac</i>)	5 g L ⁻¹

Tabla 1. Preparación de medio complejo LB para *E. coli*.

Se autoclave a 120 °C (1 atm de sobrepresión) durante 20 minutos. Tras su enfriamiento, se añaden los antibióticos pertinentes a partir de una disolución concentrada, esterilizada por filtración, hasta una concentración de:

Ampicilina (<i>Boehringer Mannheim</i>)	50 mg L ⁻¹
Kanamicina (<i>Boehringer Mannheim</i>)	70 mg L ⁻¹

Los recipientes en los que se lleva a cabo el cultivo han de contener una cámara de aire de un volumen no inferior a tres/cuatro veces el de medio líquido con objeto de permitir la aireación suficiente de manera que la concentración de oxígeno disuelto no limite el crecimiento del cultivo.

El inóculo para el cultivo puede proceder de un medio sólido, de un cultivo líquido conservado a -70 °C en glicerol al 20%, o de otro cultivo en crecimiento. Una vez inoculado, el cultivo se mantiene en un incubador orbital (Certomat™ de *B. Braun Biotech*) a 37 °C y con agitación (150-250 rpm).

Para preparar el medio mínimo SV, se disuelven y se esterilizan las sales en autoclave. La tiamina y la glucosa se añaden después para formar el medio SV⁺⁺, a partir de disoluciones concentradas (0.5 mg/mL y 20% p/v, respectivamente) esterilizadas por filtración (filtros estériles Millipore de 0.22 µM de *Gelman Sciences*).

[Fe ₂ (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₃].6H ₂ O (<i>Probus</i>)	7 mg L ⁻¹
MgSO ₄ (<i>Probus</i>)	50 mg L ⁻¹
NH ₄ Cl (<i>Probus</i>)	2 g L ⁻¹
KH ₂ PO ₄ (<i>Probus</i>)	4,4 g L ⁻¹
K ₂ HPO ₄ (<i>Probus</i>)	7,8 g L ⁻¹
Tiamina (<i>Sigma Cell Culture</i>)	5 mg L ⁻¹
Glucosa (<i>Panreac</i>)	0,2 %

Tabla 2. Preparación de medio mínimo SV para *E. coli*.

Conservación de cepas

Los cultivos en placas pueden ser conservados a 4 °C durante unas semanas. Sin embargo, en ocasiones interesa guardar una cepa durante largo tiempo. Para ello se preparan cultivos en medio líquido y se les añade glicerol estéril hasta el 20% (típicamente a un vial de microcentrífuga estéril se añade 850 mL del cultivo y 150 mL de glicerol estéril). Se agita bien y se congela preferiblemente a una temperatura inferior a -50 °C.

PRACTICA:

Primer día:

1-Preparación del medio sólido complejo. Cada grupo preparará 30 ml de medio complejo.

2-Preparación de medio líquido LB (Luria-Bertani). Cada grupo preparará 50 ml de este medio de cultivo.

3-Autoclavado. Esterilización.

4-Vertido del medio de cultivo en Placas de *Petri*. Las placas se solidificarán en aproximadamente media hora.

5-Inoculación en Placas *Petri* de un cultivo de *E. coli*. Con un asa de siembra se inoculará a partir de un cultivo líquido en una Placa *Petri* dividida en tres secciones. Se tomarán

células con el asa de siembra de un cultivo líquido proporcionado por el profesor. El asa de siembra se pasará secuencialmente por las tres secciones en que se encuentra dividida la placa. Esta siembra se realizará en dos placas, una placa con antibiótico (Ampicilina) y en otra sin el. Las placas se dejan crecer en estufa a 37 °C durante la noche.

Segundo día:

1-Inoculación en medio líquido de un cultivo de *E. coli*. Se añadirán a la llama 5 ml del medio de cultivo proporcionado por el profesor a 50 ml de sendas soluciones estériles de medios LB y SV⁺⁺. El medio SV⁺⁺ se preparará a partir del medio SV proporcionado por el profesor, añadiéndole las cantidades necesarias de tiamina y glucosa a partir de las soluciones stock.

2-Determinación de la curva de crecimiento del cultivo. A intervalos de tiempos regulares, siguiendo las indicaciones del profesor, (anotad estos tiempos con respecto al tiempo cero del cultivo) se tomará una muestra de 1 ml de cada cultivo y se medirá su turbidez a una longitud de onda de 600 nm en el espectrofotómetro. Al mismo tiempo, se contarán el número de células correspondientes a esa medida en una Cámara Neubauer al microscopio. Posteriormente se dibujará la curva de crecimiento de cada cultivo.

3-Observación del crecimiento de las Placas de *Petri* inoculadas el día anterior.

INFORMACION ADICIONAL

<u>Abs</u>	<u>n° células</u>
0.2	2×10^8
0.6	4×10^8
1	6×10^8

-CUESTIONES:

-Dibujar las Curvas de Crecimiento de *E. coli* en los medios líquidos LB y SV. Compararlas.

-Calcular el tiempo de generación durante la fase exponencial.

BIBLIOGRAFIA:

-Microbiology. Concepts and Applications. Paul A. Ketchum. John Wiley & Sons, Inc. 1988.

-Introducción a la Microbiología. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke y Christine L. Case. Editorial Acribia, S.A. 1993. Capítulo 6.

-Biology of Microorganisms. Thomas D. Brock, Michael T. Madigan, John M. Martinko and Jack Parker. Prentice-Hall International, Inc. 1994.

MATERIALES Y REACTIVOS

- Campana de Flujo Laminar.
- Placas Petri.
- Plant Count Agar, Triptona, Extracto de Levadura, NaCl.
- Botellas de Cultivo (0.5 L y 0.25 L).
- Mecheros de alcohol
- Asas de siembra.
- Gliceroles.
- Microscopio.
- Cámara Neubauer.
- Cubetas espectrofotómetro.

MEDIOS E INOCULOS

Primer día:

- Placas Petri con Ampicilina
- Placas Petri sin Ampicilina
- Cultivo *E. coli* con plásmido resistente a Ampicilina (1 Falcon, 1 eppendorf por grupo)
- Cultivo *E. coli* sin plásmido resistente a Ampicilina (1 Falcon, 1 eppendorf por grupo)

Segundo día:

- Cultivo *E. coli* sin plásmido resistente a Ampicilina en medio SV⁺⁺ (100 ml)
- Cultivo *E. coli* sin plásmido resistente a Ampicilina en medio LB (100 ml)
- Soluciones stock de tiamina y glucosa.
- Medio SV (X x 50ml)

PRACTICAS DE BIOLOGIA CELULAR

CULTIVO DE CELULAS ANIMALES

Sesion 1.-

INTRODUCCION:

La mayor parte de la información actual que poseemos acerca de como funcionan las células vivas, se ha obtenido no a partir de células tomadas directamente de un organismo, sino de células procedentes de cultivos *in vitro*. El estudio posterior mediante técnicas bioquímicas, de microscopia, biología molecular etc. nos ha ido revelando una gran cantidad de información sobre los mecanismos celulares de la vida. Es por ello capital conocer las técnicas básicas de cultivo celular antes de abordar cualquier estudio de biología celular.

La mayor parte de estos estudios se realizan utilizando lo que llamamos "líneas celulares establecidas", que son células que proliferan de forma indefinida mientras se mantengan en un medio de cultivo nutritivo adecuado. Estas células son, en su mayoría, de origen tumoral, ya que las células normales han perdido su capacidad de proliferación y no se pueden mantener en cultivo más allá de unos pocos días o semanas.

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE DIVERSOS CULTIVOS CELULARES

Material

- Líneas celulares: Jurkat (leucemia linfoide T humana)

Procedimiento

IMPORTANTE : Todo tipo de manipulación que se realice con células eucarióticas en cultivo ha de realizarse en condiciones estériles. En el aire se encuentran en suspensión gran cantidad de bacterias, hongos microscópicos, levaduras, y diversos tipos de microorganismos. Si no se evita que estos microorganismos caigan sobre nuestro medio de cultivo durante las manipulaciones, dada su alta tasa de proliferación, acaban

adueñándose del cultivo en detrimento de las células eucarióticas, las cuales acaban muriendo.

Deben tomarse para ello una serie de precauciones de forma sistemática y rutinaria :

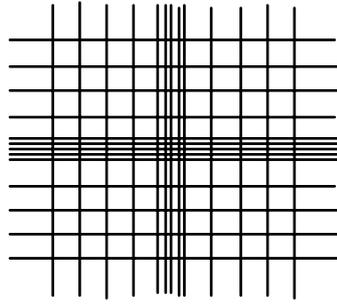
1) Trabajar siempre en una campana de flujo laminar, la cual filtra el aire que luego expulsa, de forma que dentro de la campana hay siempre una presión positiva y el aire sin filtrar no puede entrar.

2) Utilizar todo el material previamente esterilizado (pipetas, puntas de micropipeta, medios de cultivo, etc.)

3) Manipular con sumo cuidado dentro de la campana de flujo laminar. Es conveniente lavarse las manos con jabón y después con una solución de alcohol al 70% antes de manipular en la campana. Los "gestos" a la hora de manipular son también muy importantes. Las partes del material que vayan a entrar en contacto directo con las células o con el medio de cultivo no se pueden tocar con las manos o no pueden tocar accidentalmente la superficie de la campana. Si eso ocurre, hay que cambiar de material.

Procedimiento para células en suspensión:

- En un tubo pequeño de plástico poner 100 μ l de la disolución de azul Trypan.
- Resuspender el cultivo de células Jurkat con una pipeta. Realizar esta operación cuidadosamente para que no se forme espuma.
- Tomar 100 μ l de la suspensión celular con una micropipeta y mezclarlos con el colorante.
- Colocar sobre el hemocitómetro un cubre e introducir entre ambos una pequeña cantidad de la suspensión coloreada de células con una micropipeta.
- Contar las células que aparezcan sin color dentro de los cuadros en los cuatro cuadrantes del hemocitómetro.



- El colorante azul Trypan sólo penetra en las células cuya membrana está dañada, por lo que las células no teñidas son las células viables. Realizar dos contajes: uno de las células teñidas (no viables) y otro de las no teñidas (viables).

La concentración de células viables en el cultivo original se calcula del siguiente modo:

$$\text{n.º células viables} \times \text{dilución} \times 10^4 / \text{n.º cuadrantes} = \text{células / ml}$$

El porcentaje de viabilidad se calcula dividiendo el número de células viables (no teñidas de azul) por el número total de células (teñidas + no teñidas) y multiplicando el resultado por 100.

Bibliografía

Freshney, R. I. "Culture of animal cells: A manual of basic technique". 1987. Alan R. Liss, Inc., New York.

Freshney, R. I. "Animal cell culture: A practical approach". 1992. Oxford University Press, Oxford.

Sesión 2.-

SEPARACION DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA POR CENTRIFUGACION EN GRADIENTE DE DENSIDAD

Las células mononucleares de la sangre pueden aislarse fácilmente del resto de células mediante centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Paque (un polisacárido al que se ha añadido metrizoato de sodio, densidad = 1,078 g/ml). Las células mononucleares así obtenidas están compuestas por un 70% de linfocitos T, un 20% de linfocitos B y un 8% de monocitos aproximadamente.

Material

- Sangre heparinizada.
- Solución salina equilibrada Hank's.
- Ficoll-Paque (Histopaque, Sigma, $\rho=1,078$ g/ml).
- Azul Trypan al 0,4% en NaCl 0,15 M.
- Tubos de centrifuga estériles de fondo cónico.
- Medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, glutamina 1 mM y antibióticos (Medio completo).
- Hemocitómetro Neubauer.
- Pipetas, pipetas Pasteur y micropipetas.
- Guantes de látex desechables.

Procedimiento

- En un tubo de fondo cónico poner 10 ml de Ficoll-Paque.
- Con las manos protegidas por guantes de látex, depositar sobre el Ficoll-Paque aproximadamente 5 ml de sangre, muy despacio, para que no se mezcle con el Ficoll.
- Centrifugar el tubo 30 minutos a 1400 rpm, sin freno y a 20-25°C.

- En el fondo del tubo se encuentran la mayoría de las células rojas y los granulocitos, mientras que en la interfase plasma-Ficoll quedan fundamentalmente las células mononucleares.
- Recoger las células de la interfase con una pipeta Pasteur, con cuidado de no arrastrar un exceso de Ficoll, y trasvasarlas a un tubo en el que previamente se habrán depositado 10 ml de medio RPMI1640.
- Centrifugar 10 minutos a 800 rpm.
- Retirar el sobrenadante con una pipeta Pasteur.
- Resuspender el pellet en 2 ml de RPMI1640 + 10% FCS.
- Determinar la densidad celular y la viabilidad del cultivo por tinción con azul Trypan como se describe en la práctica anterior.
- Poner en cultivo, a una densidad celular de $1-2 \times 10^6$ células/ml en placas Petri pequeñas. La mitad de las células se pondrán en cultivo en medio completo y la otra mitad en ese mismo medio, pero estimuladas con 2 $\mu\text{g/ml}$ del mitógeno fitohemaglutinina (PHA).
- Se mantendrán los cultivos durante al menos 72h.
- Cada día se comparará la cantidad de células y la viabilidad de las mismas en los cultivos estimulados o sin estimular, utilizando el método del azul Trypan y conteo en el hemocitómetro.

Bibliografía

Klaus, C.C.B. "Lymphocytes: a practical approach". 1987. IRL Press, Oxford.

Sesión 3. -

CULTIVO DE LINEAS CELULARES

Material

- Líneas celulares: Jurkat (leucemia linfoide T humana) y L929 (fibroblastos de ratón)
- Frascos de cultivo estériles de 25 cm².
- Placas *Petri* de 35 mm de diámetro.
- Tubos de centrifuga de 15 ml.
- Medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, glutamina 2 mM y antibióticos (penicilina-estreptomicina, 100U/ml y 100 µg/ml respectivamente).
- Tripsina al 0,05% en PBS (Suero fisiológico)
- PBS estéril.
- Azul Trypan al 0.4% en NaCl 0.15 M.
- Hemocitómetro Neubauer.
- Pipetas y puntas de micropipeta estériles.
- Cubreobjetos.

Procedimiento:

A) Células en suspensión (Jurkat)

- En un tubo pequeño de plástico poner 100 µl de la disolución de azul Trypan.
- Resuspender el cultivo de células Jurkat con una pipeta. Realizar esta operación cuidadosamente para que no se forme espuma.
- Tomar 100 µl de la suspensión celular con una micropipeta, mezclarlos con el colorante contar las células y determinar su viabilidad.

- Tomar un volumen que contenga el número adecuado de células y añadir medio de cultivo hasta conseguir una densidad final de $2,0-3,0 \times 10^5$ cel/ml.
- Las células se cultivarán durante 48 h, realizando un contaje cada 24h para confeccionar la curva de crecimiento correspondiente.

B) Cultivos en monocapa (L929)

- Con una pipeta Pasteur estéril retirar el medio de cultivo con cuidado de no rascar el fondo de la placa.
- Lavar las células que se encuentran adheridas al fondo de la placa con PBS estéril.
- Añadir 1 ml de la disolución de tripsina recién descongelada.
- Incubar a temperatura ambiente 5 minutos.
- Añadir 1 ml de medio de cultivo.
- Trasvasar la suspensión obtenida a un tubo de plástico con fondo cónico y con tapón de rosca.
- Centrifugar 5 minutos a 1000 rpm.
- Retirar el medio y resuspender con una pipeta Pasteur el pellet en 1 ml de medio de cultivo.
- Resuspender bien y mezclar en otro tubo 100 μ l de esta suspensión con un 100 μ l de solución de azul Trypan.
- Contar las células en un hemocitómetro como el apartado A.
- Tomar un volumen que contenga aproximadamente 8×10^4 células y completar hasta 1 ml en una placa Petri.
- El crecimiento de estas células adherentes se seguirá en el microscopio invertido, aunque no se cuantificará debido a la mayor complicación que supone la tripsinización de estas células para poder contarlas. En la práctica de determinación del crecimiento celular por el método del MTT se usarán no obstante estas células adherentes.

Bibliografía

Freshney, R. I. "Culture of animal cells: A manual of basic technique". 1987. Alan R. Liss, Inc., New York.

Freshney, R. I. "Animal cell culture: A practical approach". 1992. Oxford University Press, Oxford.

Sesión 4.-

Cultivo de células en microplacas. Determinación de la toxicidad de una sustancia

Para estudiar el efecto de numerosas variables ambientales sobre el crecimiento celular se utilizan microcultivos en los cuales se pueden variar diversos parámetros (número de células, concentraciones de componentes del medio de cultivo, diferentes aditivos ó fármacos, etc.). Esta técnica permite utilizar muy pequeñas cantidades de células y de medio de cultivo, pudiendo analizar cada situación experimental experimental por duplicado, triplicado o cuadruplicado. El desarrollo de microplacas de 24, 48, 96 ó 384 pocillos y de micropipetas, sistemas de adición y recolección automática de muestras y lectores (de absorbancia, fluorescencia, luminiscencia, radiactividad) automáticos de microplacas, ha hecho que esta tecnología se halla desarrollado enormemente en estos últimos años y sea hoy de elección en los laboratorios biotecnológicos de todo el mundo.

Como muestra de este tipo de cultivos analizaremos la toxicidad del etanol sobre microcultivos de células L929 en microplacas de 96 pocillos.

Procedimiento

- Esta práctica se realizará con células adherentes L929 previamente sembradas en placas de 96 pocillos, las cuales se entregarán a los alumnos al principio de la práctica. Cada placa servirá para varios grupos. Se analizará la toxicidad de diferentes cantidades de etanol sobre los cultivos.

1) Preparar (en condiciones estériles) cantidades suficientes de medio de cultivo sin etanol, o bien con 2%, 4% o con 6% etanol, para todos los grupos

2) Al ser las células adherentes, se elimina el medio de cultivo por inversión de las placas sobre papel de filtro.

3) Añadir 100 µl de medio de cultivo a una línea sin células, que servirá como blanco (siempre la línea no. 1). Seguidamente, cada grupo añadirá los medios de cultivo con diferentes cantidades de etanol por cuadruplicado en 4 líneas sucesivas de la placa.

	1	2	3	4	5	
A	Blanco	Control	Etanol 2%	Etanol 4%	Etanol 6%	GRUPO 1
B	Blanco	Control	Etanol 2%	Etanol 4%	Etanol 6%	GRUPO 2
C	Blanco	Control	Etanol 2%	Etanol 4%	Etanol 6%	GRUPO 3
D	Blanco	Control	Etanol 2%	Etanol 4%	Etanol 6%	GRUPO 4
E	Blanco	Control	Etanol 2%	Etanol 4%	Etanol 6%	GRUPO 5
F	Blanco	Control	Etanol 2%	Etanol 4%	Etanol 6%	GRUPO 6
G						
H						

- Dejar en cultivo en el incubador durante al menos 24 h

Sesión 5. -

TEST DE PROLIFERACIÓN CELULAR DE MOSMANN

Los métodos clásicos de cuantificación de la proliferación celular son el conteo directo de las células con un hemocitómetro, o la adición a los cultivos de un nucleótido radiactivo que se incorpora al DNA o al RNA seguido por la determinación de la radiactividad en un contador de centelleo. Recientemente se han introducido otros métodos que utilizan técnicas de medida no radiactivas y que permiten una manipulación más sencilla de las muestras. El más popular de estos nuevos métodos es el test colorimétrico diseñado por Mosmann en 1983. Este test relaciona el número de células en proliferación presentes en los cultivos con la cantidad de cristales azules de formazán producidos por la reducción del colorante soluble bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT), por parte de reductasas de la cadena de transporte electrónico mitocondrial y del retículo endoplásmico.

Material:

- Suspensiones celulares en medio de cultivo o cultivos de células en monocapa.
- Placas de 96 pocillos estériles.
- RPMI 1640 + 2,5% SFB
- MTT 5 mg/ml en suero fisiológico (PBS).
- Dimetilsulfóxido (DMSO).
- Micropipetas.
- Puntas de micropipeta estériles.
- Lector de microplacas ELISA.

Procedimiento:

Terminado el tiempo de incubación con el etanol:

- Añadir 10 µl de disolución estéril de MTT (5 mg/ml en PBS) en cada pocillo de la placa, incluidos los pocillos de blancos.
- Incubar a 37°C durante 2 h.
- Centrifugar las placas a 3000 rpm durante 15 minutos.
- Eliminar la mezcla de reacción por inversión de las placas sobre papel de filtro.
- Añadir 100 µl de DMSO en cada pocillo para disolver los cristales de azul formazán formados.
- Agitar en una placa vibradora.
- Medir la absorbancia de las disoluciones obtenidas en los diversos pocillos en un lector de placas ELISA, a una longitud de onda de 550 nm.
- Correlacionar las absorbancias obtenidas con el número de células sembradas en cada pocillo o calcular el crecimiento relativo a las células control.

Bibliografía

- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *J. Immunol. Meth.* 65, 55-65.
- Alley, M. C., Scudiero, D. A. et al. (1988). "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay". *Cancer Res.* 48, 589-601.

10-TECNICAS DE MANEJO DE ORGANISMOS PLURICELULARES

-Organismos vegetales. Fundamentos de la organografía vegetal. Cultivo de organismos vegetales con fines experimentales.

OBJETIVO DE ESTA PRÁCTICA:

Adquisición de una serie de conocimientos básicos de organografía vegetal, la planta y sus partes. Conocer la técnica de Micropropagación y la manipulación de cultivos vegetales *in vitro*.

RESUMEN TEORICO DE LA PRÁCTICA

**Introducción al cultivo in vitro (parte de la Biotecnología). La Micropropagación.*

En sentido amplio el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se refiere al crecimiento y desarrollo de órganos o secciones, tejidos, células o protoplastos, sobre un medio nutritivo y en condiciones de asepsia. El tamaño del explanto de partida normalmente es muy pequeño, por lo que la técnica de propagación vegetativa *in vitro* ha sido denominada micropropagación.

**Motivos para micropropagar plantas.*

Si los métodos existentes de propagación *in vivo* son imposibles o muy lentos. Si se necesitan plantas de un genotipo selecto sin demora. Mejora genética y selección genética. Si es necesaria la producción de plantas libres de patógenos. Obtención de forma muy rápida de gran cantidad de organismos a partir de un parental de interés.

**Etapas de la Micropropagación.*

- 1-Establecimiento del cultivo aséptico.
- 2-Mantenimiento del cultivo en condiciones adecuadas.
- 3-Enraizamiento *in vitro/in vivo* de los brotes.
- 4-Transferencia al ambiente natural. Aclimatación.

**Explanto/e/a.*

Con el término explanto se describe un fragmento cortado de un tejido o de un órgano utilizado para iniciar un cultivo. Como explanto puede ser utilizado casi cualquier órgano o tejido, pero para la micropropagación es más conveniente partir de una yema o meristemo que garantice la estabilidad genética de sus células.

**Cámaras de transferencia y de cultivo.*

Cámara de flujo laminar. Cámara o habitación de cultivo.

**Medios de cultivo.*

Los medios de cultivo pueden ser semi-sólidos o líquidos según sea el soporte que sustenta al explanto -normalmente agar-agar o agua-. Generalmente estos medios contienen componentes inorgánicos, sales minerales, que las plantas necesitan tanto en gran cantidad (macronutrientes) como en cantidades pequeñas pero imprescindibles (micronutrientes). Los medios de cultivo contienen también una fuente de energía -normalmente sacarosa o glucosa-, vitaminas y reguladores de crecimiento -normalmente auxinas y citoquinas-. Los cultivos se incuban bajo condiciones ambientales determinadas, luz, humedad y temperatura.

** El cuerpo de la planta*

El cuerpo de la planta está constituido por el sistema radical, que de ordinario es subterráneo, y el vástago, que de ordinario es aéreo. El sistema radical está formado enteramente por raíces; el vástago está integrado por una serie de ejes (tallos) y apéndices (hojas y partes reproductoras). Los puntos de unión de las hojas se denominan nudos y las aéreas situadas entre ellos son los entrenudos.

El sistema radical está implicado principalmente en la absorción de agua e iones, la fijación y el almacenamiento. El vástago desempeña su cometido principalmente en la fotosíntesis y la reproducción sexual.

BIBLIOGRAFIA:

-Introducción a la Microbiología. Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke y Christine L. Case. Editorial Acirbia, S.A. 1993.

-Plant Cell Culture Technology. M. M. Yeoman. Blackwell Scientific Publications. 1986.

-El Reino Vegetal. Robert E. Scagel, Robert J. Bandoni, Glenn E. Rouse, W. B. Schofield, Janet R. Stein y T.M.C. Taylor. Ediciones Omega S.A. 1987.



PLANTA VASCULAR Morfología general

A. planta completa x 0.1.

B. sección longitudinal de una flor x 10:

ca, cáliz: co, corola: f, flor: gy, gineceo:
i, entrenudo: l, hoja; n, nudo; r,
receptáculo; rs, sistema radical; s, tallo;
ss, vástago; st, estambre.

EXPERIENCIA

Micropropagación de una planta en el laboratorio

Medios de cultivo comúnmente empleados para clavel:

MS*: Se emplea para el crecimiento de semillas y a partir de ellas obtener el material de partida. Contiene exclusivamente sales minerales y agar, y carece de vitaminas, hormonas y sacarosa.

C₂: Es el medio para la inoculación de meristemos y repicaje de explantos. Contiene las sales minerales MS* con el aporte de hormonas, vitaminas y sacarosa.

C₄: Tiene como fin el enraizamiento. Contiene las sales minerales MS* con el aporte de vitaminas y sacarosa, y carece de hormonas.

MEDIO DE CULTIVO	MS*	C₂	C₄
<i>Macroelementos</i>	g/l	g/l	g/l
NH ₄ NO ₃	1.65	1.65	1.65
KNO ₃	1.90	1.90	1.90
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.44	0.44	0.44
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.37	0.37	0.37
KH ₂ PO ₄	0.17	0.17	0.17
<i>Microelementos</i>	mg/l	mg/l	mg/l
MnSO ₄ .4H ₂ O	22.3	22.3	22.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.6	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	6.2
IK	0.83	0.83	0.83
Na ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	0.02
<i>Hierro en EDTA</i>	g/l	g/l	g/l
FeSO ₄	0.0278	0.0278	0.0278
<i>Vitaminas y Activadores</i>	mg/l	mg/l	mg/l
Tiamina		0.4	0.4
Mio-inositol		100	100
Acido Indol-acético		0.3	
Kinetina		1	
<i>Otros</i>	g/l	g/l	g/l
Sacarosa		30	30
Agar	7.5	7.5	7.5
pH	5.7	5.7	5.7

PRÁCTICA:

1-Identificación de las diferentes partes de una planta y flor en el ejemplar proporcionado por el profesor.

2-Desinfección del material vegetal. Se toman esquejes de la planta y se trocean en unidades de 2-3 entrenudos (si se puede se seleccionará el meristemo apical). Se puede también seleccionar el ovario de la flor. Se coloca el material vegetal en un vaso de unos 100 ml y se añade una disolución desinfectante compuesta de lejía al 15% y detergente, se deja incubar 15 min.. Se descarta el líquido y se procede al lavado del material vegetal con agua destilada estéril. Se hacen 3 lavados de 5 min..

3-Selección del explanto a implantar. El sitio de trabajo y las manos (lavadas con agua y jabón) deben encontrarse limpios y si se desea se nebulizan con alcohol al 70% como medida de esterilización. El material que vaya a estar en contacto con la planta requiere medidas especiales de esterilización (autoclavado o flameo). Con unas pinzas estériles se coloca el material vegetal un papel de filtro estéril. Se toma un esqueje con unas pinzas pequeñas y se corta con un bisturí en la zona entrenudos de la planta obteniendo un explanto que contenga un nudo. El corte se realiza sujetando con la pinza el esqueje y cortando con el bisturí. Se seleccionara para la micropropagación un nudo y un óvulo, que deberá ser extraído del ovario siguiendo el mismo procedimiento.

4-Implantación del explanto. Se toma un tubo de ensayo que contiene medio de cultivo esterilizado, se le quita el tapón y se flamea en el mechero para esterilizar posibles contaminantes en las paredes exteriores de la boca del tubo. Se produce la implantación con la pinza o la lanceta del explanto dentro del tubo, clavándolo en el agar y desplazándolo dentro de el. Se flamea de nuevo la boca del tubo y se cubre con cuidado con papel de aluminio esterilizado.

5-Crecimiento del Cultivo. El cultivo se deposita en la cámara de cultivo en las condiciones adecuadas de temperatura e iluminación.

MATERIALES Y REACTIVOS

- Cabina de Flujo Laminar.
- Papel de filtro estéril
- Agua estéril (0.5 l/grupo).
- Mecheros de alcohol
- Pinzas, tijeras y lancetas estériles.
- Tubos de cultivo.
- Vaso precipitados. 11 y 100 ml

MEDIOS E INOCULOS

- Soluciones stock de medios de cultivo.
- Lejía 15%.
- Planta.

-Organismos animales. Fundamentos de la organografía animal. Técnicas de manejo de organismos pluricelulares:

1.-Organismos animales.

- 1.1.-Mamíferos (Cerdo (*Sus scrofa*), Perro (*Canis familiaris*), Gato (*Felix catus*), Conejo (*Oryctolagus cuniculus*), Cobaya (*Cavia porcellus*), Hámster (*Mesocricetus auratus*), Jerbo (*Gerbillus sp.*), Rata (*Rattus norvegicus*), Ratón (*Mus musculus*)).
- 1.2.-Aves (Pollo (*Gallus sp.*), Codorniz (*Coturnix coturnix*)).
- 1.3.-Peces (Carpín (*Carasius auratus*)).
- 1.4.-Invertebrados (*Schistocerca gregaria*, *Drosophila melanogaster*).

2.-Fundamentos de organografía animal

- 2.1.-Distribución general de sistemas
- 2.2.-Anatomía comparada del sistema nervioso
- 2.3.-Anatomía comparada del sistema circulatorio
- 2.4.-Anatomía comparada del sistema respiratorio
- 2.5.-Anatomía comparada del sistema digestivo
- 2.6.-Anatomía comparada del sistema urogenital

3.-Manipulación del animal

- 3.1.-Zonas de agarre (recogida y transporte)
- 3.2.-Zonas de sujeción (inmovilización)
- 3.3.-Puntos de inyección y extracción

4.-Condiciones de mantenimiento y crianza

- 4.1.-Jaulas
- 4.2.-Acuarios
- 4.3.-Terrarios
- 4.4.-Dosificadores
- 4.5.-Alimentación; automatismos
- 4.6.-Reproducción

5.-Legislación

6.-Disección de un invertebrado artrópodo (Cangrejo de Río)

- Disección de un pez (Trucha)
- Disección de un mamífero (Rata)

1.-Organismos animales.

1.1.-Introducción

En función de los objetivos experimentales, se han utilizado distintos animales. Se ha buscado además que dichas especies animales tuviesen una fácil reproducción y escasas necesidades ambientales y nutricias.

Así, de invertebrados cuyo gran poder reproductor y su fácil cuidado facilitan su elección (por el contrario, su tamaño lo dificulta), los más utilizados han sido los insectos y dentro de éstos cabe destacar a dos: la Mosca del Vinagre o de la Fruta (*Drosophila melanogaster*) cuyas enormes glándulas salivares presentan células cuyos cromosomas son lo suficientemente grandes como para ser fácilmente utilizados por los Genéticos y una de las Langostas del desierto africano, la *Schistocerca gregaria*, muy utilizada en Fisiología. El único inconveniente de los invertebrados (aparte del de su tamaño) es el de la brevedad –como adulto- de su ciclo vital.

Sin lugar a dudas, los animales más utilizados en el campo de la biología experimental son vertebrados. Sus mayores longevidades y tamaños, permiten una manipulación más fácil y una experimentación más larga en el tiempo.

Entre los vertebrados, de nuevo se han buscado especies cuyo comportamiento dócil, su alta tasa reproductora y sus escasas necesidades ambientales y nutricias permitieran un fácil manejo y cuidado. Así, entre los peces, la mayor parte de la experimentación se ha realizado sobre los géneros *Cyprinus* y *Carassius* (carpas y carpines), de agua dulce, fría, de amplia tolerancia química (pH, dureza, nitritos), de fácil alimentación con piensos artificiales y capaces de aclimatarse a acuarios de diverso tamaño. Sólo tenemos que pensar, que en algunos lugares del mundo, se crían en grandes cantidades para usos alimenticios e industriales (producción de harinas animales).

Entre las aves, las dos especies más utilizadas, lo han sido, una por su tamaño, la Codorniz (*Coturnix coturnix*) y la otra por su facilidad reproductora y de mantenimiento, la Gallina (*Gallus* sp.).

Tradicionalmente, se han utilizado también anfibios y reptiles en la experimentación biológica (véase rana y lagartos y lagartijas), pero la situación delicada de éstos en el medio natural, aconsejó hace ya algún tiempo a los biólogos solicitar su protección. Por otro lado, la escasa capacidad reproductora de ambos grupos en cautividad, facilitó esta medida.

Por último, el grupo “estrella” en la experimentación biológica, es el de los mamíferos, y dentro de éstos destacan los roedores y grupos afines, cuya tasa de reproducción es la más alta del grupo. Así, entre los roedores, destacaremos a la Rata (*Ratus norvegicus*), al Ratón (*Mus musculus*), al Hámster (*Mesocricetus auratus*), al Jerbo (*Gerbillus* sp.) y a la Cobaya o Conejillo de Indias (*Cavia porcellus*); entre los grupos afines está el de los lagomorfos, con el Conejo (*Oryctolagus cuniculus*) como representante.

De los demás grupos, se ha experimentado sobre todo con animales domesticados, como es el caso del Perro (*Canis familiaris*), del Gato (*Felix catus*) o del Cerdo (*Sus scrofa*), aunque el grupo más interesante desde al punto de vista humano (y cuyas características fisiológicas nos son más cercanas) es el de los primates (Monos, Chimpancé, Orangután y Gorila), cuya cercanía con el hombre y su escaso poder reproductor ha hecho que –salvo excepciones inevitables- se desaconsejara su utilización.

1.2.-Insectos

Como ya hemos dicho, hemos seleccionado a dos:

*la Mosca de la Fruta o del Vinagre (*Drosophila melanogaster*), perteneciente al Orden de los Dípteros (o Insectos Pterigotas con un par de alas). Fácil de cuidar y reproducir en frascos grandes en los que se coloca una papilla de frutas, mezclada con antibiótico y fungicida para impedir el desarrollo de hongos y bacterias. En medio, para servir de sujeción a larvas y adultos

se coloca una tira de papel de filtro doblado en forma de acordeón. Se atontan con calor para pasarlas de un frasco a otro.

*la Langosta del desierto (*Schistocerca gregaria*), perteneciente al Orden de los Ortópteros (Insectos Pterigotas con el tercer par de patas desarrollado para el salto y con el primer par de alas semiendurecido (tégmenes)). Se cría y mantiene en evolucionario. Hace sus puestas en vermiculita esterilizada y se alimenta de hierba (casi de cualquier tipo) y de harina.

1.3.-Peces

Las carpas (*Cyprinus carpio*) y carpines (*Carassius auratus*), han sido unos de los animales que más tempranamente sufrieron la domesticación humana (y los primeros entre los peces), por lo que hoy conocemos perfectamente sus necesidades alimenticias y ambientales. Los carpines (*Carassius auratus*) son preferibles, pues su pequeño tamaño, nos permite mantenerlos en espacios menores que los dedicados a las carpas. Como ya hemos dicho, se mantienen en acuarios sin arena (para permitir una mejor limpieza), con un filtro biológico impulsado por bomba y una lámpara fluorescente. Su alimentación por escamas o piensos integrales. Su reproducción (aunque puede ser forzada mediante inseminación artificial) en acuario independiente.

1.4.-Anfibios y Reptiles

Si bien hoy está prohibida su utilización en laboratorio, es bueno saber que la rana (principalmente) ha sido uno de los animales más utilizados por la biología. La rana verde o común (*Rana ridibunda*) se mantiene fácilmente en acuaterrario (es la más acuática de las ranas) con una dieta a base de insectos (grillos). Igualmente, es fácil su reproducción.

Algo parecido podríamos decir de los lagartos y lagartijas, pertenecientes al género *Lacerta*, de fácil mantenimiento en terrarios, con una dieta a base de insectos (grillos y tenebrio). Su difícil reproducción aconsejó su no utilización hace ya tiempo.

1.5.-Aves

La gallina (o el gallo o el pollo) (*Gallus sp.*) animal de sobras conocido (seguramente con la cabra uno de los primeros en ser domesticado), fácil de mantener en jaula y de alimentar con piensos integrales. Su reproducción muy fácil, lo mismo que el desarrollo de sus embriones. Perteneciente al orden de los Galliformes.

Lo dicho para la gallina sirve perfectamente para la codorniz (*Coturnix coturnix*), con la característica positiva de su menor tamaño, por lo que se puede mantener en menor espacio. Perteneciente al mismo orden de los Galliformes.

1.6.-Mamíferos

Por varios motivos, los mamíferos son los mejores animales de experimentación. Es evidente, si aceptamos el principio biológico de que: “la filogenia de un ser vivo es sólo una recapitulación de su ontogenia”, los mamíferos de experimentación serán los más cercanos al ser humano, por lo que muchos de sus componentes fisiológicos serán coincidentes o muy próximos. Todos los siguientes pertenecen al superorden de los Placentarios (Euterios):

*el Cerdo (*Sus scrofa*), seguramente, es uno de los animales más interesantes desde el p.d.v. expuesto en el encabezamiento, ya que muchas de sus características orgánicas son próximas a la especie humana. Perteneciente a la familia de los Suidos, suborden Suiformes, incluida en el importante orden de los Arctiodáctilos. Su fácil mantenimiento (estabulado) y reproducción hacen de él uno de los favoritos (además de por lo expuesto antes).

*el Perro (*Canis familiaris*) mamífero doméstico perteneciente a la familia de los Cánidos, que junto con los Félidos forman el grupo de los Cynofélidos, incluidos en el suborden de los Fisípedos a su vez incluidos en el orden de los Carnívoros. Fácil de alimentar con piensos artificiales y de reproducir en cautividad.

*el Gato (*Felix catus*), perteneciente a la familia de los Félidos, originariamente arborícolas y con garras retráctiles, incluida dentro de suborden de los Fisípedos, perteneciente al orden de los Carnívoros. Como el perro, fácil de alimentar y de reproducir (en menos espacio).

Ambos (perro y gato) no son muy utilizados (salvo en veterinaria) pues su cercanía afectiva con el hombre dificulta dicha utilización.

*el Conejo (*Oryctolagus cuniculus*), también domesticado, pertenece a la familia de los Lepóridos, dentro del orden de los Lagomorfos (no emparentados filogenéticamente con los roedores aunque presentan dentición semejante). Junto con el cerdo y los ratones y ratas, es el animal más utilizado en la experimentación biológica, y sobre todo es demandado cuando se pretenden obtener productos bioquímicos en cierta cantidad (sueros y antisueros, p.ej.). Su mantenimiento en jaula y su alimentación por piensos integrales es muy simple. Además su –en general- buen carácter lo hacen muy apropiado para su manipulación (el único problema es el de su tamaño).

*la Cobaya (*Cavia porcellus*), perteneciente a la familia de los Cávidos, incluidos dentro del suborden de los Caviomorfos, grupo típico del Nuevo Mundo que a su vez se incluyen dentro del importantísimo orden de los Roedores (el orden más numeroso de mamíferos) con característica dentición (incisivos de crecimiento continuo). Tradicionalmente utilizadas por la experimentación biológica, hoy en día han sido superadas por otras especies con mayor grado de fertilidad (y de menor debilidad) como es el caso de los ratones y ratas.

*el Hámster (*Mesocricetus auratus*), animal caracterizado por sus bolsas bucales, perteneciente a la subfamilia Cricetinos, incluida dentro de la familia Cricétidos, dentro del suborden de los Myomorfos, pertenecientes al orden de los Roedores. Animal muy dócil, de tamaño apropiado y alta tasa de reproducción, puede ser mantenido en jaula y alimentado con pienso integral. Su único defecto es su corta cola, que dificulta las sangrías.

* el Jerbo (*Gerbillus* sp.), perteneciente a la familia Gerbillidae, incluida en el suborden de los Myomorfos, perteneciente al orden de los Roedores; últimamente muy utilizado, por su buen carácter, fácil reproducción y alimentación, tamaño adecuado y con cola de tamaño apropiado para la extracción de sangre.

*la Rata (*Ratus norvegicus*), también perteneciente al orden de los Roedores, al suborden de los Myomorfos, familia de los Muridos, subfamilia Murinos.

*el Ratón (*Mus musculus*), con la misma taxonomía que la rata.

Ambos, rata y ratón, son junto con el cerdo y el conejo, los animales más utilizados en experimentación. Fáciles de mantener, en poco espacio, con pienso integral y de una fortaleza física fuera de lo normal, presentan además comportamientos adecuados (tras la oportuna selección genética) para su manipulación.

2.-Fundamentos de organografía animal

Cuando estudiamos a un ser vivo, lo podemos hacer de diferentes maneras. Desde el punto de vista de la Anatomía Comparada, nos interesará observar cómo los diferentes sistemas y partes del cuerpo de los animales a estudiar, varían con la complejidad del grupo, o lo que es lo mismo con su rango filogenético. En la presente sesión no vamos a poder ocuparnos de las muchas diferencias que existen entre los animales mencionados, por lo que sólo brevemente, nos ocuparemos de sus órganos más interesantes.

2.1.-Distribución general de sistemas

Básicamente, los animales que nos ocupan presentan el cuerpo dividido en tres partes: **cabeza, tórax y abdomen** en los insectos y crustáceos y **cabeza, tronco y cola** en los vertebrados (sólo los mamíferos presentan a su vez el tronco dividido en dos partes por el músculo diafragmático: **tórax** y **abdomen**). En la cabeza, todos ellos presentan un cerebro (en el

caso de los insectos ganglionar) y sofisticados órganos sensoriales (de la visión, del tacto, del olfato, del gusto y del oído) y en todos ellos se encuentra la boca. En el tórax y abdomen en el caso de los insectos y en el tronco en el caso de los vertebrados, es donde encontramos a la mayor parte de los órganos del animal, pertenecientes a los sistemas digestivo, respiratorio, circulatorio, reproductor y excretor. Por último, en la cola de los vertebrados no encontramos ningún órgano importante.

En un primer paso, vamos a ver cómo se distribuyen los distintos órganos del animal en un corte por el plano sagital y en visión ventral –en el caso de los vertebrados- y dorsal en el caso de los insectos, debido a que éstos presentan su cordón nervioso ventral, mientras que aquellos dorsal.

2.2.-Anatomía comparada del sistema nervioso

Los animales más primitivos presentan exclusivamente un **plexo** nervioso, formado por neuronas bipolares y multipolares (protonuronas) que forman una red epidérmica y subepidérmica por todo el cuerpo y sus sinapsis son bidireccionales, lo que permite al impulso transmitirse en todas las direcciones. Posteriormente, aparece un sistema nervioso **ganglionar** en donde ya podemos distinguir un SNC y un SNP. El modelo más extendido es el *escalariforme*, con un cerebro y con los pares de ganglios y el doble cordón nervioso ventral, más o menos separados. Este sería el caso de los artrópodos y por tanto de los insectos y crustáceos, cuyos ganglios son grandes y la presencia de órganos sensitivos desarrollados, elevada. Este sistema nervioso, les permite no sólo un comportamiento complejo, sino además la posibilidad de aprendizaje básico.

En los vertebrados, el cambio es total, pues el cordón nervioso es único, dorsal y hueco (canal central de la médula que se prolonga en los ventrículos del cerebro) (mientras que en los invertebrados era doble, ventral y macizo) que acaba en su parte anterior en una gran masa encefálica.

De las dos grandes partes del SNC, la médula espinal, se ha modificado muy poco en el curso de la evolución de los vertebrados, no así el encéfalo, que pasa desde una disposición lineal en los peces hasta el complejísimo encéfalo de los mamíferos, expandido y plegado profundamente.

El encéfalo embrionario se divide primariamente en dos segmentos: el **prosencefalo**, situado en la parte anterior y doblado hacia la parte ventral y el **rombencefalo**, situado en la parte posterior. Luego, el *prosencefalo* se divide en el **telencefalo** anterior y el **diencefalo** posterior. El *rombencefalo*, se divide en tres partes: el **mesencefalo** que abarca en su parte ventral a la parte craneal del tegmento y en su parte dorsal al techo óptico o lóbulos ópticos; al **metencefalo** que incluye en su dorso al cerebelo, en su vientre a la parte media del tegmento y en su centro, en los mamíferos, al puente de Varolio); y el **mielencefalo** que incluye a la médula oblonga (bulbo raquídeo), que se continúa con la médula espinal.

El telencefalo se divide en dos grandes evaginaciones, los hemisferios, que en su parte central contienen a los ventrículos y en cuyos extremos se desarrollan los bulbos o lóbulos olfatorios. El diencefalo es una parte relativamente pequeña, que generalmente queda recubierta por otras partes del encéfalo y que alberga al tercer ventrículo. Su pared dorsal forma el epitálamo, las laterales el tálamo y la ventral el hipotálamo. En el epitálamo se forma la epífisis u órgano pineal que en los peces y anfibios mantiene células sensoriales, mientras que en reptiles, aves y mamíferos se convierte en un órgano glandular endocrino, como la hipófisis situada por debajo del hipotálamo.

El techo del mesencefalo suele presentar unas protuberancias pares (cuerpos bigéminos) que en muchas aves son especialmente grandes y se extienden lateralmente (lóbulos ópticos).

La diferenciación dorsal más importante del metencefalo es el cerebelo. Como éste es el encargado de la coordinación motora y del equilibrio, aquellos animales que se separen del

suelo y tengan un grado importante de movilidad (aves y mamíferos) tendrán éste órgano muy desarrollado.

Por último, el mielencéfalo posee una estructura parecida a la de la médula espinal.

2.3.-Anatomía comparada del sistema circulatorio

El sistema circulatorio de los artrópodos es abierto o lagunar, es decir, que la sangre es bombeada desde un corazón (en realidad, un vaso dorsal más musculoso perforado por unos orificios llamados *ostiolos*) hacia vasos sanguíneos que desembocan en espacios tisulares (cav. Celomáticas, lagunas); por lo tanto en ellos, no puede separarse el fluido tisular del sanguíneo (plasma) como sí ocurre en los sistemas cerrados.

En los vertebrados la circulación es **cerrada**, ya que el medio circulante o sangre queda restringido a vasos a lo largo de todo su recorrido. Consta de corazón (ventral), arterias y venas.

En los peces, el corazón presenta un solo *atrio o aurícula*, precedido eso sí de un *seno venoso* y un solo *ventrículo* que desemboca en un *bulbo aórtico (cono arterial)* del que sale un tronco arterial (*aorta ventral*), que tras pasar por el sistema branquial (*arcos aórticos*) da lugar a una *aorta dorsal* que llevará la sangre al resto del organismo. La sangre regresa por dos *venas cardinales* (ant. y post.) (que en los tetrápodos darán lugar a las venas *cavas*) al seno venoso.

En los anfibios, el corazón adopta la forma compacta que ya permanecerá en los demás tetrápodos, dividida en dos partes (ventricular y atrial). El paso a la vida terrestre y a la respiración pulmonar origina dos importantes cambios: uno, la separación de los dos tipos de sangre, la oxigenada, proveniente de los pulmones y la sangre poco oxigenada proveniente del resto del organismo (circulación **doble**); y dos, la separación del atrio en dos cámaras, de las cuales, la derecha recibe la sangre sin oxigenar y la izquierda, oxigenada. A su vez, se desarrolla un tabique incompleto en el ventrículo que no impide la mezcla de la sangre (la tendencia es a formar un órgano con dos bombas, una para cada circulación (mayor y menor)). Donde sí se forma un tabique espiralado y completo es en el bulbo arterial, que dirige la sangre en dos direcciones: una, hacia los vasos de la aorta ventral y dos, hacia el par dorsal de vasos, las arterias pulmonares. En ellos, el seno venoso pierde importancia.

En los reptiles se observan las siguientes diferencias: 1. El seno venoso continúa reduciéndose. 2. El bulbo arterial, desaparece. A cambio, forma el tramo inicial de los grandes vasos que parten del corazón (el tronco pulmonar en la parte dorsal y el tronco ventral o aórtico que es par en alguno de ellos, pero que se comunican por el orificio de Panizza). 3. Tiene lugar la división parcial del ventrículo con lo que se favorece en mayor grado la separación de las dos corrientes sanguíneas.

Por último, en las aves y mamíferos, el tabique ventricular es completo, por lo que ambas sangres no se pueden mezclar (circulación **completa**). En las aves se pierde el tronco aórtico izquierdo, mientras que en los mamíferos es el único que se conserva.

2.4.-Anatomía comparada del sistema respiratorio

El proceso metabólico implica la absorción de O₂ y el desprendimiento de CO₂, a esto lo llamamos respiración. Los animales unicelulares (gran superficie de intercambio en relación a su volumen) y los menos complejos de los pluricelulares (muy bajas tasas metabólicas), realizan este proceso por difusión directa a partir del medio (acuoso). A medida que los animales se hacen mayores y desarrollan coberturas impermeables, órganos especiales como *piel, pulmones* y *branquias* se tienen que desarrollar para aumentar la superficie efectiva de intercambio. Pero debido a la lenta difusión de los gases a través del protoplasma, es necesario un sistema circulatorio para distribuirlos a todas las células. Pero aún con todo, la capacidad de transporte de gases por el plasma es limitada, por lo que los animales más desarrollados presentan proteínas sanguíneas especializadas en el transporte de los mismos (*hemoglobina* (FeHemoIntracel), *hemocianina* (Cu), *hemeritina* (FeNoHemo), *clorocruorina*

(FeHemoExtracel), etc...).

La relativamente baja concentración de O₂ disuelto en el agua es el principal problema respiratorio con el que deben enfrentarse los animales **acuáticos**. En ellos surgen las branquias que son los órganos respiratorios más efectivos para la vida en el agua. Pueden ser secundarias y externas (se originan como una evaginación del tegumento al exterior)(ej.-papulas, penachos branquiales de poliquetos sedentarios, de nudibranquios, de larvas de insectos o de anfibios), o primarias e internas (protegidas por alguna estructura externa)(ej.-agallas de los peces o branquias de crustáceos). La más perfeccionada es la branquia de un pez, formada por estructuras filamentosas delgadas y bien vascularizadas, con los vasos sanguíneos dispuestos de forma que el flujo sanguíneo se opone al flujo de agua a través de la branquia (flujo de contracorriente, que permite la máxima extracción posible de O₂ a partir del agua).

Existe una marcada diferencia entre los órganos de respiración de invertebrados y vertebrados **terrestres** y es que, mientras en los primeros se forman de la superficie externa del animal (en el caso de los artrópodos, el propio exoesqueleto quitinoso conforma los tubos que darán lugar a las tráqueas del sistema respiratorio traqueal), en los segundos, lo hacen a partir del tubo digestivo en su parte anterior. En su origen, los pulmones de los vertebrados se formaron a partir de un par de bolsas branquiales que habían perdido sus hendiduras branquiales. Estos primeros sacos sólo debieron ser utilizados en situaciones de urgencia y evolucionaron en dos direcciones: una hacia la *vejiga natatoria* de los peces óseos y otra, hacia el *pulmón* típico de los vertebrados terrestres.

En el primer caso, sólo uno de los sacos (el derecho) es desplazado hacia el dorso, entre el t.d. y la columna vertebral, situándose por encima del centro de gravedad. También su desembocadura en el t.d. se encuentra en posición dorsal. No todos los peces conservan este conducto de unión. Esta vejiga puede estar dividida en dos (caso de los ciprínidos entre los que se encuentra el carpín) e incluso puede desempeñar funciones adicionales como la de servir como órgano accesorio del sentido del oído a través de unos huesecillos (*huesecillos de Weber*), e incluso como órgano resonador (fonador) de los sonidos producidos por los músculos.

En el segundo caso, los pulmones se convierten en el órgano respiratorio central. En los que los tienen, el derecho suele ser mayor que el izquierdo (en algunos casos, como las serpientes, la reducción del izquierdo es muy exagerada y en algunos urodelos (anfibios) pueden faltar ambos). Los pulmones se abren ventralmente por un conducto impar (*tráquea*) en la *faringe*, corto al principio, largo después al desarrollarse el cuello (en las aves más largo y sinuoso). En su desembocadura en la *glotis* forma primero un aparato de cierre musculoso y más tarde a la *laringe* con aparato fonador en ranas, reptiles y mamíferos (en el caso del hombre, con cuerdas vocales). Las aves presentan también órgano fonador, la *siringe*, pero situada entre la tráquea y los bronquios.

Los pulmones varían según el grupo, así, los anfibios suele tener aún forma de saco; en los reptiles está dividido en cámaras por unos tabiques que contienen mesodermo y vasos sanguíneos; en los mamíferos también de estructura esponjosa, se dividen en millones de diminutas cavidades (*alvéolos*). Mientras que en el pulmón de todos estos, el aire sale por el mismo sitio que entró, en las aves existe una circulación del aire, gracias a los *sacos aéreos*, que no son más que evaginaciones de la pared pulmonar. Además, en las aves, los conductos de aire (*bronquiolos*) no terminan en alvéolos como en los mamíferos sino que se desarrollan como una especie de tubos, los *parabronquios*, a través de los cuales el aire fluye de forma continua. La interconexión de estos pulmones con los pares de sacos aéreos e incluso la médula de los huesos largos permite que se realice el intercambio de gases no sólo en la inspiración sino también en la espiración, por lo que su sistema respiratorio puede ser considerado como el más eficiente de los vertebrados terrestres.

2.5.-Anatomía comparada del sistema digestivo

El sistema digestivo está estrechamente relacionado, desde el p.d.v. embriológico y

estructural, con varios órganos, sobre todo los de la respiración (pulmones, branquias).

La primera región del t.d. consiste en estructuras para la alimentación y deglución e incluye a las *piezas bucales* (*mandíbulas, dientes, rádula, picos, etc...*), la *cavidad bucal* y la *faringe* muscular. Muchos tienen asociadas *glándulas salivares*. La *lengua* sólo está presente en los vertebrados (algunos insectos, como las moscas, presentan la *labela* una estructura que realiza alguna de las funciones de nuestra lengua).

En la segunda región de almacenamiento y transporte, aparece el *esófago* (presente en todos nuestros casos), encargado de transportar el alimento hacia la región digestiva. En muchos animales (caso de los insectos y aves), el esófago se ensancha para formar el *proventrículo* o *buche*, utilizado para el almacenamiento del alimento antes de la digestión.

En la tercera región de molido y primera digestión, el *estómago* (presente en todos nuestros casos) se encarga de la digestión inicial, así como del almacenamiento, trituración (es el espectacular caso de algunos crustáceos con el *molino gástrico*) y mezcla, que en el caso de algunos herbívoros se continúa con el estómago muscular o *molleja* (presente en insectos y aves). En algunos grupos aparecen aquí los *divertículos ciegos* cuya función es de aumentar la superficie del órgano estomacal (presentes en insectos y peces).

La cuarta región de la digestión final y la absorción, es el *intestino*, cuya importancia varía mucho en función del grupo animal. Así, en los insectos, donde los ciegos gástricos cumplen parte de sus funciones, el intestino se convierte más en un órgano de paso. En otros, como es el caso de muchos vertebrados, sus funciones (de enorme importancia) serán las de digerir y absorber los alimentos. Para ello, estos últimos utilizan dos estrategias, aumento de su superficie (en contacto con la luz) y aumento de longitud (enrollándose sobre sí mismo, que en el caso de los mamíferos puede ser hasta 8 veces mayor que la longitud total de su cuerpo).

Por último, la quinta región, de absorción de agua y concentración de sólidos, que en insectos forma el *recto* (cuya eficacia es espectacular en el caso de la *Schistocerca*) ayudado por las *glándulas rectales* capaces de absorber selectivamente iones (y por tanto, agua). En el caso de los peces, el intestino desemboca en la papila ano-uro-genital, que como su nombre indica está compartida por los tres sistemas. En el caso de los anfibios, reptiles y aves, lo hace en la *cloaca*, de función semejante a lo visto en los insectos. En los mamíferos, el *colon* además de reabsorber agua, presenta una importante flora bacteriana encargada de fragmentar a los desechos orgánicos y de sintetizar algunas vitaminas (K y algunas B).

En cuanto a las glándulas asociadas, en el caso de los insectos, aparece un *hepatopáncreas*, que tiene mayor relación con los ciegos gástricos que con ninguna glándula. En ellos, no hay nada parecido a la *Vesícula Biliar*. En los vertebrados, el *hígado* aparece como una evaginación del intestino con el que queda comunicado por el conducto colédoco. Lo mismo sucede con el *páncreas* que mientras que en peces y aves, desemboca separadamente del conducto biliar, en anfibios y mamíferos lo hacen de forma conjunta.

2.6.-Anatomía comparada del sistema urogenital

Aunque el título parece indicar la necesaria unión de ambos sistemas y aunque ese no sea el caso de los artrópodos, dado que el origen embriológico de los conductos genitales parece estar claramente en los túbulos de los nefridios, mantengo el título tal y como está.

Los artrópodos presentan un sistema excretor doble: por un lado, los *metanefridios* se transforman en unas glándulas que debido al lugar donde se sitúa el nefridioporo, reciben el nombre de *maxilares, antenales, labiales* y *coxales*; por otro lado (los insectos y las arañas) presentan un sistema excretor único, los *túbulos de Malpigio* que operan en colaboración con las *glándulas rectales*. El sistema es distinto del resto, pues dentro de los túbulos se segregan sales (K) de forma activa, lo que crea un arrastre osmótico de agua, solutos y desechos nitrogenados hacia dentro del túbulo. Esta “orina” pasa al recto, donde las glándulas rectales reabsorberán la mayor parte del agua y el K, dejando los desechos nitrogenados que saldrán con las heces.

En cuanto a su sistema reproductor, presentan *gónadas* pares y en el caso de la hembra,

aparece una *espermateca* (*vesícula espermática*), donde se almacenan los espermatozoides en número suficiente para fecundar más de una tanda de óvulos. Producen hormonas sexuales (*feromonas*) de una tremenda efectividad. Poseen *órganos genitales* externos y clara tendencia hacia la fecundación interna.

Los vertebrados, sobre todo los machos, presentan una total conexión entre ambos sistemas. En todos ellos, con excepción de los mamíferos, los conductos se abren en una *cloaca* (cámara común donde el digestivo, el excretor y el genital se vacían). Los mamíferos superiores no tienen cloaca y el sistema urogenital tiene una abertura independiente de la abertura anal.

La estructura del sistema reproductor en vertebrados incluye: las gónadas, los conductos gonadales, los órganos accesorios (copuladores), las glándulas accesorias y los órganos de almacenamiento de los gametos antes y después de la fecundación.

El riñón primitivo de los vertebrados (**holonefros**) se extiende desde la región cefálica hasta la cloaca y consta de canalículos que se abren al exterior a través del uréter primario (*conducto de Wolff*). En los peces, la parte anterior del riñón (**pronefros**) está siempre involucionada. En la parte posterior (**opistonefros**) aumenta el número de túbulos por segmento y la organización segmentaria se pierde. Esta última parte no se desarrolla igual en todos los vertebrados. En la mayoría de los machos (excepto en los peces teleósteos), la parte anterior del opistonefros y del uréter primario están al servicio de los órganos genitales (así separamos al opistonefros en una parte sexual (**mesonefros**) y otra renal (**metanefros**)). En los vertebrados más desarrollados, el riñón se corresponde con la parte renal del opistonefros (llamada metanefros); poseen un *uréter secundario* (mientras que el primario pasa al servicio del reproductor), cuya parte inicial está hundida en el riñón en los mamíferos, formando la pelvis renal.

3.-Manipulación del animal

Como norma general, debemos manipular a los animales de laboratorio sin brusquedad e infringiéndoles el menor daño posible, pues se estresan con facilidad, lo que puede provocar una reacción de intranquilidad mantenida durante todo el proceso de trabajo, lo que dificultará la realización del experimento.

3.1.-Zonas de agarre (recogida y transporte)

La máxima de este apartado será el recoger al animal sin estresarle demasiado y sin hacerle daño. Además sin que dicho agarre suponga la posibilidad de que el animal nos hiera. En el caso de la rata, el ratón, el jerbo, la cobaya y el hámster, el único punto de peligro reside en sus dientes, por lo que recogeremos al animal impidiéndole que pueda utilizar sus dientes para mordernos. Lo normal es sujetarlo por el pliegue de piel de detrás de su cabeza (en el caso de que no tengan cola, como es el caso del hámster y la cobaya, es el único método) o bien agarrarlo por su cola o bien por ambos.

En los animales más grandes, como es el caso del conejo (que puede utilizar sus patas para herirnos) una vez sujeto por el pliegue de piel de detrás de la cabeza, se obliga con la otra mano a que levante sus patas hacia delante (parece como si adoptara la postura de sentado). O bien sujetándolo por ambas orejas o sujetándolo por ambas patas traseras.

3.2.-Zonas de sujeción (inmovilización)

Para inmovilizar a los más pequeños, en caso de que tengan cola, agarraremos al animal de la cola y del pliegue de piel por detrás de la cabeza, manteniéndolos sobre la mesa del laboratorio. Si no tienen cola, se sujetan por todo el cuerpo contra la mesa.

Para los conejos, un sistema de inmovilización bueno es el abrazarles de manera que su cabeza, sujeta por el pliegue de piel, quede oculta en nuestra bata, mientras que con la otra mano sujetamos sus patas traseras.

3.3.-Puntos de inyección y extracción

Normalmente, se realizan cinco tipos de inyecciones (una de ellas no verdadera), la intramuscular, la subcutánea, la intraperitoneal, la intravenosa y la oral.

Para la primera, normalmente se elige el muslo del animal, en su cara ventral en el caso de rata, ratón, jerbo o hámster y en su dorso, en el caso del conejo y cobaya. Para la segunda, se coge un pliegue por detrás de la cabeza o en el costado del cuerpo, por detrás de la pata delantera. La intraperitoneal se aplica en la parte ventral del abdomen. La intravenosa se aplica en la cola de las ratas y ratones y en la oreja de los conejos. Por último, la oral no significa atravesar tejidos, sino que se deja caer el contenido de la jeringuilla dentro de la cavidad bucal.

La extracción de sangre, se realiza fundamentalmente en la vena caudal, situada en la cola de las ratas, ratones y jerbos. De todas formas, las cantidades extraídas siempre serán pequeñas. En el caso del conejo, la forma menos compleja (algunos especialistas recogen cantidades importantes mediante punción cardiaca) es recoger la sangre del pabellón auricular del conejo, previamente dilatada la vena con xilol.

DISECCIÓN DE UN CRUSTÁCEO DECÁPODO

1.- INTRODUCCIÓN

Los crustáceos forman un importante grupo de invertebrados artrópodos (apéndices articulados) principalmente acuático.

De ellos, los Malacostráceos y, dentro de estos, los Decápodos (diez patas) forman el grupo más conocido y evolucionado. Muchos de ellos, forman parte importante de nuestra cultura gastronómica, por lo que hoy en día son de gran interés para la acuicultura.

Como ya se ha dicho, por su alto grado de desarrollo evolutivo, podría considerarse a los Decápodos como uno de los grupos de invertebrados de más fácil manipulación y conservación en laboratorio para experimentación. Lo dicho es todavía más evidente en el caso del Cangrejo de río y más todavía en el Cangrejo de río americano, que se introdujo hace algunos años por parte de la Admon. para paliar la escasez de nuestro cangrejo autóctono atacado por un hongo (afanomicosis) al que el americano es resistente. Este cangrejo ha prosperado de forma que hoy es una verdadera plaga en algunos puntos del país.

Tienen pocas necesidades alimenticias (se pueden alimentar con piensos integrales), de espacio (pueden vivir en pequeños acuarios, con tal de que tengan agujeros donde instalarse), e incluso reproductoras. Además, su persistencia fuera del agua, permite trabajar con animales vivos días después de haber sido extraídos de las astacifactorias.

2.- MATERIAL Y MÉTODO.

- Cangrejo americano (rojo) machos y hembras.
- Bandejas de disección.
- Material de disección.
- Alfileres con cabeza de plástico.
- Papel de filtro.
- Lupas binoculares.

3.- ORGANOGRAFÍA EXTERNA :

Con el animal colocado sobre la parafina de la cubeta de disección, observar las partes de su cuerpo, el *cefalotórax (peréion)* y el *abdomen (pleon)*. Observar el *capuchón cefalotorácico* y su contorno *rostral*. Observar los diferentes tipos de apéndices corporales, su forma y disposición; identificar los *pereiópodos* y los *pleópodos*. Observar los segmentos abdominales, encontrando sus características sexuales externas (orificios genitales, pleópodos modificados, etc...). Observar los orificios de las glándulas antenales (gl. verdes), los dos pares de antenas y los ojos compuestos o multifacetados (pedunculados).

4.- ORGANOGRAFÍA INTERNA :

Colocar al animal, con su vientre sobre la parafina y cortar con mucho cuidado con unas tijeras finas a ambos lados del *capuchón cefalotorácico*, empezando justo al final del mismo, en su contacto con el primer segmento abdominal. Un poco antes de llegar al *rostro*, interrumpimos el corte en ambos lados y cortamos transversalmente (observar figura). Levantamos con cuidado el trozo de cutícula (exoesqueleto) cortada para observar en su interior.

Una vez realizada esta disección, se puede sujetar al animal, mediante alfileres con cabeza de plástico, a la parafina, a la altura del extremo de algún *pereiópodo* y de los *urópodos* (telson o cola).

Observaremos parte del tubo digestivo, en el que destaca su *estómago* de gran tamaño y situado cerca del rostro; con mucho cuidado, practicaremos una incisión dorsal a la altura de uno de los pliegues quitinosos del estómago, para así acceder a la cavidad gástrica y poder observar el *molino gástrico*.

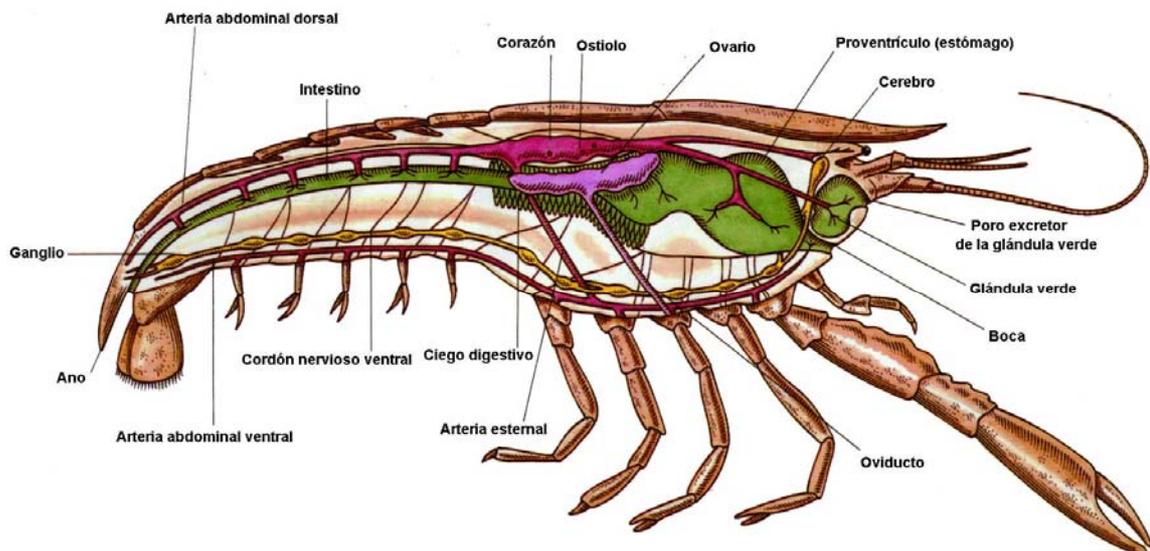
También –a primera vista- veremos la mayor parte del sistema circulatorio, con el *corazón* perforado por *ostiolos* y con forma romboidal en posición central e inmediatamente por debajo y a su alrededor, se observan, el hígado y parte del aparato reproductor, con la gónada correspondiente y sus conductos genitales. Practicando con cuidado una incisión superior en el *capuchón cefalotorácico*, es posible observar a las *glándulas antenales*, o *glándulas verdes* que no son más que *metanefridios* modificados (sistema excretor).

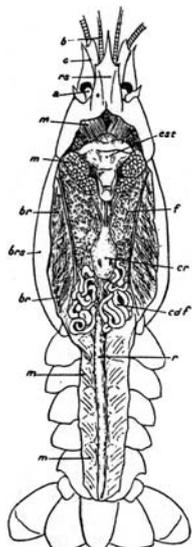
Proceder ahora a una nueva disección del dorso del animal, pero ésta vez abdominal. Para ello, practicaremos sendos cortes de forma paralela (como antes), comenzando por el primer segmento abdominal hasta llegar al último, donde daremos un corte transverso. Levantaremos con cuidado la cutícula cortada para observar casi al resto del sistema circulatorio (*vaso dorsal o aorta*) y al *intestino* del tubo digestivo. Observar la importante masa de músculos abdominales necesaria para el movimiento de estos animales.

Levantando con cuidado el circulatorio, podemos observar al aparato digestivo al completo.

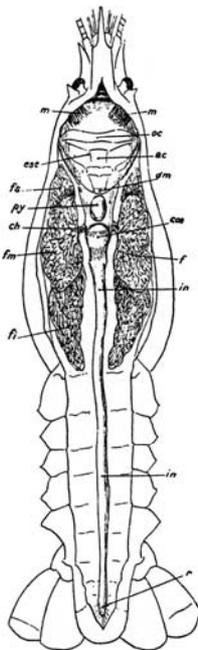
Quitando el aparato digestivo, podemos observar el reproductor, con *gónada* impar y *gonoductos* pares, que desembocan en los apéndices correspondientes. Una vez visto el reproductor, sacarlo con cuidado para observar el sistema nervioso, con su *cerebro* ganglionar, su anillo nervioso periesofágico y su doble cadena nerviosa ganglionar y ventral. Para ello será necesario también que quitemos con cuidado los haces musculares abdominales.

Por último observar el sistema respiratorio, formado por branquias dispuestas entre el *pereion* y el *capuchón cefalotorácico* del animal, cortando dicho *capuchón* a partir de uno de los cortes dados en primer lugar, hacia los lados.

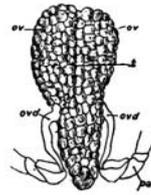




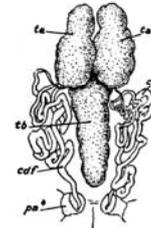
VISTA GENERAL



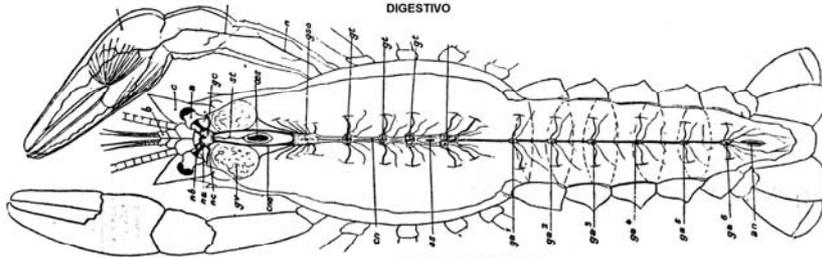
DIGESTIVO



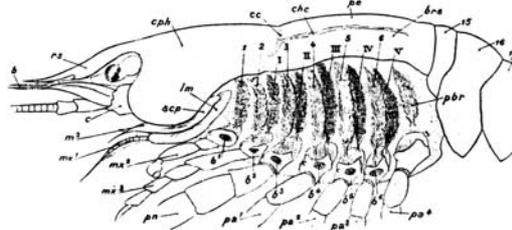
REPRODUCTOR FEMENINO



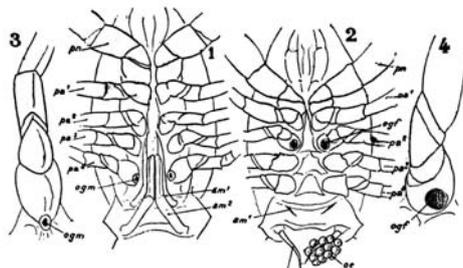
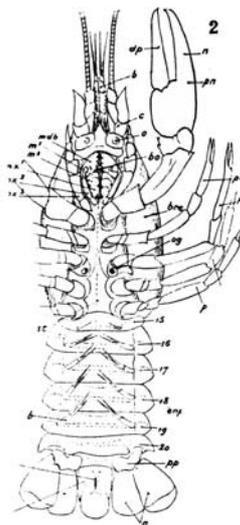
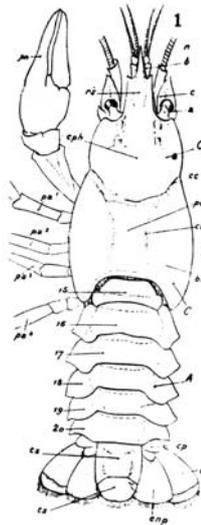
REPRODUCTOR MASCULINO



NERVIOSO Y EXCRETOR



RESPIRATORIO



DISECCION DE UN PEZ (*La trucha*)

1.- INTRODUCCIÓN

Los peces forman un importante grupo de vertebrados acuáticos. Seguramente, son los precursores del resto de vertebrados, por lo que algunas de sus características orgánicas son muy parecidas a las del resto de aquellos.

De ellos, los Ciprínidos y los Salmónidos, forman un grupo muy conocido de peces de agua dulce. Muchos de ellos, forman parte importante de nuestra cultura gastronómica (carpa, madrilla, barbo, trucha, salmón, etc..), por lo que hoy en día son de gran interés para la acuicultura.

Tienen pocas necesidades alimenticias (se pueden alimentar con piensos integrales), algunos ciprínidos también de espacio (pueden vivir en pequeños acuarios), y también reproductoras (incluso pueden ser inseminados artificialmente). Además, pueden ser conseguidos fácilmente a través de gran cantidad de piscifactorías.

Para esta práctica, se ha elegido a la trucha “arco iris” (una trucha norteamericana, cultivada de forma intensa en nuestras piscifactorías) por su facilidad de obtención, pero podría servir cualquier otra de las especies mencionadas.

2.- MATERIAL Y MÉTODO.

- Trucha arco iris machos y hembras.
- Bandejas de disección.
- Material de disección.
- Alfileres con cabeza de plástico.
- Papel de filtro.
- Lupas binoculares.

3.- ORGANOGRAFÍA EXTERNA.

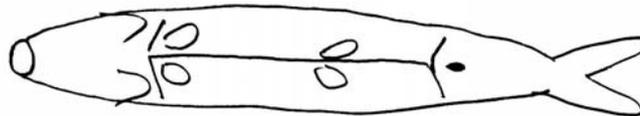
Con el animal colocado sobre la parafina de la cubeta de disección, observar las partes de su cuerpo, *región cefálica o cabeza*, *región troncal o tronco* y *región caudal o cola*. La *región cefálica* tiene la *boca* en posición terminal, amplia, sostenida por mandíbulas, limitada por los labios y con dientes (pasar el dedo para notarlos). Observar también la *lengua* en el interior de la cavidad bucal (también con dientes).

Por encima se encuentran las *narinas o fosas nasales* y lateralmente los *ojos*. En la parte posterior de la cabeza y a ambos lados se encuentra la *región branquial*, cubierta por el *opérculo* que protege a las branquias.

La *región troncal* comienza detrás de la cabeza y termina en el orificio anal. A ambos lados del cuerpo se encuentra la *línea lateral*, con función sensorial ya que recoge las vibraciones o movimientos del agua. A partir del orificio anal comienza la *región caudal*, compuesta de un pedúnculo muscular que se prolonga en la *aleta caudal*.

4.- ORGANOGRAFÍA INTERNA.

Colocar al animal, con su dorso sobre la parafina y cortar con mucho cuidado con unas tijeras finas por la línea medio-ventral, partiendo **desde encima** de la *papila ano-uro-genital* hasta llegar cerca del opérculo. Luego, prolongamos el corte por ambos lados, hasta llegar cerca de la línea lateral (observar figura). Sujetamos con cuidado por medio de alfileres con cabeza de plástico ambos labios a la parafina.



4.1.- DIGESTIVO.

Una vez realizada esta disección, observaremos la cavidad visceral al descubierto. En ella, observaremos parte del tubo digestivo, principalmente, el *intestino*, que forma varias asas, envuelto en una gran cantidad de tejido adiposo (importante como aislante en el medio en el que vive la trucha). El sistema digestivo comienza en una *faringe* (no visible desde nuestro lado), un *esófago* ancho al que sigue un amplio *estómago* que se estrecha en su unión al *intestino*, lugar donde pueden apreciarse una gran cantidad de *ciegos pilóricos o ciegos gástricos*. El intestino desemboca en la *papila ano-uro-genital*. El *hígado* es muy grande y se sitúa cerca del estómago en la parte anterior de la cavidad visceral, desembocando al principio del estómago. Por debajo del *hígado*, puede observarse una gran *vesícula biliar*.

4.2.- CIRCULATORIO.

En la parte anterior de la cavidad, y por encima del digestivo, se observa al *corazón*, delimitado por la *membrana pericárdica* y que está formado por dos cámaras, el *ventrículo* y – por debajo- una gran *aurícula*. También es visible el *bulbo aórtico* de color blanquecino.

4.3.- RESTO DE ÓRGANOS VISCERALES.

Entre el intestino y la grasa circundante, puede verse un órgano ovalado y de color marrónáceo, el *bazo*.

Por debajo del digestivo (al que podemos desenrollar para facilitar otras observaciones), veremos al reproductor, formado por un par de *gónadas* alargadas, con sus conductos que acaban en la *papila ano-uro-genital*. Inmediatamente por debajo de las gónadas, aparece la *vejiga natatoria*, órgano de flotación (parecido a un globo transparente) que está unido por *el conducto neumático o pneumatóforo* con el *esófago* y que en algunos casos puede incluso funcionar como órgano respiratorio o incluso fonador.

Retirando los órganos anteriores, se pueden observar ahora, al fondo de la cavidad visceral, dos masas alargadas y oscuras (pardo-rojizas), los *riñones* de las que salen unos conductos (*uréteres*) que desembocan a través de una *vejiga urinaria* en la *papila ano-uro-genital*.

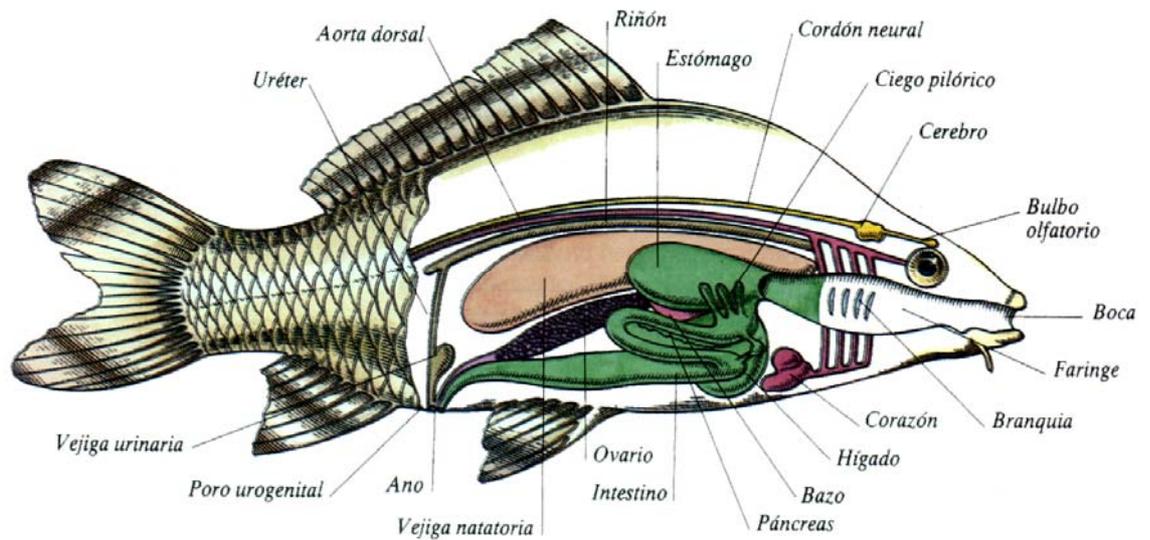
4.4.- RESPIRATORIO.

Proceder ahora a la disección del opérculo, con lo que dejamos al descubierto la *cavidad branquial*, que alberga los arcos branquiales dobles. Observar las *branquias* y su disposición.

4.5.- NERVIOSO.

Para ver el sistema encefálico, deberemos –en primer lugar- decapitar a la trucha, justo por detrás del cráneo. A continuación desprenderemos la capa de piel que se encuentra por la parte dorsal del cráneo, con lo que ya podremos observar por transparencia al *encéfalo*.

Luego, con cuidado y desde detrás hacia delante, cortaremos el hueso del cráneo a ambos lados, formando como una especie de tapa, que iremos levantando con cuidado para descubrir las tres partes visibles del encéfalo (bulbos olfatorios, hemisferios cerebrales y cerebelo).



DISECCIÓN DE RATA

1.- *INTRODUCCIÓN.*

La rata blanca es el animal más comúnmente usado como mamífero de laboratorio. Esta práctica tiene como objetivo el conocimiento de la rata como modelo experimental, mediante la familiarización con la anatomía macroscópica de sus sistemas de órganos más importantes, y adquirir el adiestramiento en su manejo para ser utilizada posteriormente en otras prácticas.

2.- *MATERIAL Y MÉTODO.*

- Ratas Wistar machos y hembras.
- Bandejas de disección.
- Material de disección.
- Cinta adhesiva.
- Vasos de precipitados de 50 ml.
- Algodón.
- Éter-etílico.
- Papel de filtro.
- Campana de cristal.
- Hilo.

La práctica comienza con la anestesia y muerte del animal en una campana de cristal mediante un algodón empapado en Éter. Una vez muerta, se procede a la fijación de la rata sobre la tabla de disección, con la parte ventral hacia arriba. Sujétese en posición extendida mediante cinta adhesiva en las extremidades. Para facilitar la observación del funcionamiento de determinados órganos, la rata debería mantenerse viva, por lo que habría que vigilar constantemente que ni se despertara ni dejara de respirar; para ello se aplicaría un vaso de precipitados, con un algodón empapado en Éter, al hocico de la rata, y se alejaría o acercaría en función de su estado.

Determinese el sexo externamente. A continuación, levantamos la piel mediante pinzamiento y se hace una incisión en la línea media, a través de la piel de la superficie ventral, desde la altura del labio inferior hasta los orificios genitales. Separar la piel de la capa muscular con los dedos, con cuidado de no dañar los nervios y músculos de la zona axilar y retirarla hacia los lados.

3.- *DISECCIÓN ABDOMINAL.*

3.1.- *APARATO DIGESTIVO.* (Fig. 2.1)

A lo largo de todo el abdomen se realiza una incisión en la línea alba del plano muscular. Para no dañar los órganos, las tijeras deben mantenerse horizontalmente y con la punta roma hacia el interior del abdomen. Una vez

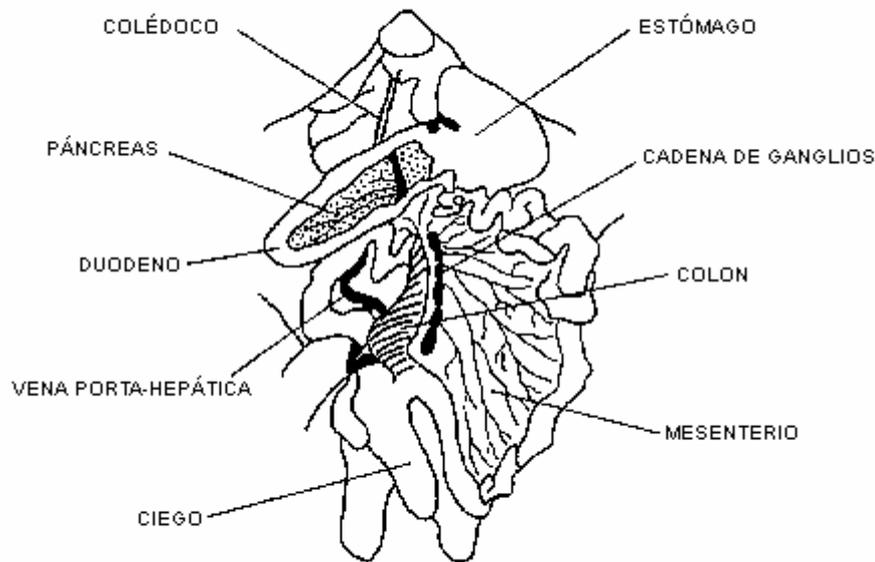


Figura 2.1.- Representación esquemática del aparato digestivo de la rata disecado.

separado el músculo a ambos lados de la incisión aparecen todas las vísceras abdominales:

- *Hígado* con varios lóbulos. Identifíquese la desembocadura de las vías biliares en el intestino delgado (*conducto colédoco*) y la *vena porta-hepática*.
- *Estómago*, en donde se diferencian la zona cardial, la fúndica y la pilórica.
- *Páncreas*, que es difuso y de color rosado, tiene forma de numerosas masas tisulares diseminadas en el mesenterio del intestino delgado.
- *Bazo*, que tiene forma de lengüeta.
- Paquete intestinal cubierto de masas de grasa que deben ser separadas. Moviendo este paquete hacia la izquierda se podrán identificar todas las partes del intestino. En primer lugar se sigue el *intestino delgado*, observándose sucesivamente el *duodeno* (localícese el *colédoco*), el *yeyuno* y el *íleon*. De la misma forma se sigue al *intestino grueso*, identificando el *ciego* (saco muy voluminoso), el *cólon* (con estriaciones) y el *recto*, que desemboca en el *ano*.

Posteriormente se procede a la extracción de todo el tracto digestivo. Para ello se ha de ligar la *vena porta-hepática* y las arterias *celíaca* y *mesentérica* anterior. Se corta el esófago y el recto, desgarrando suavemente el mesenterio.

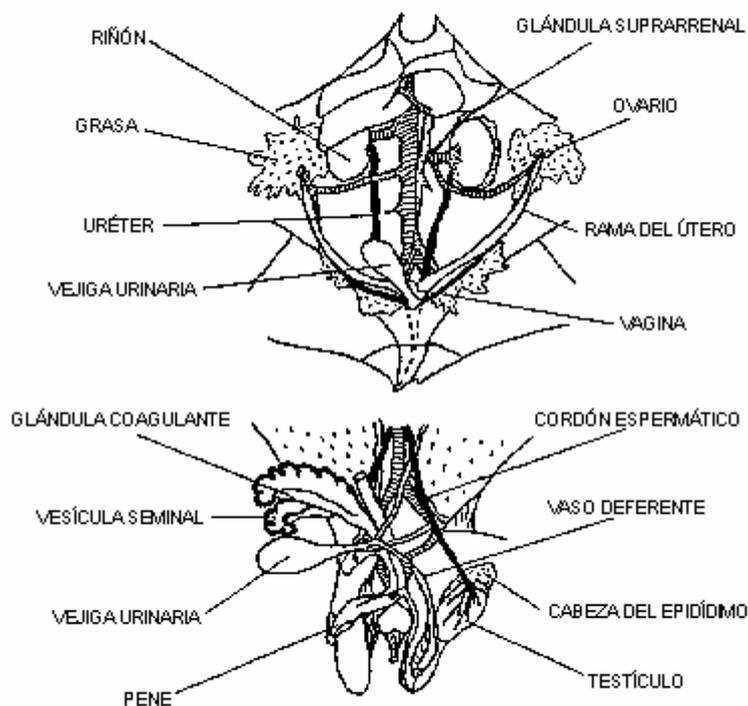


Figura 2.2.- Representación esquemática de los aparatos urinario y reproductor.

3.2.- APARATO UROGENITAL. (Fig. 2.2)

Una vez extraídos los órganos digestivos queda expuesta la pared posterior de la cavidad abdominal, donde pueden verse los *riñones*, los *uréteres* y la *vejiga urinaria*.

Junto al riñón aparecen las *cápsulas suprarrenales*. Separar por simple tracción una de ellas y cortarla transversalmente para observar la *corteza* y la *médula adrenal*. Extirpar un riñón y mediante corte longitudinal observar las distintas zonas (*corteza*, *médula* y *pelvis*).

El tipo de órganos de la reproducción dependerá, claro está, del sexo del animal. Si la rata es hembra, se encontrarán los *ovarios* cerca de los *riñones* despegando con cuidado la grasa. También se observan los *oviductos*, muy cortos, cerca de los *ovarios* y se siguen hasta las dos *ramas del útero* que acaba en la *vagina*. En el macho pueden encontrarse los *testículos* en el *saco escrotal*. Se rompe el *saco* y sacando el *testículo* se puede observar el *epidídimo*, *vasos deferentes* y *cordón espermático*. También se pueden identificar, como órganos anejos al aparato reproductor masculino, las *vesículas seminales*, detrás de la vejiga urinaria, con forma de hoja lobulada y las *glándulas prostáticas*. Por último aparecen la *uretra* y el *pene*.

3.3.- VASOS SANGUÍNEOS DEL ABDOMEN.

Separando los restos de mesenterio y grasa que puedan estorbar se observan: la *aorta* descendente que se ramifica en dos *arterias ilíacas comunes*, que luego se dividen en *internas* y *externas* y de ellas parten las *femorales*; la *vena cava posterior*, que recibe dos *venas ilíacas comunes* en las que también confluyen una *externa* y otra *interna*. Obsérvense también las *arterias y venas renales*.

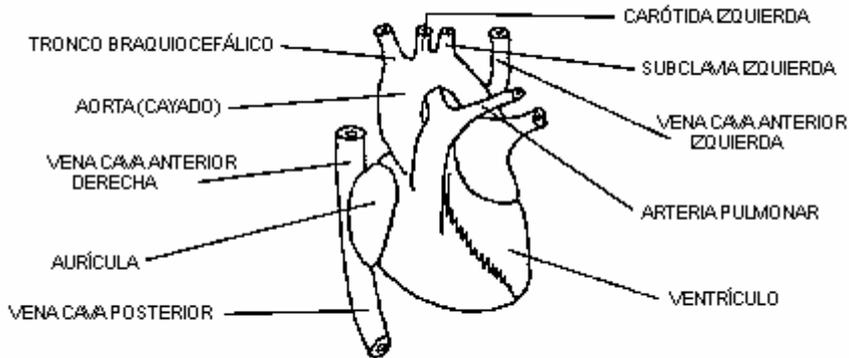


Figura 2.3.- Representación esquemática del corazón y sus principales vasos sanguíneos.

4.- DISECCION DEL TORAX. (Fig. 2.3)

Se pueden observar el *corazón* y los *pulmones* por transparencia a través del diafragma pinzando el *cartílago (apéndice) xifoides* y levantándolo. Haciendo una incisión en la pared torácica se observa cómo, al entrar el aire en la *cavidad pleural*, el *pulmón* se retrae separándose del diafragma. Esto sucede al desaparecer la presión negativa interpleural.

Después de abrir la cavidad torácica, los *pulmones* ya no pueden funcionar, por lo tanto, podría suspenderse la anestesia en caso de trabajar con el animal vivo.

A continuación, se introducen las tijeras directamente en la línea media, en el extremo inferior de la caja torácica, y se corta por el centro del *esternón* en dirección hacia la cabeza. Puede observarse el *timo*, formado por una masa blanquecina que tapa parcialmente el *corazón*, y los *pulmones* colapsados.

Después de extraer el *timo* y separar la grasa que rodea a los grandes vasos, desplazar el *corazón* hacia un lado para identificar los siguientes vasos: *aorta (cayado)*, de donde salen, en primer lugar, el *tronco braquioencefálico*, que se dividirá más arriba en *carótida y subclavia derechas*, y a continuación la *carótida y subclavia izquierdas*. También se pueden ver, saliendo del *ventrículo derecho*, la *arteria pulmonar*, que rápidamente se bifurca en las *arterias pulmonares derecha e izquierda* y llegando a la *aurícula izquierda*, las *venas pulmonares*. A la altura a la *aurícula derecha* hay que observar las *venas cavas anteriores derecha e izquierda y la posterior*. Observar los movimientos del corazón.

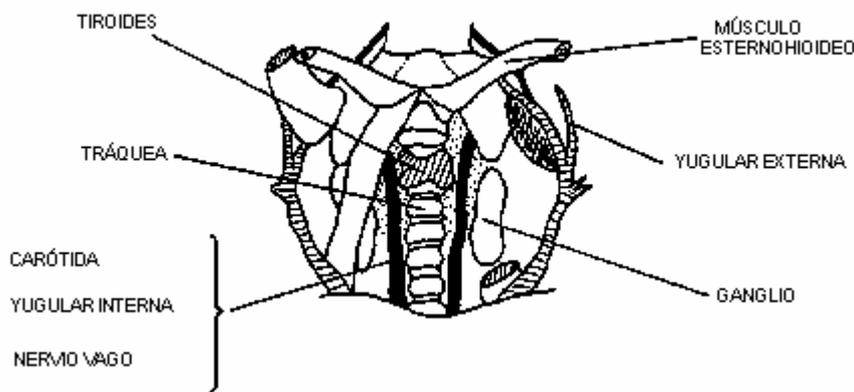


Figura 2.4.- Representación esquemática del cuello.

5.- DISECCIÓN DEL CUELLO. (Fig. 2.4)

Antes de abrir la capa muscular, identificar en esta región del cuello los *nódulos linfáticos* y las *glándulas salivares*. A continuación se corta por la línea media del *músculo (esternohioideo)* y se separa hacia los lados.

Podrá observarse entonces la *tráquea*, la *glándula tiroidea* y vasos sanguíneos: la *arteria carótida común* y la *vena yugular interna*. Junto a la carótida puede identificarse el *nervio vago*.

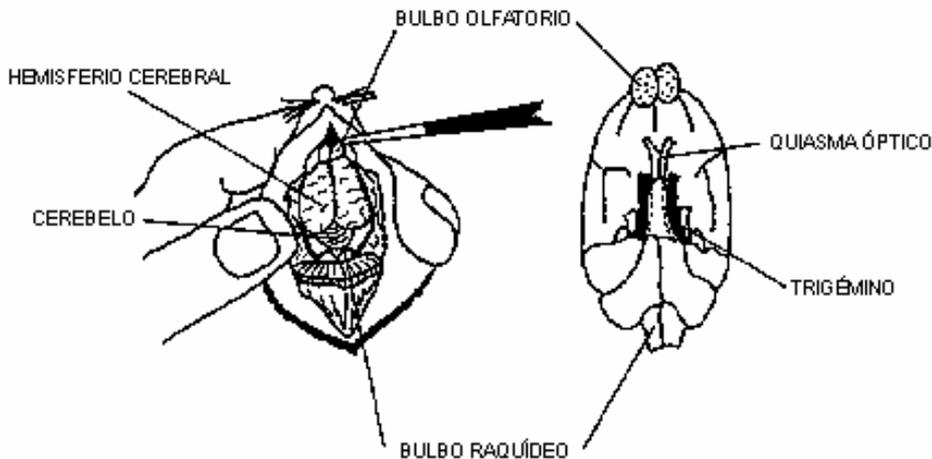


Figura 2.5.- Representación esquemática del cerebro.

6.- DISECCIÓN DEL CEREBRO. (Fig. 2.5)

Manteniéndose a la ratona con la cara dorsal hacia arriba, se hace una pequeña incisión con el escalpelo en la piel, entre los pabellones auditivos. Se continúa la incisión hacia delante, hasta el hocico y hacia detrás, hasta el nivel de las extremidades anteriores. Se estira lateralmente la piel y se coge la cabeza de la ratona con los dedos pulgar y medio. La parte libre de la piel ayuda a sujetarla bien. Manteniéndose el escalpelo al mismo nivel que la parte posterior del cráneo se perfora el *hueso interparietal*.

Es muy importante mantener el escalpelo en posición horizontal. La presión ejercida sobre los instrumentos puede ser controlada en todo momento, ya que cualquier desviación causará o bien la punción del cerebro o bien el fracaso en la perforación del cráneo.

Con el escalpelo ir sacando el techo del cráneo hasta que quede al descubierto: *bulbo olfatorio*, *hemisferios cerebrales* y la mayor parte del *cerebelo*.

