

Aula Prática Nº 5. Manipulação de Embrião de Galinha in vivo

Protocolo da Aula 9 (22/05)

Entregar desenho no dia 22/05

O objetivo desta aula é introduzir duas técnicas de manipulação de embriões de galinha. Vocês vão aprender abrir um ovo fecundado e identificar/analisar o embrião dentro do ovo, por meio de contraste. Além disso, farão coleta de embriões em papel de filtro e posterior identificação/estadiamento.

Prática 1 > Materiais:

- Seringa de 1ml
- Seringa de 5ml
- Nanquim (concentração: 50%)
- Tesoura cirúrgica com ponta fina
- Pinça de ponta fina
- Fita adesiva larga
- Lupa
- Suporte para o ovo
- Saco de lixo na cor branca (lixo biológico)
- Alicate
- Tabela HH para estadiamento

Não inicie o procedimento antes da demonstração!

Após a Demonstração, siga os passos a seguir:

1. Pegue um suporte para o ovo e um ovo que já foi encubado.
2. Pegue uma seringa de 1 ml e preencha com nanquim 50%. Dobre a ponta da agulha com um alicate ou pinça de ponta grossa, fazendo com que a agulha tenha formato de “L” (Figura 1).
3. Com a seringa de 5 ml, faça um pequeno furo no pólo maior, por cima do ovo e direcione a ponta da seringa para o polo maior do ovo. Puxe cerca de 5 ml de albumina (clara). Retire a seringa, mas **não descarte a clara** (Figura 1).
4. Feche o orifício por onde você retirou a clara com um pedaço de fita adesiva. Coloque também um pedaço em cima da casca do ovo (visão dorsal) para evitar que fragmentos da casca caiam sobre o embrião.
5. Com uma pinça de ponta fina ou uma tesoura de ponta fina, faça um furo em um ponto da casca (vista dorsal). **Cuidado para não afundar a ponta do instrumento na gema ou no embrião.** Com a tesoura, faça uma janela oval na casca do ovo (Figura 1).

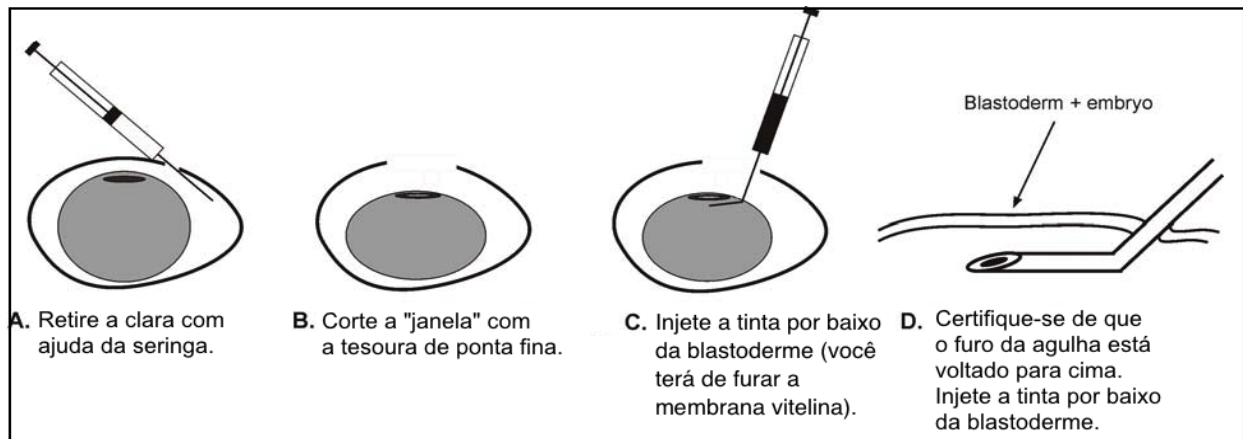


Figura 1: Descrição do procedimento inicial para abrir o ovo ("janela") e injetar o nanquim para contraste.

6. Encontre o embrião no ovo. Ele deve estar no meio da gema, cercado pela zona opaca (região branca) (Figura 2).

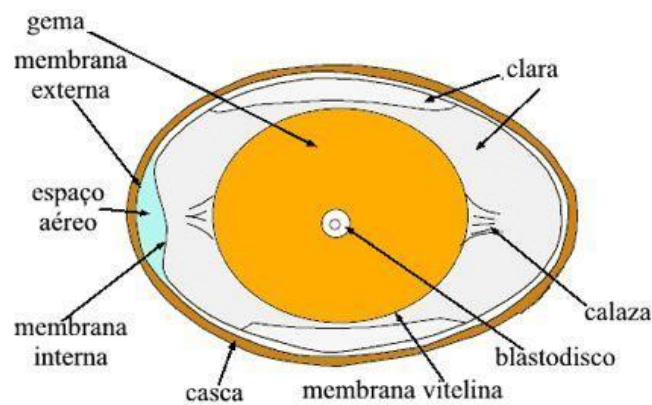


Figura 2: Estrutura de um ovo de galinha, mostrando o blastodisco (embrião no estágio de pré-gastrula) como vocês devem vê-lo no ovo (vista "de cima"). Os embriões desta prática estão em estádios mais avançados, então ao invés de um disco, vocês verão uma área esbranquiçada, com o embrião no centro.

7. Se a gema estiver muito funda dentro do ovo, adicione um pouco da clara que está na seringa de volta dentro do ovo. Pegue a seringa de 1ml com nanquim e posicione a agulha por debaixo do embrião. Injete o nanquim devagar, aos poucos, e observe o contraste por baixo do embrião. Cuidado para não deixar a agulha muito próxima do embrião, perfurando-o, nem muito longe, assim a tinta se dispersará na gema.
8. Observe o embrião na lupa e o desenhe, marcando todas as estruturas que você conseguir reconhecer. Não se esqueça de estadiar o embrião dentro do modelo HH (Hamburger & Hamilton, 1951).

Prática 2 > Materiais:

- Tesoura cirúrgica com ponta fina
- Pinça de ponta fina
- Papel filtro (com furo no meio)
- Placa de Petri
- Lupa
- Saco de lixo na cor branca (lixo biológico)
- Prato
- Solução salina 1x
- Tabela HH para estadiamento

Não inicie o procedimento antes da demonstração!

Após a Demonstração, siga os passos a seguir:

1. Coloque um pouco de solução salina no prato e em uma placa de petri. Isso amortecerá a gema quando o ovo for quebrado.
2. Dê batidinhas no ovo na borda do prato. Com o ovo em mãos, posicione os polegares dentro da solução salina e abra o ovo delicadamente.
3. Localize o embrião.
4. Segure o papel de filtro pela borda com uma pinça. Posicione o papel de filtro sobre o embrião, deixando-o no centro do orifício.
5. Segure, além do papel de filtro, a membrana vitelínica e corte em volta do papel de filtro com uma tesoura. **Não solte ou abra a pinça!**
6. Transfira o papel de filtro com o embrião para a placa de petri contendo solução salina.
7. Com o auxílio de uma lupa, faça o estadiamento e identificação das principais estruturas.

- **AO TERMINAR, NÃO ESQUECER DE DEVOLVER TODO O MATERIAL, JOGAR FORA O LIXO E LIMPAR A BANCADA.**

Referências

Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology*, 88(1), 49-92.