



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE BIOLOGÍA**



MANUAL DE PRÁCTICAS DE EMBRIOLOGÍA ANIMAL COMPARADA

Fecha de actualización: enero de 2025

Biol. Ma. Carmen López Maldonado

M. en C. Ana Leticia Escalante Jiménez

M. en C. María Concepción Apatiga Castelán

Dr. Salvador Manzo Ávalos

Biol. Luz Lilia Jiménez Rico

INDICACIONES GENERALES PARA EL TRABAJO EN EL LABORATORIO DE EMBRIOLOGÍA ANIMAL COMPARADA

Reglamento y medidas de seguridad.

- a) Formación de equipos.
 - Se formarán seis equipos de trabajo constituidos de 3 a 5 personas (dependiendo el número de alumnos).
- b) Reglamento del laboratorio.
 - Para acreditar la parte práctica el alumno deberá asistir como mínimo al 75% de las sesiones.
 - El tiempo de tolerancia para la llegada al laboratorio será de 10 minutos después de la hora fijada, tres retardos constituyen una falta.
 - Es obligatorio el uso de la bata en el laboratorio.
 - No se permite introducir alimentos ni bebidas.
 - Se requiere de gran cuidado y limpieza en el manejo y uso de los equipos del laboratorio.
 - Se recomienda mantener el laboratorio en orden, para lo cual es indispensable depositar la basura en los botes colectores (si se trata de material biológico que pueda descomponerse, este deberá desecharse fuera del laboratorio o preferentemente fuera de las instalaciones de la universidad).
 - Las mochilas y objetos personales serán guardados en los anaqueles laterales del laboratorio, en la mesa de trabajo se tendrán únicamente los materiales que se necesiten en cada práctica.
 - Las fotografías tomadas durante las prácticas no deberán ser publicadas en redes sociales, serán usadas exclusivamente para la entrega de los reportes.

Nota: Todos los alumnos deben respetar las reglas de seguridad e higiene dentro del laboratorio de Embriología Animal Comparada.

Material que se debe presentar para el desarrollo de las prácticas de laboratorio.

Personal:

- Bata de laboratorio (blanca).
- Pinzas, agujas y tijeras de disección.
- Manual de prácticas.

Por equipo:

- Un marcador permanente de punto fino.
- Etiquetas adhesivas de 2.5 cm. (por sección)
- Dos jergas de microfibra (para el secado de cristalería y limpieza de la mesa de trabajo).
- Material biológico (se indicará previo a cada práctica).

MÉTODO Y DESARROLLO GENERAL DEL CURSO

a) Los reportes del laboratorio deben contener.

- Portada de cada una de las prácticas correspondientes que deberá indicar: nombre de la Universidad, nombre de la Facultad, nombre de la materia, título y número de la práctica, nombre del alumno, sección, nombre de la profesora del laboratorio y fecha de entrega.

La entrega de la práctica será engrapada o con un clip y en un folder.

- Resultados (incluye la presentación de esquemas con sus respectivas interpretaciones, así como la entrega de preparaciones realizadas).
- Cuestionario.
- Conclusiones.
- Literatura citada.

b) Evaluación.

El curso se compone de una parte teórica con valor del 70% y una práctica con un valor del 30% ambos rubros deberán ser aprobados con un mínimo de 6. En ambos casos será necesario un porcentaje de asistencia del 75%. En caso de reprobar teoría y/o laboratorio deberán presentar examen extraordinario. Los exámenes extraordinario y regularización comprenderán tanto conceptos de teoría como de laboratorio. La evaluación se hará de la siguiente manera:

- Trabajo individual y por equipo y entrega de material biológico
- Reporte y manual de prácticas
- Exámenes

CONTENIDO

Práctica No. 1. Introducción de las técnicas utilizadas en el estudio de embriones.....	5
Práctica No. 2. Espermatogénesis (Parte I y II).....	8
Práctica No. 3. Ovogénesis y tipos de óvulos (Parte I y II).....	24
Práctica No. 4. Técnica de Dawson	34
Práctica No. 5. Determinación de los estadios de desarrollo del caracol de jardín (<i>Cornu aspersum</i>).....	39
Práctica No. 6. Determinación de los estadios de desarrollo en aves.....	45

PRÁCTICA No. 1

INTRODUCCIÓN DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO DE EMBRIONES

INTRODUCCIÓN

La embriología se encarga del estudio del desarrollo del embrión, es decir, desde la formación de los gametos hasta el nacimiento. La formación y el desarrollo de un embrión se conoce como embriogénesis. Todos los animales superiores comienzan sus vidas a partir de una sola célula, el óvulo fecundado (*cigoto*). El momento de la fecundación, cuando el espermatozoide se encuentra con el óvulo, representa el punto inicial en la historia de la vida u ontogenia del individuo.

El estudio de la embriología empezó con observaciones anatómicas sencillas y con el avance científico y tecnológico se fue comprendiendo mejor. En la actualidad el estudio de la Embriología no sólo comprende estudios morfológicos, sino también utiliza una serie de métodos y técnicas asociados a otras áreas de estudio como son la genética, la biología celular y molecular, la anatomía, entre otras, que permiten integrar nuevas técnicas para conocer más acerca del desarrollo de los organismos.

Los equipos y las técnicas histológicas, incluyendo las embriológicas, deben ser consideradas herramientas fundamentales en la formación del biólogo; actualmente son numerosas y variadas las técnicas utilizadas en el desarrollo embrionario, sin embargo, muchas de estas no están al alcance de los biólogos en general, ya que requieren de tecnología especializada. El empleo de técnicas y materiales costosos hacen relativamente difícil el reproducir experimentos y prácticas en un laboratorio con fines docentes; sobre todo aquellas técnicas de carácter experimental, no obstante, existen técnicas de fácil empleo que nos permiten la obtención de material de calidad que nos ayuden al conocimiento del desarrollo embrionario.

OBJETIVO

- Conocer algunas de las técnicas utilizadas en el estudio del desarrollo embrionario.

INVESTIGAR

- a) Las funciones del Microscopio y del Microtomo, tipos o modelos existentes y su uso.
- b) Las técnicas de fijación y tinción comúnmente utilizadas en estudios histológicos, citológicos y embrionarios.
- c) Los principales reactivos químicos y colorantes y su mecanismo de acción, utilizados en embriología.

MATERIAL

- Trabajo de Investigación (previamente realizado por el alumno).
- Embriones de animales preservados con diferentes técnicas.
- Microscopio compuesto.
- Microscopio estereoscópico.
- Microtomo.
- Incubadora.
- Cámara de Neubauer.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. Comentar las diferentes técnicas y equipos que se emplean en el estudio del desarrollo embrionario.
2. Observar embriones preservados con diferentes técnicas y reconocer algunas estructuras con la ayuda de esquemas y fotografías.

RESULTADOS

Describe tus resultados y muestra las fotografías correspondientes, indicando los nombres de las estructuras observadas.

CUESTIONARIO

1. De la siguiente lista de reactivos menciona tres ejemplos y su mecanismo de acción:

-Aclaradores.

-Sueros fisiológicos.

-Colorantes.

-Conservadores.

2. Discute brevemente los métodos para la obtención de cortes de tejidos y las técnicas de fijación, inclusión y tinción.

3. ¿Cómo se clasifican los colorantes?

CONCLUSIÓN

LITERATURA CITADA

LITERATURA SUGERIDA

Estrada, F. E., et al. 1982. Manual de Técnicas histológicas. AGT Editor. México.
Primera Edición.

Gaviño, G., et al. 1972. Técnicas biológicas selectas de laboratorio y de campo.
Editorial Limusa. Primera Edición. México.

Knudsen, J.W. 1966. Biological Techniques. Collecting, Preserving and Illustrating
Plants and Animals. Harper Int. Edit. Primera Edición.

Mahoney, R. 1971. Laboratory techniques in zoology. Butterworths & Co. (Publishers)
London. Tercera edición.

PRÁCTICA No. 2

ESPERMATOGÉNESIS

INTRODUCCIÓN

La espermatogénesis es un proceso mediante el cual se forman los espermatozoides a partir de las células germinales primordiales, tiene lugar en las gónadas masculinas, los testículos; estos órganos están formados por numerosos tubos seminíferos que convergen en conductos comunes y llevan el esperma maduro al exterior, en los tubos existe una disposición ordenada de células en distintas fases de desarrollo. Este proceso es similar entre las clases de vertebrados y se divide en tres fases: fase proliferativa, fase meiótica y espermiogénesis. En la fase proliferativa, las células formadoras de espermatozoides las espermatogonias, se multiplican por mitosis y forman espermatogonias de tipo A y B, las espermatogonias tipo A continúan dividiéndose y siguen originando espermatogonias tipo A y B, mientras que las espermatogonias tipo B pasarán a la primera división meiótica y ahora se denominan espermatoцитos primarios, cada uno se divide en dos células hijas iguales, las cuales al iniciar la segunda división meiótica reciben el nombre de espermatoцитos secundarios, al completarse la meiosis resultan cuatro espermátidas haploides, cada una deberá entrar a la fase de espermiogénesis, en donde sufren una profunda transformación para convertirse en espermatozoides maduros (Figura 1) (Patten, 1990, Gilbert, 2005).

OBJETIVOS

- Reconocer las diferentes etapas de la espermatogénesis.
- Obtener y diferenciar espermatozoides de diferentes grupos de animales.
- Realizar un análisis macroscópico a la muestra de semen humano.

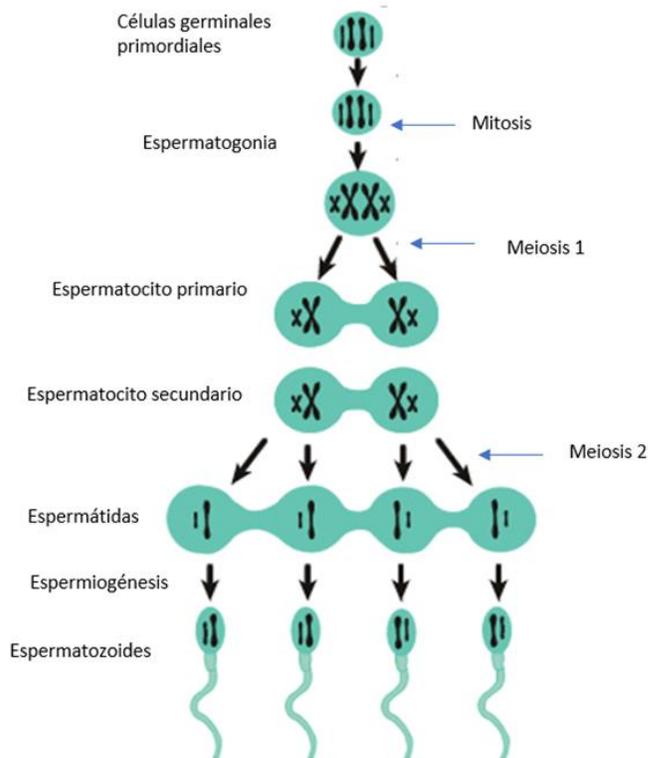


Figura 1. Diagrama del proceso de espermatogénesis. Tomada de goconqr.com. Fecha de consulta 16 enero de 2024.

MATERIAL BIOLÓGICO

Material proporcionado por el profesor:

- Laminillas permanentes de espermatozoides y cortes de testículos de diferentes grupos de animales.

Material proporcionado por el alumno:

- Parte I: semen de humano, perro, ratón, pez, gato, cerdo, etc.
- Parte II: semen de humano (una muestra por equipo). El semen deberá ser recolectado media hora antes de la práctica.

MATERIAL DE LABORATORIO

- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Palillos de madera.
- Pipeta Pasteur.
- Dos tubos de ensayo
- 2 contadores manuales

- Esmalte de uñas transparente.
- Papel pH.
- Cámara de Neubauer.
- Alcohol al 96%.
- Solución salina al 5%.
- Colorante Hematoxilina.
- Colorante Eosina.
- Colorante Nigrosina.
- Bálsamo de Canadá o Resina.
- Microscopio compuesto.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

PARTE I

1. Con las laminillas que te proporcionará el laboratorista, observar en el microscopio e identificar las espermatogonias, las células de Sertoli, los espermatoцитos primarios y secundarios, las espermátidas y los espermatozoides, usando como referencia las figuras 2 y 3.
2. Con las laminillas que te proporcionará el laboratorista, observar la morfología de los espermatozoides de diferentes especies.
3. Preparar frotis con las muestras de semen.

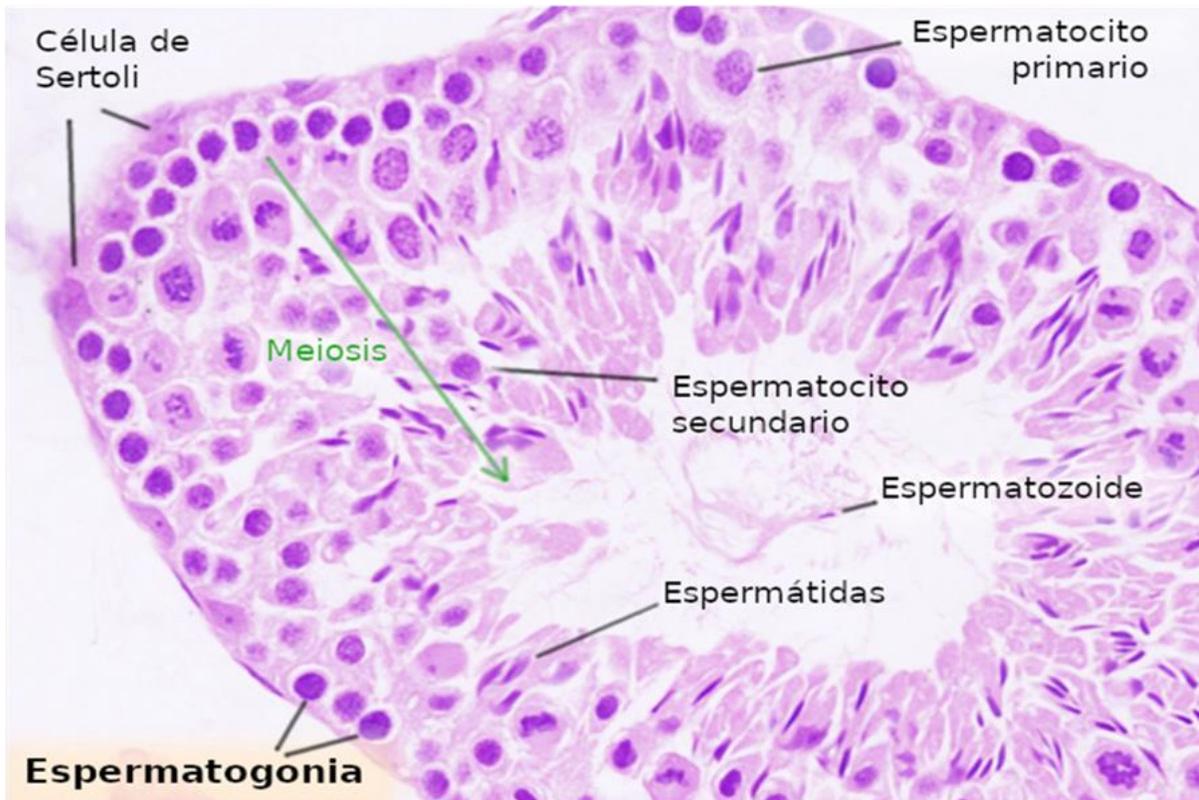


Figura 2. Corte de túbulo seminífero de rata, donde se observan distintos tipos celulares del epitelio germinativo. Tomada de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/8-tipos-celulares/espermatogonias.php>. Fecha de consulta 26 de enero de 2024.

TÉCNICA PARA PREPARACIÓN DE FROTIS

1. Se realizarán dos frotis, para el primero se colocará una gota de semen en un portaobjetos y se extenderá rápidamente con otro portaobjetos haciendo un ángulo de 45° como se muestra en la figura 4a, formando una delgada película y se deja secar a temperatura ambiente.
2. Para el segundo frotis se colocará una gota de semen en un portaobjetos y se extenderá rápidamente utilizando una pipeta Pasteur o un palillo de madera, formando

una delgada película como se muestra en la figura 4b y se deja secar a temperatura ambiente.

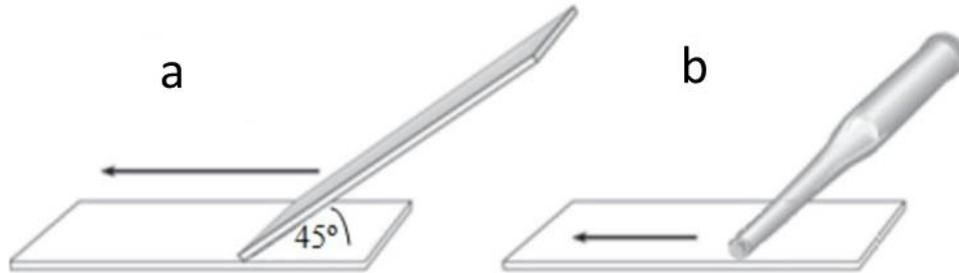


Figura 4. Técnica para preparación de frotis a) en muestras de viscosidad normal se utiliza un portaobjetos a 45° para el arrastre de una gota en un segundo, b) en muestra viscosas se emplea una pipeta.

3. Cubrir la muestra con alcohol al 96% y dejar secar a temperatura ambiente.
4. Agregar una gota de Hematoxilina de manera que la muestra quede cubierta por completo durante dos minutos, enseguida eliminar el exceso de Hematoxilina, enjuagando con agua destilada (aplicando en la parte superior del portaobjetos, no directamente sobre la muestra) y dejar secar a temperatura ambiente.
5. Agregar una gota de Eosina de manera que la muestra quede cubierta por completo por 30 segundos, enseguida eliminar el exceso de colorante enjuagando con agua destilada (aplicándola en la parte superior del portaobjetos y no directamente sobre la muestra) y dejar secar a temperatura ambiente.
6. Colocar el cubreobjetos y sellarlo con el esmalte transparente de uñas.
7. Observar las preparaciones en el microscopio con los objetivos 10x y 40x, en caso de ser necesario agregar aceite de inmersión y observar con el objetivo 100x.
8. Con un cotonete impregnado de alcohol al 96%, limpiar exceso de colorante y de espermatozoides en los bordes del cubreobjetos.
9. Etiquetar la muestra con los datos correspondientes como se indica en la figura 5.

<p>Espermatozoides de humano Técnica de Bloom Solución Hematoxilina-eosina <i>Homo sapiens</i></p>		<p>UMSNH FAC. DE BIOLOGÍA 8° Semestre Sección: _____ Equipo: _____ Fecha: _____</p>
---	--	---

Figura 5. Etiquetado de laminilla (frotis).

PARTE II

ANÁLISIS MACROSCÓPICO

Especificaciones para la toma de muestras de semen humano: las muestras deberán ser obtenidas mediante masturbación, con una anticipación de media hora previa a la práctica y deberán ser recolectadas en un frasco estéril; los frascos con las muestras deben ser cubiertos con papel aluminio y se deben mantener en un lugar seco y fresco a temperatura ambiente.

Para determinar la calidad de semen, se analizan los siguientes parámetros: licuefacción, pH, volumen, viscosidad y color de la muestra de semen; los dos primeros se deben determinar dentro de los primeros 15 a 20 minutos después de la eyaculación.

Licuefacción: ocurre en los primeros 15 a 20 minutos de la eyaculación a temperatura ambiente, observe que su muestra sea homogénea, sin grumos ni coágulos.

pH: se determina colocando el papel pH en la muestra de semen como se indica en la Figura 6a, observa y compara la coloración con la escala de pH.

Volumen: se mide empleando un frasco recolector graduado para muestras clínicas (Figura 6b), considerando que un volumen normal es de 1.5-6 ml.

Viscosidad: en la muestra de semen introducir una pipeta Pasteur o un gotero, si al levantarla observas que cae el semen en gotas se considera normal, pero si se forma un filamento de 2 cm se considera anormal (Figura 6c). El aumento de la viscosidad puede estar asociada con disfunción prostática y baja movilidad espermática lo que puede reducir la capacidad de fecundación del espermatozoide.

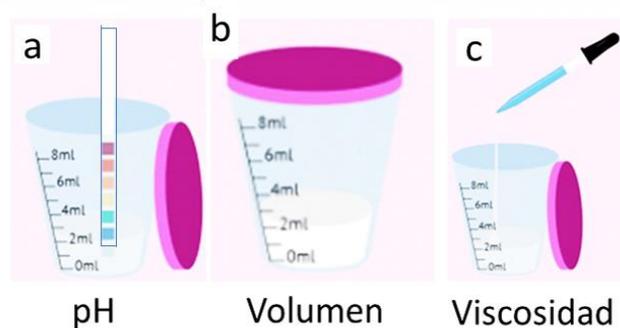


Figura 6. Análisis macroscópico de muestra de semen humano, a) determinación de pH, b) volumen, c) viscosidad.

Color del semen: se determina mediante la observación.

- Blanco opalescente.
- Ligeramente amarillento.
- Rojizo: indica contaminación con sangre.
- Amarillento: alto contenido de leucocitos o medicamentos.
- Amarillo intenso: debido a la bilirrubina o ingestión de vitaminas.
- Transparente: baja concentración de espermatozoides.
- Otro, especifique.

Anotar las observaciones del análisis macroscópico en la siguiente tabla.

Tabla de resultados del análisis macroscópico de semen.

MUESTRA 1				
Licuefacción	pH	Volumen	Viscosidad	Color

ANÁLISIS MICROSCÓPICO

En la valoración de la motilidad se consideran dos aspectos: el cuantitativo que determina el número total de espermatozoides por microlitro y el cualitativo que determina el tipo de movilidad de los espermatozoides.

Determinación de la motilidad.

1. Colocar una gota de semen en un portaobjetos limpio y cubrirla con un cubreobjetos, llevar la muestra al microscopio y observar con el objetivo 10x y posteriormente con 20x y 40x, con poca luz;
2. Determina el tipo de motilidad de los espermatozoides utilizando las siguientes referencias:

Tipos de movilidad:

- Tipo A: movilidad progresiva, rápida y rectilínea.
- Tipo B: movilidad progresiva, pero lenta.
- Tipo C: los espermatozoides se mueven, pero no avanzan.
- Tipo D: espermatozoides inmóviles.

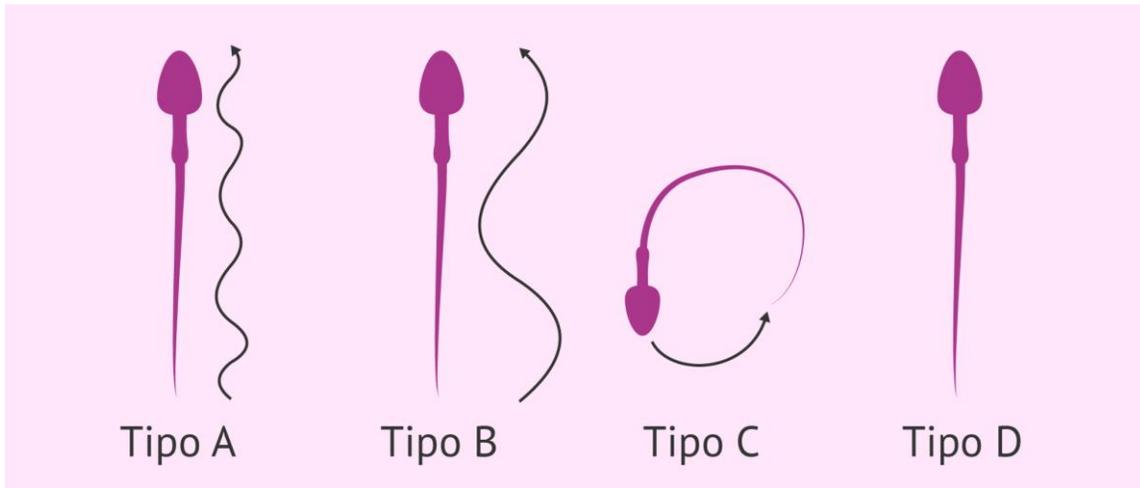


Figura 7. Tipos de motilidad de los espermatozoides. Tomada de López et al. (2012)

En la siguiente tabla anota el porcentaje de motilidad observado a diferentes tiempos hasta completar 1 hora de observación.

Tabla del porcentaje de movilidad o motilidad de los espermatozoides.

MUESTRA	
Tiempo	Porcentaje
0 minutos	
5 minutos	
15 minutos	
30 minutos	
45 minutos	
60 minutos	

Nota: La motilidad de los espermatozoides disminuye después de la eyaculación, de tal forma que en las dos horas siguientes se puede observar hasta un 60% de

motilidad, mientras que a las seis horas o más, todavía el movimiento persiste entre el 25 al 40%.

Viabilidad.

Nos permite conocer el número de espermatozoides vivos para determinar la calidad del líquido seminal, se observa empleando la técnica de Bloom, en la cual se utiliza la solución eosina-nigrosina (Lynch *et al.*, 1972).

1. Colocar una gota pequeña de semen en un portaobjetos y con un palillo de madera o portaobjetos extiende la muestra de manera homogénea, de manera que quede una capa delgada y deja secar a temperatura ambiente.
2. Fijar la muestra cubriendo con alcohol al 96% durante 3 minutos.
3. Coloca la muestra en el colorante eosina-nigrosina durante 3 a 5 minutos.
4. Enjuaga con agua destilada para quitar el exceso de colorante (aplicando el agua en la parte superior del portaobjetos) y deja secar la muestra completamente a temperatura ambiente.
5. Observa la muestra en el microscopio con el objetivo 10x y después con 40x; los espermatozoides muertos se tiñen de rojo o rosa y los vivos no se tiñen.
6. Para la conservación del frotis coloca un cubreobjetos y sella el margen con barniz de uñas transparente y con alcohol al 96% elimina el exceso de colorante y espermatozoides.
7. Etiqueta la preparación con los datos correspondientes.

RESULTADOS

Describe tus resultados y muestra las fotografías de lo observado, reporta si se observaron anomalías morfológicas (cabeza cónica, bicefalia, macrocefalia, doble flagelo, enroscamientos del flagelo, etc.).

Compara tus resultados con la tabla de valores de los parámetros esperados (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de los parámetros esperados del análisis de semen.

PARÁMETROS	VALORES ESPERADOS
Volumen	≥ 1.5 ml
pH	≥ 7.2
Concentración	≥ 15,000,000/ml
Movilidad progresiva	≥ 32%
Morfología (malformaciones)	≥ 4%
Vitalidad esperada	≥ 58%
Licuefacción	Completa

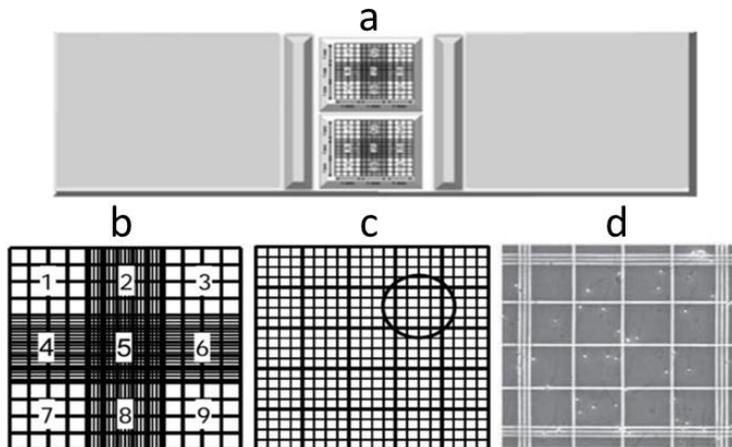
Con los datos obtenidos en el análisis de movilidad, registra el porcentaje de espermatozoides que observaste de acuerdo a la siguiente tabla.

Astenospermia: mala movilidad.	Necrospermia: muchos espermatozoides muertos.	Teratozoospermia: mala morfología.	Hipospermia: bajo volumen.

MÉTODO DE RECuento DE ESPERMATOZOIDES EN LA CÁMARA DE NEUBAUER.

Para realizar el recuento de espermatozoides en la cámara de Neubauer (Figura 8), toma en cuenta lo siguiente:

1. Anote el tiempo en que ocurrió la eyaculación ya que no debe dejar pasar más de 60 minutos.
2. Con una pipeta Pasteur subir y bajar la muestra para evitar la formación de agregados.
3. Colocar una gota de la muestra en un portaobjetos y cubrirla con el cubreobjetos.
4. Realizar un conteo preliminar utilizando el objetivo 40x. Para determinar la dilución se deberá consultar la tabla de referencia de diluciones (Tabla 2).
5. Una vez determinada la dilución, hacer dos preparaciones de la misma muestra colocando en dos tubos de ensayo la cantidad de semen y de diluyente correspondiente (Figura 9a).
6. Cargar cada subcámara de la cámara de Neubauer con 10 μL de la muestra (Figura 9b).



Micrograph courtesy of C. Brazil.

Figura 8. Cámara de Neubauer: a) se observan las dos subcámaras, b) subcámara donde se aprecian nueve cuadrantes, c) cuadrante cinco formado por 25 cuadrados, d) cada cuadrado está enmarcado por una triple línea y a su vez cada uno se divide en 16 cuadros pequeños.

Tomada de López et al. (2012)

Tabla 2. Referencia para las diluciones requeridas de acuerdo al número de espermatozoides (OMS, 2010).

Número de esp 40X	Número de esp 20X	Dilución requerida	Cantidad de semen (microlitros)	Diluyente Solución salina 5%	Área de conteo
>101	>404	1:20 (1+19)	50 microlitros	950	Cuadrantes 5,4,6
16-100	64-400	1:5 (1+4)	50 microlitros	200	Cuadrantes 5,4,6
2-15	8-60	1:2 (1+1)	50 microlitros	50	Cuadrantes 5,4,6
<2	<8	1:2 (1+1)	50 microlitros	50	Todos los 9 cuadrantes

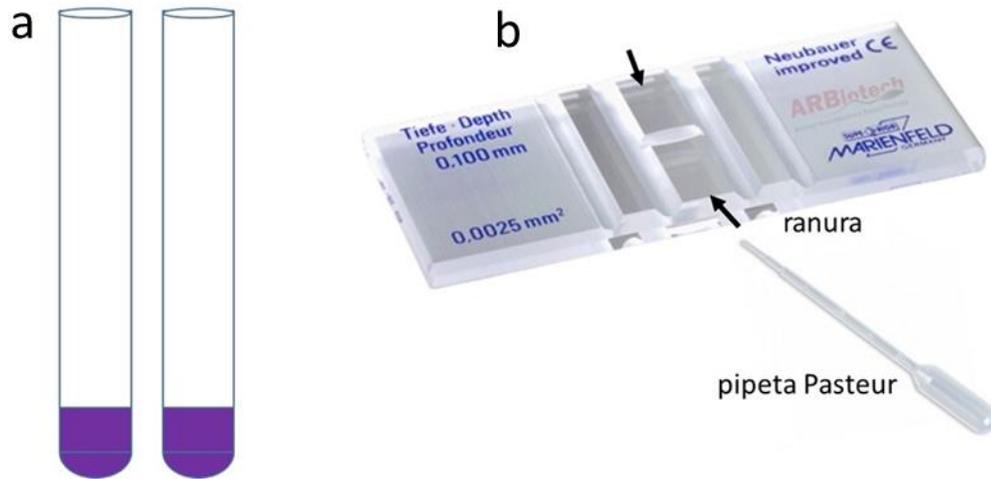


Figura 9. Preparación de muestra en cámara de Neubauer a) tubos de ensayo con muestra de semen y diluyente, b) sitio de la cámara de Neubauer en donde debe colocarse la muestra de semen con su respectivo diluyente.

Conteo de espermatozoides en la cámara de Neubauer.

1. El conteo se realiza por filas, no por cuadrantes.
2. Si hay más de dos espermatozoides se inicia el conteo en las filas de los cuadrantes 5, 4 y 6 hasta llegar a un mínimo de 200 espermatozoides (Figura 10a).
3. Si se llega a 200 sigue contacto hasta completar la fila.
4. Si hay menos de dos espermatozoides en tu muestra, entonces deberás contar en los nueve cuadrantes.

Criterio de recuento de espermatozoides.

1. Contar solo los espermatozoides completos, como se muestra en la figura 10b.
2. Respecto a la triple línea que separa los cuadrantes grandes, se deberá tener en cuenta lo siguiente:
 - Contar los espermatozoides cuya cabeza se encuentra entre la primera y segunda fila.
 - Contar los espermatozoides cuya cabeza se encuentra en la segunda línea, solo de lado izquierdo o abajo del cuadrante.
 - No se cuentan los espermatozoides que se encuentran entre la segunda y tercera línea.

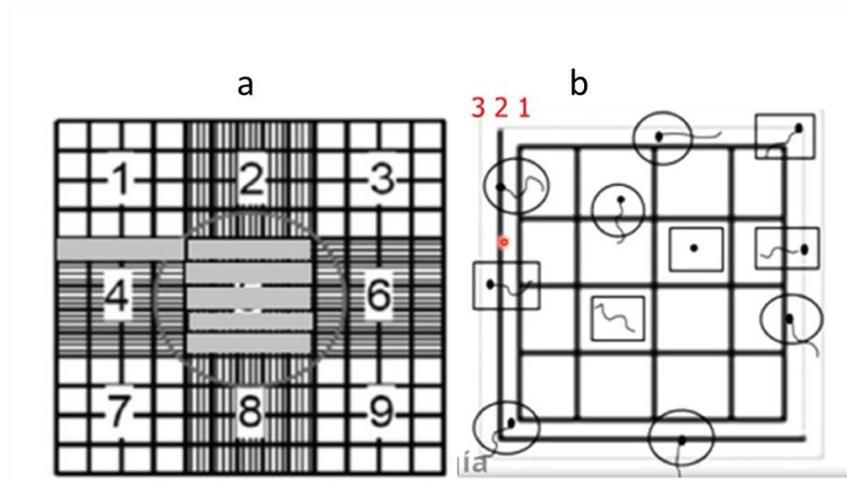


Figura 10. Conteo de espermatozoides en cámara de Neubauer: a) se cuentan filas completas empezando por el cuadro 5 seguido por el 4 y 6 si fuera necesario, b) los espermatozoides que se encuentran en círculos son los que se cuentan y los que se encuentran en rectángulos no se cuentan. Tomada de López et al. (2012),

Fórmula para el conteo de espermatozoides.

Para conocer el número de espermatozoides en una muestra de semen se aplica la siguiente fórmula:

$$C = \left(\frac{N}{n}\right) \left(\frac{1}{20}\right) \times \text{factor de dilución}$$

Donde:

C= concentración de espermatozoides (10^6 espermatozoides/ml).

N= número de espermatozoides.

n= número de filas.

Para obtener el número total de espermatozoides se multiplica la cantidad obtenida con la fórmula por el volumen total de semen obtenido.

Para corroborar que el conteo fue el adecuado se suman las dos cantidades contadas en las diferentes subcámaras y se remite a la tabla 3 para ver el intervalo de aceptación, este se obtiene restando las dos cantidades anteriores, si la diferencia está dentro del intervalo del valor aceptado el conteo es aceptable, de lo contrario se repite el procedimiento desde las diluciones.

Tabla 3. Diferencias aceptables de la suma entre dos réplicas contadas con diluciones de 1/20 (OMS, 2010).

Suma de las subcámaras	Diferencia aceptable	Suma de las subcámaras	Diferencia aceptable
144-156	24	329-346	36
157-169	25	347-366	37
170-182	26	367-385	38
183-196	27	386-406	39
197-211	28	407-426	40
212-226	29	427-448	41
227-242	30	449-470	42
243-258	31	471-492	43
259-274	32	493-515	44
275-292	33	516-538	45
293-309	34	539-562	46
310-328	35	563-587	47

Ejemplo:

Si se colocó una gota de muestra de semen en el portaobjetos y se observó al microscopio con el objetivo de 40x y se contaron 150 espermatozoides:

1. Tendríamos que realizar una dilución de 1/20.
2. Si en la cámara de Neubauer contamos 215 espermatozoides en dos filas en la primera subcámara y en la segunda 232 espermatozoides en dos filas, al sustituir la fórmula tendríamos lo siguiente:

$$C = (447/4) \times (1/20) \times 20 = 111.75 \text{ millones de espermatozoides/ml}$$

Si se obtuvieron 3 ml de semen, entonces se multiplica $111.75 \times 3 = 335.25 \times 10^6$ espermatozoides/eyaculado.

Lavado y limpieza de la cámara de Neubauer.

1. Retirar la cámara de Neubauer y el cubreobjetos con mucho cuidado.
2. Lavar la cámara y el cubreobjetos con agua jabonosa.
3. Enjuagar la cámara de Neubauer y el cubreobjetos con agua de la llave (a chorro).
4. Secar la cámara de Neubauer y el cubreobjetos cuidadosamente con una toallita de papel.

RESULTADOS

2. Completa la siguiente tabla de acuerdo a tus resultados.

Azoospermia: sin espermatozoides	Oligozoospermia: baja concentración	Concentración normal de 15 a 150 millones por ml

2. Presenta tus esquemas y fotografías de las anomalías observadas en la muestra, señalando las estructuras observadas.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué factores modifican la motilidad de los espermatozoides?
2. ¿Por qué es importante conocer la viabilidad de los espermatozoides?
3. ¿Cuál es la concentración normal de espermatozoides en un eyaculado?

CONCLUSIÓN

LITERATURA CITADA

LITERATURA SUGERIDA

Dollander, A. y R. Fenart. 1986. Elementos de embriología general. Limusa. México.

Torrey, T. W. 1983. Morfogénesis de los Vertebrados. Limusa. México.

López G. M^a. J., A. Urbano F, M. Cárdenas P. (2012). Manual de laboratorio para el análisis del semen. ISBN online: 978-84-695-4746-5

PRÁCTICA No. 3

OVOGÉNESIS Y TIPOS DE ÓVULOS

INTRODUCCIÓN

La ovogénesis es el proceso de formación de los óvulos a partir de las células germinales primordiales y ocurre en las gónadas femeninas, los ovarios. Las células germinales se denominan ovogonias y sufren proliferación por medio de divisiones mitóticas, al ocurrir la primera división meiótica se transforman en ovocitos primarios y pasan al periodo de crecimiento. Este periodo es muy prolongado y varía dependiendo de las especies; esta variación se presenta en cantidad y tamaño de los óvulos, el tamaño depende si el huevo fecundado es de desarrollo interno o externo al cuerpo de la madre, al concluir el crecimiento el ovocito primario ya alcanzó la última fase de la primera división meiótica y da inicio a la primera fase de la segunda división meiótica, ahora el ovocito se denomina ovocito secundario y en esta fase el citoplasma se reparte de modo muy desigual y la masa de citoplasma que contiene el vitelo permanece intacta en cada división, mientras que la parte con menos citoplasma se convierte en el primer cuerpo polar, este primer cuerpo polar sufre una división y forma el segundo cuerpo polar, aquí ocurre la ovulación y si el óvulo es fecundado se completa la segunda división meiótica y se forma el tercer cuerpo polar (Figura 1) (Patten, 1990).

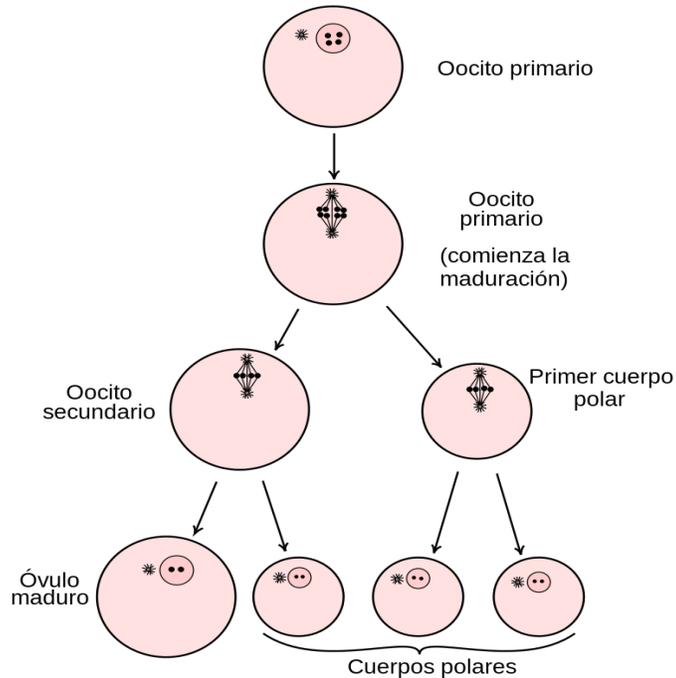


Figura 1. Diagrama del proceso de ovogénesis. Tomada de:
https://upload.wikimedia.org/25ikipedia/commons/4/47/Gray5_-_es.svg.
 Fecha de consulta enero de 2024.

OBJETIVOS

- Identificar las diferentes etapas del desarrollo del ovocito.
- Identificar las diferentes membranas que presenta el óvulo.
- Conocer las técnicas aplicadas para estimar la fecundidad de una hembra.

MATERIAL BIOLÓGICO

- Laminillas de cortes histológicos de ovarios de diferentes animales.

Material por equipo:

Parte I

- Dos huevos sin fecundar, uno crudo y otro cocido (por 15 minutos).
- Un huevo fecundado.

Parte II

- Una hembra de pez de preferencia tilapia de 10 a 15 cm de longitud y con gónada madura.

MATERIAL DE LABORATORIO

- Cajas de Petri.
- Microscopio estereoscópico.
- Microscopio compuesto
- Probetas de 10 y 50 ml.
- Papel secante.
- Balanza.
- Regla de 30 cm.
- Cúter o bisturí.
- Pinzas de disección.
- Pinzas de relojero.
- Charola.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

PARTE I

OBSERVACIÓN DE LAMINILLAS.

1. Identifica las diferentes etapas de maduración de los óvulos en las muestras de cortes histológicos de ovarios que se te proporcionan, usando de referencia las figuras 2 y 3.



Figura 2. Fotografía de corte histológico de ovario de bovino observado en el microscopio a 100x, en donde se observa el desarrollo de los folículos ováricos, desde folículos primordiales hasta su estadio final. Tomada de Escalante, 2024.

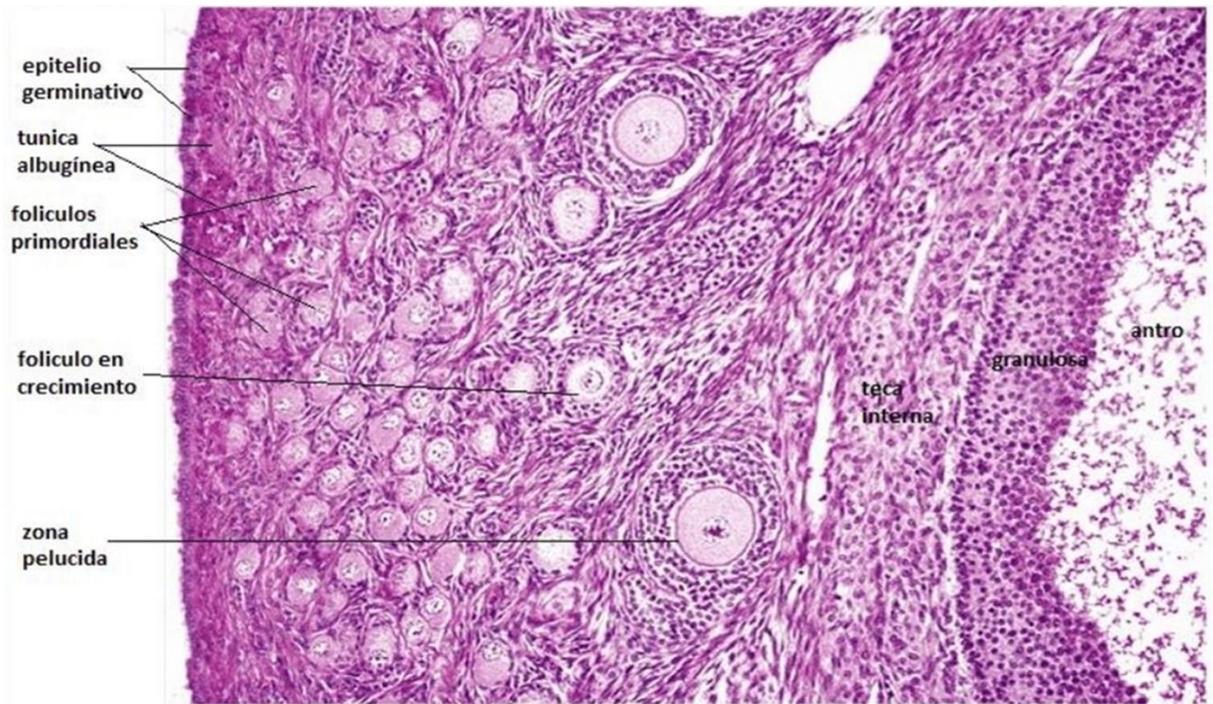


Figura 3. Corte transversal de un ovario. Tomada de <https://i.pinimg.com/originals/69/a3/9a/69a39a0c5420e45d7542545b9ce362c1.png>. Fecha de consulta 26 de enero de 2024.

OBSERVACIÓN DEL HUEVO DE GALLINA

1. Observa el cascarón del huevo crudo en el microscopio estereoscópico y describe sus características particulares y su composición.
2. Rompe el cascarón y coloca el contenido del huevo en una caja de Petri e identifica las diferentes estructuras y membranas internas que conforman al huevo, utiliza como referencia la figura 4.
3. Retira el cascarón del huevo cocido y realiza un corte sagital y observa las membranas y estructuras internas que conforman al huevo, utiliza como referencia las figuras 5 y 6.
4. Observa y anota las diferencias que presenta un huevo fértil y uno infértil.

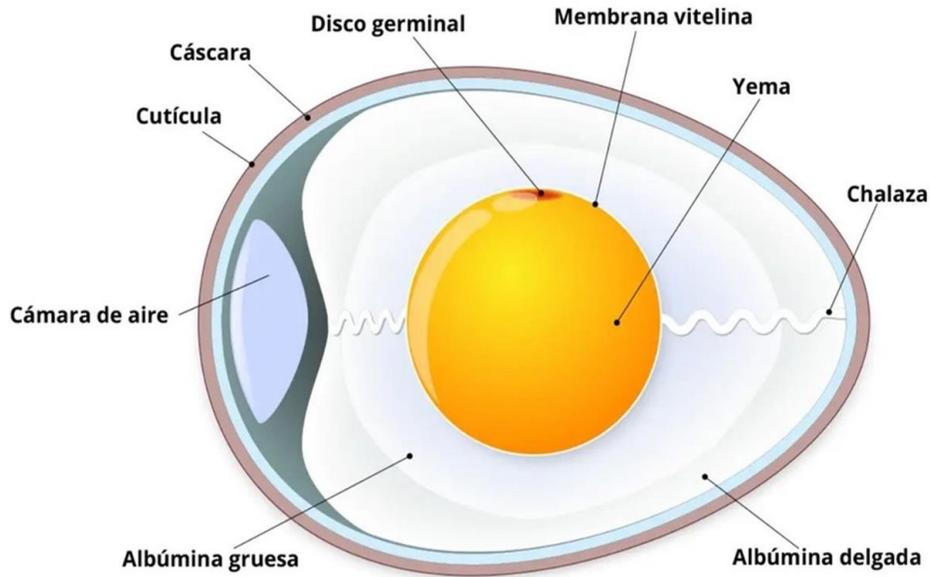


Figura 4. Partes que conforman el huevo de gallina.
<https://chefcampus.com/cursos/fundamentos-de-la-cocina-el-huevo-tecnicas-y-usos/lecciones/2-estructura-y-composicion/> Fecha de consulta 02 de febrero de 2024.

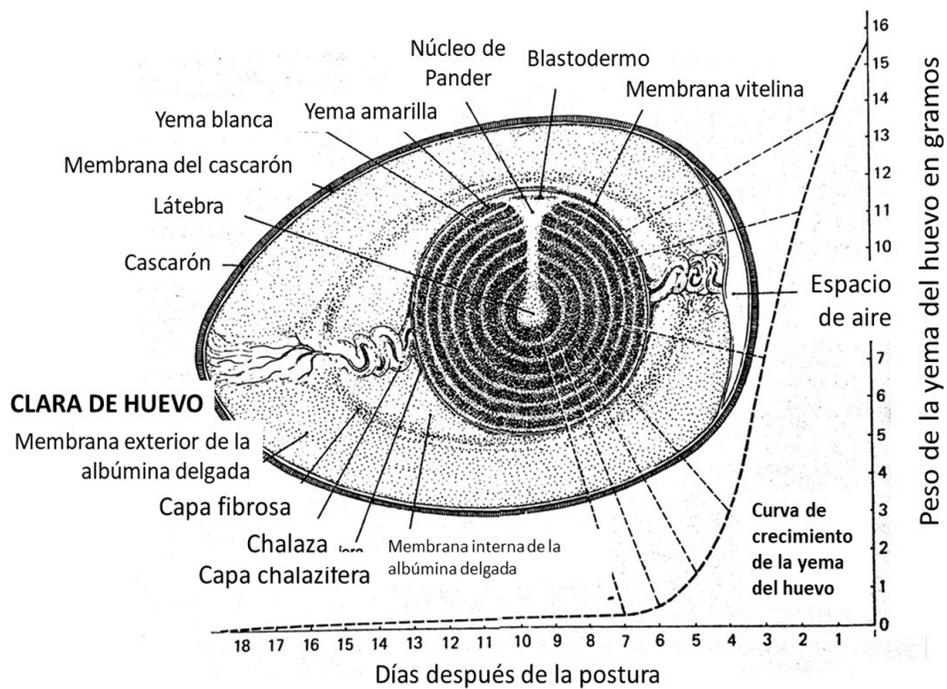


Figura 5. Partes internas del huevo de gallina, tomado de Carlson, 1990.

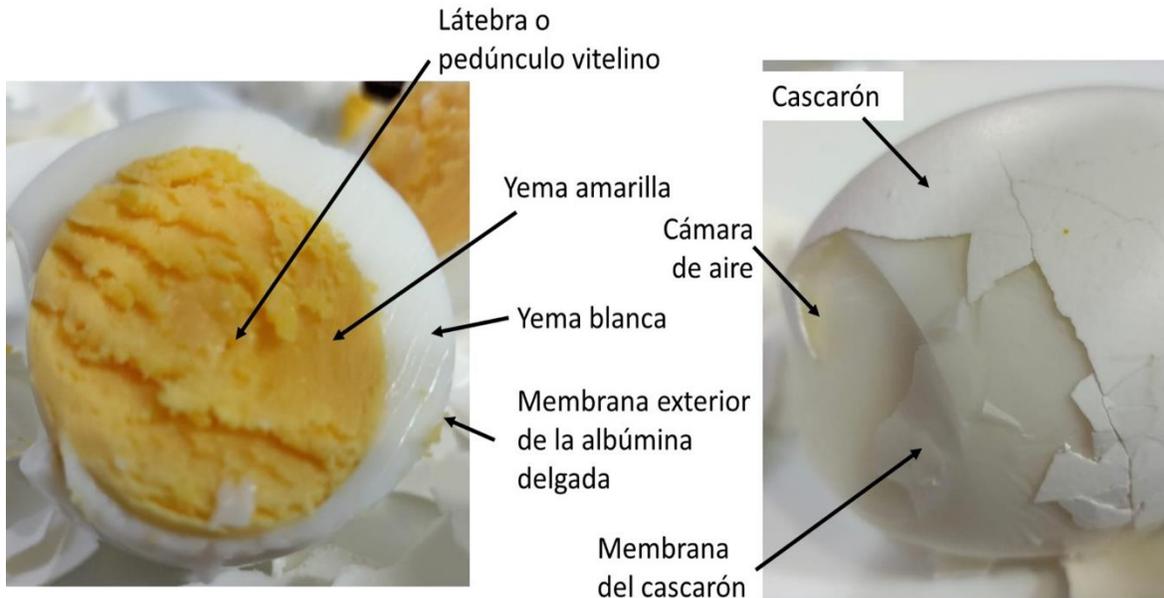


Figura 6. Fotografía de huevo de gallina cocido en donde se observa su composición. Escalante, 2024

RESULTADOS

Esquematiza las laminillas observadas mencionando los nombres de cada una de las partes que lograste identificar.

CUESTIONARIO

1. Dependiendo de la cantidad y distribución de vitelo ¿qué tipo de huevo es el de gallina?
2. Nombre y función de cada una de las estructuras observadas en el huevo.
3. ¿Cuáles son los minerales que se encuentran en el cascarón del huevo de gallina?

PARTE II

FECUNDIDAD

La **fecundidad absoluta** de los peces es el número total de huevos que se producirán en una temporada de desove, mientras que **fecundidad relativa** es el número de huevos por unidad de peso corporal. Para calcular la fecundidad relativa, se divide la fecundidad absoluta entre el peso total del pez.

La fecundidad se determinará mediante las siguientes técnicas: gravimétrica, volumétrica y conteo directo.

Técnica gravimétrica.

1. Pesar y medir a la hembra (de la cabeza a la aleta caudal).
2. Hacer la disección y ubicar la gónada como se observa en la figura 7, en seguida extraer la gónada y pesarla (es importante mantenerla hidratada durante este procedimiento).



Figura 7. Ubicación y extracción de la gónada de un pez hembra. Tomada de Laboratorio de embriología animal comparada, 2024.

3. Tomar una muestra del 10% de la gónada de la parte anterior, media y posterior como se muestra en la figura 8.

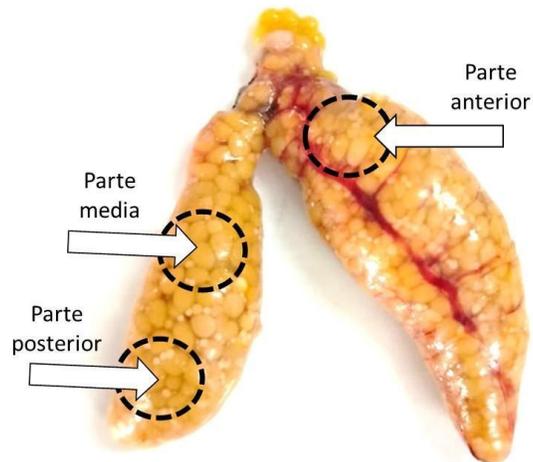


Figura 8. Gónada del pez en donde se indica la posición para obtener las muestras.

4. Contar el número total de los huevos de la muestra.
5. La fecundidad se obtiene mediante la siguiente fórmula

$$N = \frac{W \cdot n}{w}$$

En donde:

N = Número total de huevos de la gónada

W = Peso total de la gónada

w = Peso de la muestra de la gónada

n = Número total de huevos contados en la muestra de la gónada

DATOS OBTENIDOS

Técnica volumétrica.

1. Pesar y medir a la hembra (de la cabeza a la aleta caudal) antes de retirar la gónada.
2. Extraer la gónada y pesarla.
3. Para determinar el volumen total de la gónada:
 - a) En una probeta aforar con agua una medida conocida.
 - b) Coloque la gónada dentro de la probeta y anotar el volumen desplazado.
4. Retirar la gónada y tomar una muestra del 10% y colocarla en la probeta.
5. Medir el volumen desplazado de la muestra, de la misma manera en que se realizó para el volumen desplazado de la gónada.
6. Contar el número total de huevos de la muestra.
7. Mediante la siguiente fórmula se obtiene la fecundidad.

$$N = \frac{V \cdot n}{v}$$

En donde:

N = Número total de huevos de la gónada

V = Volumen total de la gónada

v = Volumen de la muestra de la gónada

n = Número total de huevos contados en la muestra de la gónada

DATOS OBTENIDOS

Conteo directo.

1. Pesar y medir a la hembra (de la cabeza a la aleta caudal) antes de retirar la gónada.
2. Extracción de la gónada:
 - a) Colocar al pez en una charola y realizar un corte en la parte ventral, iniciando desde la cloaca hacia la parte superior hasta las aletas pectorales.
3. Contar el número total de huevos de la gónada

DATOS OBTENIDOS

Peso total de la hembra _____ g

Longitud de la hembra _____ cm

Número de huevos de la gónada _____

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál de las tres técnicas utilizadas te pareció más adecuada y por qué?

2. ¿Cuál de las técnicas aplicarías en una granja de peces y por qué?

3. ¿Cuál es la importancia del peso y la talla para la determinación de la fecundidad?

CONCLUSIONES

LITERATURA CITADA

LITERATURA SUGERIDA

Bagenal, T. 1978. Methods for assessment of fish production in freshwaters. IBP Handbook No. 3. 3 th. Edition. Blackwell-Oxford.

Carlson B. M. 1990 Embriología básica de Patten. Interamericana.McGraw-Hill. ISBN-968-25-1459-2

Deza Falla. S. R. 2018. Distribución y aspectos reproductivos del género *Pterygoplichthys sp*, en la cuenca del río Amacuzac, Morelos. Tesis. Centro de investigaciones Biológicas UAEM. Cuernavaca, Morelos. 76 págs

Torrey, T. W. 1978. Morfogénesis de los vertebrados. Limusa. México

PRÁCTICA 4

TÉCNICA DE DAWSON

(Modificada por Fernando Villaseñor Gómez)

INTRODUCCIÓN

La técnica Dawson o de diafanización es una técnica de conservación anatómica que transparenta los tejidos blandos para teñir los tejidos mineralizados y poder observar los componentes óseos y cartilagosos (Figura 1), ésta técnica se ha empleado para el estudio del desarrollo embrionario del sistema óseo de los vertebrados debido al contraste que se genera entre tejidos óseo y cartilaginoso durante la morfogénesis, esto permite desarrollar estudios de embriología y anatomía comparadas, con lo cual se han determinado implicaciones evolutivas de los vertebrados (Sandoval et. al., 2016).



Figura 1. Embrión de gato doméstico. Tomada de Escalante, 2023.

OBJETIVOS

- Aplicar la técnica de Dawson y reconocer su utilidad como herramienta en el estudio de la embriología.
- Comparar el desarrollo del sistema óseo en los diferentes estadios de desarrollo embrionario que presenta el organismo.

MATERIAL

- Embriones, fetos o neonatos (de 5 a 15 cm de longitud).
- Tijeras de punta fina.
- Bisturí.
- Pinzas de punta fina.
- Aguja de disección.
- Alcohol al 96%.
- Peróxido de hidrógeno comercial
- Solución de hidróxido de potasio a 1.5%
- Agua destilada.
- Solución de rojo de Alizarina 1%.
- Glicerina.
- Timol.
- Frasco de vidrio transparente de boca ancha.
- Etiquetas.
- Cajas de Petri.
- Microscopio estereoscópico.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

En cada una de las etapas señaladas a continuación, el embrión debe ser sumergido en su totalidad en las soluciones indicadas, antes de realizarse los cambios de las soluciones es importante retirar por completo la que tenía el ejemplar y enjuagar con agua destilada, el embrión debe colocarse desde el inicio de la técnica en un recipiente de vidrio, de boca ancha y ahí permanecerá durante el desarrollo de la práctica, con el fin de evitar manipulación excesiva que pueda dañar al ejemplar.

Esta técnica se basa en la fijación con alcohol al 96%, diafanización con hidróxido de potasio (KOH), tinción con rojo de Alizarina y conservación con glicerina pura y granos de timol. Los tiempos varían según el tamaño y la fase de desarrollo del embrión y de la especie de la que se trate.

- a) Los embriones se pueden fijar en formol al 10% o alcohol al 96%. Si se utiliza alcohol como fijador, es posible que al final del proceso se hagan visibles unas

pequeñas masas blancas y opacas de grasas, las cuales se saponificaron por la acción del fijador.

- b) Los ejemplares se evisceran con mucho cuidado para no destrozarlos, para esto se realiza una pequeña incisión en la parte ventral del cuerpo y se extraen los órganos con unas pinzas de punta fina. Si aparecen burbujas debajo de la piel, se hacen pequeños agujeros con una jeringa o una aguja de disección.
- c) Los ejemplares fijados y eviscerados se pasan a cambios de agua pueden variar de 1 a 5 días, con la finalidad de quitar el exceso de fijador.
- d) Después se coloca al ejemplar en una solución de hidróxido de potasio al 1.5% a 2% hasta que los huesos comienzan a ser visibles a través de los músculos; en caso de que la solución se enturbie, debe cambiarse. (Esta parte de la técnica puede llevarse unas semanas o más dependiendo del tamaño del ejemplar). CUIDADO: no mover innecesariamente los frascos que contienen los ejemplares, ya que los embriones se tornan muy delicados y se rompen con facilidad.
- e) Cuando el ejemplar comienza a tomar un color blanquecino se le agregan 4 ml de peróxido de hidrógeno comercial y se deja reposar por dos días.
- f) Ya que el ejemplar toma un tono completamente blanquecino se le agregan de 2 a 5 ml (de acuerdo al tamaño) del colorante rojo de Alizarina hasta que adquiera un color morado intenso. Si el colorante se sedimentara en los días siguientes, agregar un poco más de la misma solución y dejarlo reposar por 4 días.
- g) Cuando los ejemplares están completamente teñidos, incluyendo la masa muscular, se transfiere a la solución 1.
- h) Si el ejemplar presenta exceso de grasa, se le agregan de 1 a 5 ml de peróxido de hidrógeno dependiendo del tamaño del embrión. Posteriormente colocar las siguientes soluciones a los ejemplares, una semana cada una:

Solución 1. 20 partes de Glicerina; 3 partes de KOH al 2%; 77 partes de agua destilada

Solución 2: 50 partes de Glicerina; 3 partes de KOH al 2%; 47 alcohol al 96%

Solución 3 75 partes de Glicerina; 25 alcohol al 96%

En ésta última solución, el exceso de colorante debe haber salido por completo de la masa muscular y las estructuras esqueléticas deben ser visibles. Si esto no sucediera, cambiar a la solución 3 hasta lograr la transparentación total.

- i) Finalmente, se pasa el ejemplar a glicerina pura y se le adiciona unos granitos de timol como conservador y sus datos (Figura 3).

Figura 2. Embrión de gato doméstico, mostrando exceso de grasa. Tomada de Escalante, 2023.



**DATOS DE LA ETIQUETA
PARA TU EMBRIÓN**

Técnica:
Especie:
Etapa de desarrollo:

UMSNH
Fac. Biología
Sección:
Equipo:
Fecha:

Figura 3. Embrión colocado en un frasco de vidrio de boca ancha y los datos que debe llevar el ejemplar

RESULTADOS

- Observe, esquematiza y describa el sistema óseo
- Investiga las fases del desarrollo embrionario del ejemplar que preparaste y compara la osificación de tu ejemplar y describe las diferencias.
- Determine si existe malformación en el sistema óseo.
- Una vez terminado el proceso entregar su ejemplar, debidamente etiquetado.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuántos tipos de osificación se llevan a cabo en los vertebrados? Descríbelos brevemente.
2. Investiga las propiedades del rojo de Alizarina.
3. ¿En qué tipos de estudios se utiliza la técnica de Dawson y cuál es su utilidad?

CONCLUSIÓN

LITERATURA CITADA

LITERATURA SUGERIDA

Estrada, F. E., et al. 1982. Manual de Técnicas histológicas. AGT Editor. Primera edición. México.

Gaviño, G., et. al. 1972. Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y Campo. Editorial Limusa. Primera Edición. México.

Knudsen, J. W. 1966. Biological Techniques. Collecting, Preserving and Illustrating Plants and Animals. Harper. Int. Edit. Primera Edición.

PRÁCTICA No. 5

DETERMINACIÓN DE LOS ESTADIOS DE DESARROLLO DEL CARACOL DE JARDÍN (*Cornu aspersum*).

INTRODUCCIÓN

Cornu aspersum es un molusco terrestre originario del norte de África que ha invadido todos los continentes a excepción de la Antártida. Es el caracol terrestre más usado con fines comerciales a nivel mundial: como alimento para el hombre; como producto para el cuidado de la piel o con fines farmacéuticos; como mascota; en biomonitoreo de contaminación por metales pesados; y en docencia. Su éxito para colonizar nuevas áreas se debe a su alta resistencia a las variaciones de temperatura como a las enfermedades, su buena adaptación a la crianza en cautiverio, a su alta fecundidad, a su rápido crecimiento, y a su precocidad sexual. Ha causado impactos económicos severos en agricultura, fruticultura, viticultura y jardinería. Es portador del nemátodo causante de la aelurostrongilosis felina en gatos domésticos y silvestres. Compite con especies nativas; modifica la estructura de las comunidades vegetales; aumenta la biomasa de bacterias y hongos; y aumenta las tasas de descomposición (CONABIO 2017).

OBJETIVO

- Reconocer y describir los diferentes estadios de desarrollo de *Cornu aspersum*.
- Preparar laminillas de los diferentes estadios de desarrollo de *Cornu aspersum*.

MATERIAL BIOLÓGICO

- Huevos de *Cornu aspersum* de diferentes tiempos de incubación (material a cargo de los alumnos).

MATERIAL DE LABORATORIO

- Portaobjetos y cubreobjetos.
- Cajas de Petri.
- Bisturí o navajas.
- Agujas de disección.
- Pipetas Pasteur.
- Tijeras de punta fina.
- Pinzas de relojero (de punta fina).
- Solución salina
- Alcohol 96%.
- Colorante Hematoxilina o Azul-eosina-methylene
- Microscopio compuesto.
- Microscopio estereoscópico.
- Un caracolario

PREPARACIÓN DEL CARACOLARIO

1. El caracolario se debe preparar con un recipiente grande con tapadera y con ventilación como se muestra en la figura 1; en seguida se deben colocar dos vasos transparentes con tierra asoleada por cinco días y después hidratarla con la finalidad de evitar patógenos en nuestro cultivo, además se debe agregar un recipiente con agua limpia y alimento fresco (lechuga, zanahoria, repollo, avena) y se debe limpiar diariamente para evitar enfermedades. Se colocará en un lugar en donde reciba 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad a temperatura de 18 a 20°C y una humedad relativa de 75 a 90%.



Figura 1. Preparación del caracolario e inicio del cultivo del caracol *Cornu aspersum*, Jiménez, 2023.

2. Recolectar 10 caracoles maduros sexualmente (la concha deberá medir de 2 a 4 cm), colocarlos en un caracolario para la obtención de los huevos, se recomienda estar al pendiente de la cópula y la puesta de huevos (anotar la fecha) con la finalidad de saber el tiempo de incubación (Figura 2).

3. Posteriormente extraer 10 huevos con diferentes días de incubación y colocarlos en frascos diferentes, en alcohol al 96%, etiquetar con los datos correspondientes como se muestra en la figura 3 y llevarlos al laboratorio el día de la práctica.

Nota: Traer el resto de los huevos en el recipiente donde fueron puestos por el caracol.



Figura 2. Puesta de huevos de caracol *Cornu aspersum*.
<https://quo.eldiario.es/naturaleza/g10276/caviar-de-caracol/>.
Fuente consultada el 02/02/2023

Datos para etiquetar los frascos con huevos de caracol.

Huevos de *Cornu aspersum*:

Días de incubación:

Fecha de recolecta:

Preservados en:

Sección:

Equipo:



Figura 3. Colecta de huevos de *Cornu aspersum* en frascos de vidrio con alcohol al 96% debidamente etiquetados.

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

1. En una caja de Petri coloca los huevos de caracol recolectados de los diferentes días de incubación este procedimiento se realiza en el microscopio estereoscópico.
2. Con ayuda de una pinza de relojero sujetar el cascarón del huevo y con una tijera de punta fina cuidadosamente rompa el cascarón.
3. Agrega una gota de colorante (Azul de metileno, rojo Alizarina) y observa el embrión en el microscopio estereoscópico y realiza esquemas y determina la fase del desarrollo en la que se encuentra, de acuerdo a la figura 4.

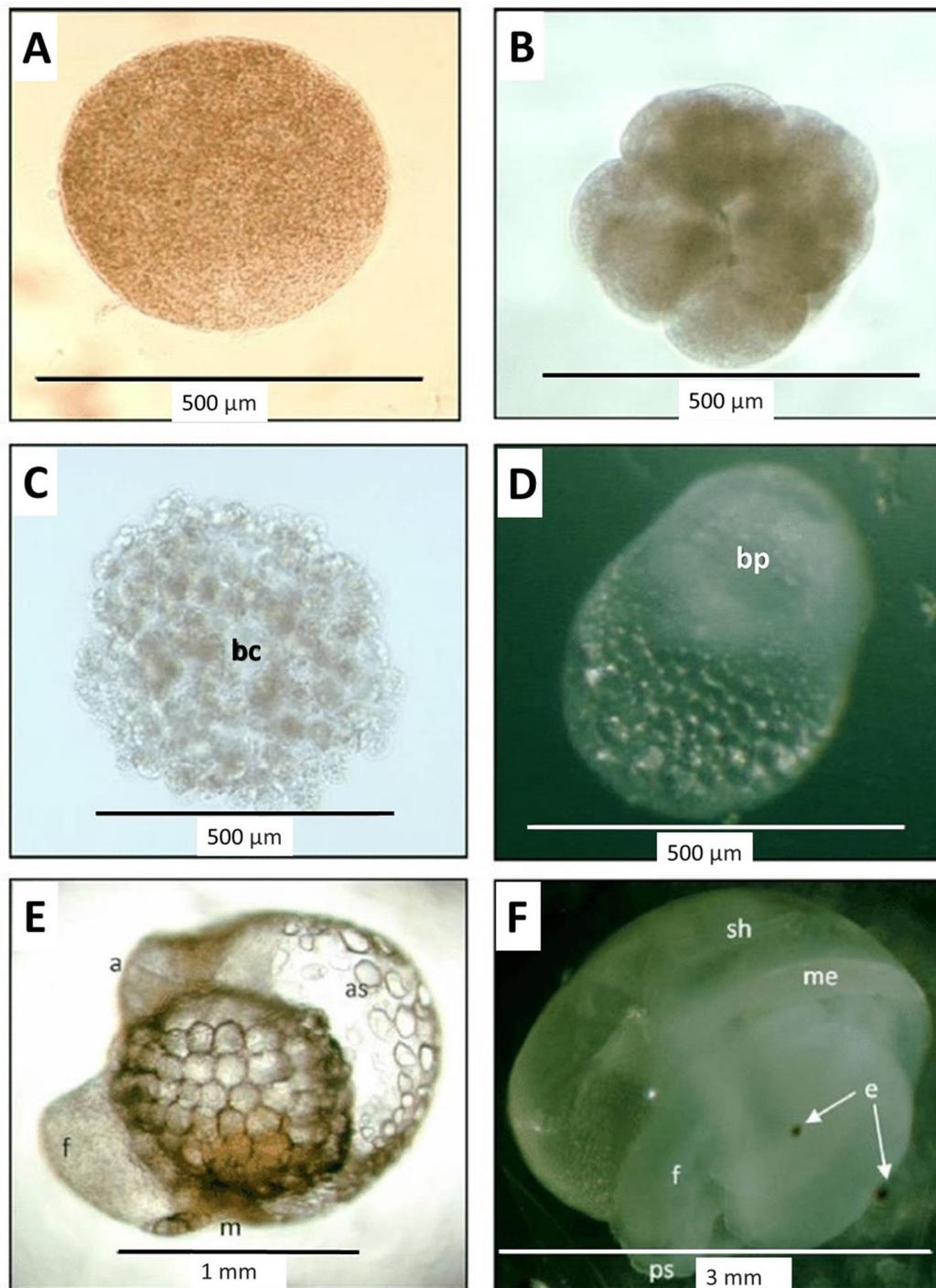


Figura 4. Etapas principales de la embriogénesis de *Cornu aspersum*, tomado de (Pierre-Emmanuel (2014)). a). 1 Célula (0-3 horas después de la fertilización); b) 8 células (8-12 horas después de la fertilización); c). Mórula (2-3 días después de la fertilización); d). Gástrula (4 días después de la fertilización); e) y el Estado larvario (E, 7 días y f), 12 días después de la fecundación). Leyenda: **a, ano; **as**, saco anterior; **bc**, blastocèle; **bp**, blastoporo; **e**, ojos en tentáculos; **f**, pie; **m**, boca; **me**, manto; **ps**, seno pedius; **sh**, concha.**

RESULTADOS Y OBSERVACIONES.

- Esquematiza y define los estadios de desarrollo de los embriones, colocando el nombre de las estructuras que se observan en cada uno de los embriones.

CUESTIONARIO.

1. Investiga la duración sobre el tiempo del desarrollo embrionario de dos especies diferentes de invertebrados.
2. ¿Cómo se reconoce el momento más próximo a la eclosión de los caracoles?
3. ¿Qué estructuras observó en los diferentes estadios de desarrollo?

CONCLUSIÓN

LITERATURA CITADA

LITERATURA SUGERIDA

CONABIO, 2017. Método de Evaluación Rápida de Invasividad (MERI) para especies exóticas en México. *Cornu aspersum* (Müller, 1774).

Pierre-Emmanuel BAURAND Le (2014). Embryotoxicité de contaminants métalliques et organiques chez l'escargot *Helix aspersa* - Embryotoxicity of metallic and organic chemicals in the land snail *Helix aspersa*. Université de Franche-Comté U.F.R SCIENCES ET TECHNIQUES Laboratoire Chrono-Environnement (UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA).

PRÁCTICA 6

DETERMINACIÓN DE ESTADIOS DE DESARROLLO EN AVES

INTRODUCCIÓN

Todos los animales que nacen de un huevo fecundado, atraviesan por varias fases de desarrollo embrionario, que difieren según la especie (fase de división del cigoto en dos células, cuatro células, ocho células, etc.), fase de la mórula, fase de blástula, continuando con el movimiento de las capas celulares hasta formar las capas germinales (gastrulación), a la cual se denomina gástrula y por último la neurulación. El desarrollo embrionario de las aves inicia en el oviducto, posterior a la fecundación, donde se originan las primeras segmentaciones celulares en el momento de la formación del huevo.

La primera división ocurre cuando el huevo está en el istmo y continúa su descenso por el tracto reproductivo, aproximadamente unas 6 a 8 horas antes de la puesta se observan dos zonas distintas en la superficie de la yema: área pelúcida y la zona opaca, estas zonas indican el estado temprano de la blástula y en esta etapa el eje simétrico del futuro embrión es determinado por el enrollamiento de las chalazas durante la formación de la cáscara. Posterior a la puesta, unas 5-6 horas de incubación, se forma un engrosamiento en la parte posterior del área pelúcida, después de 16 horas este engrosamiento se extiende a lo largo del blastodermo y se forma la línea primitiva. A las 18 horas ya se puede distinguir la extensión cefálica, la gastrulación se ha completado e inicia la neurulación. Después de 20 horas la línea primitiva reduce su tamaño y comienza la diferenciación con la formación del pliegue cefálico y la individualización de las somitas. A las 40 horas se forma el cerebro y el corazón y el intestino anterior va tomando forma. El embrión se sitúa sobre la yema sobre su lado izquierdo. Alrededor de los 5-6 días el vitelo completa su desarrollo, desaparece la membrana vitelina y el alantoides empieza a funcionar como órgano respiratorio. Al final de la incubación (18-19 días) los riñones empiezan a funcionar y da inicio a la respiración aérea para pasar a la fase de eclosión.

Es necesario tomar en cuenta que, al momento de la puesta, ya han ocurrido procesos: fertilización, división y crecimiento de células y diferenciación de células. Entre la postura y el inicio de incubación es un estado de vida embrionaria inactiva (no hay crecimiento), a partir del inicio de la incubación ya se pueden ir observando los cambios día a día y por horas desde los primeros dos días de incubación.

OBJETIVOS

- Observación de los diferentes estadios de desarrollo.
- Fijación y conservación de embriones.

MATERIAL BIOLÓGICO

- Seis huevos de gallina fertilizados y frescos por equipo, estos deben ser de buena calidad y de origen de confianza.

MATERIAL DE LABORATORIO

- Incubadora
- Tijeras, pinzas, bisturí
- Aguja de disección
- Pipetas Pasteur y gotero
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Portaobjetos cóncavos
- Cajas de Petri
- Una cuchara de plástico
- Pincel de cerdas suaves
- Pegamento UHU
- Mica de plástico
- Alcohol a diferentes concentraciones
- Formol al 10%
- Glicerina
- Granos de Timol
- Azul de Metileno

- Eosina
- Hematoxilina
- Solución salina
- Agua destilada
- Resina

DESARROLLO DE LA PRÁCTICA

PARTE I.

Los huevos deben estar fecundados recientemente por lo menos de uno a tres días antes de introducirlos en la incubadora.

1. Etiquetar los huevos con los siguientes datos: fecha, tiempo de incubación, sección y número de equipo como se muestra en la figura 1.



Figura 1. Etiquetado de huevos fecundados.

Procedimiento para la incubación de huevos

1. Programar la incubadora a una temperatura de 37 a 38°C, con una humedad de 40 a 45%.
2. Colocar los huevos en posición horizontal en la incubadora como se muestra en la figura 2.
3. Incubar los huevos de la siguiente manera: dos huevos se incuban a 48 horas, dos huevos a 72 horas y otros dos a 116 horas.
4. Revisar periódicamente que la temperatura y humedad se mantengan dentro de los límites mencionados, además deberán girar diariamente los huevos siempre teniendo cuidado de conservar posición horizontal.



Figura 2. Colocación de huevos en posición horizontal, dentro de la incubadora.

Extracción del embrión

1. Colocar el huevo en posición horizontal y marcar con un lápiz el área en donde se encuentra el embrión (Figura 3a).
2. Hacer un orificio en la parte roma como se muestra en figura 3b; introducir delicadamente la tijera o la pinza por el orificio para cortar la sección marcada (figura 3c) sin dañar la yema (Figura 3d).
4. Se coloca el huevo en una caja de Petri y comienza a cortar el cascarón y retira por completo la parte cortada (Figura 3e).
5. Con cuidado perfora la yema por un lado del embrión, de manera que se extienda la yema y el embrión, esto permitirá una mejor observación del sistema circulatorio y algunas estructuras (Figura 3f).

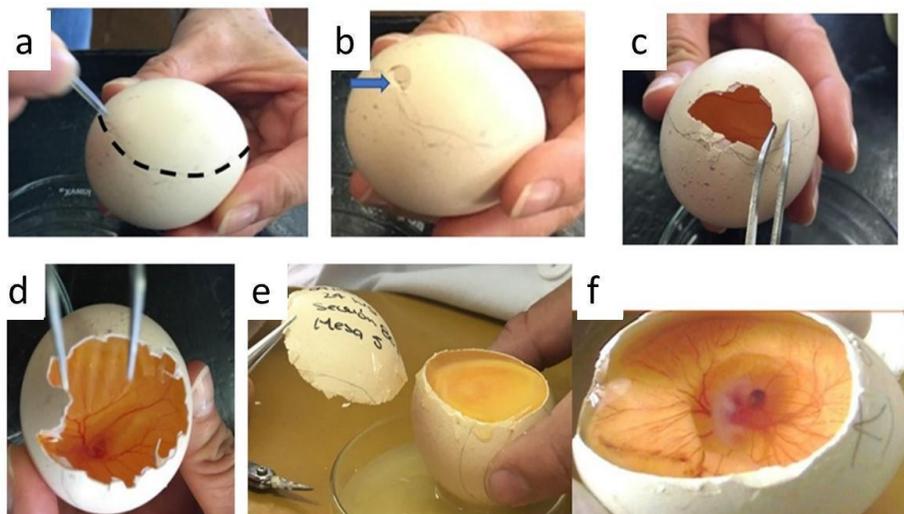


Figura 3. Procedimiento para la extracción del embrión de pollo, a) marca indicando al área que se debe cortar; b) orificio por la cual se introducirá la tijera para iniciar el corte; c) corte de cascarón, d-f) exposición de embrión.

6. En seguida, se separa el embrión de la albúmina, para ello debes realizar un corte alrededor del embrión, aproximadamente 5mm alrededor de él; con ayuda de las pinzas de disección sujeta la membrana y realiza el corte como se muestra en la figura 4.

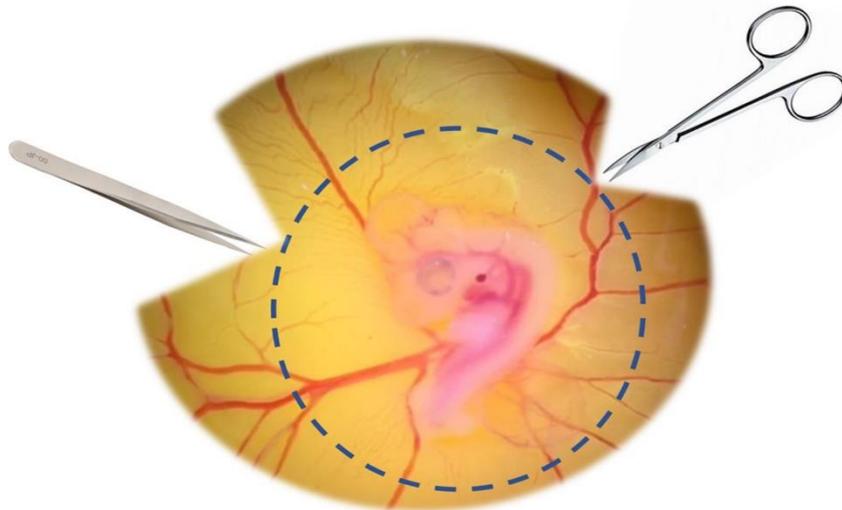


Figura 4. Corte alrededor del embrión para separarlo de la albúmina.

7. Con una cuchara de plástico se extrae el embrión y se coloca en una caja de Petri, y lava con solución salina repetidamente hasta eliminar el exceso de albúmina y los restos de membranas (Figura 5).

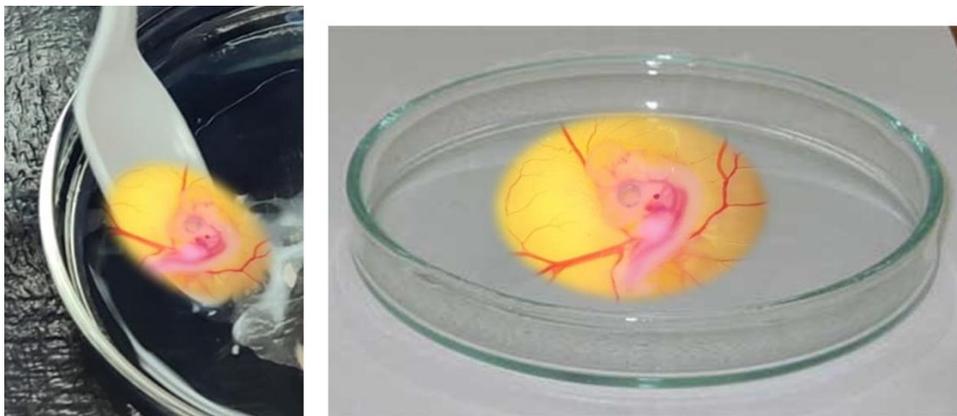


Figura 5. Embrión sin restos de albúmina ni membranas.

Fijación del embrión

El embrión limpio y sin restos de albúmina se coloca en un frasco de vidrio debidamente etiquetado y se cubre con formol al 10% (Figura 6) y se debe guardar en el refrigerador durante siete días.



Figura 5. Fijación de embrión de pollo.

PARTE II

Lavado del embrión.

1. Colocar cada embrión en una caja de Petri con agua destilada, lavar por 15 minutos para eliminar el exceso del fijador (Figura 6).



Figura 6. Lavado de embriones en agua destilada.

Tinción del embrión.

- 1. Una vez limpio el embrión se cubre con el colorante eosina-hematoxilina por 5 minutos, con el objetivo de resaltar la morfología externa (Figura 7).
- 2. Para el lavado, se realizarán tres repeticiones en donde se colocará el embrión en agua destilada durante 10 minutos en cada repetición.

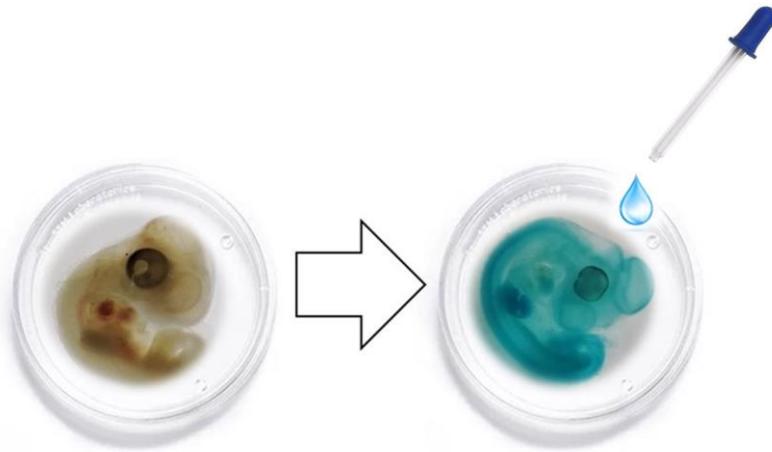


Figura 7. Tinción de embriones de pollo.

Deshidratación de embriones de pollo.

1. Dejar reposar cada embrión en alcohol al 35%, 50%, 85%, 96% y en absoluto, por 10 minutos en cada concentración (Figura 8).



Figura 8. Deshidratación de embriones en alcohol a distintas concentraciones.

2. Observar los embriones en el microscopio identificando las estructuras que se muestran en la figura 9, en caso de no observarse porque tenga exceso de colorante, entonces debes agregar xilol, gota a gota durante 15 minutos.

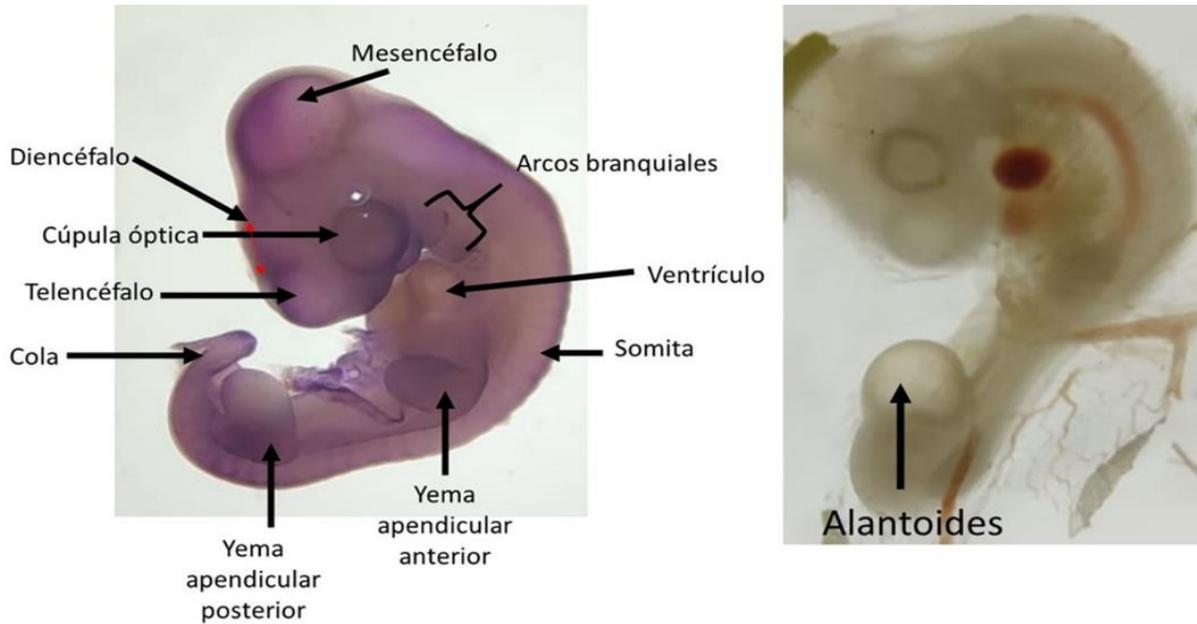


Figura 8. Estructuras externas de embriones de pollo de 113 horas de desarrollo.

Conservación de embriones de pollo.

Se llevará cabo utilizando dos técnicas:

Técnica 1. En glicerina pura

1. Para la conservación de embriones de 116 horas de incubación, se coloca el embrión en un frasco ampolletero, se agrega glicerina pura hasta cubrir por completo y se adicionan unos granos de Timol.
2. Se etiqueta el frasco con los datos correspondientes como se muestra en la figura 9.

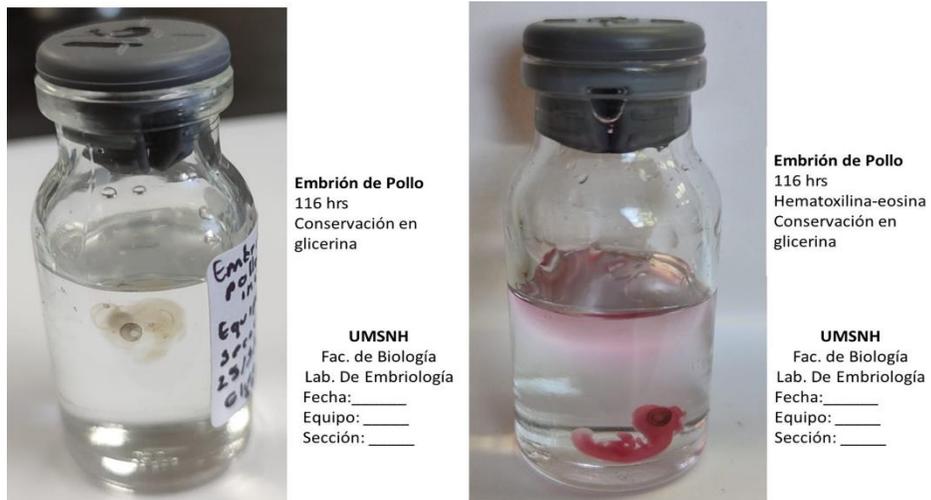


Figura 9. Etiquetado y conservación de embrión en glicerina pura.

Técnica 2. Montaje con resina sintética o bálsamo de Canadá.

1. Coloca el embrión en el centro del recuadro del portaobjetos que previamente preparaste o bien en el espacio un portaobjetos cóncavo y rellena con resina o Bálsamo de Canadá.
2. Cubre con un cubreobjetos y sella el recuadro con barniz de uñas transparente.
3. Limpia los excesos de resina o Bálsamo de Canadá con cotonetes empapados en xilol.
4. Dejar secar en posición horizontal sin encimar las laminillas.
5. Etiquetar las laminillas como se muestra en figura 10.

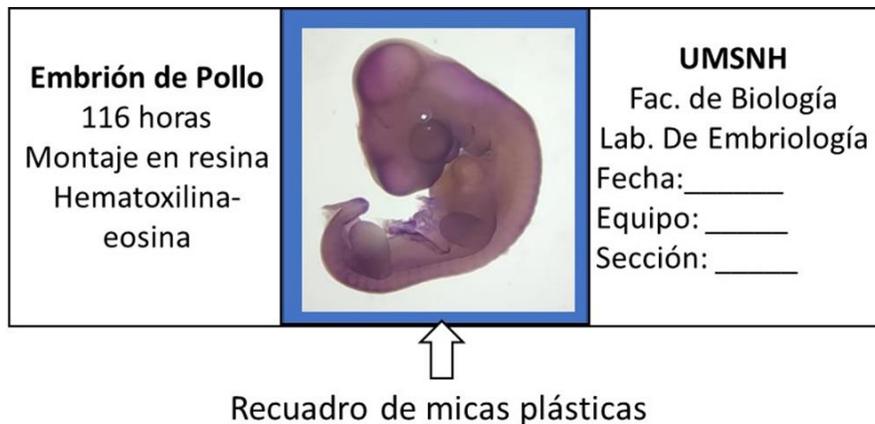


Figura 10. Etiquetado de laminilla con la técnica montaje en resina.

RESULTADOS

- Identifica y compara la morfología externa de tus preparaciones con las figuras del Anexo 1.
- Observa y enlista las estructuras presentes en los estadios de 72, 96 y 116 horas.
- Entrega de embriones a tu profesora.

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué es importante conocer las etapas del desarrollo embrionario en las aves?
2. ¿Qué fases del desarrollo embrionario son las más susceptibles en las aves?

3. ¿Qué condiciones ambientales pueden afectar el desarrollo embrionario en un ave?

4. ¿Qué características tiene cada una de las técnicas de conservación que realizaste?

CONCLUSIONES

LITERATURA CITADA

LITERATURA SUGERIDA

Carlson B. M. 1990 Embriología básica de Patten. Interamericana.McGraw-Hill. ISBN-968-25-1459-2

Freeman, W. H. y B. Bracegirdle. 1975. Atlas de Embriología. Edit. Paraninfo. España. 199 pp.

Sandoval T. M. Universidad Nacional del Nordeste. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Departamento de Biología - Área Zoología. Embriología Animal. Protocolo para obtención de embriones de pollo en laboratorio.

Warin, S. El desarrollo embrionario. 2008. Selecciones avícolas. CEVA Santé animale.

Alfonso H. E. 1968. Blastogenesis (idea general del desarrollo embrionario). Compendio y atlas de embriología. Ed. Atika S. A. Madrid, España. 1 ra ed. Pp. 25-36.

Wischnitzer, S. 1980. Atlas y Guía de Laboratorio de Embriología de Vertebrados. Ediciones Omega. Barcelona.

ANEXO 1. FIGURAS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO DEL POLLO

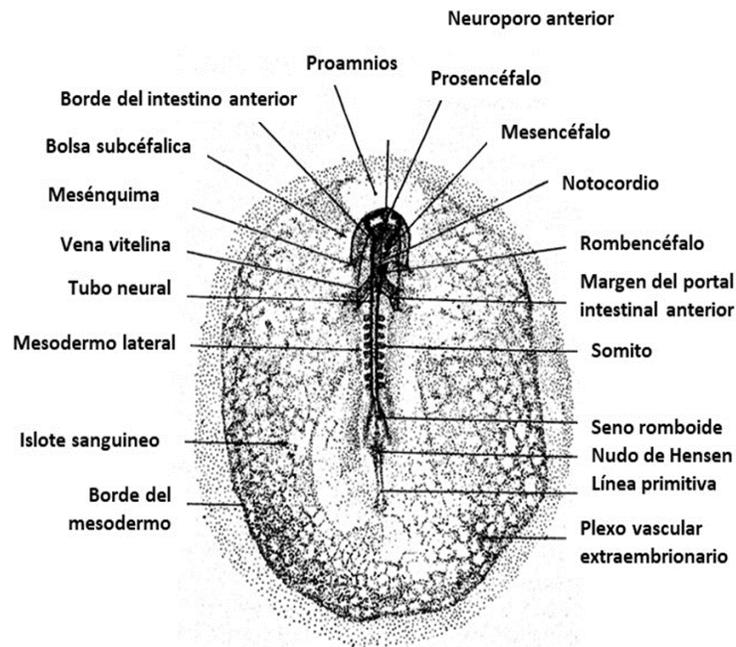


Figura 1. Vista Dorsal de un embrión de pollo completo con ocho pares de somitas, con 27 a 28 horas de incubación, tomado de Carlson, 1990.

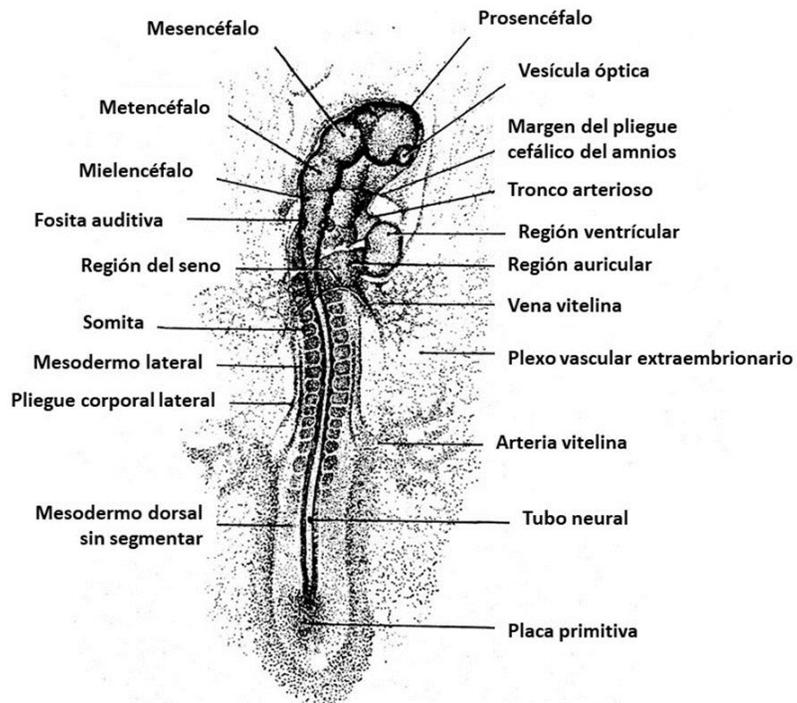


Figura 2. Vista dorsal de un embrión de pollo completo con 19 pares de somitas, aproximadamente a las 43 horas de incubación. Debido a la torsión, la región cefálica se presenta en vista dextrodorsal, tomado de Carlson, 1990.

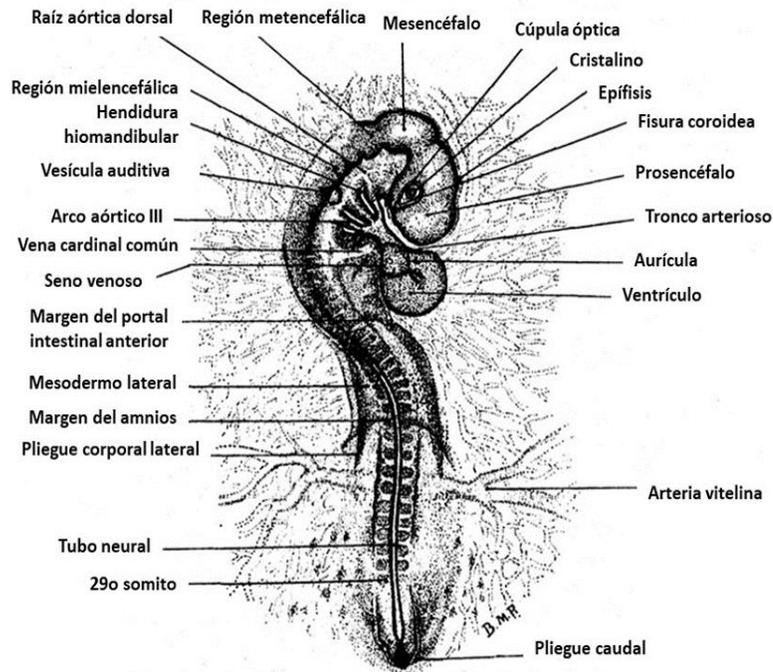


Figura 3. Vista dextrodorsal de embrión de pollo con 29 somitas, alrededor de 55 horas de incubación, tomado de Carlson, 1990.

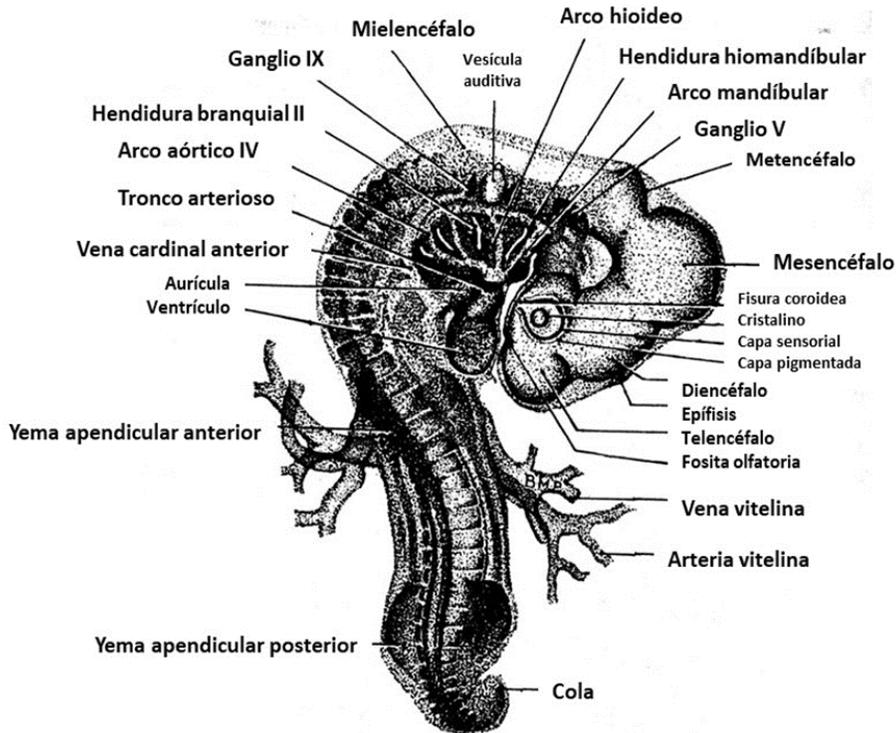


Figura 4. Vista dorsal derecha de un embrión de pollo con 36 somitas, aproximadamente a los tres días de incubación, tomado de Carlson, 1990.

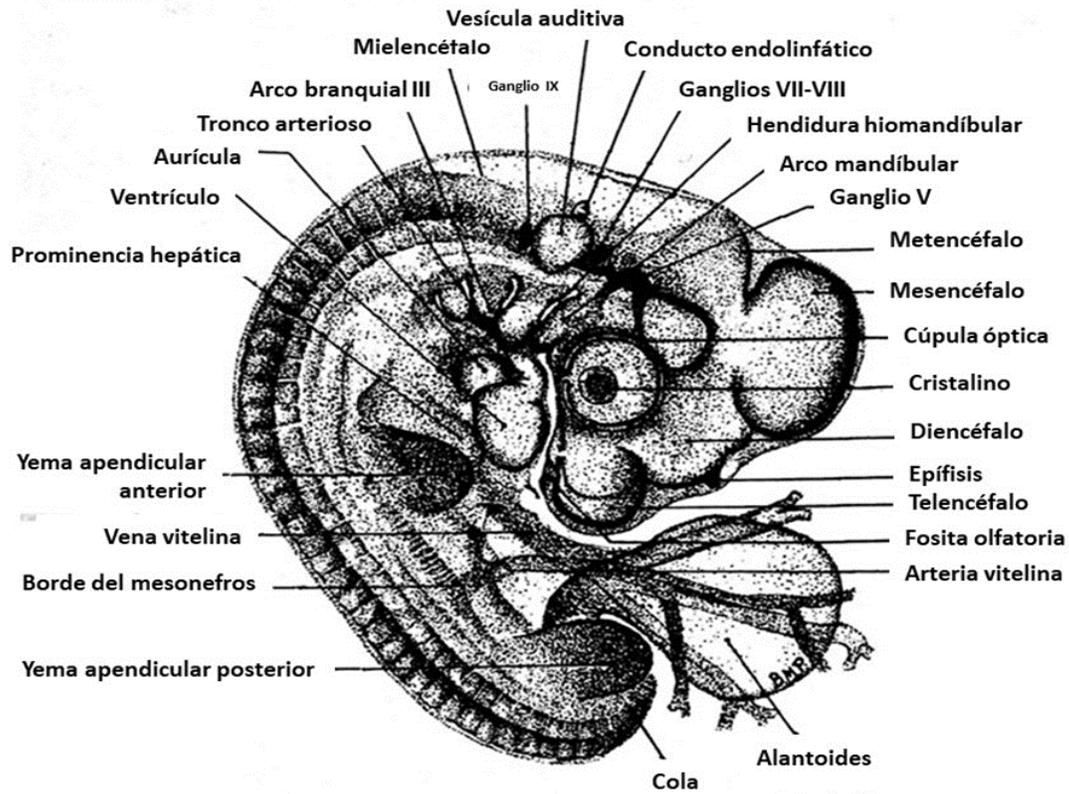


Figura 5. Vista dorsal derecha de un embrión de pollo con 41 somitas, aproximadamente a los tres días de incubación, tomado de Carlson, 1990.