

Guía de trabajos prácticos de Embriología

1. Gametogénesis

**Ernestina Susana Teisaire¹. Olga Lucrecia Nieto¹. Isabel Adriana Roldán¹.
Zandra Ulloa Kreisel¹. María López Aragón¹. Ana García Moreno².**

¹ Cátedra de Embriología y Anatomía Comparadas. Facultad de Ciencias Naturales e I.M.L. Universidad Nacional de Tucumán. Miguel Lillo 205 – 4000. S.M. de Tucumán. Argentina.

eteisaire@csnat.unt.edu.ar

² Departamento de Zoología y Antropología Física. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. c/ José Antonio Novais, 2. 28040 Madrid. España.

agmoreno@bio.ucm.es

Resumen: En esta práctica se estudiarán los procesos de formación de las líneas germinales masculina y femenina, tomando como ejemplos dos grupos de Vertebrados: Anfibios y Mamíferos.

Palabras clave: Ovogénesis. Ovocito. Vitelogénesis. Envolturas. Espermatogénesis. Espermogénesis. Espermatozoide. Determinación de la viabilidad espermática.

OBJETIVOS

- Reconocer los elementos celulares de la línea germinal femenina y de los diferentes tipos de envolturas.
- Reconocer los elementos celulares de la línea germinal masculina y determinar la viabilidad espermática.

MATERIAL BIOLÓGICO

Ovarios y testículos de anfibios (anuros) y mamíferos (ratas), fijados en formol. Preparaciones histológicas. Ovocitos de anfibios anuros en diferentes estadios de maduración. Sapos y ratas.

MATERIAL DE LABORATORIO

Cajas de Petri. Cajas de Petri con base de parafina negra. Ansas de cabello. Aguja para desmedular. Soluciones fisiológicas (Holtfreter 10% y Tyrode). Instrumental y bandejas de disección. Guantes de látex. Hilo de algodón. Algodón. Éter o cloroformo. Varillas y portaobjetos de vidrio. Colorante: eosina amarillenta. Equipo óptico para realizar las observaciones.

TÉCNICAS

Técnicas de inmovilización

- **Anestésicos**

Todas las experiencias traumáticas realizadas sobre los animales deben efectuarse previa anestesia de los mismos, con el objeto de evitar el dolor hasta el final del experimento". Los anestésicos y vías de administración son diversos, su elección depende del animal, ya que varía la sensibilidad ante una misma droga. También depende del tipo de experiencia, puesto que cada anestésico ejerce una acción diferente sobre los distintos sistemas orgánicos al influir de manera variable en las distintas regiones del sistema nervioso, deprimiendo en mayor o menor grado las funciones orgánicas, ocasionando alteraciones o el enmascaramiento de los resultados del experimento.

Anestésicos volátiles. Éter, cloroformo, etc.

Materiales. Ratas de laboratorio (material biológico). Campana o recipiente de vidrio. Algodón. Éter etílico o sulfúrico o cloroformo. Pinza Kocher.

Procedimiento

- ✓ Colocar el animal bajo una campana de vidrio e introducir simultáneamente un algodón embebido en éter etílico o cloroformo. El animal está completamente anestesiado cuando al pinzar la musculatura abdominal no reacciona.
 - ✓ Observar el comportamiento de una rata constatando: inquietud, respiración, actividad cardiaca, reflejos, etc.
 - ✓ Compare el comportamiento en el animal anestesiado con el normal.
- **Inmovilización por destrucción medular en anfibios**

Materiales. Material biológico: sapo. Aguja para desmedular.

Procedimiento

Se toma un sapo teniendo la precaución de no tocar las glándulas parótidas. Con la otra mano se imprime movimientos de flexión a la cabeza del animal con el objeto de encontrar la interlínea occipito-atloidea, ya que el eje sobre el cual se efectúa este movimiento coincide con la misma.

Una vez ubicada ésta, se introduce en la línea media dorsal la aguja de desmedular penetrando unos pocos milímetros de manera perpendicular, hasta alcanzar el canal medular (se manifiesta porque el animal presenta movimientos convulsivos). Se impulsa la aguja en sentido caudal. Si se introduce con facilidad significa que la aguja está correctamente ubicada en el canal; a continuación se efectúan movimientos en sentido posterior varias veces con el objeto de obtener una buena destrucción medular.

Cuando la maniobra se realiza constantemente la aguja se desliza con facilidad, puede haber evacuación de orina y el signo más importante es que el animal queda completamente flácido y sin tono muscular.

Hipofisectomía

Se puede realizar en Anfibios (sapo) o en Mamíferos (rata) con un procedimiento diferente para cada caso.

Durante el procedimiento tratar de observar la ubicación. Forma y vascularización de la glándula hipófisis.

- **Procedimiento en Anfibios**

En primer término se procede a desmedular el animal. Luego se coloca sobre una planchuela en posición cúbito-dorsal. Se fija la cabeza con alfileres y se abre la boca cortando las comisuras con tijeras para ampliar el campo de disección (Fig. 1). A continuación se separa la capa mucosa que recubre los huesos del techo de la boca, se secciona con cizalla en cuatro puntos dispuestos en cruz que corresponden a las láminas óseas del **esfenoides**, la denominada **silla turca**, lugar de ubicación de la hipófisis.

En un siguiente paso se trata de levantar con pinzas y con sumo cuidado el hueso seccionado, inmediatamente por debajo se observa la glándula que se diferencia del tejido circundante por su forma arriñonada definida y de color rosado por la intensa vascularización. Estas características pueden observarse con más detalle bajo la lupa (Fig. 2).

Una vez extraída la **hipófisis**, colocarla en una solución salina si es utilizada en el momento, o bien conservarla en vaselina líquida o glicerina a 4º C (en heladera).

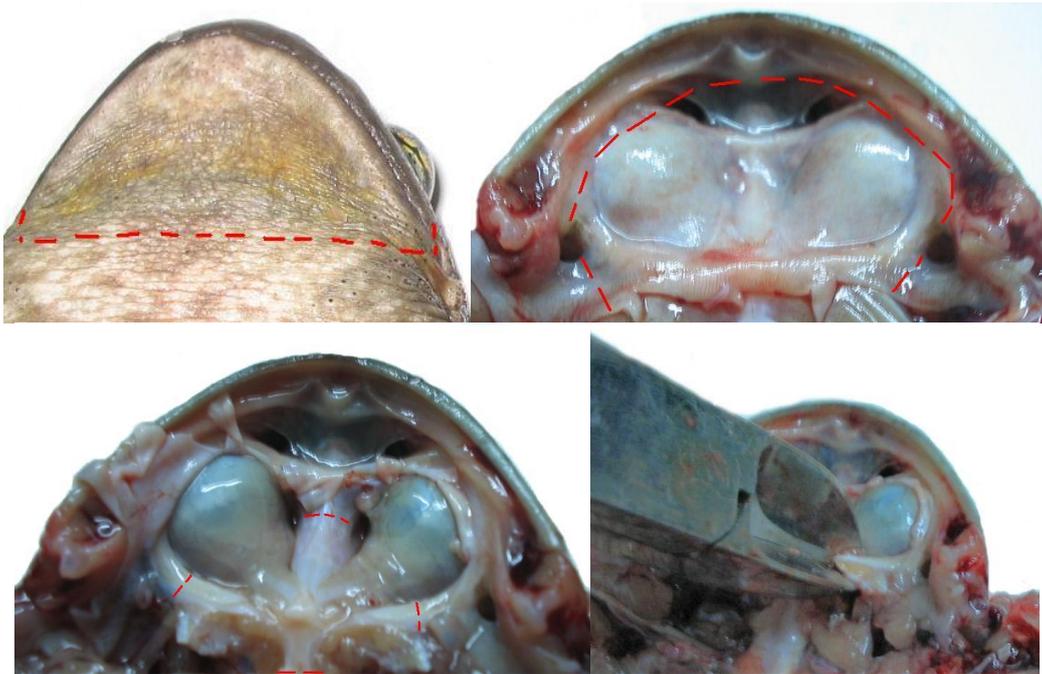


Figura 1. Exposición del paladar y extracción de la hipófisis.

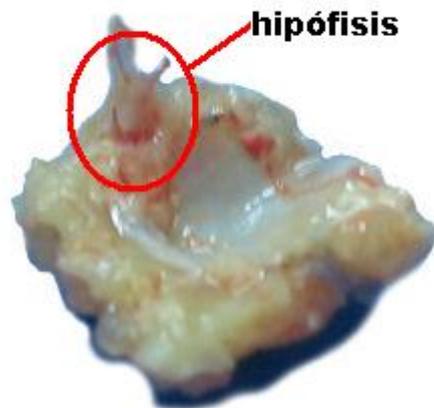


Figura 2. Sección de silla turca con la hipófisis adherida.

Preparación de soluciones fisiológicas

- Para anfibios

Para anfibios es utilizada la [solución de Holtfreter](#)

| | |
|------------------------------------|---------|
| ClNa | 5,5 g |
| ClK | 0,05 g |
| Cl ₂ Ca | 0.1 g |
| H ₂ O bidestilada | 1000 ml |

Se diluye 1: 9 con agua bidestilada. Hacer hervir dos veces y luego agregar en frío 0,2 g de NaHCO₃ por litro (esta sustancia deberá ser esterilizada con estufa a seco).

- **Para mamíferos**

Para mamíferos se utiliza la [solución Tyrode gr/ml](#)

| | |
|--------------------------|---------|
| ClNa | 8 g |
| ClK | 0,2 g |
| ClCa | 0,2 g |
| MgSO ₄ | 0,15 g |
| NaHCO ₃ | 1000 ml |

Cantidad suficiente para 1.000 cc de agua destilada. El agua destilada debe airearse antes de preparar la solución.

DESARROLLO DEL TRABAJO PRÁCTICO

Estudio de los ovarios

Colocar en una cubeta o caja de Petri con una solución de Holtfreter al 10%, un ovario de una hembra de anfibio anuro adulta y observar sin colorantes las siguientes estructuras: [gránulos de pigmento](#), [membranas ováricas](#), [vasos sanguíneos](#) y [ovocitos](#).

A continuación observar el grado de diferenciación (crecimiento) en que se encuentran los [ovocitos](#) y completar en la foto de la figura 3 las estructuras señaladas.

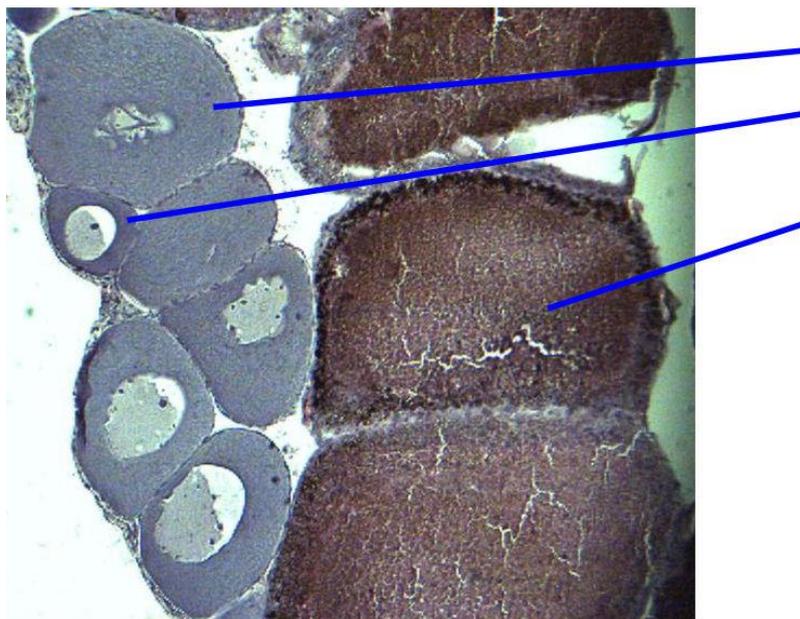


Figura 3. Corte histológico en ovario de sapo (*Rinella arenarum*).

Luego en este mismo material (**ovario fijado**), observar en la lupa y clasificar los ovocitos de acuerdo a los diferentes momentos de la **vitelogénesis**. Para ello emplear por comparación el trabajo de Valdez Toledo (1978), que se le facilitará en el trabajo práctico.

Observar **cortes de ovario** en preparaciones histológicas, preferentemente de Anfibios y Mamíferos a fin de:

- Destacar las diferencias estructurales de las gónadas.
- Reconocer los diferentes tipos celulares de la línea germinal.

Estudio de los testículos

Observar preparados histológicos de **testículos** de Anfibios y Mamíferos (sapo y conejo).

Diferenciar y señalar en la foto de la figura 4 los tipos celulares de la línea germinal: **espermatogonia**, **espermatocitos I y II**, **espermátide** y **espermatozoide**.

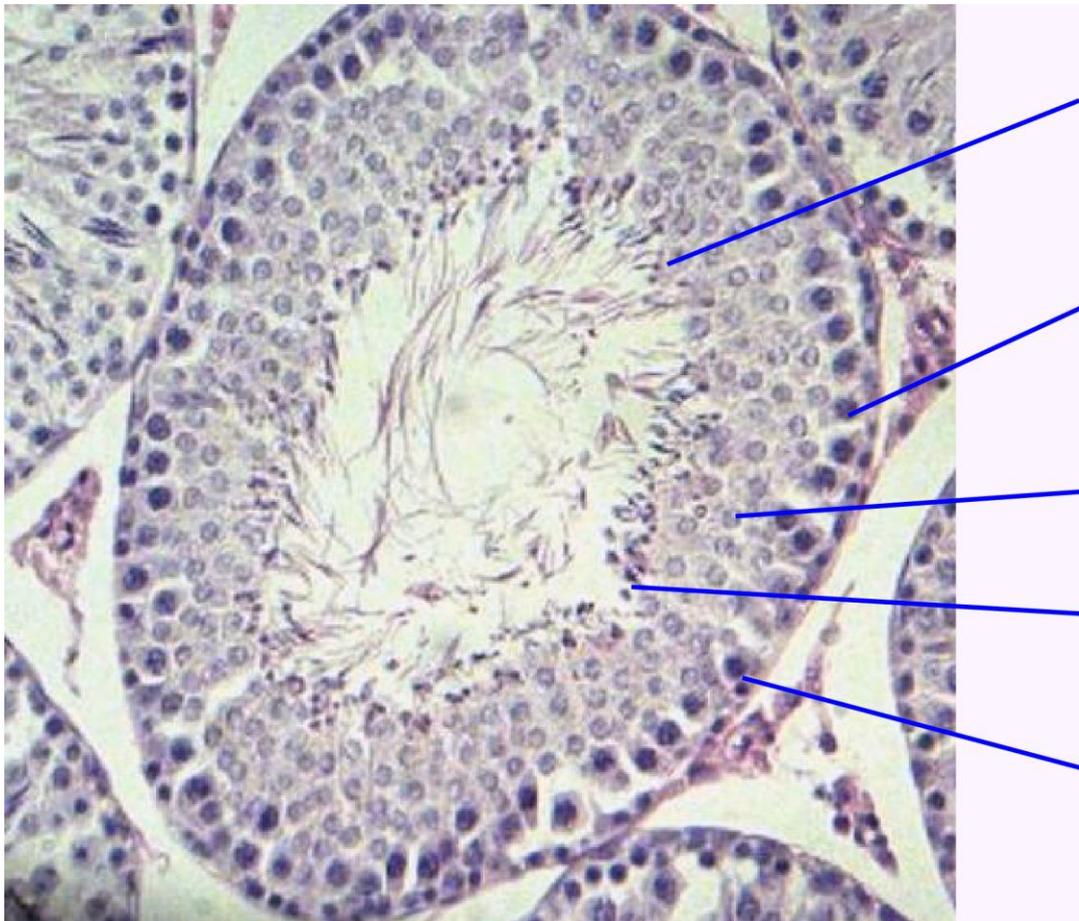


Figura 4. Corte histológico de testículo de conejo (*Oryctolagus cuniculus*).

Determinación de la viabilidad espermática (aplicable a **espermatozoides** de Vertebrados)

- **Obtención de los gametos masculinos de sapo (*Rinella arenarum*) por macerado testicular**

Procedimiento

Desmedular un macho adulto.

Hipofisectomizar.

Realizar la disección como se indica en la figura 5 y localizar los **testículos**.

Extraer los **testículos**, colocar en solución salina de Holtfreter al 10% y macerar.

En un portaobjeto recoger con pipeta una gota de la **suspensión espermática** y llevarla al microscopio a fin de verificar la motilidad.

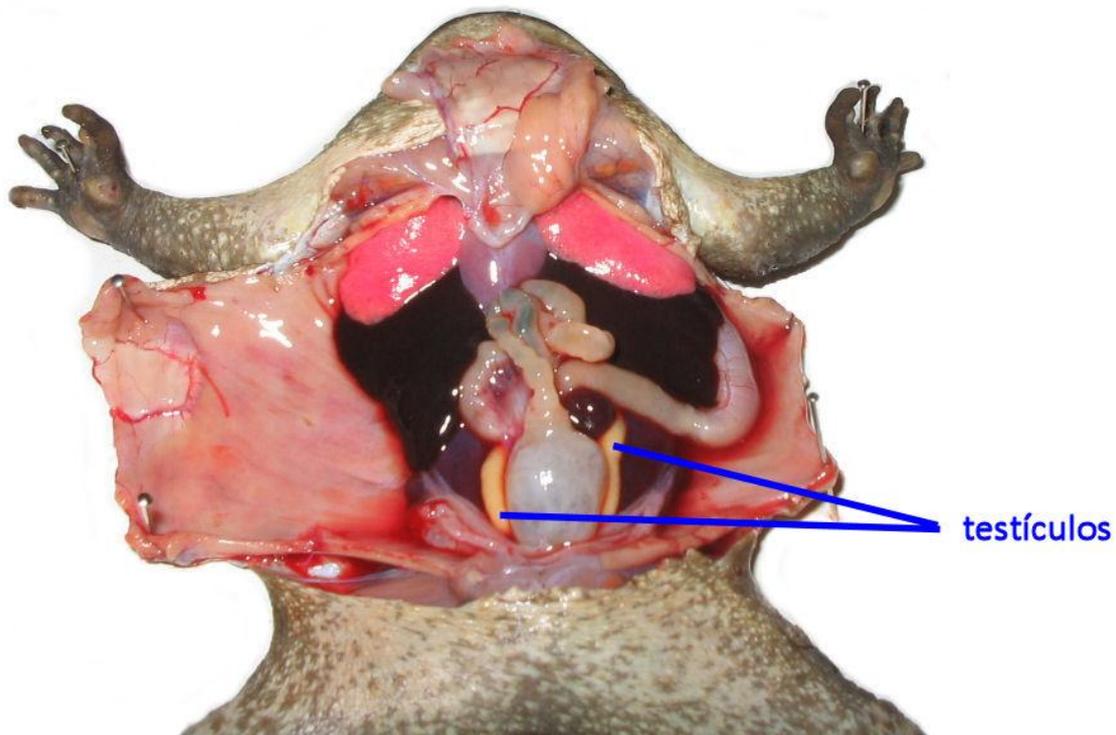


Figura 5. Disección de sapo (*Rinella arenarum*).

- **Obtención de gametos masculinos en rata blanca de laboratorio**

Procedimiento

Anestesiarse el animal con el éter o cloroformo.

Realizar un corte ventral siguiendo las líneas punteadas y observar la anatomía interna del animal, (Fig. 6). Luego cortar con tijeras finas y separar la piel que cubre el **escroto**, situado en posición abdominal posterior, (Fig. 7).

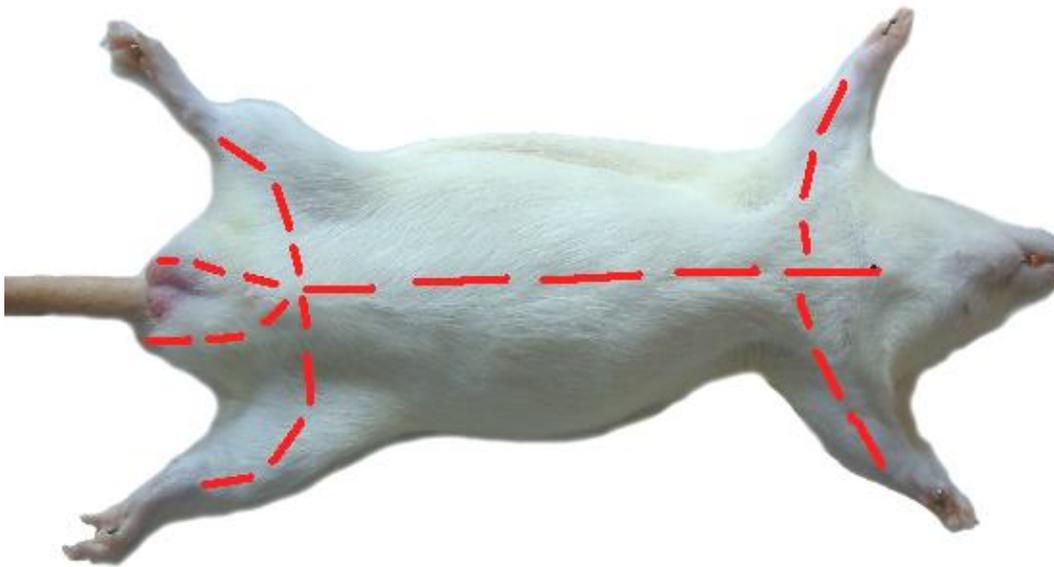


Figura 6. Líneas de disección de rata blanca de laboratorio.

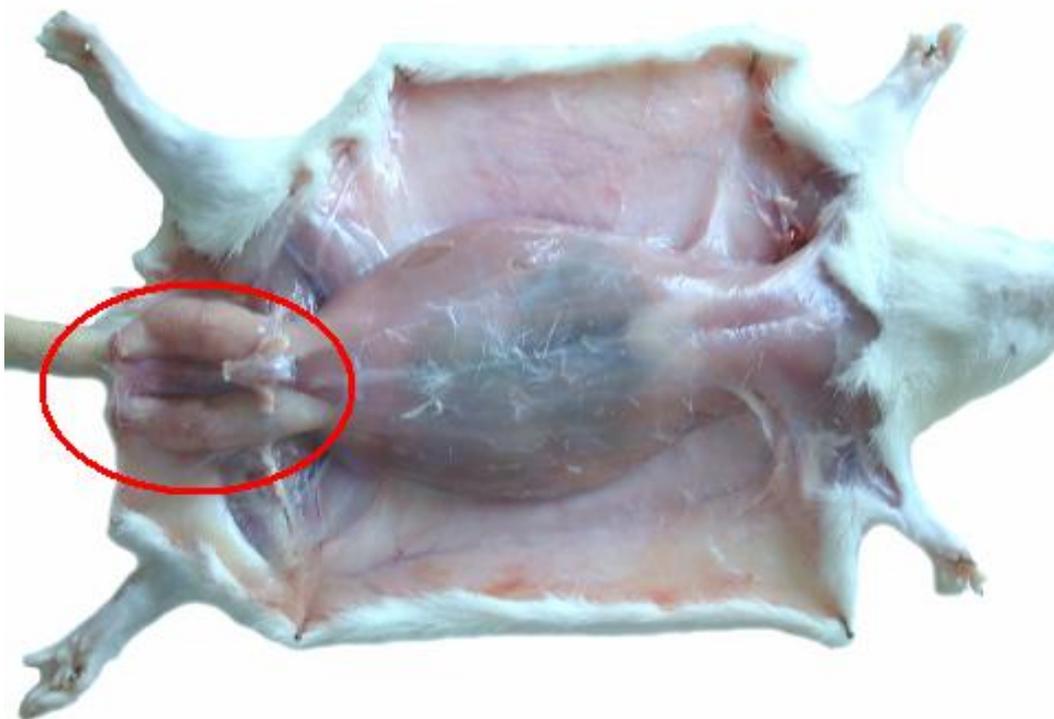


Figura 7. Segundo paso de la disección de rata blanca de laboratorio.

Proceder de la misma forma con la membrana transparente que rodea a cada **testículo** que se encuentra acompañado por el **epidídimo** (Fig. 8).

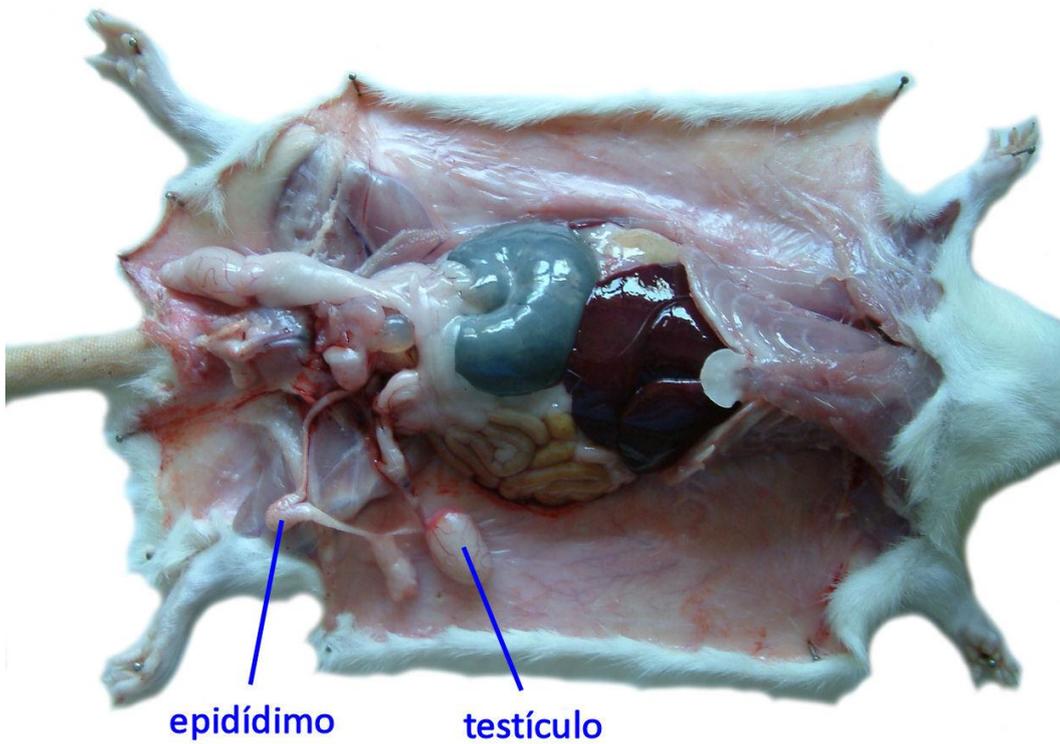


Figura 8. Tercer paso de la disección de rata blanca de laboratorio.

Ligar los extremos del conducto del **epidídimo** con hilo de algodón y luego extraerlo para colocarlo en una caja de Petri conteniendo solución fisiológica de Tyrode (Fig. 9).

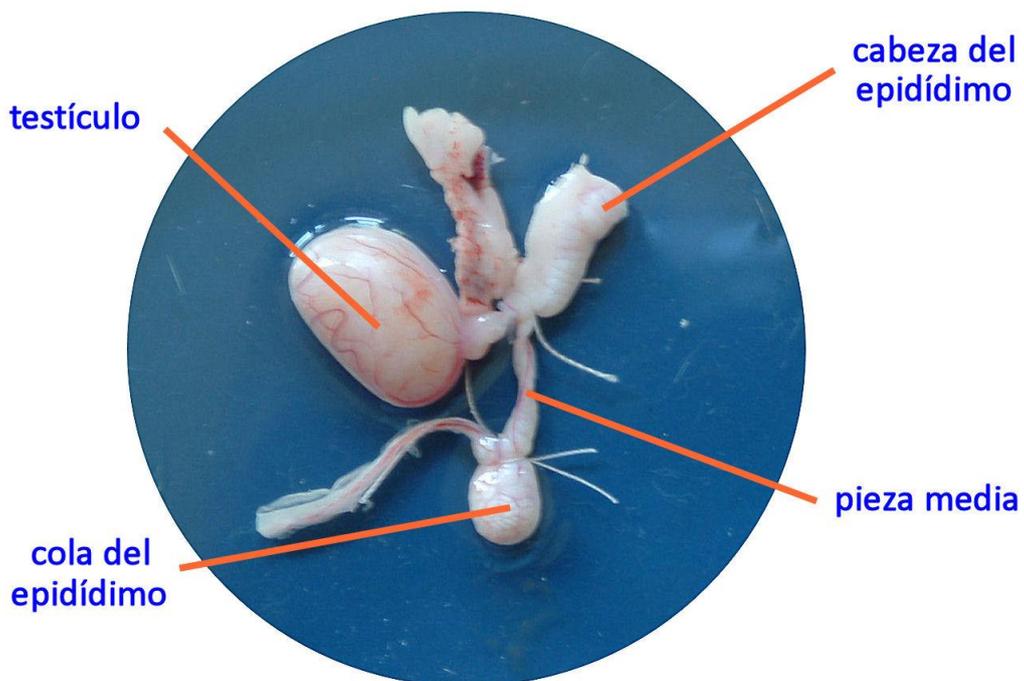


Figura 9. Testículo y epidídimo extraídos durante la disección.

Reconocer las tres regiones del **epidídimo** (**cabeza**, **cuerpo** y **cola**); y separarlas por medio de ligaduras con hilos de algodón.

Aislar cada región en cajas de Petri. En cada una realizar cortes con tijera a fin de liberar los **espermatozoides** de los **túbulos seminíferos**. Extraerlos con pipetas Pasteur, jeringas o agujas de tuberculina.

El material extraído se emplea para la observación en portaobjetos con una gota del colorante Eosina (Eosina amarillenta al 0.5%).

Observaciones

Como el objetivo del experimento es analizar la viabilidad espermática en cada una de las regiones del **epidídimo**, se recomienda no mezclar el material biológico ni el instrumental cuando se manipule cada región.

- **Observación del material en microscopio óptico**

Procedimiento

Preparar una solución de **Eosina** al 0.5% en la solución fisiológica para mamíferos.

Colocar y mezclar en un portaobjeto una gota de material a observar y una gota de la solución de Eosina. Dejar de 2 a 3 minutos y observar (esta coloración permite observaciones de hasta 3-4 horas).

- **Interpretación de los resultados**

Espermatozoides coloreados e inmóviles: **muertos**.

Espermatozoides no coloreados e inmóviles: **vivos**.

Espermatozoides no coloreados y móviles: **vivos y aptos para capacitar**.

Nota: Cuando el porcentaje de espermatozoides muertos es igual o mayor al 5% la fertilización será nula.

BIBLIOGRAFÍA

Valdez Toledo, C. L. 1978 La Maduración ovocitaria de *Bufo arenarum* adulto en función del período estacional. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Tucumán. 73 pp.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA

- Freeman, W.H. y Bracegirdle, B. 1967. *An Atlas of Embriology*. Heinemann educational Books, London. 2ª ed., 107 p.
- Biggers, J.D. y Schuetz, A.W. 1972. Oogenesis. *Proc. of a Symposium on Oogenesis held in Baltimore, Maryland*. Univ. Park. Press., Baltimore and Butterworths, London, IV+543 p.
- De Robertis, E.D.P. y De Robertis, E.M.F. 1981. *Biología Celular y Molecular*. Ed. El Ateneo, 10ª ed., Bs. As., 613 p.
- Dovzhansky, T.; Ayala, F.J.; Stebbins, G.L. y Valentine, J.W. 1980. *Evolución*. Ed. Omega S.A., Barcelona, 558 p.
- Gavrilov, K. 1958. *Curso de Anatomía y Fisiología Comparadas*. Univ. Nacional de Tucumán, Tucumán.
- Gilbert, S. F. 2005. *Biología del Desarrollo*. 7ª ed. Ed. Médica Panamericana S.A., Bs. As., Argentina. 881 pp.
- Grasse, P.P. 1976. *Zoología, Vertebrados - Anatomía Comparada*. Tomo 2, Ed. Masson et Cie. 184 pp.
- Houillon, C. 1978. *Sexualidad*. Ed. Omega S.A., Barcelona, 3ª ed. Colección Métodos, 202 p.
- Houillon, C. 1980. *Embriología*. Ed. Omega S.A., Barcelona, Colección Métodos, 184 p.
- Kardong, K. V. 2007. *Vertebrados. Anatomía Comparada, Función, Evolución*. Ed. Mc.Graw-Hill. Interamericana, 4ª ed., 732p.
- Lodish, H.; Berk, A.; Matsudaira, P; Kaiser, CA.; Krieger, M; Scott, M.P.; Zipursky, S.L. y Darnell, J. (2008). *Biología Celular y Molecular*. 5ª ed. (2ª reimpresión). Bs. As., Argentina. Ed. Médica Panamericana S.A. 973 pp. + 55 pp
- Lovtrup, S. 1977. *The Phylogeny of Vertebrata*. Johm Wiley and Sons ed., 330 p.
- Montero, R. y Autino, A.G. 2009. *Sistemática y filogenia de los Vertebrados. Con énfasis en la fauna argentina*. 2ª ed. Tucumán, Argentina. 414 pp.
- Moore, K.L. 1985. *Embriología Básica*. 2ª ed. Nueva Editorial Interamericana, México. 286 pp.

- Pirlot, P. 1976. *Morfología Evolutiva de los Cordados*. Ed. Omega S.A., Barcelona. 996 pp.
- Pisano, A. 1977. *Tópicos de Embriología*. Fund. para la Educ. y la Cultura, Bs. As., Argentina, 330 p.
- Romer, A.S. 1973. *Anatomía Comparada (Vertebrados)*. Ed. Interamericana, México - Argentina. 453 pp.
- Sadler, T.W. 1987. Lagman, *Embriología Médica*. Ed. Médica Panamericana, S.A., Bs. As., 424 p.
- Schwartz, V. 1977. *Embriología Animal Comparada*. Ed. Omega S.A., Barcelona, 417 p.
- Torrey, T.W. 1978. *Morfogénesis de los Vertebrados*. Ed. Limusa, México, 3 ed., 576 p.
- Wake, M.H. (ed.). 1979. *Hyman's comparative vertebrate anatomy*. 3ª ed., The Univ. of Chicago Press, Chicago -London, 787 p.
- Weichert, C.K. y PRESCH, W. 1981. *Elementos de la anatomía de los Cordados*. 2ª ed. Mac Graw Hill de Méjico. 531 pp.
- Wischnitzer, S. 1980. *Atlas y guía de laboratorio de embriología de Vertebrados*. Ed. Omega, S.A., Barcelona, 154 p.

BIBLIOGRAFÍA DE CONSULTA ESPECIALIZADA

- Bacetti, B. (ed.). 1970. *Comparative Spermatology*. Accademia Nazionale Dei Lincei-Rome. Academic Press. N.Y.- London.
- Billett, F.S. y Wild, A.E. 1975. *Practical Studies of Animal Development*. Chapman and Hall, London. 251 p.
- Bock, W. J. y Shear. 1972. A staining method for gross dissection of vertebrate muscle. *Anat. Anz.*, 130: 222-227.
- Dettlaff, T.A. y Vassetzky, S.G. (eds.). 1991. *Animal species for developmental studies. Vol. 2. Vertebrates*. Consultants Bureau, New York. 453 p.
- Fawcett, D.W. y Bedford, J.M. (eds.). 1979. *The spermatozoon*. Urban and Schwarzenberg, Baltimore-Munich. 441 p.
- Knobil, E. y NEILL, J. (eds.). 1988. *The physiology of reproduction*. Raven Press, Ltd., New York. 185 p.

Mahoney, R. 1973. *Laboratory techniques in Zoology*. 2nd. ed., Butterworth & Co. (Publ.), London. 518 p.

Srivastava, M.D.L. 1965. Cytoplasmic inclusions in oogenesis. *International Review of Cytology*, 18: 73-98.

Recibido: 1 julio 2009.

Aceptado: 2 enero 2010.