

### **3.- MATERIAL Y MÉTODOS**

## MATERIAL

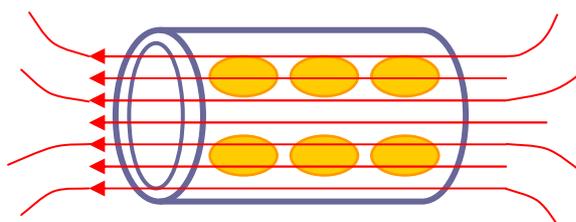
Concretados los objetivos y realizadas las hipótesis de trabajo, fueron evaluadas las distintas posibilidades de generar un campo electromagnético de forma artificial y que cumpliera las condiciones siguientes:

- Ser continuo o alterno (en función de la corriente eléctrica aplicada).
- Ser homogéneo y uniforme.
- Ser mensurable.

Se decide construir un modelo solenoidal recto por cumplir con los requisitos antes mencionados y además porque:

- La inducción electromagnética, puede ser fija o variable a voluntad, lo cual nos permite trabajar con intensidades que pueden oscilar entre las 0 y las 50 mT.
- El control del campo electromagnético y el de los parámetros que genera, pueden ser controlados en todo momento.
- La bobina inductora puede construirse sobre un carrete cuyo tamaño nos permite ubicarla en el interior de una estufa incubadora y a su vez poder colocar en su centro hasta un máximo de 12 huevos.

La figura 1 esquematiza la dirección de las líneas de fuerzas en el interior y exterior de la bobina, así como la posición en la que se situaron los huevos respecto al campo electromagnético.



**Figura 1:** Esquema de un campo electromagnético continuo y homogéneo

### 3.1.- CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS DE LOS APARATOS

#### 3.1.1 Solenoide

La bobina solenoidal se construye sobre un carrete (chasis) de material plástico (PVC), cuyas dimensiones permiten:

- Colocación en su interior un máximo de 12 huevos.
- Alojarse externamente la bobina.
- Introducirla y manipularla con facilidad en el interior de la estufa incubadora (Figuras 2 y 3)

#### Características

- Longitud total del carrete (L).....200 mm
- Longitud útil de la bobina (l).....160 mm
- Diámetro interno de la bobina (D<sub>I</sub>).....120 mm
- Diámetro interno útil de la bobina (D<sub>U</sub>).....110 mm
- Diámetro externo del carrete (D<sub>E</sub>).....190 mm
- Capacidad útil ( núcleo de la bobina).....138.544 mm<sup>3</sup>

#### Características técnicas del solenoide

a) 1952.83 m de hilo de cobre monofilamento y de sección 0.8659 mm<sup>2</sup>, barnizado exteriormente y con unas resistencias térmicas de :

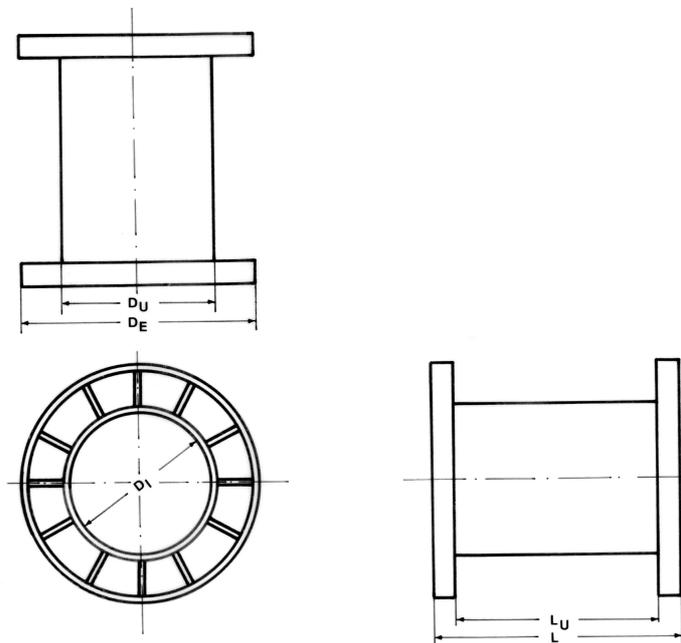
- 0.0195 Ω/m entre 0-10°C
- 0.0205 Ω/m entre 10-20°C
- 0.0212 Ω/m entre 30-40°C

- b) Múltiples capas concéntricas superpuestas, alineadas y aisladas entre sí, con un número de vueltas máximo de 3946.70.
- c) Salidas y conexiones intermedias que nos permiten trabajar con distintas longitudes de hilo conductor, o su equivalente en número de espiras. Esta característica nos ofrece un amplio abanico de posibilidades en la obtención de campos electromagnéticos, de distinta inducción electromagnética. Las conexiones, en número de 6, son realizadas según se especifica en la tabla 1

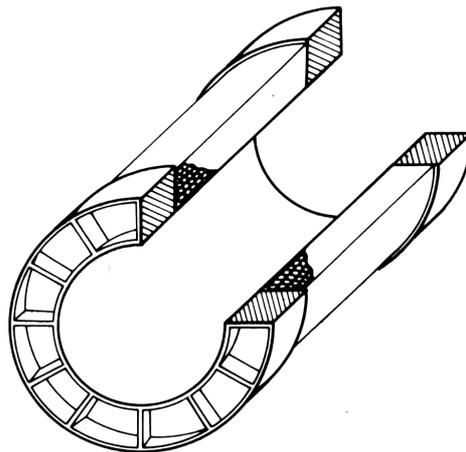
**Tabla 1:** Relación longitud/espiras de cada una de las conexiones intermedias del solenoide.

| CONEXIONES | Nº ESPIRAS | LONGITUD (m) |
|------------|------------|--------------|
| 1          | 2789.66    | 1292.45      |
| 2          | 3023.44    | 1419.81      |
| 3          | 3280.77    | 1561.32      |
| 4          | 3492.24    | 1683.96      |
| 5          | 3724.95    | 1830.10      |
| 6          | 3946.70    | 1952.83      |

El cálculo teórico de todos los componentes electromecánicos, se realiza sobre la base de las características técnico-espaciales que nos permiten obtener las inducciones electromagnéticas establecidas para el presente trabajo (de 0 a 40 mT).



**Figura 2:** Plano del solenoide (1:4)



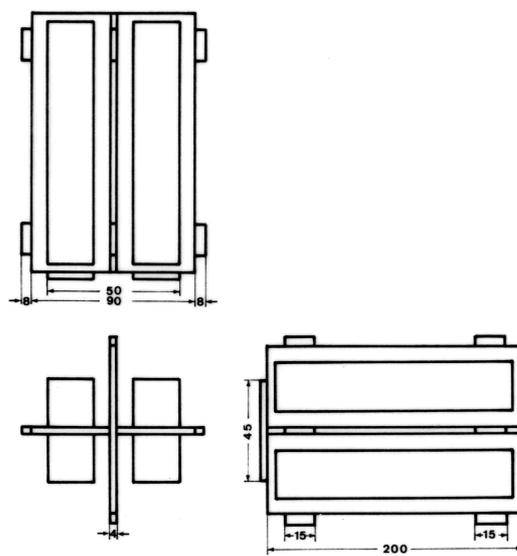
**Figura 3:** Perspectiva del solenoide (1:3)

### 3.1.2 Soporte fijador de los huevos

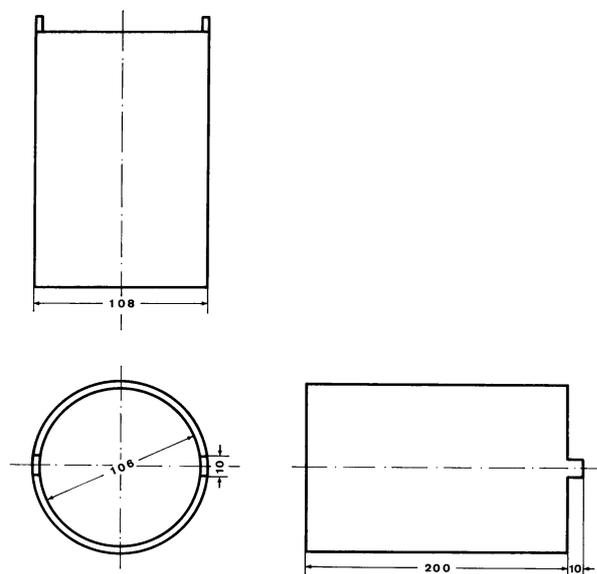
Con el objeto de poder colocar los huevos en el interior de la bobina solenoidal y de que el eje mayor del huevo sea paralelo a las líneas de fuerza del campo magnético, se construye una estructura de soporte que permita su distribución y que facilite una maniobrabilidad y acceso sencillo, rápido y cómodo.

La estructura construida consta de 2 láminas de madera contrachapada de 4 mm de grosor de 90x200mm de tamaño, dispuestas perpendicularmente y paralelas a las líneas de fuerza del campo (Figura 4). A su vez, dicho soporte, se coloca en un cilindro de PVC de diámetro ligeramente inferior al del carrete de la bobina; para crear una pequeña cámara de aire que facilite la refrigeración del sistema y evite que la superficie externa de los huevos esté en contacto directo con las paredes de la bobina inductora (Figura 5).

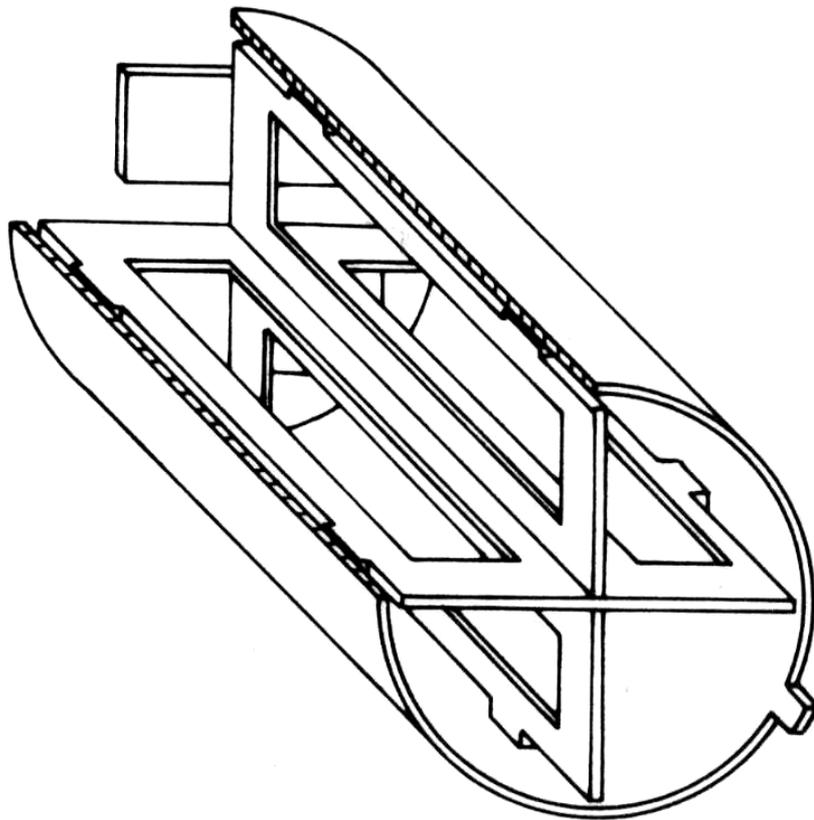
Por último, para permitir un correcto apoyo y fijación de los huevos, se realiza un vaciado rectangular de 20x180mm en las láminas de madera. Esto nos permite colocar 4 baterías de 3 huevos cada una, aprovechando al máximo la capacidad de la bobina a la vez que se impide el desplazamiento de los huevos durante el volteo (Figura 6).



**Figura 4:** Plano del soporte de los huevos (1:3)



**Figura 5:** Plano del cilindro(1:3)



**Figura 6:** Perspectiva del soporte incluido en el cilindro (1:3)

### 3.1.3 Fuente de alimentación (estabilizada)

La fuente de alimentación utilizada para el suministro de corriente eléctrica continua está provista de conexión para toma de tierra, como sistema de descarga y protección eléctrica y tiene las siguientes características técnicas:

- Marca..... Promax
- Modelo..... FAC-522B
- Regulación carga.....  $\leq 0.2\%$
- Regulación red.....  $\leq 0.02\%$
- Tensión de salida estabilizada en C.C..... 0-54 V
- Intensidad de salida estabilizada..... 0-2 A
- Corriente de cortocircuito.....  $\approx 2.4$  A
- Coeficiente de temperatura.....  $\leq 0.04\%$  por  $^{\circ}\text{C}$
- Resolución.....  $\pm 0.1$  V/ 0.01 A
- Tensión de red (C.A.)..... 220V, 50 H
- Dimensiones..... 185x210x265 mm.

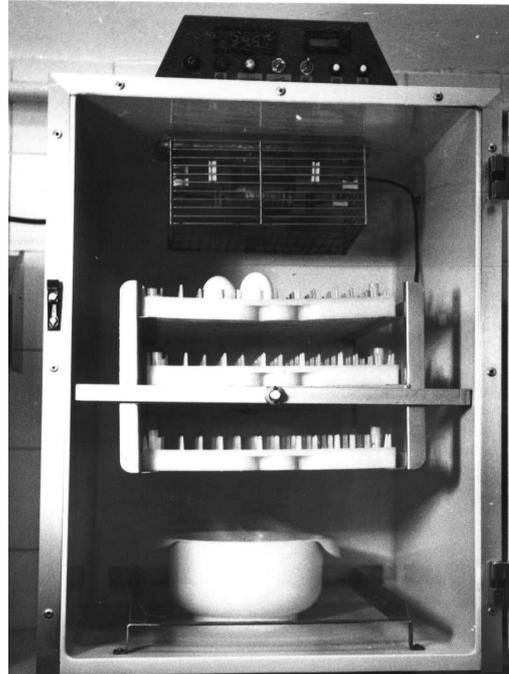
Está constituida en base a un circuito impreso monolítico para transformar la corriente alterna (CA) en corriente continua (CC), con estabilizador y control automático de desconexión por aumento de la temperatura interna.

El voltaje y la intensidad de la corriente de salida son controlados por tres potenciómetros de ajuste fino que nos permiten obtener la monitorización de los parámetros necesarios por medio de un voltímetro y un amperímetro digitales.

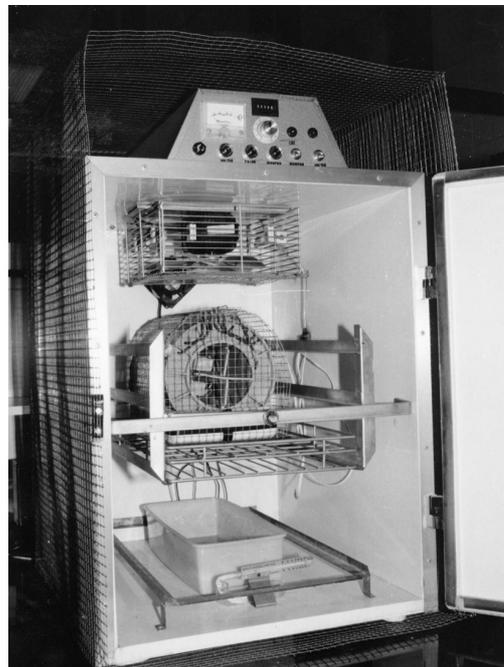
### 3.1.4 Estufas incubadoras

Características técnicas (Figura 7):

- Marca..... Masalles
- Modelo..... 25
- Tensión de red:..... 220V / 60H / 1.1 A
- Control de temperatura automático de gran precisión, por dos termistores con indicador electrónico visual externo.
- Control automático de selección de temperaturas por reostato exterior, regulable a voluntad y que acciona una resistencia interna que calienta el aire ambiente de la incubadora.
- Refrigeración del ambiente de incubación por medio de un ventilador central situado en el techo (ventilador núm 1), conectado y controlado por los sensores de temperatura de los reostatos.
- Bandeja motorizada de volteo.
- Control manual y/o automático de volteo horario, con contador visual externo.
- Cámara de incubación, isotérmica, de dimensiones 485x670x550 mm, compuesta por 3 capas superpuestas de fibra de vidrio, madera y plástico termoestable rígido.
- Orificios de ventilación, situados en la pared posterior de la cámara.



**Figura 7:** Estufa incubadora



**Figura 8:** Incubadora, solenoide y ventiladores protegidos por las jaulas de Faraday

### **3.1.5 Jaulas de Faraday**

Para aislar y derivar las corrientes producidas tanto por la bobina, como por los aparatos existentes en el interior de la estufa y en el laboratorio, se instalan cuatro jaulas de Faraday (Figura 8).

Cada una de estas jaulas se construye con malla metálica (enrejado cuadrangular de 10x10 mm) de hierro galvanizado (zincado) electrosoldado de 1 mm de diámetro, que se sitúan cubriendo los componentes generadores de campos electromagnéticos, permitiendo el acceso a los mismos a través de compuertas móviles. Así:

1. Jaula A: Alrededor de la bobina inductora, envolviéndola completamente.
2. Jaula B: Cubriendo todos los ventiladores.
3. Jaula C: Cubriendo la estufa incubadora en la que se aloja la bobina.
4. Jaula D: Cubriendo la estufa incubadora de los grupos control (no expuestos al campo electromagnético).

### 3.1.6 Fluxómetro

Para la medición, tanto del campo magnético ambiental, como del generado por la bobina o por las estructuras del laboratorio se utiliza un fluxómetro.

Las características técnicas del fluxómetro son las siguientes:

- Marca..... Oxford Instruments Magnetometer
- Modelo..... kGAUSS-031T
- Margen de medida..... 0G – 150 KG
- Margen de error.....  $\pm 2.5\%$
- Sonda de cristal de Germanio que mide el campo mediante el efecto Hall.
- Control digital del campo (4 dígitos) con coma flotante según la escala.
- Ajuste fino manual con control de puesta a cero por medio de un reostato externo.
- Corrector automático de la medición del campo para temperaturas entre 4.2-300°K.

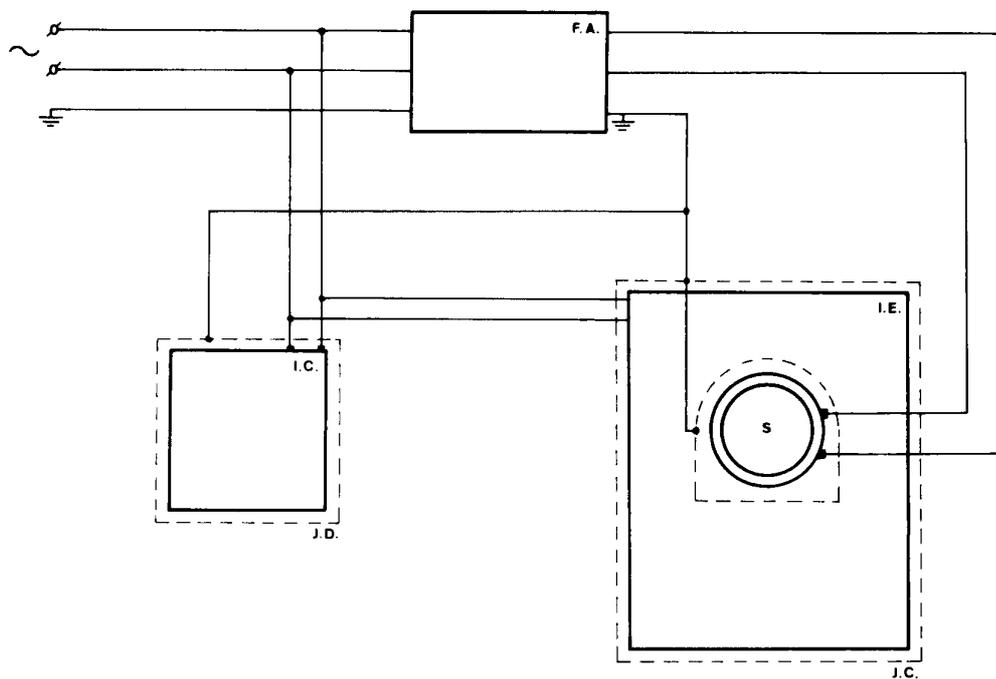
### **3.2.- SISTEMA DE TRABAJO Y CONTROL**

La bobina, con su jaula correspondiente, se instala en el interior de la incubadora (Figura 9), apoyada y fijada al soporte de volteo, y orientada de tal forma que una de sus bocas, se dirija hacia la puerta de la incubadora, con lo cual se facilita el acceso a la misma.

La incubadora, recubierta por su correspondiente jaula de Faraday, se sitúa sobre una mesa de madera del laboratorio, en un área aislada físicamente del resto. En la mesa sólo se hallan 2 torretas de conexión eléctrica de corriente alterna, con 2 salidas cada una, a 220 V/ 50H y con las respectivas derivaciones a tierra, en las cuales se efectúan las conexiones eléctricas correspondientes.

La estufa incubadora de los huevos controles (protegida con su jaula correspondiente) se sitúa a 3 m de distancia de la anterior, en el mismo soporte y con la misma orientación.

Previamente a la realización de las conexiones e instalación definitivas, se comprueba la no existencia de aparatos eléctricos ni conducciones de alta tensión en el área de trabajo que puedan influir en los parámetros estudiados. La fuente de alimentación se coloca al lado de las estufas y se procede a la conexión eléctrica de todos los componentes.



**Figura 9.** Instalación eléctrica de los aparatos.

**IE** = Incubadora expuestos

**JE** = Jaula Faraday expuestos

**S** = Solenoide

**IC** = Incubadora controles

**JC** = Jaula Faraday controles

**FA** = Fuente alimentación

### 3.2.1 Control teórico-práctico del campo electromagnético

#### a) Cálculo teórico

Basándonos en las características físico-químicas del material utilizado y el tipo de corriente eléctrica motriz que se ha de aplicar a la bobina, se efectúa el cálculo teórico del campo electromagnético en el interior del solenoide.

Según la ley de HOPKINSON la inducción electromagnética en el interior de una bobina solenoidal se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$H = \frac{4\pi \cdot N \cdot I}{L}$$

Donde:

**H**= Inducción electromagnética (mT)  
**N**= Número de espiras  
**I**= Intensidad de corriente (Amperios)  
**L**= Longitud útil de la bobina (cm)

El flujo magnético se calcula:  $\Phi = H \cdot S$

Donde:

**$\Phi$** = Flujo magnético (maxvelio)  
**S**= Sección interna (cm<sup>2</sup>)  
**H**= Inducción electromagnética

Las líneas de fuerza en el interior de la bobina son paralelas al eje longitudinal de la misma (parámetro no modificable), mientras que su número (inducción electromagnética), puede ser modificado variando los parámetros: **N** (Número de espiras), **I** (Intensidad de la corriente), **L** (Longitud de la bobina).

Efectuados todos los cálculos para cada una de las salidas de la bobina, obtenemos los valores de intensidad y voltaje para cada una de las inducciones electromagnéticas determinadas (Tabla 2).

**TABLA 2.-** Valores teóricos de intensidad y voltaje necesarios para obtener las densidades de flujo magnético

| CONEXIONES     |   | 1       | 2       | 3       | 4       | 5       | 6       |
|----------------|---|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Long. hilo (m) |   | 1292.45 | 1419.81 | 1561.32 | 1683.96 | 1830.10 | 1952.83 |
| Nº. espiras    |   | 2789.66 | 3023.44 | 3280.77 | 3492.24 | 3724.25 | 3946.70 |
| mT             |   |         |         |         |         |         |         |
| 2.5            | A | 0.114   | 0.105   | 0.097   | 0.091   | 0.085   | 0.081   |
|                | V | 3.123   | 3.160   | 3.210   | 3.248   | 3.297   | 3.353   |
| 5.0            | A | 0.229   | 0.211   | 0.195   | 0.183   | 0.171   | 0.162   |
|                | V | 6.274   | 6.351   | 6.454   | 6.533   | 6.634   | 6.707   |
| 7.5            | A | 0.344   | 0.317   | 0.292   | 0.274   | 0.257   | 0.243   |
|                | V | 9.425   | 9.541   | 9.665   | 9.781   | 9.971   | 10.060  |
| 10             | A | 0.458   | 0.423   | 0.390   | 0.366   | 0.343   | 0.324   |
|                | V | 12.549  | 12.732  | 12.908  | 13.066  | 13.307  | 13.413  |
| 15             | A | 0.688   | 0.635   | 0.585   | 0.549   | 0.515   | 0.486   |
|                | V | 18.851  | 19.113  | 19.363  | 19.599  | 19.981  | 20.120  |
| 20             | A | 0.917   | 0.846   | 0.780   | 0.733   | 0.687   | 0.648   |
|                | V | 25.125  | 25.464  | 25.817  | 26.168  | 26.654  | 26.827  |
| 25             | A | 1.147   | 1.058   | 0.975   | 0.916   | 0.859   | 0.810   |
|                | V | 31.427  | 31.845  | 32.272  | 32.701  | 33.327  | 33.533  |
| 30             | A | 1.376   | 1.270   | 1.170   | 1.099   | 1.031   | 0.972   |
|                | V | 37.702  | 38.226  | 38.726  | 39.234  | 40.000  | 40.240  |
| 35             | A | 1.605   | 1.481   | 1.365   | 1.282   | 1.202   | 1.135   |
|                | V | 43.976  | 44.587  | 45.181  | 45.767  | 46.635  | 46.988  |
| 39             | A | 1.789   | 1.651   | 1.521   | 1.429   | 1.304   | 1.264   |
|                | V | 49.018  | 49.695  | 50.345  | 51.015  | 51.592  | 52.329  |
| 40             | A | 1.830   | 1.693   | 1.560   | 1.466   | 1.374   | 1.297   |
|                | V | 50.141  | 50.959  | 51.635  | 52.336  | 53.308  | 53.695  |

**A** = Amperios

**V** = Voltios

### b) Cálculo práctico (medición del campo real)

Mediante el fluxómetro se efectúan las mediciones del campo electromagnético existente en el interior del laboratorio y en sus estructuras.

Las intensidades obtenidas fueron las siguientes:

- Ambiente del laboratorio..... 0-0,1 mT
- Incubadora de controles.....0-0,1 mT
- Soporte metálico de la mesa de trabajo..... .0,2 mT
- Bobina desconectada, interior.....0-0,1 mT

Estas mediciones se repiten con la bobina e incubadoras en marcha (a 37.5°C de temperatura, 80% de humedad ambiental y a la máxima densidad de flujo magnético). Se observa la aparición de un campo electromagnético alrededor de la bobina que desaparece aproximadamente a 30 cm, de distancia de la misma. Esta distancia se reduce considerablemente cuando las jaulas de Faraday están conectadas según se refleja en la tabla 3. Al verificar el “Norte terrestre”, vemos que éste no sufre variación alguna, lo cual nos permite asegurar que el campo inducido es menor al campo magnético terrestre.

**Tabla 3.-** Valores de las mediciones del campo magnético en las proximidades de la bobina inductora en diferentes condiciones.

| <b>Distancia Sonda-bobina</b> | <b>Jaula solenoide</b> | <b>Puerta estufa</b> | <b>Jaula estufa</b> | <b>Campo magnético</b> |
|-------------------------------|------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|
| 20 cm                         | Desconectada           | Abierta              | Desconectada        | 9 mT                   |
| 20 cm                         | Conectada              | Abierta              | Desconectada        | 6 mT                   |
| 30 cm                         | Conectada              | Abierta              | Desconectada        | 4 mT                   |
| 30 cm                         | Conectada              | Cerrada              | Desconectada        | 3 mT                   |
| 30 cm                         | Conectada              | Cerrada              | Conectada           | 0-1mT                  |

También se realizan las mediciones en el interior de la bobina para comprobar, de una manera práctica, la relación que existe entre el valor

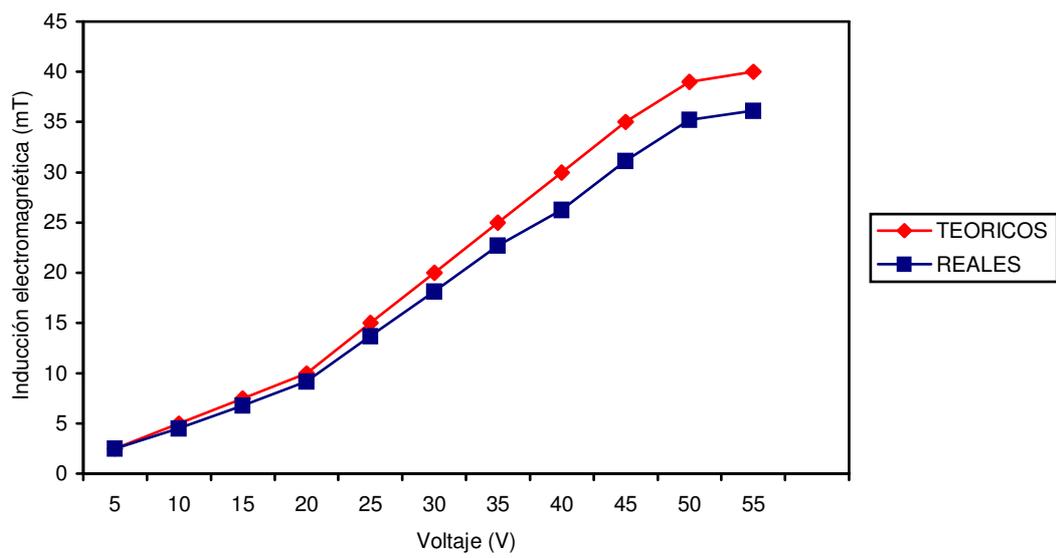
teórico de CEM aplicado y el valor práctico obtenido (éste último debe ser menor por la pérdida de energía existente).

Para ello se introduce la sonda del fluxómetro en el interior de la bobina y se aplican los voltajes e intensidades teóricos, con el fin de conocer sus respectivas inducciones electromagnéticas (Tabla 4).

**TABLA 4:** Comparación entre flujo magnético teórico y práctico.

| <b>DENSIDADES DE FLUJO MAGNÉTICO (mT)</b> |                       |
|---|-----------------------|
| <b>VALOR TEÓRICO</b>                      | <b>VALOR PRÁCTICO</b> |
| 2.5                                       | 2,4780                |
| 5.0                                       | 4,5114                |
| 7.5                                       | 6,8368                |
| 10  | 9,1650                |
| 15  | 13,6878               |
| 20  | 18,1344               |
| 25  | 22,7198               |
| 30  | 26,2742               |
| 35  | 31,1470               |
| 39  | 35,2197               |
| 40  | 36,1228               |

Las diferencias entre los valores teóricos (aplicados) y los prácticos (obtenidos por medición directa del campo con el fluxómetro) son, en todos los casos, inferiores al 10% lo que, dadas las características del material experimental y del tipo de corriente aplicado, puede considerarse aceptable (Figura 10).



**Figura 10:** Valores teórico/reales de las inducciones electromagnéticas del solenoide

### 3.2.2 Control de las condiciones de incubación

#### a) Temperatura

El paso de la corriente a través de la bobina provoca un desprendimiento de energía en forma de calor (efecto Joule); por este motivo y con el fin de no alterar la temperatura normal de incubación, se realizó un estudio específico de la misma.

Se calculó, en base a la “ley de Joule”, el calor extra que generaba la bobina conectada a la máxima potencia:

$$Q = R \cdot I^2 \cdot t \cdot 0.24$$

Donde:

**Q**= Energía calorífica desprendida por la resistencia al paso de la corriente por el hilo conductor

**R**= Resistencia total de la bobina (Ohm)

**I**= Intensidad de la corriente (A)

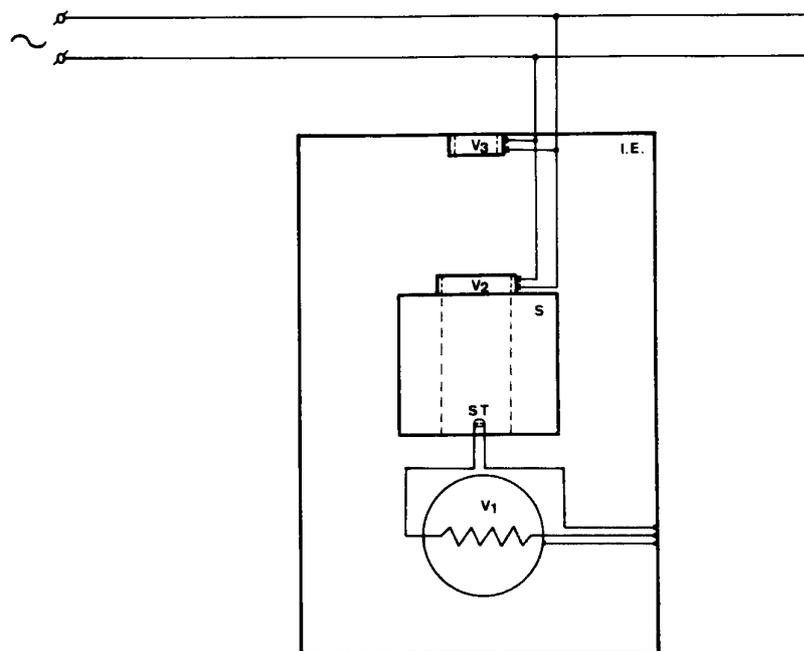
**t**= tiempo de funcionamiento (s)

La energía calórica generada por la bobina en estas condiciones fue de:

$$Q = 16.71 \text{ calorías/segundo}$$

Los valores reales de la temperatura de incubación se obtiene por mediación de un segundo termostato colocado en el interior de la bobina, en la zona donde se colocan los huevos, V1 (Figura 11)

Como el sistema de refrigeración propio de la incubadora es insuficiente para reducir el exceso de calor generado, se instalan dos ventiladores suplementarios ( V2 y V3) en su interior del siguiente modo (Figura 11)



**Figura 11.** Esquema eléctrico de la incubadora de los huevos expuestos (IE)

S = Solenoide V<sub>1</sub>,V<sub>2</sub>,V<sub>3</sub> = Ventiladores

ST = Sensor temperatura

Ventilador 1 (V2) situado en el extremo de la bobina, dando lugar a un flujo de aire que circula por el interior de la bobina.

Marca: Papst-Lufter Motoren KG.

Modelo: 8550N.

Tensión: 220v 50-60 Hz

Potencia: 13/15 W 1200/1300 rpm

Ventilador 2 (V3), situado en la pared de la estufa, concretamente en el propio orificio de ventilación, que facilita la disminución de la temperatura por forzar el intercambio de aire.

Marca: Papst-Lufter Motoren KG.

Modelo: 8440N

Tensión: 220v 50-60Hz

Potencia: 13/15W 1000/1150 rpm

Una vez conectados los ventiladores suplementarios, se repitieron los controles de temperatura en el interior de la incubadora en la que se instala el solenoide.

Las mediciones se realizaron combinando las siguientes posibilidades:

1. Bobina (C) a distintas intensidades y (D) desconectada.
2. Temperatura en el interior del solenoide (BOBINA) y en su exterior (temperatura AMBIENTE de la incubadora).
3. Variación en la conexión (C) y desconexión (D) de los distintos ventiladores.

Los resultados obtenidos se exponen en la tabla 5.

**Tabla 5.** Controles prácticos y ajustes de la temperatura de incubación.

| BOBINA | VENTILADORES |   |   | TEMPERATURAS °C |          |
|--------|--------------|---|---|-----------------|----------|
|        | 1            | 2 | 3 | BOBINA          | AMBIENTE |
| D      | D            | D | D | 25              | 25       |
| D      | C            | C | C | 28              | 28       |
| C      | D            | D | D | 44              | 40       |
| D      | C            | D | D | 27              | 27       |
| C      | C            | D | D | 43              | 37       |
| C      | C            | C | D | 40              | 36       |
| C      | C            | C | C | 36              | 35       |

D: Bobina desconectada      C: Bobina conectada

Se comprobó que con el solenoide conectado, produciendo la máxima intensidad de campo magnético, y los tres ventiladores en funcionamiento se provocaba una circulación de aire caliente en la incubadora que mantenía la temperatura en el interior de la bobina a un mínimo de 36°C.

Esto permitió que variando según las necesidades el número de ventiladores en funcionamiento, pudiéramos garantizar una temperatura

de incubación constante de 37,5°C para todas las series de embriones expuestos.

b) Humedad

El grado de humedad en el interior de las incubadoras se midió de forma continua por un higrómetro comercial, marca Brut-Hygrometer y se mantuvo en valores superiores al 70%.

### 3.3 MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado para la realización de la presente tesis doctoral consta de un total de 220 huevos fecundados de la raza White Leghorn (*Gallus domesticus*) obtenidos de una granja comercial (Nueva Comarcal, Reus, España)

### 3.4 EQUIPO DE MORFOMETRÍA

El estudio morfométrico se realizó (Figura 12) en un procesador de imágenes MOP-VIDEOPLAN 2000 Kontron, que cuenta con una CPU (Unidad Central de Proceso) tipo Z80 que funciona con un sistema operativo CP/M 86, implementado con un programa básico compilado en MS/BASIC, que hace posible la recogida de datos de los periféricos, la gestión de archivos y de los protocolos de medida realizando posteriormente un mínimo tratamiento estadístico de los resultados.

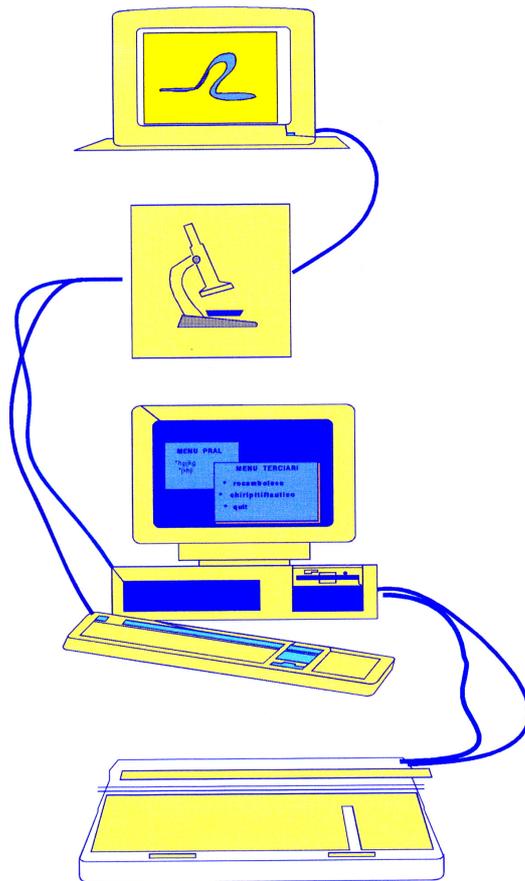
La unidad central de proceso tiene incorporados los siguientes periféricos:

- Cámara de video (Hitachi) conectado a un microscopio planapocromático (Zeiss).
- Digitalizador planimétrico.
- Monitor de televisión de alta resolución (Sony Trinitron).
- Impresora HP color

La medición de los parámetros a determinar se efectuó con la imagen proyectada sobre un monitor de televisión y las medidas se obtuvieron con un lápiz de lectura óptico.

Los valores obtenidos fueron transferidos mediante un bus RS232 Centronics, redireccionando la salida de impresora a un ordenador AT; lo

cual permitió un cálculo estadístico de los datos, más completo que el que permitía el implementado en el morfómetro.



**Figura 12:** Unidad de morfometría

## MÉTODOS

### 3.5. SERIES EXPERIMENTALES

Se emplean un total de 220 huevos fecundados de la raza White-Leghorn, de los cuales 180 han sido incubados bajo la acción del campo electromagnético generado, y se han considerado expuestos y 40 han sido incubados sin dicha influencia y se consideran controles.

Tanto los huevos controles como los expuestos, fueron colocados en la incubadora correspondiente, con su polo más agudo orientado hacia el sur del campo.

Condiciones físicas de incubación:

- Temperatura 37,5 °C
- Humedad superior al 70 %, medida de forma continua por un higrómetro comercial marca Brut-Hygrometer.
- Volteo de los huevos: automático una vez cada hora.
- Condiciones lumínicas: oscuridad durante todo el periodo de incubación.

Los embriones utilizados se han sacrificado a los 10, 15 ó 21 días de incubación y su estadio de desarrollo se determina según de Hamburger y Hamilton (1951).

Las intensidades de CEMc utilizadas han sido de: 9,1 mT, 13,6 mT, 22,7 mT, 26,2 mT y 31,1 mT.

La elección de los huevos de una misma puesta para ser destinados a controles o expuestos, así como para ser sacrificados en una determinada fecha, se randomiza mediante una serie de números aleatorios obtenidos por ordenador.

Las series, finalmente quedan constituidas tal y como indican las tablas 6 y 7.

**Tabla 6:** Distribución de los embriones sacrificados a los 10 y 15 días

| INTENSIDAD | SERIE | EXPUESTOS | EXPUESTOS |         | CONTROL | CONTROL |         |
|------------|-------|-----------|-----------|---------|---------|---------|---------|
|            |       |           | 10 DIAS   | 15 DIAS |         | 10 DIAS | 15 DIAS |
| 9,1 mT     | A     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
|            | B     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
|            | C     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
| 13,6 mT    | A     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
|            | B     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
|            | C     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
| 22,7 mT    | A     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
|            | B     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
|            | C     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
| 26,2 mT    | A     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
|            | B     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
|            | C     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
| 31,1 mT    | A     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
|            | B     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |
|            | C     | 8         | 4         | 4       | 2       | 1       | 1       |

**Tabla 7:** Distribución de los embriones sacrificados a los 21 días

| INTENSIDAD | EXPUESTOS | CONTROLES |
|------------|-----------|-----------|
| 9,1 mT     | 12        | 2         |
| 13,6 mT    | 12        | 2         |
| 22,7 mT    | 12        | 2         |
| 26,2 mT    | 12        | 2         |
| 31,1 mT    | 12        | 2         |

### 3.5.1 Identificación de los embriones

Cada embrión se identifica mediante dos letras y un número.

|               |                     |               |
|---------------|---------------------|---------------|
| LETRA DE EDAD | LETRA DE INTENSIDAD | Nº DE EMBRION |
|---------------|---------------------|---------------|

La primera letra señala la edad de sacrificio del embrión:

- **T** para los sacrificados a los 10 días
- **L** para los sacrificados a los 15 días
- **V** para los sacrificados a los 21 días

La segunda letra señala la intensidad de campo bajo la que se ha incubado el embrión:

- **A** corresponde a 9,1 mT
- **B** corresponde a 13,6 mT
- **D** corresponde a 22,7 mT
- **E** corresponde a 26,2 mT
- **F** corresponde a 31,1 mT
- **X** corresponde a los controles

El número identifica al embrión dentro de cada grupo: de **0** a **12**.

### 3.5.2 Exteriorización de los embriones

A la totalidad de los embriones, tras su exteriorización e independientemente del período en que son sacrificados y de su pertenencia al grupo control o expuesto, se les determina estadio, peso y talla.

El sacrificio de los embriones, tras su extracción del huevo, se ha realizado en todos los casos, en la franja horaria de 9 h a 11 h.

### **3.6 DETERMINACIÓN DEL ESTADIO, PESO Y TALLA**

Para la valoración del estadio, se ha utilizado una lupa binocular marca Zeiss, modelo 475057, con dispositivo incorporado para cámara fotográfica marca Fujica modelo ST 901 y una fuente de luz fría marca Schott, modelo KL1500.

Se siguen los criterios de estadiaje de Hamburger y Hamilton (1951) para el embrión de pollo, para cada una de las edades estudiadas, 10, 15 y 21 días de incubación.

Previo a la determinación del peso de los embriones, se coloca el embrión durante unos segundos sobre papel de filtro de laboratorio, para que este absorba el líquido periférico. Para este fin, se utiliza una báscula electrónica marca Sartorius analytic, modelo A2005, de alta precisión.

La talla en milímetros (mm), entendida como la distancia vértex-cóccix, se determina con una cinta métrica.

### **3.7 PROCESADO PARA MICROSCOPIA ÓPTICA**

Las muestras se fijan en formaldehído al 10 %. En los embriones de 10 y 15 días, se fija toda la cabeza, tras cortar transversalmente el cuello del embrión.

En el caso de los embriones de 21 días, se realiza la exéresis del encéfalo; durante esta manipulación, las cabezas de los pollitos, tras ser separadas del tronco se mantienen sumergidas en el mismo líquido fijador.

Tras el lavado de las muestras para eliminar el fijador, se secan en papel de filtro y se deshidratan en una serie creciente de alcoholes.

La imbibición de parafina de las muestras se tiene lugar en el interior de una estufa marca P-Selecta modelo 207, a 60 °C.

Mediante un microtomo (Reichter-Jung, modelo 2030) provisto de cinta transportadora, se realizan cortes seriados, en el plano sagital, de 7 µm de grosor. Los cortes así obtenidos, se adhieren a los portas mediante una fina capa de gelatina oro y se mantienen 24 horas en una estufa, a 40 °C.

La tinción posterior de las muestras se realiza con Hematoxilina-Eosina.

### **3.8 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS CORTES**

De entre todos los cortes en que aparece la glándula pineal se selecciona aquel en el que se realizarán las mediciones. Este corte será el MEDIO, es decir, aquel en el que el número de cortes anteriores a él sea igual al de cortes posteriores (por ejemplo, si se han realizado 101 cortes de la glándula pineal, las mediciones se realizarán en el número 51, tendremos 50 cortes anteriores y 50 posteriores al escogido).

### 3.9 PARÁMETROS ESTABLECIDOS

En el estudio morfométrico de la glándula pineal del embrión de pollo, se han definido distintos parámetros, en los que se ha tenido en consideración los siguientes factores como fuente de variabilidad estructural y/o metodológica:

- 1) La forma irregular y el crecimiento asimétrico de la glándula pineal en las distintas etapas del desarrollo.
- 2) La orientación de corte de la cabeza del embrión y por tanto de la glándula pineal.
- 3) La dificultad en obtener la orientación ideal de los cortes, dada la flexión del embrión y el pequeño tamaño de la glándula pineal.

Tanto para la selección de los cortes como para el estudio de las distancias y diámetros, se ha utilizado una Lupa estereoscópica binocular marca Zeiss, modelo 475057, con ocular milimetrado, dispositivo incorporado para cámara fotográfica (Fujica ST 901) y una fuente de luz fría (Schott KL1500).

Para la determinación de las áreas y de las densidades, se ha utilizado un Sistema de análisis de imagen semiautomático (MOP-VIDEOPLAN 2000, KONTRON), que cuenta con una Unidad Central de Proceso tipo Z80 y funciona con un sistema operativo CP/M 86. La unidad central de proceso tiene incorporados los siguientes periféricos:

- Video cámara color HITACHI, modelo VK-C2000E, conectada a un microscopio ZEISS.
- Digitalizador planimétrico.
- Monitor de televisión Sony Triniton RGB, modelo KX-14CP1.

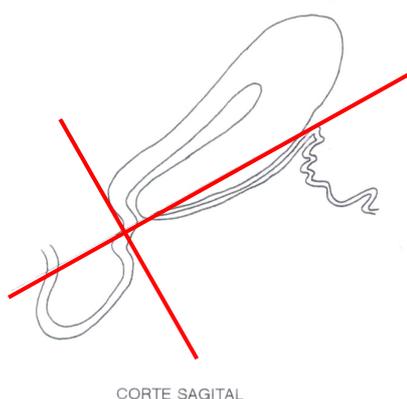
La obtención de estos últimos parámetros se realiza a partir de la imagen proyectada sobre un monitor de televisión, mediante un lápiz de lectura óptico.

De forma previa y sistemáticamente, antes de la obtención de cada uno de los parámetros, se procede a la calibración del microscopio con un micrómetro objetivo en función de los aumentos utilizados, que han sido

- Embriones de 10 y 15 días: medida áreas x 25.
- Embriones de 21 días: medida áreas x 10.

Para poder realizar las distintas mediciones, se establece previamente un eje de coordenadas:

Partiendo del ángulo formado por la inclinación frontal de la glándula pineal con el techo del diencefalo, se traza una tangente con el punto más alto del techo del diencefalo; a esta línea se le denomina eje horizontal. Se traza una línea perpendicular a la anterior y tangente al extremo posterior de la glándula, a esta línea se le denomina eje vertical.

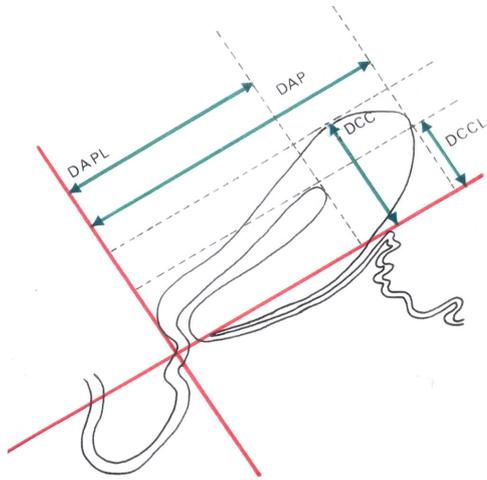


**Figura 13:** Esquema de corte sagital con el eje de coordenadas

### 3.9.1 Distancias

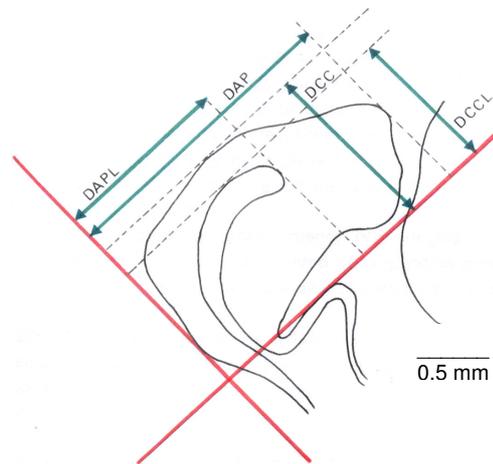
Se define como distancia a la longitud, en milímetros, entre un punto determinado de la glándula pineal y otro punto externo a ella. Son indicadores de la disposición de la glándula pineal en la cabeza del embrión. (figuras 14, 15 y 16))

- **Distancia anteroposterior (DAP):** longitud, entre el eje vertical y una línea paralela a éste y tangente al extremo más anterior de la glándula pineal.
- **Distancia anteroposterior de la luz (DAPL):** longitud entre el eje vertical y una línea paralela a éste y tangente al extremo anterior de la luz de la glándula.
- **Distancia craneocaudal (DCC):** longitud entre dos líneas paralelas al eje horizontal y tangentes a los extremos craneal y caudal, respectivamente, de la glándula pineal.
- **Distancia craneocaudal de la luz (DCCL):** longitud entre dos líneas paralelas al eje horizontal, uno tangente al extremo caudal de la glándula y otro tangente al extremo craneal de su luz.
- **Proporción entre DAPL/DAP:** proporción que se establece entre la distancia antero-posterior total y la de la luz.
- **Proporción entre DCCL/DCC:** proporción que se establece entre la distancia cráneo-caudal total y la de la luz.



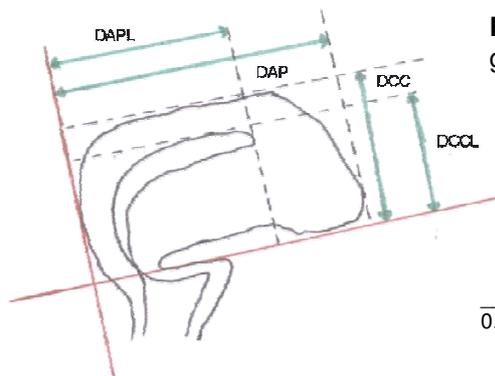
**Figura 14:** Distancias determinadas en la glándula pineal de los embriones de 10 días

0.2 mm



**Figura 15:** Distancias determinadas en la glándula pineal de los embriones de 15 días

0.5 mm



**Figura 16:** Distancias determinadas en la glándula pineal de los embriones de 21 días

0.8 mm

### 3.9.2 Diámetros

Se define como diámetro la longitud en milímetros, entre dos puntos de la propia glándula pineal. Los diámetros son indicadores del tamaño de la glándula. A cada una de las tres divisiones de un diámetro se le denomina segmento. Los segmentos indican la longitud proporcional de las distintas paredes de la glándula pineal. (Figuras 17,18 y 19)

- **Diámetro sagital:** longitud entre los extremos anterior y posterior de la glándula pineal, medida sobre una línea paralela al eje horizontal y que atraviese la luz glandular, a 21  $\mu\text{m}$  de su punto más craneal. El diámetro sagital se subdivide en tres segmentos:

Segmento sagital posterior: Longitud entre los extremos posteriores de la pared y de la luz de la glándula pineal, corresponde a la pared posterior de la glándula.

Segmento sagital de la luz: Longitud entre los extremos anterior y posterior de la luz de la glándula pineal.

Segmento sagital anterior : Longitud entre los extremos anteriores de la luz y de la pared de la glándula pineal, corresponde a la zona apical de la glándula.

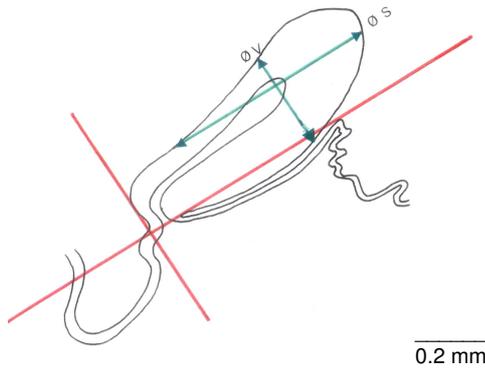
- **Diámetro vertical.** Longitud entre el extremo superior e inferior de la glándula pineal, medida sobre una línea paralela al eje vertical que atraviesa la luz y situado a 21  $\mu\text{m}$  del extremo más apical de la luz glandular. El diámetro vertical se subdivide en tres segmentos:

Segmento vertical superior : longitud entre los extremos superiores de la pared y de la luz de la glándula pineal, corresponde a la pared posterior de la glándula.

Segmento vertical de la luz : longitud entre los extremos superior e inferior de la luz de la glándula pineal.

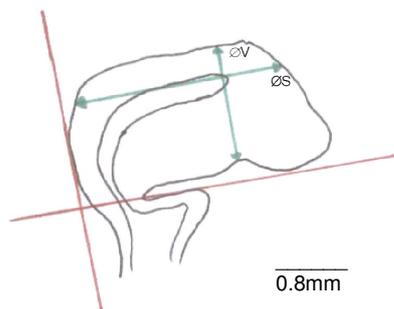
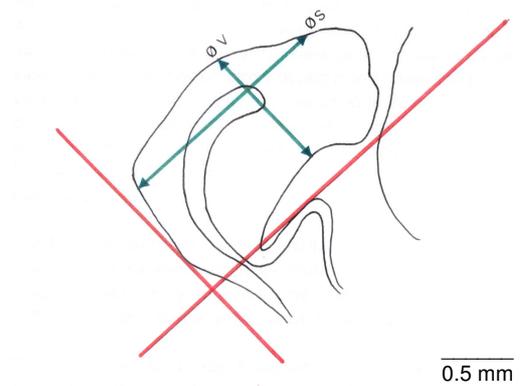
Segmento vertical inferior : longitud entre los extremos inferiores de la luz y de la pared de la glándula pineal, corresponde a la pared anterior de la glándula.

Se han estudiado los segmentos según el porcentaje que representan sobre el diámetro estudiado.



**Figura 17:** Diámetros determinados en la glándula pineal de los embriones de 10 días.

**Figura 18:** Diámetros determinados en la glándula pineal de los embriones de 15 días.

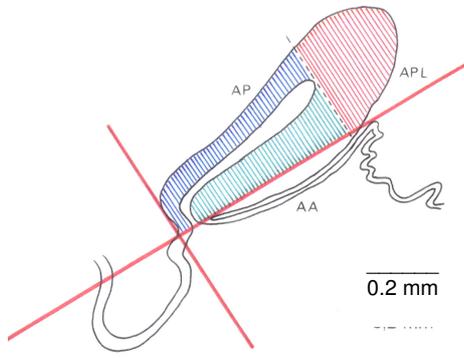


**Figura 19:** Diámetros determinados en la glándula pineal de los embriones de 21 días

### 3.9.3 Áreas

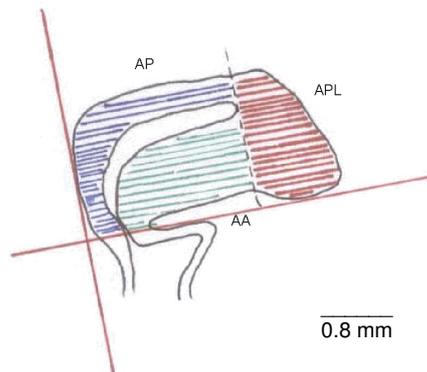
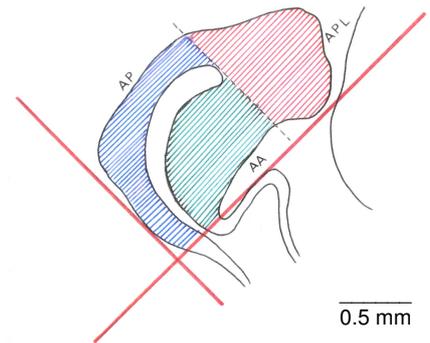
Se considera área ( $\text{mm}^2$ ), a una determinada superficie de la glándula pineal delimitada: por sus propias paredes, los ejes de coordenadas establecidos y/o líneas paralelas a los mismos, (Figuras 20, 21 y 22), así:

- **Área apical (APL):** Región de parénquima glandular que queda delimitada por la superficie más distal de la glándula y una línea paralela al eje vertical y tangente al extremo más distal de la luz glandular.
- **Área anterior (AA):** Región de parénquima glandular delimitada por las paredes anteriores de la glándula y su luz, por la porción de eje horizontal que corta dicha región por su base y el límite de la región apical.
- **Área posterior (AP):** Región de parénquima glandular delimitada por las paredes más posteriores de la glándula y su luz, la porción de eje vertical que corta dicha región por su base y el límite de la región apical.



**Figura 20:** Áreas determinadas en la glándula pineal de los embriones de 10 días

**Figura 21:** Áreas determinadas en la glándula pineal de los embriones de 15 días.



**Figura 22:** Áreas determinadas en la glándula pineal de los embriones de 21 días

### **3.9.4 Densidad vesicular**

En cada una de las áreas determinadas, apical, anterior y posterior, se realiza el conteo de vesículas, que se determinan como cada una de las agrupaciones de células parenquimales, dispuestas radialmente, con una luz central.

Así quedarán definidos los siguientes parámetros de densidad:

- Número de vesículas / área apical
- Número de vesículas / área anterior
- Número de vesículas / área posterior

### 3.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los datos obtenidos se ha realizado por el paquete informático SPSS, versión 6.1.

□ **Análisis descriptivo:**

La descripción de las variables se ha efectuado mediante media y desviación estándar.

□ **Análisis Univariable**

La comparación de grupos se ha efectuado mediante análisis de la varianza de un factor (ANOVA). Para comparaciones múltiples de los grupos dos a dos, se ha practicado la corrección de Bonferroni.

El nivel de significación estadística aceptado para la comparación inicial ha sido de  $p < 0,05$ .