



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FES Iztacala**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**



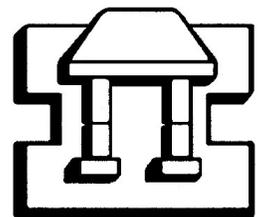
**IMPLEMENTACIÓN DE UNA TÉCNICA COMBINADA  
PLASTINACIÓN-TRANSPARENTACIÓN PARA EL ESTUDIO  
DEL ESQUELETO DE MAMÍFEROS**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**B I Ó L O G A**  
P R E S E N T A :

**AURORA MINERVA KIRWAN ALCÁNTARA.**

DIRECTOR DE TESIS :  
M. en Neurociencias  
**JORGE RICARDO GERSENOWIES RODRÍGUEZ.**

Laboratorio de Anatomía Comparada. Unidad  
de Morfología y Función.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



## CONTENIDO

## INDICE

	PÁGINA
RESUMEN.....	01
I. INTRODUCCIÓN.....	02
II. ANTECEDENTES.....	05
II.1 PERSPECTIVA HISTÓRICA.....	05
a) Grecia.....	05
b) Roma.....	06
c) África .....	06
d) Arabia.....	06
II.2 DISECCIÓN.....	07
a) ANATOMISTAS DE LOS SIGLOS XVI Y XVIII.....	07
II.3 PRESERVADORES Y EMBALSAMAMIENTO.....	07
II.4 PARAFINIZACIÓN E INCLUSIÓN EN PARAFINA.....	10
II.5 TRANSPARENTACIÓN.....	11
II.6 INCLUSIÓN EN RESINA.....	12
II.7 PLASTINACIÓN.....	13
III. JUSTIFICACIÓN.....	14
IV. OBJETIVOS.....	15
DIAGRAMA DE FLUJO.....	16



<b>V. MÉTODO</b> .....	<b>17</b>
<b>V.1 Obtención de los organismos</b> .....	<b>17</b>
<b>V.2 Sacrificio</b> .....	<b>18</b>
<b>V.3 Fijación</b> .....	<b>19</b>
<b>V.4 Transparentación</b> .....	<b>19</b>
<b>V.5 Plastinación</b> .....	<b>20</b>
a) <b>DESHIDRATACIÓN</b> .....	<b>20</b>
b) <b>INMERSIÓN EN SUSTANCIAS MISCIBLES CON RESINA</b> .....	<b>21</b>
c) <b>IMPREGNACIÓN PASIVA</b> .....	<b>21</b>
d) <b>CURADO O ENDURECIDO</b> .....	<b>21</b>
<b>V.6 Técnica histológica</b> .....	<b>22</b>
<b>VI. RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
a) <b>FIJACIÓN</b> .....	<b>23</b>
b) <b>USO DE SOLUCIÓN DE ROJO DE ALIZARINA “S” AL 1% PARA TEÑIDO</b> .....	<b>25</b>
c) <b>ALGUNAS OPCIONES</b> .....	<b>27</b>
d) <b>LA ACCIÓN DEL TINTE DE ALIZARINA Y EL HUESO</b> .....	<b>29</b>
e) <b>COMPONENTES ÓSEOS</b> .....	<b>30</b>
f) <b>EJEMPLARES PLASTINADOS</b> .....	<b>32</b>
g) <b>EN EL ESTUDIO HISTOLÓGICO</b> .....	<b>33</b>
<b>VII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>35</b>



a) Conservadores.....	35
b) Proceso de transparentación.....	35
c) Utilidad de la tinción con Rojo de Alizarina “S” .....	36
d) Etapa de preparación previa al impregnación con resinas poliéster.....	37
<b>X. CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>XI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>41</b>
<b>XII. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>42</b>
<b>XIII. ANEXOS.....</b>	<b>52</b>
ANEXO 1.....	53
ANEXO 2.....	57
ANEXO 3.....	64





## RESUMEN

A las estructuras que constituyen al organismo y permiten reconocerlo y describirlo como objeto de estudio anatómico, se suman métodos alternativos, así, la combinación de dos técnicas, transparentación y plastinación, dio como resultado la diafaniplastinación, como contribución de este trabajo. Resuelve problemas de conservación, evitando emplear productos que necesitan renovarse y provocan en los usuarios, serios problemas de salud. El fenómeno que más afectó los procesos haciéndolos más lentos, fue la temperatura ambiente baja. En este estudio, las mejores transparentaciones fueron las efectuadas en ejemplares frescos, sin embargo, en su mayoría resultaron viables. Se considera que el proceso en general es económico y accesible. En conclusión, los modelos después de la diafaniplastinación, resultan inodoros, durables, no tóxicos, manipulables, prácticos y eficaces. Se espera que la diafaniplastinación sea de gran utilidad en áreas de Anatomía patológica y en centros de enseñanza secundaria, media superior y sobre todo de estudios superiores y universitarios, así como en laboratorios para el estudio de la zoología, taxidermia y otros, además de su aprovechamiento en museografía y demostraciones anatómicas de arte, y en modelos de estudio osteológico de los distintos tipos de vertebrados tiene un amplio potencial.



## I.- INTRODUCCIÓN

Los Biólogos y demás científicos necesitan del desarrollo de técnicas que les ayuden en su quehacer científico dado que les permite incrementar el grado de exploración de los fenómenos naturales. La optimización de métodos y técnicas, facilita su ejercicio como ciencia.

Como área central de la Biología, la Anatomía Animal Comparada se refiere al estudio de la estructura de los organismos, las relaciones entre sus diferentes componentes así como su evolución y adaptaciones al medio. Su mayor influencia se ejerce en la fisiología a la cual están destinadas. El nivel de organización sistemático para el estudio de las estructuras puede abarcar desde el nivel celular y tisular o histológico [Tórtora y Reynolds, 1998].

Los intentos para preservar un cuerpo se remontan a civilizaciones como la egipcia y algunas culturas americanas, entre ellas la azteca [Arráez, 1997]. Es entonces en 1551 que se funda la universidad de la Nueva España, donde se realizaban estudios de Cirugía, impulsando el uso de la disección y por ende dando gran importancia a la Anatomía [Bandera, 1929],

Desde tiempos remotos, se experimentaron varios tipos de sustancias químicas con el objeto de obtener preparaciones anatómicas duraderas que preservaran la estructura de las células y tejidos en forma semejante al estado vivo y permitieran realizar posteriormente, el conocimiento de su constitución [Arráez, 1997]. Estas sustancias que preservan la arquitectura celular y tisular, detienen la autólisis, previenen la multiplicación de bacterias, y endurecen los tejidos, son denominadas fijadores [Hildebrand, 1969], de los cuales los más utilizados, son los derivados aldehídicos [formaldehído, paraformaldehído, glutaraldehído, acroleína] así como el ácido ósmico, el tetróxido de osmio, los compuestos mercúricos y crómicos, los alcoholes, la acetona, el dietil-pirocarbonato, la carbodiimida, los imidatos y las benzoquinonas entre otros [Wollman, 1955, 1956; Lev and Thomas, 1955; Davenport, 1960; Avers, 1963; Lillie, 1965; Baschong and Baschong-Presiabnotto, 1983].



El formaldehído, es un producto químico ampliamente utilizado en la industria, así como un poderoso germicida, fungicida y preservador. En 1893 se revela que fue sintetizado veinticinco años antes por el químico alemán August W. Von Hofman. Actúa sobre las proteínas haciéndolas insolubles e imputrescibles, por lo que se usa en terapéutica como antiséptico y desinfectante, y en el laboratorio como fijador de muestras histológicas y como conservador de estructuras si éstas son sumergidas en su medio (Arráez, 1997).

La disección anatómica, gracias a los conservadores, puede realizarse por tiempos prolongados. Por otra parte, por su acción lipolítica, facilita la incisión (Valdez, 1999). En la enseñanza e investigación anatómica y zoológica, la exhibición de ejemplares íntegros o en cortes, además de elemental, es un trabajo universalmente aceptado (Bickle, et al., 1981). Debido a la necesidad de que los tejidos puedan ser manipulados e incluso cortados, sin provocar en ellos alteraciones, se estimuló la generación de técnicas como la parafinización que conserva indefinidamente ciertos organismos aparentando su forma o posición natural. Esto evita que los organismos para conservarse, tengan que estar inmersos en sustancias tóxicas. La única restricción de la parafinización, reportada por García-Domínguez (1987) es su uso en especies con plumas o pelos pues afecta el aspecto de tales estructuras (Lynch, 1972; Lynch et al, 1979; Humason, 1970; Martoja y Martoja, 1970; García-Domínguez, 1987).

El avance de las técnicas continúa, así, los métodos de transparentación y tinción, han complementado el impulso del estudio osteológico de diversos vertebrados (Hollister, 1934, Gostonyi, 1984, Dingerkus and Ulher, 1981). Sus usos particulares van desde la enseñanza e investigación anatómica de organismos completos, órganos del cuerpo por separado, cortes histológicos de uso didáctico, así como también en la demostración de ejemplares zoológicos de museo y hasta de tipo artesanal (Bridgman y Humelbaugh, 1963; Karnoswsky, 1965; Gersenowies y González, 1993), así como el descubrimiento de estructuras anatómicas que de otra forma pasarían desapercibidas (Ortega-Ortiz, et al., 2000).

La representación tridimensional y tangible de estructuras que constituyen al organismo y permiten reconocerlo y describirlo como objeto de estudio (Gersenowies y González, 1993), se ha logrado por medio de la impregnación de polímeros sintéticos que determinan las propiedades ópticas: transparentes u opacas, y propiedades mecánicas: flexibles o firmes



reportadas por Borek (1986) y Prasad y Willians (1991). Este método conocido como Plastinación, fue desarrollado por Von Hagens (1979 a) y reproducido, o bien continuado por distintos investigadores a través del mundo, adecuándolo a las posibilidades del lugar, institución o presupuesto disponibles.

La plastinación es la técnica más moderna para la preservación macroscópica del material biológico destinado a la enseñanza y exhibición museográfica. El desarrollo de polímeros apropiados para esta técnica, fue un paso importante para el uso práctico de la misma que consiste básicamente en la sustitución de los fluidos celulares y/o tisulares, principalmente agua y lípidos, por resinas elásticas de silicón o rígidas epóxicas (Von Hagens, 1979 b). La dificultad está en que estos polímeros no están disponibles de manera comercial y los que se dispone, sus posibles usos no han sido debidamente investigados (Gersenowies y Gonzáles, 1993).

La aportación de este trabajo es la combinación de dos técnicas: la transparentación y la plastinación, llamadas aquí diafanoplastinación, la que permitiría obtener preparaciones anatómicas de utilidad en el estudio de la morfología de los vertebrados. Dicha combinación no se ha llevado a la práctica por lo que no existen reportes al respecto, Esta es una adaptación que potencialmente tiene las ventajas de cada una de estas técnicas y que además en conjunto son posiblemente la forma más adecuada para estudiar el esqueleto de diversos mamíferos, en especial los de tamaño pequeño.



## II.- ANTECEDENTES

### II. 1 PERSPECTIVA HISTÓRICA

La anatomía, es una ciencia cuyos orígenes se remontan a la prehistoria, y sus estudios sistemáticos se reportan en el código de Hammurabi en Babilonia (1752—50 a C), Numerosas tablas de arcilla en Nínive, y Azur, papiros egipcios con descripciones de corrientes sanguíneas [papyrus d'ébers, v 1550 avant J. C.] del año 1550-1600 a. C., además de otros [Chevallier, 1995].

El término de Anatomía Comparada aparece por primera vez, teniendo una connotación moderna, en los escritos de **Nehemiah Grew** en 1677 [Cole, 1975].

Los principios biológicos, son objeto de la inexorable ley de la evolución por selección natural, por lo que la elucidación de la relación de un órgano en un animal en comparación con la característica correspondiente en otro, nos permite diferenciar la analogía del proceso natural del desarrollo de las estructuras y la influencia selectiva del medio en el esquema independientemente establecido entre dos órganos [Cole, 1975].

Entre los estudiosos, filósofos y naturalistas, que han contribuido al crecimiento de la Anatomía animal comparada, tenemos a:

#### **Grecia**

**Aristóteles de Estagira** (384-322 a C.), importante biólogo griego, precedido por civilizaciones como Babilonia, Egipto así como filósofos griegos. Aristóteles, fue fundador de la ciencia biológica [Cole, 1975]. Fue el primer investigador que separó las ciencias biológicas de los problemas teológicos e hizo un reconocimiento de los patrones morfoestructurales para el establecimiento de la clasificación de los animales en base a los géneros naturales [Gersenowies, 2000].

**Lucrecio** [Titus Lucretius Carus; 98-55 a C.], de origen romano, ejemplo de actitud práctica para los griegos, escribió De la Naturaleza de las cosas [De rerum Natura] donde afirma que nada se genera de la nada y el nacimiento de los seres consta de corpúsculos mínimos e indivisibles [Gersenowies, 2000]



## Roma

**Claudio Galeno** de Pérgamo (130-200 d C.), basó sus estudios en los métodos desarrollados por Aristóteles. Médico Griego residente en Roma, versado en anatomía comparada con su propia concepción teológica de la misma. (Cole, 1975; Valdéz, 1999) Se destacó también por sus estudios sobre la médula espinal, mecanismo de respiración y sistema cardiovascular,

**Bartolomeo Eustaquio** (1530-1574 d C.), fue profesor de Anatomía en Roma durante el Renacimiento, donde revisó los trabajos de Vasalio, complementándolos (Gersenowies, 2000).

## África

**Herófilo** de Calcedonia (315-255 a C.), con gran apoyo de los reyes Ptolomeos, llegó a la conclusión que el cerebro posee la función primordial de la inteligencia (Gersenowies, 2000), según Galeno, fue de los primeros en diseccionar tanto animales como seres humanos (Pérez, 1997),

**Erasístrato** de Chíos (310-245 a C.), se distinguió en fisiología y trabajó en conjunto con Herófilo con el mismo apoyo de los reyes Ptolomeos. Hizo disecciones animales y humanas en el S VI y junto a Herófilo, se consideran como los sabios que formalizaron y sistematizaron el estudio de la anatomía descriptiva tanto animal como humana (Cooperias, 1990; Pérez, 1997; Gersenowies, 2000),

## Arabia

Tras la caída del imperio romano, los árabes y el imperio de Bizancio conservaron los antiguos escritos griegos, tratando de revivir la antigua ciencia por personajes como Alberto Magno, Mondito de Luzzi, Ermolao Barbaro, Thomas Linacre, Ginter de Andrenach y Leonardo da Vinci, principalmente:

**Alberto Magno** (1200-1280 d C.), destacó por sus conocimientos en ornitología, embriología y zoología, y criticó y complementó la obra de Aristóteles "Animalibus" en su obra "De Animalibus XXIV" (Gersenowies, 2000).



## II.2 DISECCIÓN

La disección como método de enseñanza por los anatomistas de los siglos XVI y XVII, y la necesidad de conservar los cadáveres humanos y piezas anatómicas, favoreció la aparición de procedimientos y el desarrollo de prácticas con fines educativos y científicos (Arráez, 1997).

**Leonardo de Vinci** (1452-1519), universalmente un gran genio. En contraste con los escultores griegos, además de sus obras artísticas también hizo profundos estudios de anatomía superficial del cuerpo humano. Investigó el método comparativo con animales (Cole, 1975; Chevallier, 1995).

### **Anatomistas de los siglos XVI-XVIII**

**Andrés Vesalio** (1514-1564), en el renacimiento es como el padre de la Anatomía moderna (Cole, 1975). El más grande anatomista del siglo XVI, publicó en 1543 su libro "De Humani Corporis Fabrica" (Sigerist, 1974; Cole, 1975; Chevallier, 1995), hizo una amplia crítica a la obra de Galeno, sin embargo, fue inspirado por éste en sus investigaciones (Gersenowies, 2000)

**Georges Léopold Cuvier** (1769-1832), realizó trabajos de Anatomía Animal Comparada y clasificación animal en su "Anatomie Comparee" (Gersenowies, 2000). Estableció los principios básicos que fijan las relaciones de dependencia de los distintos órganos y huesos del cuerpo de los animales (Valdéz, 1999).

## II.3 PRESERVADORES Y EMBALSAMAMIENTO

La conservación de los organismos después de la muerte, se presentó en forma natural por medio de la momificación y la fosilización con todos sus tipos de preservación en civilizaciones tan antiguas como la Egipcia o en América precolombina. Los entierros de nómadas europeos o de aristócratas chinos, además de otros, han favorecido numerosas investigaciones destinadas a evitar la descomposición de los tejidos humanos y animales. Las motivaciones religiosas del embalsamamiento y la preservación y los beneficios de inmortalidad conferida por el enfoque de divinidad que tiene la imagen de "supervivencia", dieron lugar a consideraciones que rescatan más tarde el enfoque científico de verdaderas



técnicas anatómicas de embalsamado y preservación [Correa, 2002; Gryglewski, 2002], destacando en el estudio de estos temas:

**Robert Boyle** (1627-1691), quien promovió los métodos anatómicos. Afirmó que la preservación del cuerpo humano y otros organismos en “espíritu de vino” (como entonces conocían al alcohol), con notables facultades balsámicas, resiste poderosamente la putrefacción, de partes suaves del cuerpo sin perder su consistencia [Cole, 1975].

**Marcelo Malpighi** (1628-1694 d C), descubrió la anastomosis de las arterias y las venas en rana con ayuda del microscopio [Gersenowies, 2000].

**Frederik Ruysch** (1638-1731), con una gran reputación como preparador e instructor de inyecciones anatómicas [Cole, 1975].

**Pierre Dionis** (1643-1718), usa el ácido tánico en contra del crecimiento de hongos. [Dionis, 1710; Arráez, 1997, González y González, 2002] empleado para curtir pieles por sus propiedades surfactantes (acción similar a la del jabón o los detergentes) por lo que tiene efectos antifúngicos y se usa desde tiempos ancestrales, pues se encuentra en el vino tinto y otros alimentos [Torres, 2000].

**Carl Von Linnaeus** (1707-1778 d C), sentó las bases para una clasificación natural de la nomenclatura moderna en su libro titulado “Systema Naturae” [Cole, 1975; Gersenowies, 2000].

**George Louis Leclerc** (1707-1788 d C), considerando solo a los vertebrados, se acerca a la idea de los patrones morfoestructurales básicos que se presentan en cordados, suponiendo que no sería erróneo que a través del tiempo la naturaleza produjo todos los seres orgánicos a partir de un solo ser inicial [Gersenowies, 2000].

**Johann Jacob Ritter** (1714-1784), utiliza el arsénico por su acción antifúngica [Arraez, 1997]. En la actualidad se sabe sin embargo, que el arsénico es de gran peligro para los usuarios pues inhibe la transcripción del gen hTERT, que a su vez inhibe la expresión de la telomerasa, una enzima. Una parte por millón (ppm), es una concentración muy alta según la EPA [Environmental Protection Agency] de Estados Unidos [Gryglewski, 2002].



**William Hunter** (1718-1783), utiliza el alcohol como medio de fijación y conservación [Gryglewski, 2002].

**John Hunter** (1728-1793), trabajó con su hermano probando sustancias conservadoras como el alcohol [Gryglewski, 2002].

**Karl William Sheele** (1742-1786), aplicó la glicerina para conservación de cadáveres. [Arráez, 1997]. Scheele descubrió la glicerina en 1779, en los productos de la saponificación de aceite de oliva. La glicerina posee una propiedad solvente peculiar y poderosa, y también es un preservativo excelente y sólo el alcohol lo supera, y tiene un uso considerable [Cook, 1869], Su avidez por el agua es tan amplia que reduce la humedad de los tejidos a los que se aplica, de modo acelerado. La glicerina es un higroscópico poderoso, considerablemente antiséptica, mata parásitos y preserva tejidos animales; pero las estructuras conservadas en él se tornan blandas [Felter, 1922].

**Francois Chaussier** (1746-1828), emplea el sublimado o bicloruro de mercurio para evitar la putrefacción y favorecer la momificación [Arráez, 1997], usado en la actualidad como conservador de tejidos y catalizador [Rendiles 2000]. Interfiere con la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y en elevadas concentraciones endurece células adhiriéndose a algunas enzimas causando lisis y muerte celular. Produce hemólisis en células como los eritrocitos, precedida por una masiva salida de iones de potasio pues funciona como bloqueador de los principales canales de transporte de agua [Konigsberg, 2001; Lissi, 2002]

**Jean Nicolas Gannal** (1791-1851), utiliza el arsénico como embalsamador, moderniza las primeras técnicas de conservación temporal por medio de la circulación sanguínea, como la técnica de inyección arterial, para impregnar los órganos y tejidos cadavéricos, usando entre otras sustancias, fosfato de calcio, nitrato de potasio, ácido arsenioso [su sublimado], sulfato de aluminio, y otros conservadores [L´archer, 1991].

**August Wilhem Von Hofmann** (1818-1892), químico alemán, descubre el aldehído fórmico, también llamado formol o formalina. El formol y sus derivados desde 1868 hasta la fecha, son base de la conservación de piezas anatómicas y cadáveres completos, y los más usados en las técnicas de conservación y embalsamamiento [Arraez, 1997].



**Holmes** (1842-1882) En Birminham 1887, hace, igual que Ruysch, progresos en métodos y sustancias para embalsamar (Holmes 1883, 1911; Gryglewski, 2002)

Hoy conocemos los inconvenientes del uso del formol, tanto para los anatomistas como para los estudiantes (Correa, 2002). En 1979, el Instituto de Toxicología Química Industrial de EEUU publica uno de los primeros trabajos relacionados con la toxicidad del formaldehído, confirmados por múltiples autores. (Gestal, 1993; Arráez, 1997). Algunos de los datos más importantes al respecto de los riesgos del uso del formol se encuentran en el Anexo 2, Sección 2.1.2 del presente trabajo.

## II.4 PARAFINIZACION E INCLUSIÓN EN PARAFINA:

A fines del siglo XIX, debido a la necesidad de que los tejidos pudieran ser manipulados e incluso cortados, sin provocar en ellos alteraciones, se practicaron técnicas como la parafinización de **Leo Frederick** utilizada desde 1876 (Frederick, 1876).

**Entre los que desarrollaron esta técnica se pueden mencionar:**

**Ferdinand Hochstetter** (1787-1870), disecaba sus especímenes para la enseñanza de la anatomía. Desafortunadamente, todo lo relacionado con las preparaciones de este científico, fue destruido durante los ataques de la 2ª. Guerra Mundial, (Hochstetter and Schmeidel, 1924; Hochstetter, 1927; Arráez, 1997)

**Pedro Ara** (1891-1973), utilizó la impregnación de cera-parafina para conservar características faciales. Famoso por la preservación del cadáver de Eva Perón donde experimentó con diversos complementos acompañando a la parafina, e hizo una importante estandarización de sus técnicas, que no quiso nunca revelar, pero que sin embargo le dio un gran éxito, tanto en su demostración del tiempo de duración de sus preparaciones anatómicas, así como en la apariencia de sus ejemplares logrados, todo esto a pesar de que se reporta, que en algunos casos, los cadáveres se encontraban en proceso de putrefacción de algunos de sus órganos (Ara, 1936, 1974; Arráez, 1997).



**Lynch y colaboradores** (1977), usaron la parafinización, semejante a la técnica histológica de inclusión en parafina, explicada en el apéndice No. 3, Técnica número 1 (Correa, 2002).

**Federico García-Domínguez** (1987), en el Laboratorio de Ecología Marina, del Departamento de Zoología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, realizó la técnica de inclusión en parafina, para conservar animales completos, aparentando su forma y posición natural sin estar sumergidos en fluidos conservadores, ni disecados por taxidermia (García Domínguez, 1987).

**Germán I. Garrido F. Y M. A. Cornejo** (2000), en la sección de Ciencias Morfológicas del Laboratorio de Apoyo a Histología y Biología de la FES Cuautitlán. UNAM, crearon un método de inclusión en parafina para diagnóstico rápido por medio de microondas y encontraron que el tiempo de procesado se economizaba (Robinson y Fayer, 1991; Garrido y Cornejo, 2000).

## II.5 TRANSPARENTACIÓN:

**Gloria Hollister** (1934), tiñe los huesos con rojo de alizarina, que se fija a sales de calcio, se disuelve con facilidad en agua o en alcohol, que es un tinte ácido del grupo de las oxiquinonas o tintes biológicos (Gloria Hollister, 1934).

**G. Dingerkus y L. D. Ulher** (1977), en el aclarado enzimático con teñido de azul de alciano aplicado en diferentes organismos (peces, anfibios, reptiles, aves, mamíferos), usan cada uno de ellos, diferentes técnicas con alcoholes ácidos en distintas concentraciones (Dingerkus y Ulher, 1977),.

**M. Gosztonyi** (1984), elimina el formol donde estaban fijados sus organismos, con la finalidad de evitar la inhibición de la actividad de la enzima base ajustando la técnica de Hollister donde usa rojo de alizarina "S" para teñir del esqueleto pequeños vertebrados M. (Gosztonyi, 1984),

**E. H. Park y P. Soo Kim** (1984), también usan la transparentación en embriones, muestra las malformaciones osteológicas (Park y Soo Kim, 1984),.



**Francisco Sánchez et al.** (1996), utilizan la diafanización por técnica de Dawson en embriones y fetos humanos, para diferenciar la osificación membranosa de la endocondral, tiñéndolos con rojo de alizarina "S" y azul de alciano, con aumento de concentración de KOH para disminuir el tiempo de transparentación (Moore, 1988; Sadler, 1986; Patten, 1969; Sánchez, 1996).

**Gabriela Sánchez F.** (2001) En la UNAM, Campus Iztacala, México, realizó la transparentación de peces pleuronectiformes en su estudio de comparación de las relaciones de similitud entre ocho especies de pleuronectiformes mexicanos, analizando el esqueleto postcraneal aplicando KOH, con rojo de alizarina "S" (Sánchez, 2001).

## II.6 INCLUSIÓN EN RESINA

La inclusión y el recubrimiento son los casos particulares de conservación que permiten inmovilizar todas las estructuras de forma definitiva y establecer con ello la protección de los organismos contra el medio ambiente y la humedad que de modo contrario, favorecerían la descomposición (Anexo. 3 Sección 3.1.3) .

**Charles F. Bridgman y Frank A Humelbaugh,** (1963), de la Universidad de California en Los Ángeles, realizaron avances técnicos en el incluido plástico en resinas para prototipos para la enseñanza, resultando mejores fotografías, radiografías, fotomicrografías, transparencias fotográficas clínicas, etc. Las desventajas económicas, son el curado forzoso por radiación con rayos ultravioleta, cuando el ejemplar es demasiado grande, pues el endurecido a base de catalizador, es mucho más difícil y tardado. (Bridgman y Humelbaugh, 1963).

**Santiago Aja Guardiola** (1969), expresó que en los años 60, se utilizó el acrílico, después el poliéster, pero este se fragmenta con facilidad. Propuso que la Plastinación es una de las mejores técnicas anatómicas para preservar especímenes, piezas pequeñas y cortes finos conservándose por años sin necesidad de usar frascos ni líquidos y conservan el color natural, y no desprenden olores (Romero, 2002) .

**Moosavi, et al.** (1981), realizaron mejoras en biopsias incluidas en plástico en comparación con las preservadas en parafina convencional con mejores resultados de evaluación tan buena en hueso como en médula (Moosavi, 1981).



## II.7 PLASTINACIÓN:

El origen de los embalsamamientos se puede ubicar aproximadamente desde el año 2000 A. de C., entonces el caucho se ha utilizado con fines anatómicos durante más de 150 años (Correa, 2002). En relación con esto, diversos tipos de sustancias se han empleado:

**Rossi y Chumllamski** a fines del siglo XVIII, usaron la inyección de vasos sanguíneos del riñón con una “mezcla acuosa del árbol azul brasileño” (caucho natural). También utilizado por **Stein**(1898) y **Frank** (1903) que publicaron trabajos sobre inyección (Correa, 2002).

**V. N. Stepanov** (1948), con fines de corrosión, empleó el caucho sintético primero en Leningrado, siendo publicado su método en 1949 y 1953 (Correa, 2002).

**Gunther Von Hagens** (1977), la plastinación tuvo su inicio en la Universidad de Heidelberg, Alemania (Bicley y Von Hagen, 1981; Townsend, 1981; Dawson, 1990; Williams y Williams, 1990; Muñoz, 2002).

**Martínez Galindo y colaboradores**, (1989), en México, se instituye el Departamento de Plastinación y Museografía Médica y Zootecnia de la UNAM, primero en Latinoamérica y en emplear esa técnica en la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria. Tiene fines didácticos en la museografía médica, (Guillén, 1992), así como el trabajo realizado en el Laboratorio de Plastinación y Museografía de la Escuela Nacional Preparatoria “Miguel Schutz” número 8 (López, 2001).

**Gersenowies y González** (1993) contribuyeron con trabajos de plastinación de corazón de cerdo además de otros trabajos inéditos, en el laboratorio de Anatomía Comparada de la Unidad de Morfología y Función, de la FES Iztacala (Gersonowies y González, 1993).

**Francisco Macías** (1998), en el mismo laboratorio, realizó su investigación de tesis sobre un estudio de plastinación por impregnación masiva, con elasmobranquios pleurotremados, para evaluar grados de deformación del neurocráneo por el proceso de curado de dos diferentes resinas (Macías, 1998)



### III.- JUSTIFICACIÓN

Este trabajo se propone como una innovación, la combinación de la transparentación y la plastinación, (ambas técnicas ya estandarizadas y utilizadas antes por separado con éxito), creando así la diafanoplastinación. Utilizando polímeros accesibles de manufactura nacional que no tengan complementos y tecnología sofisticados se evita que se eleven los costos y disminuya su accesibilidad.

En la elaboración de preparaciones anatómicas que tengan usos múltiples dentro de la enseñanza, e investigación. se espera que la diafanoplastinación, de la pauta de una significativa capacidad metodológica y económica a la vez que beneficia protegiendo la integridad de las estructuras, promoviendo su apropiada observación y fácil manipulación.

Así mismo, se desea que prevenga la deplorable condición de los ejemplares en laboratorios e instituciones que precisan de su empleo en prácticas estudiantiles, o su uso para identificación de estructuras anatómicas o bien, patológicas, hasta ahora tratados por sistemas tradicionales de preservación de inmersión en fluidos contra la descomposición orgánica, peligrosos para sus usuarios y examinadores.

Así tenemos que este tipo de estudios, es básico, pues el conjunto de técnicas al servicio de la ciencia ha hecho que muchas de las sustancias utilizadas tradicionalmente, no caigan en desuso por sus propiedades naturales, y su fácil acceso económico y tecnológico, y actualmente podemos servirnos de ellas como auxiliares para que los resultados finales de nuevas técnicas, o la combinación de las mismas puedan servir para mejorar y facilitar el trabajo de investigación.



## IV.- OBJETIVOS

Con base en las técnicas de Hollister (1934), Dingerkus y Ulher (1977), Gostonyi (1984), y Park & Soo Kimen (1984) de transparentación e incorporando la técnica modificada de Gersenowies y González, (1993) para la plastinación :

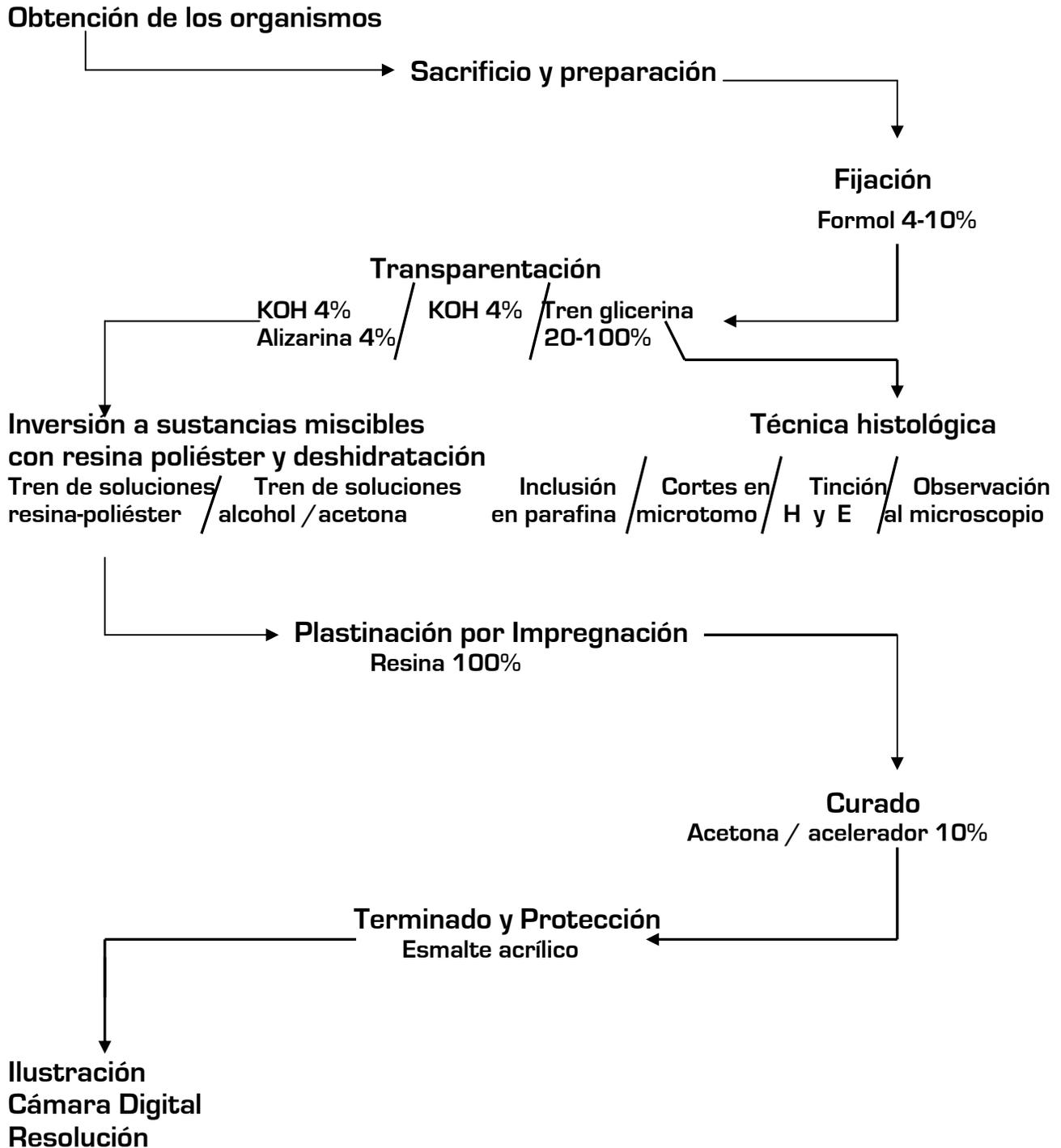
Combinar las técnicas de transparentación y plastinación:  
Diafaniplastinación

Estandarizar la técnica de diafaniplastinación.

Por medio de la Diafaniplastinación, obtener ejemplares de diversos mamíferos, que sirvan como modelos para el estudio del esqueleto.



**Fig. 1 DIAGRAMA DE FLUJO DEL MÉTODO DE TRANSPARENTACIÓN Y PLASTINACIÓN (RESINA POLIÉSTER)**





## V.- MATERIAL Y MÉTODOS

(FIG. 1)

### V.1 Obtención de los organismos

a) Se obtuvieron 10 ratones de la especie *Mus musculus* del bioterio de la Universidad Nacional Autónoma de México FES Iztacala (FOTO 1).



FOTO 1. Ratón *Mus musculus*

b) Se obtuvieron tres fetos de borrego *Ovis ammon aries*, por donación de la Biol. Adriana Hernández (FOTO 2).



FOTO 2 Borrego *Ovis ammon aries*

c) Se obtuvieron dos fetos de perro *Canis familiaris* en glicerina al 100% por donación del M. en Neurociencias Jorge Ricardo Gersenowies Rodríguez en la etapa de transparentación. (FOTO 3)



FOTO 3 Perro *Canis familiaris* en glicerina pura



d) Se obtuvieron dos ratones *Peromyscus leucopus* en etapa juvenil, descendencia de roedores de campo pero criados en el bioterio de la UNAM, Campus Iztacala (1992)  
(FOTO 4)



FOTO 4. Ratón *Peromyscus leucopus*

e) Se obtuvieron 84 Murciélagos en diferentes etapas de desarrollo, cuyas especies pueden ser consultadas en el Anexo No. 1, por donación de la Biol. Leticia Espinosa del Laboratorio de Zoología fijados con formol y alcohol etílico (FOTO 5).



FOTO 5. Cría de murciélago *Mormoops megalophyla* fijado en alcohol al 70%.

## V.2 Sacrificio

Los ratones *Mus musculus*, se sacrificaron por medio de una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico.

Los ratones *Peromyscus leucopus* (FOTO 6), así como los murciélagos, los *Mus musculus* y los borregos, se desollaron, evisceraron y posteriormente se lavaron con agua corriente.



FOTO 6. *Peromyscus* desollado.



### V.3 Fijación (Anexo 3, Sección 3.1.1)

**a) MATERIAL Y PREPARACIÓN.-** Se fijaron con formol al 4% neutralizado con borato de sodio [se recomiendan de 5-15 días] y más adelante se lavaron durante 24 horas con agua corriente para eliminar el exceso de formol (FOTO 7) .



FOTO 7. *Mus musculus* en formol al 4%

Debido al tiempo que habían permanecido en fijación (10 años), los murciélagos se pusieron en agua corriente por tres días, y fijados nuevamente con formol durante dos días, para luego proceder nuevamente al enjuagado.

### V.4 Transparentación

Según modificación indicada en la técnica 3.1.2.5 Apéndice 3.

**a)** Todos los organismos [excepto los fetos de perro, pues ya estaban transparentados], se introdujeron en una solución de hidróxido de potasio [KOH] al 4% a los adultos y al 2% a los fetos, y murciélagos, y Rojo de Alizarina "S" al 0.01%, por un período de 2-5 días, revisándolos diario para que los elementos óseos se tiñeran entre rojo y púrpura intenso (FOTO 9).



FOTO 8. *Carollia brevicauda* en formol al 4%



FOTO 9. *Mormoops megalophylla* KOH y Alizarina



**b)** Posteriormente se cambiaron a una solución de KOH al 4% hasta lograr una completa digestión de tipo alcalino.

**c)** Tanto los ratones *Peromyscus*, como los *Mus musculus*, los borregos y los murciélagos, cuyas características se encuentran en el apéndice 1, circularon por un tren de glicerina del 20%, 40%, 60%, 80%, 90% y al 100% durante 24 horas por cada solución para terminar de transparentarlos (FOTOS 10 y 11).



FOTO 10. *Mus musculus* en glicerina al 20%



FOTO 11. Murciélago en glicerina al 60%

## V.5 Plastinación (Técnica 4, Anexo 3)

De acuerdo a la modificación de la técnica de Plastinación por impregnación pasiva de Gersenowies y González, [1993], se llegó a la estandarización siguiente:

### **a) DESHIDRATACIÓN.** (FOTO 12)

Una vez transparentados se introdujeron en un tren de alcohol isopropílico al 40%, 80%, 90%, y dos veces al 100% durante dos días (48 h) cada solución. (FOTO 12).

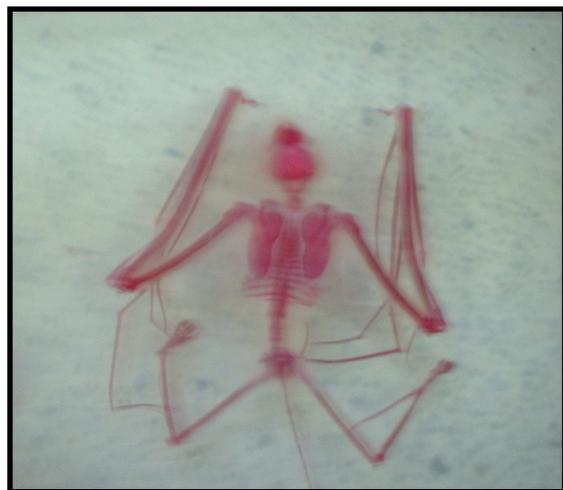


FOTO 12. Murciélago *Pteronotus parnelli* en alcohol isopropílico al 100%



**b) INMERSIÓN EN SUSTANCIAS MISCIBLES CON RESINA.** Posteriormente se condujeron por tres cambios, **i)** uno a base de acetona-alcohol isopropílico 1:1 por una semana, **ii)** posteriormente en acetona al 100% durante una semana, **iii)** un cambio a igual concentración y la permanencia durante otra semana (FOTO 13).



FOTO 13. Ratón *Mus musculus* en acetona 100%

**c) IMPREGNACIÓN PASIVA.** Después de que los ejemplares fueron saturados con acetona, se sumergieron en un recipiente con solución de resina poliéster no polimerizada. La resina se infiltra en forma gradual a través del tejido del ejemplar y lo impregna. Dependiendo de la temperatura del ambiente, esto toma normalmente una semana, y hasta tres semanas en clima frío. Posteriormente se sometieron a un tren compuesto por tres soluciones (40%, 80%, y 100%) de resina poliéster/acetona 1:1 [Gersenowies y González, 1993].

**d) ANTES DE LA POLIMERIZACIÓN.** Las muestras se dejaron escurrir a temperatura ambiente para quitar el exceso de resina. El molde que se requiere para la inmersión en las distintas soluciones de resina, puede ser de plástico flexible, cristal, etc. Según afirma Correa, [2002] los moldes de goma son los mejores ya que se pueden utilizar con mayor frecuencia.

**e) CURADO O ENDURECIDO.** Cada ejemplar se removió a los recipientes de impregnación para permitir el secado y para eliminar el exceso de resina (FOTO 14).

La resina es líquida y viscosa, por lo que se precisa endurecerla por medio de la inmersión del ejemplar en acetona y catalizador, es decir, se introdujeron en Acetona/acelerador al 10% durante uno a diez minutos dependiendo del tamaño del organismo y de la temperatura ambiente (Ir al anexo



El catalizador (Ver Anexo 2 Apartado 2.4.1) Peróxido metil etil cetona, es líquido pero se volatiliza con aire ambiental sobre la superficie del espécimen (FOTO 14).

Se limpia la superficie y se efectúan ajustes cosméticos por medio de un rociado de esmalte acrílico transparente (Gersenowies y González, 1993).

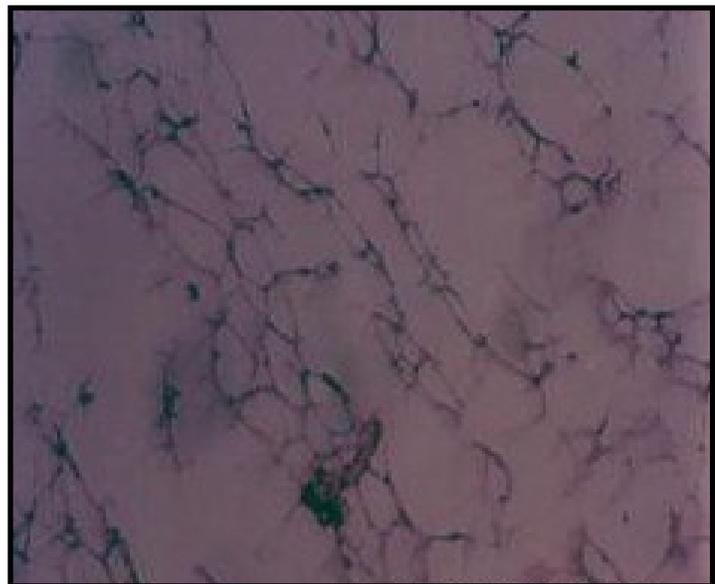


**FOTO 14.** *Mus musculus* en proceso de plastinado y curación.

## V.6 Técnica histológica.

[Técnica 5, Anexo 3]

Con el fin de determinar la clase de tejidos residuales que subsisten al finalizar la digestión alcalina de KOH utilizada en la transparentación, se tomó 1 cm<sup>2</sup> de tejido residual muscular de perro, conejo y ratón, que sirvieron de modelo para el desarrollo de este trabajo (Ver Anexo 2, Sección 2.2.2), los cuales se incluyeron en parafina (Ver Anexo 3, Sección



**FOTO 15.** Preparación histológica tejido residual muscular de ratón (red colágena).

3.1.3), para realizar cortes de 5μ en microtomo. Según sugiere Luna [1968] se llevó a cabo una

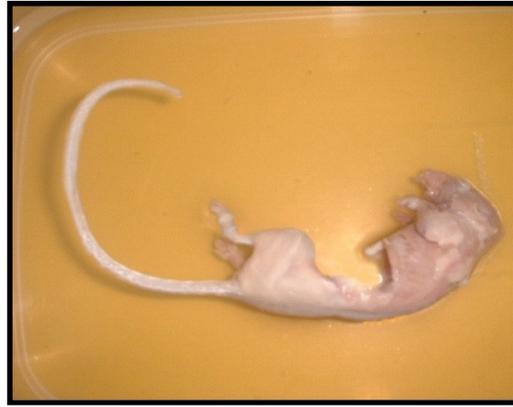
tinción hematoxilina-eosina (H y E) de Los cortes se realizaron después del paso de los organismos por el tren de glicerina de la diafanización. Se efectuó entonces el montaje de laminillas y la observación, así como la toma de impresiones fotográficas en el microscopio Carl Zeiss bifocal compuesto (FOTO 15).





## VI.- RESULTADOS

a) FIJACIÓN. Con relación a la acción del formol sobre tejidos orgánicos fijados, de diversos mamíferos, que permanecieron sometidos a temperatura variable a lo largo del trabajo efectuado durante diferentes estaciones del año como lo muestran las fotografías 16, 17 y 18:



**FOTOS 16 v 17.** Ratones *Mus musculus* fijados en formol

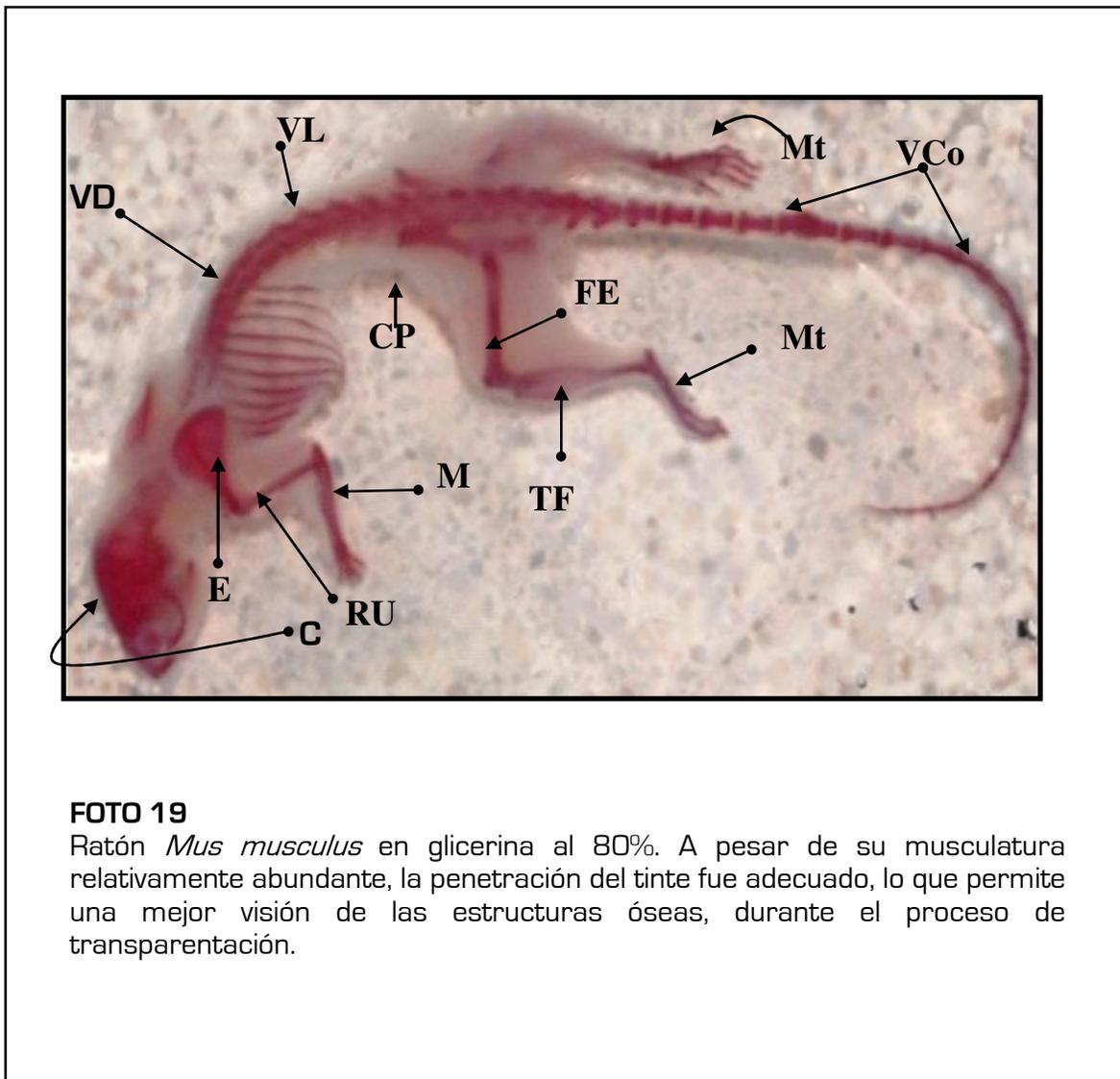


**FOTO 18** Murciélago *Mormoops megalophyla*. Fijación en formol.

No presentaron contaminación fúngica ni signos de putrefacción a pesar de que el agua circundante de algunos ejemplares presentó desarrollo de hongos.



Cuando hubo ejemplares de mayor tamaño o su musculatura fue más abundante, fue necesario aplicar piquetes con una aguja en diferentes lugares para facilitar la penetración del tinte y la transparentación de los tejidos, así se facilitaron las siguientes etapas y se pudieron apreciar mejor los detalles estructurales, como en el *Mus musculus*, (FOTO 19) donde son notorios el cráneo (C), vértebras dorsales (VD), lumbares (VL) y coccígeas o caudales (VCo), [columna vertebral], cintura pélvica (CP), costillas (Co), tibiofibula (T-F), radio-ulna (R-U), húmero (H), parte de la cintura escapular (CE), escápula (E) fémur (F E), metacarpos (M), carpos (Ca), metatarsales (Mt).





b) USO DE SOLUCIÓN DE ROJO DE ALIZARINA “S” AL 1% PARA TEÑIDO. En la tinción con rojo de alizarina, la existencia del color, facilita el estudio experimental, lo que se percibe claramente, al resaltar en rojo el tejido óseo.



**FOTO 20**

*Mormoops megalophyla* en solución de Alizarina 1% + KOH 4%. La acción de la digestión alcalina se efectúa sobre la musculatura en general mientras se visualiza la tinción ósea, sobre todo en miembros superiores e inferiores.

Las mejores preparaciones de aclarado de individuos de pequeño y mediano tamaño correspondieron a ejemplares frescos que habían sido previamente fijados en formol por lo menos durante 15 días. Los tejidos se ponían suaves en las primeras etapas del proceso de transparentación, sin embargo los organismos cuya fijación había tardado mucho tiempo, como en el caso de los murciélagos (hasta 10 años), variaban mucho en los procesos de cada una de las etapas de la transparentación, independientemente de haber estado almacenados en el mismo recipiente o tratarse de la misma especie.



Al depositar los ejemplares en KOH y Alizarina durante el tiempo de transparentación, las primeras capas musculares se volvieron traslúcidas, como se muestra en las fotografías 19, 20 y 21. Se presenta entonces una tinción ósea que va desde rojo a rojo intenso.



FOTO 21 A



FOTO 21 B

**FOTOS 21 A, B y C** Borregos  
*Ovis aries*

**21 A.** Inmersos en Alizarina "S" 1%  
y KOH 4%.

**21 B.** Alizarina KOH 4%  
[Continuación de la digestión  
alcalina].

**21 C.** Glicerina al 20% [Primer  
cambio del tren de glicerina]

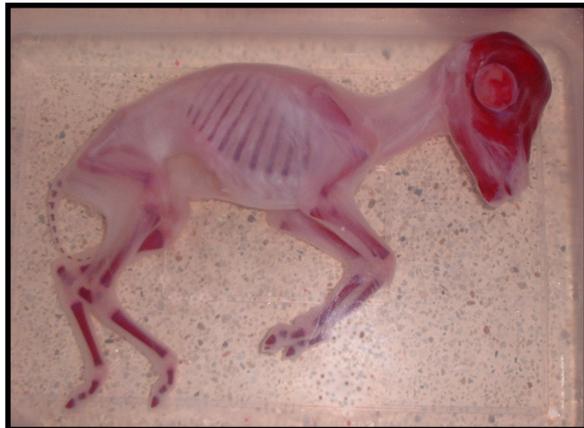
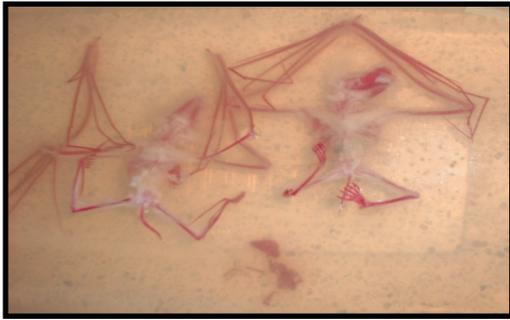


FOTO 21 C

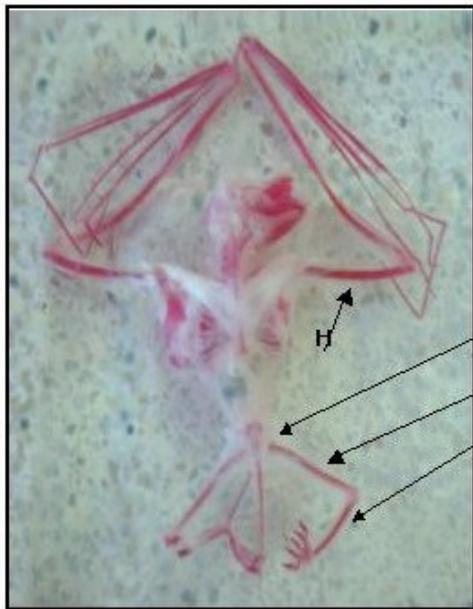
Cuando se requiere guardar ejemplares por tiempo prolongado, antes del proceso de aclarado, no se deben almacenar tejidos en alcohol ya que es perjudicial, pues incrementa su fragilidad.



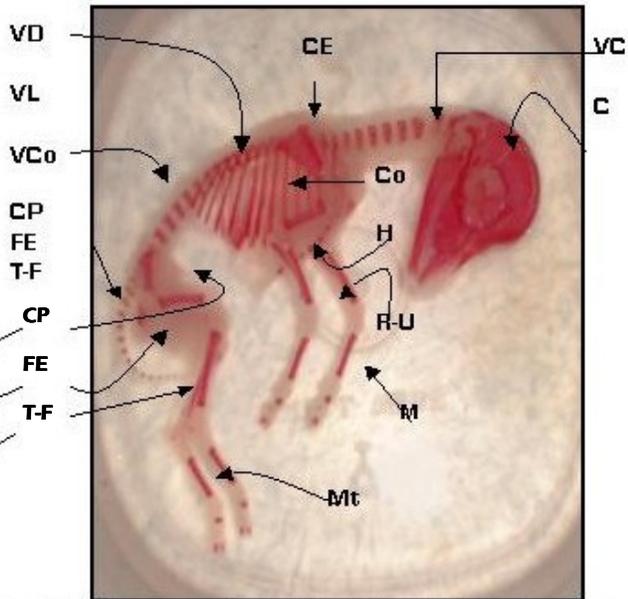
**FOTO 22**

Para evitar mayor deterioro en los tejidos de estos organismos, se disminuyó la concentración del hidróxido de potasio de 4% a 2%. Su fijación original, fue a base de alcohol etílico durante 10 años.

c) **ALGUNAS OPCIONES** Se observó que si se tiñen los huesos de ejemplares delicados tales como fetos, no soportan mucho tiempo sumergidos en hidróxido de potasio. Por lo que fue necesario reducir la concentración de la solución de KOH al 2% y añadir un poco de glicerina pura a la solución como recomienda Hollister (1934), con lo que resulta menos drástica la digestión de los músculos, donde se produce precipitación proteica. El aspecto de los ejemplares se puede distinguir en las siguientes imágenes.



**FOTO 23.** *Mormoops megalophyla* inmerso en glicerina al 40% sin protección previa con glicerina.



**FOTO 24.** ejemplar de borrego *Ovis ammon arvens* en glicerina al 60% cuyos tejidos fueron protegidos previamente al bajar la concentración de la solución de hidróxido de potasio y añadir un poco de glicerina pura.

En esta etapa, los músculos del feto del borrego, comienzan a hacerse transparentes dejando ver el cráneo [C], vértebras cervicales [VC], dorsales [VD], lumbares [VL] y coccígeas o caudales [VCo], [columna vertebral], cintura pélvica [CP], costillas [Co], tibio-fíbula [T-F], radio-ulna [R-U], húmero [H], parte de la cintura escapular [CE], fémur [FE], metacarpales [M] y metatarsales [Mt] (FOTO 26).



Mientras tanto, se observa que en la diafanización del murciélago, el cual se encuentra en una etapa anterior del aclarado, y por sus propias características corporales, de mayor masa muscular en el tronco, no permite distinguir al esqueleto completo (FOTO 23).

Durante algunas fases de la tinción, la luz solar fue un agente importante en la fijación del color, ya que esta ocurrió con mayor rapidez en los tejidos de algunos organismos. Muchas veces cuando los ejemplares alcanzaban la diafanización, un período prolongado de días poco soleados afectaban los procesos de pigmentación, En ausencia de los rayos del sol, el tratamiento era aplazado, a veces con daño a los ejemplares o simplemente con detrimento en las características del tono o el color, esto es notorio en las fotos 21 A, B, y C y 25.



**FOTO 25**

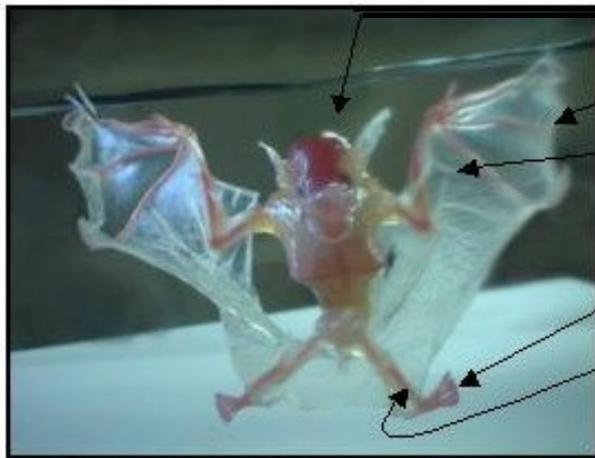
*Canis familiaris* y *Ovis ammon aries*. Nótese la diferencia de color y tono, a pesar de tener el mismo tiempo de preparación e inmersión en las sustancias de tinción y aclaración así como de fijación.

El tiempo de reacción cada una de las sustancias usadas en la tinción varió de acuerdo con el tamaño del organismo y/o su etapa de desarrollo, baste con observar la diferencia en el tono y color que tomaron los huesos de los fetos de perro y de borrego (FOTO 27), por tratarse de dimensiones distintas aunque ambos se encuentren en etapa fetal, sus tejidos son delicados pero resistentes y el grado de osificación en el espécimen puede deberse a una diferencia en el desarrollo de cada individuo.

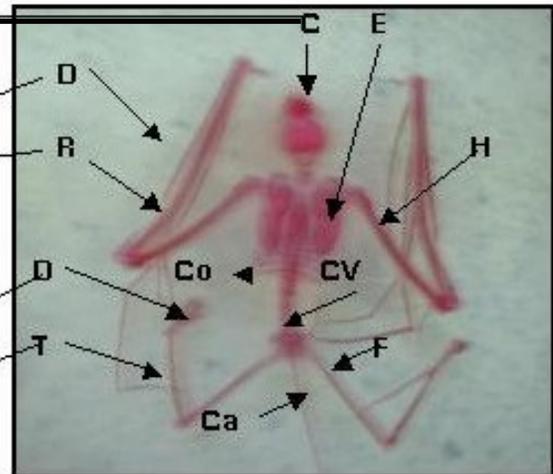


d) LA ACCIÓN DEL TINTE DE ALIZARINA SOBRE EL HUESO. Las sales de calcio absorben alizarina de acuerdo con la acumulación de minerales en el proceso de osificación del organismo y su etapa de desarrollo.

En la fotografía número 29, aparece el murciélago *Mormoops megalophylla*, de cuyo esqueleto pueden distinguirse el cráneo (C), escápula (E), húmero (H), radio (R), costillas (Co) columna vertebral (CV), isquión (I), cauda o cola (Ca), fémur(F), tibia(T), y dedos de miembros superior e inferior (D) . En las fotografías 26 y 27 se aprecian sólo algunos de los componentes del esqueleto y pero se distinguen mejor algunas otras estructuras anatómicas, pues la diafanización no se ha completado.



**FOTO 26** *Glassophaga sp* cuyas membranas de las alas y el uropatagio, son notoriamente evidentes.



**FOTO 27** *Mormoops megalophylla*, la tinción permite ver cada una de las estructuras óseas.



**FOTO 28** Los organismos se encontraban en la etapa de inmersión en glicerina al 60%



El análisis del hueso en vertebrados, muestra que su mayor constituyente es el fosfato de calcio con una pequeña cantidad de carbonato de calcio. Estos factores muestran cierta relación concerniente a la afinidad química entre la alizarina y el fosfato de calcio del hueso. [Hollister, 1934].

e) COMPONENTES ÓSEOS. Existe una aparente insuficiencia en sales de fosfato de calcio para absorber alizarina en ciertas partes del cuerpo de algunos organismos. Algunas estructuras óseas no se tiñen, como los dientes de los mamíferos en general, y particularmente los de los ratones, debido a que los cristales de su esmalte no tienen iones de calcio libres ya que su constitución por renovación permanente, no es igual y forma una estructura cristalográfica con diferentes minerales que en el resto del esqueleto, Granados [1989] reporta que los incisivos de organismos del orden Rodentia, incluyendo la familia Muridae, [modelos usados en este trabajo], sufren desgaste y crecimiento continuos durante toda la vida del animal. Histológicamente su dentina, está formada por dos capas, y tiene como base una capa externa o estrato fibroso con un pigmento amarillo más o menos intenso cuya composición química tiene importante contenido en hierro para aumentar la dureza y resistencia del esmalte, con el fin de soportar el desgaste mecánico y químico, Ello nos indica entonces, que la formación mineral de sus dientes, no coincide con el contenido de las demás piezas del esqueleto, que tienen una forma cristalográfica con mayor cantidad de sales de fosfato de calcio por lo que su afinidad con el tinte se ve afectada con la tinción característica de rojo [FOTOS 29 y 30].



**FOTO 29.** Detalle de los dientes de *Mus musculus* de perfil.



**FOTO 30.** De frente. Nótese el color amarillo naranja de las piezas dentales.



La deshidratación de los tejidos por medio de alcohol isopropílico y acetona los volvió opacos (FOTO 31 y 32), en esta etapa el esqueleto es apenas visible, pues el tejido conectivo que formaba parte de su musculatura, ahora los cubre. Su apariencia se torna hialina y pierde sus características diáfnas.



**FOTO 31.** *Ovis ammon aries*

**FOTO 32.** *Mus musculus.*

Ambos en acetona al 100%. Sus huesos son apenas visibles pero su tejido conectivo, y parte de su anterior miohistoestructura, tiene ahora una apariencia de membrana hialina

Esta apariencia se obtiene al remover la glicerina que tiene el mismo índice de refracción que los restos del tejido muscular de los organismos, es evidente como la solución va preparando las estructuras para los futuros cambios de impregnación de las sustancias resinosas por medio de las soluciones de alcohol isopropílico, alcohol-acetona y acetona pura, por ejemplo en la FOTO 34, se aprecia que los tejidos fetales del borrego adquirieron cierta fragilidad a lo largo del proceso, mientras que en el ratón, por ser tejidos de un

organismo adulto, no se vieron afectados de igual forma.



**FOTO 33**

El tejido se encuentra en buenas condiciones antes del proceso de impregnación con resinas

En las fotografías 36 y 37 en cambio, podemos observar como con la plastinación vuelve a tornarse transparente lo que anteriormente fue músculo, y sólo quedó tejido conectivo.



f) EJEMPLARES PLASTINADOS. El espécimen conserva su volumen y forma naturales y sus huesos vuelven a advertirse pues vuelven a tornarse transparentes, lo que podemos atribuir a que la resina posee un índice de refracción semejante a la glicerina y a los tejidos residuales.

La deshidratación del espécimen y al mismo tiempo su inmersión en sustancias miscibles con resina, para preparar su afinidad a la impregnación con polímeros plásticos, permitió la remoción de la glicerina.

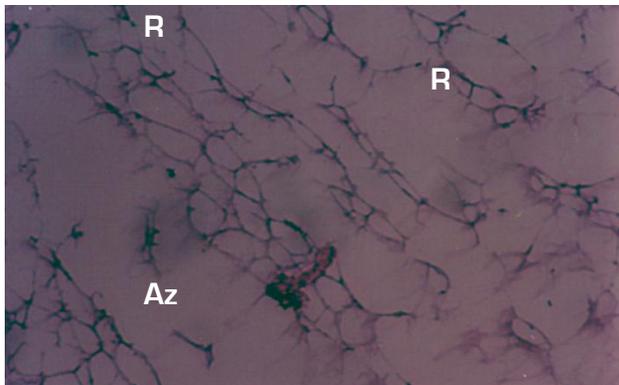


**FOTOS 34 y 35.**

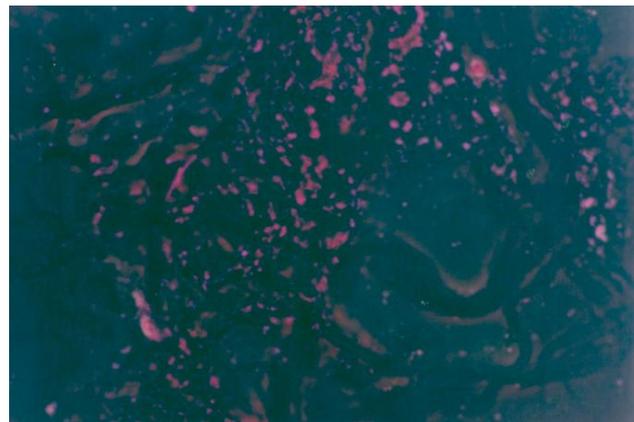
La Plastinación efectuada después de transparentar a los organismos, permitió el moldeado de figuras anatómicas, completamente manejables, donde se observan hasta las más finas estructuras como podemos notar en el detalle de los esqueletos de los ejemplares,



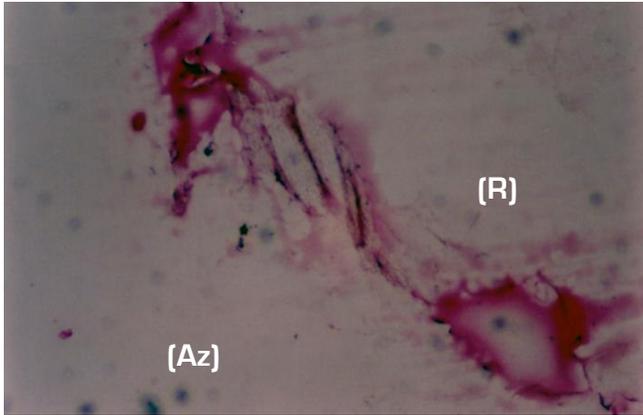
g) EN EL ESTUDIO HISTOLÓGICO, En las laminillas se observaron fibras de tropocolágena, y protropocolágena, resultado de la digestión alcalina que actúa sobre las fibras de colágena, desconformando su refracción al microscopio, la colágena puede teñirse de rosa (R) con el método estándar de hematoxilina y eosina (FOTO 35). Cuando la digestión alcanzó a ser parcial en algunas partes, también quedaron restos de paquetes musculares, los cuales aparecen de color azul (Az). Algunas otras estructuras, pertenecientes al endomicio y parte de las fascias de los haces musculares, aparecen en forma de red, pero vacías, incluso se tuvieron que observar al microscopio en contraste de fases (de PH1 hasta PH4) por medio de iluminación Köehler (se observan rojo por dentro y azul por fuera (FOTO 36) como se puede observar en las siguientes fotografías. Igualmente se observaron algunos restos de vascularización (FOTO 39), donde se aprecia un pequeño vaso sanguíneo (Vs) que probablemente se debe a estructuras no digeridas en el proceso (Bergman, 1998; Boya. 1998).



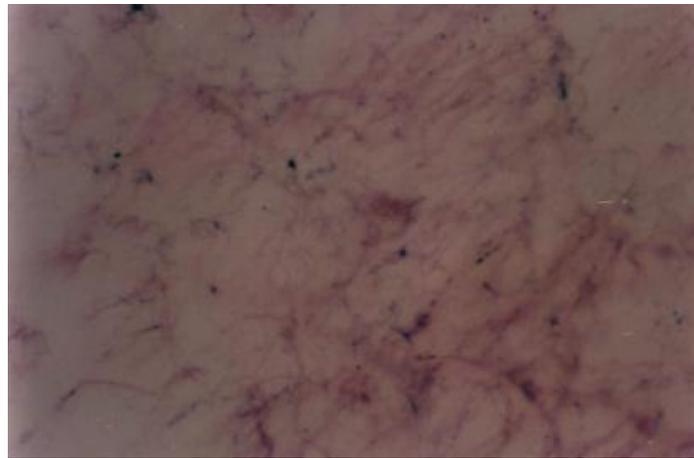
**FOTO 35.** Redes de colágena de Ratón.



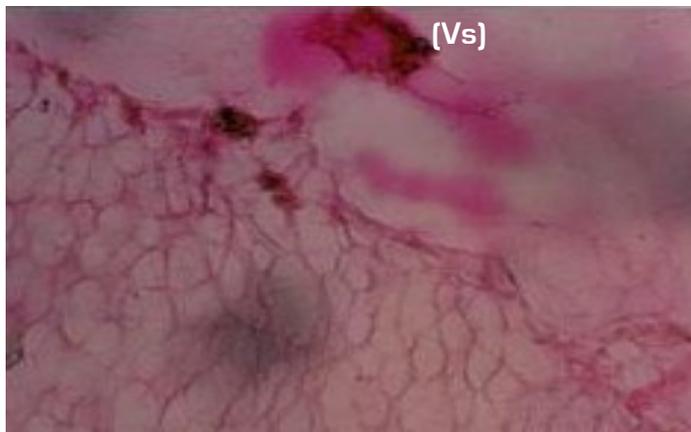
**FOTO 36,** Contraste de fases de tejido conectivo de perro.



**FOTO 37.** Fibras de colágena de perro



**FOTO 38.** Fibras de colágena de Borrego.



**FOTO 39.** Red aglomerada de colágena de perro.





## VIII.- CONCLUSIONES

- Para el estudio de la anatomía de mamíferos, una aportación de este estudio fue la combinación de dos técnicas, la transparentación y plastinación, dando como resultado lo que aquí hemos denominado como **diafaniplastinación**.
- En el proceso de diafaniplastinación, la temperatura en general, y en particular la temperatura ambiental, tienen una relación directamente proporcional con la velocidad de las reacciones en cada uno de los procesos llevados a cabo en la Diafaniplastinación.
- Aunque la técnica se desarrolló con organismos de tallas pequeñas y hasta 1 Kg de peso, tiene potencial para organismos de talla pequeña, tiene potencial para organismos de tallas y peso mayores.
- El reemplazo de fluidos en el tejido resultante fue lento, debido a la considerable viscosidad de la resina. Esto a pesar de considerarse que la resina poliéster es de baja viscosidad en comparación con otras.
- Las resinas poliéster presentaron la ventaja de óptima transparencia por su amplio índice de refracción.
- Consideramos que la diafaniplastinación podría contribuir con la investigación en el área morfofisiológica, ya que permite resolver problemas de conservación, y evitan el empleo de productos que necesitan renovarse y provocan en los usuarios, serios problemas de salud, previstos en las leyes de protección e higiene laboral.
- Los modelos después de la diafaniplastinación, son inodoros, durables, no tóxicos, manipulables, prácticos y sobre todo útiles.
- La potencialidad de la diafaniplastinación en laboratorios para la enseñanza de la zoología, taxidermia y otros, además de su aprovechamiento en museografía y demostraciones anatómicas de arte, se espera que sea amplia y pueda ser de gran



utilidad en áreas de Anatomía patológica y en centros de enseñanza primaria, secundaria, media superior y sobre todo de estudios superiores y universitarios.

- Otro probable empleo es en modelos de estudio osteológico de muchos tipos de vertebrados no ilustrados aquí.
- La práctica del experimentador y el juicio de buen cálculo y lo artesanal de las técnicas en laboratorio son elementales pues es con base en ellas que la intuición del investigador pueda tener éxito. A falta de ello, la guía de alguien con suficiente experiencia es trascendental, pues los tiempos de las técnicas pueden verse afectados por las más diversas variables, modificando los resultados esperados.



## IX.- RECOMENDACIONES

Con respecto a la durabilidad de que se hace gala en la descripción de los organismos resultantes en este trabajo, se recomienda la realización de posteriores estudios de resistencia de materiales, en los cuales se haga pasar por el manejo de estudiantes de diferentes medios y edades viables, para medir el tiempo de duración de los modelos al estar sujetos a la constante manipulación.

Así mismo se recomienda efectuar nuevas investigaciones para probar el potencial de uso en diferentes vertebrados y un margen amplio de tamaños, con pruebas de sustitución de diferentes hidróxidos para comparar la digestión alcalina y el tiempo requerido para la misma, además de mayor calidad de tejidos resultantes y mejores propiedades ópticas, sin que por ello se tenga que incurrir en gastos onerosos o equipo sofisticado.

El modelo resultante puede conservarse a la intemperie, debido a que la propia polimerización de la resina y la posterior cubierta protectora del esmalte acrílico, evita la contaminación por agentes microbiológicos, especialmente por hongos, y adquiere las características de una pieza anatómica embalsamada.

Una vez extraída la pieza del recipiente conviene mantenerla en bolsa de polietileno mientras no sea objeto de trabajo. Si con el tiempo o frecuencia de uso se observase el deterioro de su aspecto, como consecuencia del depósito de diferentes tipos de residuos, éste podrá ser renovado con una limpieza sencilla, con paño seco de preferencia, y si se utilizase algún líquido, se recomienda el alcohol de 96° (etanol) o acetona pura aplicada con cuidado con una estopa y añadiendo una nueva capa de esmalte acrílico. Se recomienda que una vez al año se de mantenimiento, o antes si su uso es muy continuo o pesado, tras el lavado del recipiente y eliminación de residuos orgánicos depositados en el fondo.

En los períodos en los que no se esté estudiando el ejemplar, conviene preservarlo de la desecación excesiva y el polvo, introduciéndolo en una cubierta de cristal, bolsa de polietileno o recipiente adecuado a su tamaño y forma, de preferencia rígido para que no suceda que accidentalmente, se le recargue algún peso excesivo, y se pueda fracturar, aunque el ejemplar guarda cierta resistencia.



## X.- LITERATURA CITADA

- Alvarez-Castañeda S. T. y J. L. Patton. 1999. Mamíferos del noroeste de México. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. pags. 67-76.
- Ara-Sarriá, P. 1936. Razón y alcurnia de la conservación artificial de la forma y de la fisonomía humana. Discurso leído en la Academia Nacional de Medicina del día 16 de abril de 1936.
- Ara-Sarriá, P. 1974. El caso Eva Perón (Apuntes para la Historia) CVS Ediciones, Gráficas Velasco.
- Autor Anónimo. 2000. Sustancias Químicas Peligrosas. Fixes Winterfur 59-66. Fichas 2059-66. Creador QuarkXpress. 14 Enero 2000. Winterthur (Empresa). Ingeniería y Peritación. Barcelona, España.
- Arráez A. L. A. 1997. Exposición demostrativa: 'A Complucad Anatomic' en una Sala de Disección. (Apuntes). XII Congreso Sociedad Anatómica Española. Valencia, España. pp 1-8.
- Avers Ch. J. 1963. An evaluation of various fixings and staining procedures for mitochondria in plant root tissues. S Tech. 38, 29-35.
- Ballenger, J. J. 1984. Some effects of formaldehyde on the upper respiratory tract. Laringoscop. 94:1411-1413, 1984.
- Bandera, B. 1929. Apuntes para la historia de la enseñanza de la Anatomía en México. Enero 1929. LX(1).
- Baschong W. and Baschong-Presiabnotto C. 1983. Reversible fixation for the study of morphology and macromolecular composition of fragile biological structures. Eur. J. Cell. Biol. 32: 1-18.
- Basset, D. L. Ethyl methalacrylate as a preserving medium for gross anatomical serial sections. Anat. Rec., 1947 (99) 145.



- Bergman, R. A. A. K. Afifi, y P. M. Heidger, Jr. 1998. Histología. McGraw-Hill Interamericana de México, S. A. de C. V. México, D. F. pp 4, 43-103.
- Bicley, H. C., G. Von Hagens and F. M. Townsend. 1981. An improved method for the preservation of teaching specimens. Arch. Pahol. Lab Med. 105: 674-676.
- Borek J. 1986, Embedding. Encapsulado. Gelman Sciences. Inc. Encyclopedia of Polymer . Science and Engineering. Second Edition. V(5). Ed Wiley Interscience. Germany. Pp 792.
- Boya, V. J. 1998. Atlas de Histología y Organografía Microscópica. Pp 16, 20, 30.
- Bridgman, Ch. F., and F. A. Humelbaugh. 1963. Plastic Embedded Teaching Specimens. Med. Biol. Illus, 13: 177-185.
- Clark., R. P. Formaldehíde in pathology departments. Clin Pathol., 1983. 36: 389-46.
- Coates-Estrada, R., y A. Estrada. 1986, Manual de Identificación de Campo de los Mamíferos de la Estación de Biología "Los Tuxtlas". Ilustraciones de Kandis Elliot. Instituto de Biología. UNAM. Dir. Gral. De Publicaciones. Ciudad Universitaria. Méx.
- Cole, F. J. 1975. A history of comparative anatomy. From Aristotle to the eighteenth century. Unaltered republication of the work first published in 1949. Dover Publications, Inc. New York, N. Y. USA. Pp .
- Cook, W. M. D., 1869. The Physiomedical Dispensatory. Classic herbal texts. Old Herbal Works. Medical Herbalism Journal. Eclectic article. Bergner Communications, Boulder, Colorado. 1(1): 1-12.
- Cooperias E. 1990. Lección de Anatomía. Cadáveres transparentes. Muy Interesante. Año VII (6). Pp 37-43.
- Correa A, F. 2002. Técnicas de conservación de piezas anatómicas. Apuntes de la cátedra de Anatomía de la Unidad de Medicina Veterinaria. Universidad de Granma. Santiago de Cuba.



- Chevallier, J. Dr. 1995. HISTOIRE DE LA PHLEBOLOGIE. HISTOIRE DE LA VEINE NORMALE. La veine dans l'Antiquité. HISTOIRE DES VARICES. (Debate) Contested Science in Seventeenth-century France Coffman Room. 1995 History of Science Society Annual Meeting Program. September. October. 1995. Minneapolis, Minnesota, USA.
- Davenport H. A. 1960. Histological and Histochemical Technics. Sannders W. B. edits. Philadelphia. 342 pp.
- Dawson, T., T. P. Williams J. 1990. How do we teach pathology? Silicone plastinated pathology specimens and their teaching potential. Department of Pathology, University of Wales College of Medicine, Heath Park, Cardiff. Wales, CF44XN. U. K. Journal of Pathology. Vol. 162:265-272.
- Dingerkus, G. and L. D. Uhler. 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained, whole small vertebrates for demonstration of cartilage. Stain Tecnology. 1977. The Williams & Williams Co. USA. 52(4): 229-232.
- Dionis, P. A. 1710. Course of chirurgical operations, demostrated in the Royal Garden at Paris, London: Tonson J, editor. 2ª edición..p.137-155.
- Div. Autores. Manual de Patología General. Capítulo 2. Patología Celular. Calcificación Patológica. Patología General. Escuela de Medicina. 1(1): 027
- Div. Autores. 1960. The Merck Index.Merck and Company Inc. Rahway,New Jersey. Page 460.
- Estrada F. E. 1982. Manual de técnicas histológicas. México: AGT Editor.
- Ewer, R. F. 1998. The Carnivores. The Cornell University Press. Ithaca, New York. 500 páginas
- Felter, Harvey Wickes. M. D. 1922. The Eclectic Materia Medica, Pharmacology and Therapeutics. The Plants. Henriette´s herbal pages. Old herbal works. The British Pharmaceutical Codex. Direction of the Council of the Pharmaceutical Society of Great Britain (Since 1911). The Pharmaceutical Press, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 1(1): 22



- Foolich, K. W. , Andersen, L. M. Knutsen. A. and P. R. Flood 1984. Phenoxyethanol as a non-toxic substitute for formaldehyde in long-term preservation of human anatomical specimens for dissection and demonstration purposes. Ana. Rec. 208: 271-278.
- Fortoul GT. 1998. La práctica histológica. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Frederick, Leo. 1876. Conservadora Se Tisus para la paraffine. Gaz. Med. Fr. 1876, Serie L. I (45).
- García-Domínguez F. 1987. Técnica de inclusión en parafina para la conservación de animales completos. Acta Mexicana de Ciencia y Tecnología. Enero- Marzo, 1987. V (17): 59-60.
- Garrido F., G. Isauro y M. Á. Cornejo C. 2000. Método de inclusión en parafina para diagnóstico rápido por medio de microondas. Nota de Investigación. Recibido el 23 de Marzo del 2000. Aprobado el 13 de abril 2000. Laboratorio de apoyo a Histología y Biología. FES Cuautitlán. UNAM. Edo. de Méx. México.
- Gartner L. P., and J. L. Hiatt. 1997. Histología. Texto y Atlas. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Gersenowies, R. Jorge Ricardo y M. González I. 1993 . Plastinación de corazón de cerdo con resinas poliéster de fabricación nacional. Laboratorio de Anatomía Animal Comparada. Coloquio de Investigación UNAM. Campus Iztacala del 1 al 3 de diciembre de 1993.
- Gersenowies, R. J. R. 2000 . Historia de la Anatomía Animal Comparada. Serie: Lecturas de Anatomía Animal Comparada. Monografía No. 1. Textos electrónicos de Biología. Laboratorio de Anatomía Animal Comparada. UNAM. Campus Iztacala febrero de 2000. pp 56.
- Gestal O., J. J. 1993. Riesgos del Trabajo del Personal Sanitario. Concepto, importancia y clasificación. Editorial Interamericana-McGraw Hill. 2ª. Edición. Madrid. P. 214-262.



- Getty R. 1996. Sisson y Grossman Anatomía de los animales domésticos. Tomos 1 y 2. Ciencia y Cultura Latinoamérica, S. A. de C. V. Quinta Edición. México, D. F. 2002 pags. + el índice de materias.
- Gibaja O, S. 1998. Pigmentos Naturales Quinónicos. Edición [Cuidado] Odín del Pozo. Impreso en el Centro de Producción Editorial. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Fondo Editorial UNMSM. Pp 29.
- Glories, Y. 1978. Evolution of phenolic compounds during wine aging. Ann Nutr Aliment 1978; 32(5):1163-9.
- González, Agustín E. 1986. La física de los polímeros. Un tema unificador de la ciencia. Revista Ciencia. 1986. V (37): 217-233.
- González I., J. y J. J. González Pérez. 2002. Historia general de la higiene bucodentaria. Cap. XIII: La higiene bucodentaria en el siglo XVIII (La Ilustración). Parte I Gaceta dental Santa Apolonia. INDUSTRIA Y PROFESIONES. No 132. Sección: La mirada en el espejo. Noviembre 2002.
- Gosztonyi, 1984. The use of enzyme-based Laundry "Presoaks" for clearing small vertebrates for alizarin red of Bone and Tissues. Stain Tech. 59(5):305-307.
- Granados E. H. 1989. El pigmento del esmalte en los incisivos de los roedores. Ciencia y Desarrollo. Nov-Dic. 89 (XV) : 101-106.
- Gryglewski RW. 2002. A sketch of history of the European tanatopraxis. [Un boceto de historia de la tanatopraxis europea; (Article in Polish)]. Katedra Historii Medycyny CM UJ, Krakow, KopernikaArch Hist Filoz Med 2002;65(1):47-54.
- Guillén, J. 1992. La Plastinación, novedosa técnica de conservación de especímenes. Marzo 1992. Gaceta UNAM. 26-26: 24-25.
- Hildebrand, M. 1969. Anatomical Preparations. Berkeley, University of California, Press, U. S. A. 693 pp.



- Hochstetter F, y G. Schmeidel. 1924. Method or process of permanently preserving animals and plants. US Pat. 1,602,489.
- Hochstetter F, 1927. Ueber ein Verfahren zur Hesterlung von Trockenpreparaten von Tieren und Pflanzen in natuerlicher Form und Farbe. Forschungen und Fortschritte, 3:140-141.
- Hollister G. 1934. Clearing and dyeing fish for bone study. Zoologica: Zoological Society. XII [10]: 89-100.
- Holmes, O.W.; Medical essays. 1883. Boston,. X,445 p., or. cl. Garrison & Morton 6390 68.00
- Holmes, O.W.; 1911. Medical essays. Boston-New York, 1911, 7th ed. XVII,445 p., or. cl. (minor traces of use) Cf. Garrison & Morton 6390 45.00
- Humason, I. G., 1970. Animal tissue techniques. 4a. Ed. W. H. Freeman and Co. New York. 661p.
- Karnoswsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J.Cell.Biol. 27: 137.
- Karow, J. 2000. Plastic Bodies On Display. Do plastinated corpses cross the line between Science education and desecration. Scientific American: Explore: Plastination.March272000.<http://www.Sciam.com/explorations/2000/032700plastic>
- Konigsberg, Mina. El sombrerero loco. Artículo de *Casa del Tiempo*, Revista de la Dirección de Difusión Cultural, Universidad Autónoma Metropolitana, Vol XIV, Epoca II, No. 75.
- L´Archer Dr Hubert. 1991. La mémoire du soleil - aux frontières de la mort. Éd. désIris. "Les Jardins d'En-Gaddi". 1991. Broché, France. 371p.
- Lev M. and J. T. Thomas. 1955. An improved method for fixing and staining frozen sections. Am. J. Clin. Pathol. 25, 465-469.



- Lillie R. D. 1965. Histopathologic technic and practical histochemistry. McGrawHill De. New York.
- Lissi, E., G. Celedón, F. Venegas, M. Lanio, C. Alvarez Soto, D. Martinez, y A. M. Campos. 2002. Efecto del cloruro de mercurio sobre la actividad hemolítica de citolisinas. [Mercury chloride effect upon the hemolytic activity of cytolsins]. Resumen del Trabajo de Investigación. 2 septiembre 2002. Depto. de Fisiología, Fac. de Ciencias, U. de Valparaíso; Lab. de Biomemb. Fac. de Biol. U. de La Habana; Depto. de Quím. Fac. de Quím. y Biol. U. de Santiago, Cuba. 146(83)59.76.
- López E. 2001. Estructuras vivas estáticas, colección biológica de la Prepa 8 en Iztacala. Gaceta UNAM Iztacala. Oct. 10 2001. 175:6.
- Luna, L.G. 1968. Manual histologic staining methods of the Armed Forces. Institute of Pathology. Mc Graw, Nueva York. 258 p.
- Lynch, M. J., Raphael, S. S. 1972. Métodos de laboratorio. 2<sup>a</sup>. Ed. Editorial Interamericana. México. 1522 p.
- Lynch, M. J., Raphael, S., Mellor, D., Spare, P. y Inwod, M. 1977. Métodos de laboratorio. Nueva Editorial Interamericana. México. Capítulo 46. pg. 1300-1309.
- Macías O. J. F. 1998. Comparación de dos Resinas Sintéticas en la Plastinación de Elasmobranquios Pleurotremados. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM. Pp 18.
- Martoja, R. y M. Martoja. 1970. Técnicas de Histología Animal. Toray Masson. Barcelona, 350 p.
- Medellín, R. A., H. T. Arita, y O. Sánchez. 1997. Clave de Campo: Identificación de los murciélagos de México. Asociación Mexicana de Mastozoología, A. C. Publicaciones especiales Núm. 2. México, 1997 UNAM.
- Moore Keith L. 1988. Embriología Clínica. Cuarta edición. Interamericana-McGraw-Hill. México. Pp . 92, 97, 368, 372, 379, 380.



- Moret de A., O. J. 1990. Contribución al Estudio de los Efectos Tóxicos del Formaldehído. Trab. Pres. a Examen de Oposición para ascenso a la Categoría de Profesor Titular. Depto. De C. Morfológicas de la U. Académica de Anat. Hum. Fac. de Med. Univ. De los Andes. Mérida Venezuela.
- Moosavi, H.; M. A Lichtman; J. A. Donelly; y Ch. J. Churkian. 1981. Plastic-Embedded Human Marrow Biopsy Specimens. Improved Histochemical Methods.. Departments of Pathology. Strong Memorial Hospital, Rochester , N. Y. Accepted for publication July 7, 1980. Reprint request to Department of Pathology. Mercy Hospital, Port. Huron Mich. Arch Pathol Lab Med 1981; 105:269-273
- Muñoz R. 2002. Gunter Von Hagens. La fascinación del cuerpo. Entrevista. Babab. No. 12- marzo 2002. pp 1-15.
- Nowak, R. M. and J. L. Paradiso. 1983. Walker´s Mammals of the World: 4th Edition: Volume I and II. The Johns Hopkins University Press. Baltimore y Londres. 1363 páginas + índice en dos tomos (ISBN: 0-8018-2525-3, LC:QL703.W222 1983)
- Ortega-Ortíz J. G. , B. Villa-Ramírez, J. R. Gersenowies R. Polydactyly and other features of the manus of the vaquita *Phocoena sinus*. Marine Mammal Science, 16(2); 277-286 (Abril 2000)
- Pabst, R. 1987. Exposure to formaldehyde in Anatomy: an Occupational Health Hazard? Anat. Rec., 1987. 219: 109- 112,
- Park, E. H. and P. Soo Kim. 1984. A procedure for staining cartilage and bone of whole vertebrate larvae white rendering all other tissue transparent. Stain technol. 59(5): 269-272.
- Patten Bradley M. 1969. Embriología Humana. 4ª. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. España. Pp 43, 44.
- Pérez-Tamayo, R. 1997. De la magia primitiva a la medicina moderna. Primera edición, FONDO DE CULTURA ECONÓMICA . México, D.F. CIENCIA 3 PRIMERA PARTE. 3(1): 154.



- Prasad P. N, and D. J. Willians. 1991. Introducción a Efectos Ópticos No Lineales en Moléculas y Polímeros, John Wiley&Sons, New York, , pp. 222-251.
- Prophet E. B. and B. Mills. 1994. Laboratory Methods in Histotechnology. US: Armed Forces Institute;
- Rendiles, Hernando, Dr. 2000. Patología Laboral relacionada con Mercurio. Guides to the Evaluation of Permanent Impairment. Salud Ocupacional en Venezuela. Julio de 2000. Universidad de Zulia Venezuela.
- Robinson y Fayer. 1991. Técnica de Robinson y Fayer. Curso de técnicas histológicas e histopatológicas. Escuela Superior de Medicina. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.
- Romero L. 2002. La plastinación, apoyo en la formación de médicos. Gaceta UNAM.7 oct. 3579: 1-8,9, 12, 16 y 17.
- Sadler T. W. 1986. Langman Embriología Médica. Quinta edición. Médica Panamericana S. A. Argentina. pp. 83, 8, 140, 146.
- Sánchez F, G. 2001. Relaciones de similitud entre ocho especies de pleuronectiformes mexicanos a partir del análisis del esqueleto postcraneal. Tesis de Licenciatura. FES Iztacala. UNAM.
- Sánchez, S, I., Víctor T. V., J. Zevallos G., J. C. Cari & S. S. Beltrame. 1996. Visualización del Desarrollo Óseo en Fetos Humanos por Técnica Modificada de Dawson. Trab. originales. Rev. Méd. del C I E M (Centro de Investigación y Estudios Médicos) Iván E. Sánchez S. Pres. del C. I. E. M. Fac. de Med, Hum. Univ. Catól. de Sta. Ma. Arequipa, Perú. 1996 [1]91.
- Sepúlveda SJ. 1997. Histología. Instructivo de laboratorio. México: McGraw-Hill Interamericana.
- Sigerist, H.E., 1974, Fundación de la anatomía en el Renacimiento, en *Historia y sociología de la medicina*, edición del doctor Gustavo Molina, Bogotá, pp. 147-152.



- Torres K., R. 2000. Introducción a los surfactantes y sus aplicaciones. Curso dictado durante el VI COLAEIQ – V CONEIQ [VI CONG. LATINOAMERICANO DE ESTUDIOS DE INGENIERIA QUÍMICA Y V CONGRESO NACIONAL DE ESTUDIOS DE INGENIERÍA QUIMICA] aprobado por la Dir. Gral. de Escuelas de la Provincia de Mendoza, Argentina - 7 al 12 de agosto de 2000.
- Tórtora, G. J. y S. Reynolds Gi. 1998. Principios de Anatomía y Fisiología. Harcourt Brace de España S. A. Séptima edición. Madrid. Pp 5, 21, 25, 26.
- Tuttle, M. D. 1997. El Mundo de los Murciélagos. America´s Neighborhood Bats Universty or Texas Press, 1997 (Rev. Ed.), pp. 5-16
- Valdez A. R. 1999. William Harvey. En Elementos. Revista trimestral. Julio-Septiembre. 1999. 35 (6) : 1-9
- Von Hagens, G. 1979 a. Polymers for plastination. Impregnation of Biological Specimens with Polymers for RESEARCH AND EDUCATIONAL PROGRAMS. Issued: November 1979.
- Von Hagens, G. 1979 b. Impregnation of Soft Biological Specimens with Thermosetting resins and Elastomers<sup>1</sup>. Anatomisches Institut der Universitat Heidelberg. D.-6900 Heidelberg. Federal Republic of Germany. Reprinted from The Anatomical Record. Vol. 194, No. 2, june 1979. The Wistar Institute Press 1979. pp 247-255.
- Wollman M. 1955. Problems of fixation in cytology, histology and histochemistry. In International Reww of Cytology. IV. Bourne C. H. And Danielli I. F. (eds). Academic Press. New York. Pp 569.
- Wollman M. 1956. A histochemical method for the differential staining of acidic tissue components (particularly ground-substance polysaccharides) Bull. Exp. Res. Council. Israel. Section E. Experimental medicine 6 E. 27-35.



## XI.- ANEXOS



## ANEXO 1

### CARACTERÍSTICAS DE LOS ORGANISMOS

Tabla 1. Características de los Murciélagos

NUMERO DEL FRASCO	CANTIDAD de ORGANISMOS	LUGAR de COLECTA	FAMILIA Y ESPECIE *
FRASCO NO. 1	1 Hembra	Guerrero	Phyllostomidae
FRASCO NO. 2	2 Adultos	Oaxaca	Phyllostomidae <i>Carollia perspicillata</i>
	4 Adultos	Oaxaca	Fam. Phyllostomidae <i>Sturnira lilium</i>
FRASCO NO. 3	4 Adultos	Oaxaca	Phyllostomidae
FRASCO NO. 4	1 Adulto - 1 cría	Catemaco Veracruz	Molossidae <i>Molossus rufus</i>
FRASCO NO. 5	2 Adultos	Oaxaca	Phyllostomidae <i>Artibeus jamaicensis</i>
FRASCO NO. 6	4 Adultos	Oaxaca	Phyllostomidae <i>Carollia brevicauda</i>
FRASCO NO. 7	1 Adulto	Hidalgo, Nte. De Atotonilco. Munic. Plan Colorado	Phyllostomidae
FRASCO NO. 8	84 Adultos	Guerrero, Gro. Colotlipa, Grutas de Juxtlahuaca	Mormoopidae <i>Mormoops megalophylla</i>
FRASCO NO. 9			
FRASCO No 10	4 Adultos - 1 cría	Guerrero, Gro. Colotlipa, Grutas de Juxtlahuaca	Mormoopidae <i>Pteronotus parnelly</i>
FRASCO No 11	23 Adultos	Guerrero, Gro. Colotlipa, Grutas de Juxtlahuaca	Phyllostomidae <i>Glossophaga sp</i>

\* (Medellín, Arita y Sánchez. 1997; Coates-Estrada y Estrada, 1986)



**Tabla No. 3. Características de los organismos**

NUMERO DEL RECIPIENTE	CANTIDAD de ORGANISMOS	LUGAR de COLECTA	FAMILIA Y ESPECIE *
1	10	Criados en el bioterio	Fam. Muridae <i>Mus musculus</i>
2	3	DONACIÓN	Fam. Bovidae <i>Ovis ammon aries</i>
3	2	DONACIÓN	Fam. Canidae <i>Cannis domesticus</i>
4	1	DONACIÓN	Fam. Felidae <i>Felis catus</i>
5	5 Adultos 2 crías	Criados en el bioterio	Fam. Muridae <i>Peromyscus leucopus</i>

- [Getty, 1996]

## TAXONOMÍA

**Nombre común** Carnero en adultos,  
cordero o borrego la cría

Reino Animalia  
 Subreino Eumetazoa  
 Rama Bilateria  
 Filo Chordata  
 Subfilo Vertebrata  
 Clase Mammalia  
 Subclase Eutheria  
 Orden Artiodáctila  
 Suborden Rumiantes  
 Familia Bovidae  
 Subfamilia Bovinae  
 Género Ovis  
 Especie *Ovis ammon aries* [Goldman, 1937]

[ Nowak, y Paradiso, 1983; Ewer, 1998]



Nombre común **Ratón doméstico**

Orden Rodentia  
 Suborden Sciurognathi  
 Familia Muridae  
 Subfamilia Sigmodontinae  
 Género Peromyscus  
 Especie Peromyscus leucopus (Rafinesque, 1818)

[Nowak, y Paradiso, 1983; Ewer, 1998]

Género Mus (Linnaeus, 1758)  
 Especie Mus musculus

[Nowak, y Paradiso, 1983; Ewer, 1998]

Nombre común **Murciélagos**

Orden Chiróptera  
 Familia Mormoopidae  
 Género Mormoops  
 Especie *Mormoops megalophylla* (Peters, 1864)

[Medellín, Arita y Sánchez. 1997; Coates-Estrada y Estrada, 1986; Tuttle, 1997; Alvarez-Castañeda y Patton, 1999]

Género Pteronotus  
 Especie *Pteronotus parnelli* (Gray, 1843)

[Medellín, Arita y Sánchez. 1997; Coates-Estrada y Estrada, 1986; Tuttle, 1997; Alvarez-Castañeda y Patton, 1999]

Familia Phyllostomidae  
 Subfamilia Phyllostominae  
 Tribu Glossophagini  
 Género Glossophaga  
 Especie *Glossophaga soricina* (Pallas, 1766)

[Medellín, Arita y Sánchez. 1997; Coates-Estrada y Estrada, 1986; Tuttle, 1997]

Tribu Stenodermatini  
 Género Carollia  
 Especie *Carollia brevicauda* (Schinz, 1821)

[Medellín, Arita y Sánchez. 1997; Coates-Estrada y Estrada, 1986; Tuttle, 1997]



Género *Carollia*

Especie *Carollia perspicillata* (Linnaeus, 1758)

(Medellín, Arita y Sánchez. 1997; Coates-Estrada y Estrada, 1986; Tuttle, 1997)

Género *Sturnira*

Especie *Sturnira lilium* (É. Geoffroy St.-Hilaire, 1810)

(Medellín, Arita y Sánchez. 1997; Coates-Estrada y Estrada, 1986; Tuttle, 1997)

Familia Molossidae

Subfamilia Molossinae

Género *Molossus*

Especie *Molossus rufus* (É Geoffroy St.-Hilairee, 1805).

(Medellín, Arita y Sánchez. 1997; Coates-Estrada y Estrada, 1986; Tuttle, 1997)



## ANEXO NO. 2

### 2.1 Conservadores

**Tabla 3.** Relación de los principales fijadores Anatomía Patológica y sus principales propiedades y usos (Del suplemento No. 2 de Conecta IAAN-4826)

Fijador	Mecanismo de fijación	Tiempo recomendado	Aconsejado para	Propiedades	Inconvenientes
<b>Formol</b>	Reticulación proteica	Muestras pequeñas: 6-10 horas. Muestras grandes: 10-24 horas	Cualquier tejido	Penetración alta. Económico. No endurece excesivamente. No retrae excesivamente.	Irritante. Fija lentamente.
<b>Formol-Zinc</b> (Formol+Sulfato de Zn)	Reticulación proteica.	Un mínimo de 4-6 horas.	Cualquier tejido.	Fija a mayor velocidad. Preserva mejor la morfología.	Irritante. No comercializado; debe prepararse.
<b>Etanol</b> 70-90% Etanol + Agua.	Deshidratación.	Mínimo 10 minutos.	Citología. Criofijación.	Penetrancia elevada. Fijación muy rápida. Microbicida y conservante.	Fija mal la cromatina. Endurece y retrae los tejidos. Impide una buena tinción.
<b>Etanol-Acetona</b> 90% Etanol + 10% acetona al 19%.	Deshidratación	10-15 minutos.	Citología. Criofijación.	Es un fijador rápido.	Endurece excesivamente el tejido. Impide una buena coloración.
<b>Acetona</b>	Reticulación proteica	10 minutos.	Citología.	Buen fijador en extensiones celulares. Rápido.	Retrae y endurece los tejidos.
<b>Bouin</b> Mezcla de Formol puro y ácido pícrico al 1,2%	Reticulación proteica	1-12 horas	Piel, órganos endocrinos, testículo, tejidos embrionarios.	Fijación muy rápida.	Mal fijador de lípidos. Una exposición excesiva destruye los tejidos.
<b>B-5</b> (Formol, Cloruro de mercurio y acetato sódico)	Reticulación proteica	1-4 horas.	Tejido linfoide.	Incrementa el detalle citológico.	Endurece los tejidos. Baja penetrancia.
<b>Glutaraldehido</b>	Reticulación proteica.	2 horas	Microscopía electrónica	Preserva muy bien la morfología.	Baja penetrancia. Retrae y endurece los tejidos. Altamente tóxico.



**2.1.1 Acido tánico.** Efectivamente, el tanino que contiene el vino tinto tiene propiedades surfactantes, es decir, tiene una acción similar a la del jabón o los detergentes. Sus moléculas poseen una parte hidrocarbonada (hidrófobo) y una parte polar (hidrofílica) soluble en agua. Así la parte polar del ácido tánico se disuelve en la saliva, mientras que la parte no-polar, hidrófobo, se disuelve en la película de grasa que cubre la cavidad bucal, particularmente en la que cubre las papilas gustativas en la superficie de la lengua (Glories,1978).

**2.1.2 Formol.** Se obtiene por oxidación del metanol, usando plata u óxidos metálicos (hierro y molibdeno) como catalizadores. Además las emisiones que resultan de su fabricación y uso, el formaldehído es liberado a la atmósfera por combustión incompleta y por la descomposición fotoquímica de sustancias traza orgánicas.

En seres humanos y mamíferos, irrita intensamente las mucosas, la conjuntiva, la piel y las vías respiratorias superiores. Disuelto en agua es un tóxico protoplasmático con efecto cáustico y desnaturalizador de la albúmina concluyendo que en elevadas concentraciones y períodos de exposición prolongados, es capaz de inducir carcinoma escamoso en la mucosa nasal de ratas, alertando al mismo tiempo del posible riesgo que podría representar para la salud humana. Su propiedad de alterar las proteínas tisulares, como contrapunto, también tiene desventajas:

- Rigidez de estructuras que en la disección anatómica el docente y el investigador se han propuesto evitar para prevenir alteraciones en el manejo de ejemplares y en los resultados del estudio a realizar.
- Riesgos sobre la salud, sus propiedades fisicoquímicas lo convierten en un gas incoloro y soluble en agua, cuya emisión a la atmósfera afecta no sólo a las personas que manipulan el producto sino también a todo el personal presente en las instalaciones, determinando:
- Irritación sobre la mucosa ocular los vapores, las salpicaduras pueden causar quemaduras corneales graves.



- Irritación de la mucosa nasal y el tracto respiratorio superior, derivando en asma, bronquitis e incluso edema de pulmón y muerte, si las concentraciones son muy elevadas y el tiempo de exposición prolongado.

También es irritante de los tejidos cutáneos; así, el contacto repetido con los tegumentos da lugar a eczemas y a veces, verdaderas úlceras y alteraciones inguinales, pudiendo motivar cuadros de sensibilización y dermatitis de tipo alérgico (Lillie, 1965; Gestal, 1993; Arráez, 1997).

### **2.1.2.1 Degradación y productos de descomposición del formol**

Reacciona con el agua formando polimetileno, con HCl forma bis-clorometil éter, que es altamente carcinógeno y cataliza aminas secundarias, formando compuestos N-nitrosos/nitrosaminas, que también son carcinógenos (Moore, 1988)

Se tampona a pH 7,0, con buffer de fosfato, por lo que carece de las propiedades nocivas del formol concentrado, asegurando reacción neutra y ausencia de acidez, además de disminuir notablemente las propiedades carcinógenas e irritantes de formol concentrado (37%<sub>p/p</sub>) no tamponado (Ballenger, 1985). Las propiedades del HCHO en los procesos de preservación de los tejidos se descubrieron en 1893. No obstante, en ese momento se desconocía su alto potencial tóxico (Perkins et al., 1986). La agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) determinó por medio de evidencias de tipo humano y animal, en la exposición al HCHO a concentraciones entre 0.1-5 ppm, se producen manifestaciones de sensación quemante y de lagrimeo ocular y desde irritación hasta daño permanente en ojos y garganta cuando se salpica con una solución acuosa del compuesto. Con 10 ppm (concentración peligrosa) se produce sensación de asfixia y a 50 ppm causa daños severos (Clark, 1983).

### **2.1.3 ALGUNOS EFECTOS DE LA FIJACIÓN**

Con la finalidad de prevenir que los tejidos y con ellos, las células se prepararán adecuadamente para el proceso de fijación, es útil conocer, la velocidad de penetración de un fijador, el grado de endurecimiento que provoca en los tejidos, o el nivel potencial de deformación y contracción de los fijadores a emplear (Moret, 1990).



**Velocidad de penetración y velocidad de fijación.-** Se pretende que al determinar la dimensión y características de las piezas a fijar se deberá tomar en cuenta las distintas velocidades a las cuales penetran las soluciones químicas en el interior de los tejidos. Según las leyes de la difusión, la velocidad de penetración disminuye progresivamente a partir del momento en que se sumerge la pieza en el fijador. La velocidad de penetración es un fenómeno físico, mientras que la velocidad de fijación es un fenómeno químico que corresponde al tiempo que se requiere para la precipitación o insolubilización de los constituyentes celulares. El tiempo que debe durar la fijación está en función de su velocidad.

	<b>Coefficiente de penetración</b>
1.- Solución acuosa de ácido pícrico al 0.75%	.41
2.- Solución acuosa de tetróxido de osmio al 2%	.71
3.- Solución acuosa de ácido crómico al 1%	.83
4.- Solución acuosa de sublimado saturada	.92
5.- Solución acuosa de formol al 4%	1.2
6.- Solución acuosa de alcohol etílico 96%	1.1
7.- Solución acuosa de ácido acético al 5%	1.4
8.- Solución acuosa de bicromato potásico al 3%	1.5

[Martoja y Martoja, 1970]

## 2.2 TINCIÓN

En la interpretación y el resultado final del trabajo de investigación, donde es necesario complementar con un estudio morfológico y anatómico con el microscopio, los colorantes son los encargados de proporcionar a las estructuras un contraste suficiente para poder diferenciarlos siendo de gran utilidad en la reconstrucción espacial de las buenas imágenes citológicas y por lo tanto histológicas como la imperiosa calidad requerida en este trabajo dirigido especialmente a las diferentes variantes de estudios osteológicos, o bien, para la observación del tejido residual después de la digestión alcalina, para comprender sus peculiaridades y el resultado generado en este trabajo. Por lo tanto sólo mencionaremos los tintes utilizados aquí, y sus principales características.

**2.2.1 Tinte de Alizarina:** 1: 2-dihydroxiantraquinona. Se la encuentra como glucósido (ác. Ruberítrico) Su nombre es Alizarina S. Sus sinónimos son Alizarine, Carmine; C. I. Mordant. Red 3c.58005. Subpartida: 29/4 Fórmula condensada C<sub>14</sub>H<sub>7</sub>NaO<sub>7</sub>S.



Glucósido de las antraquinonas, sustancias amargas que estimulan la digestión, usadas contra infecciones en el corazón por estafilococos; contra infecciones por *Shigella* u otras bacterias causantes de disentería (Gibaja, 1998).

Alizarina: Colorante vegetal que antiguamente se extraía de las raíces de la granza y que ahora se produce sintéticamente de antracita. Disuelta en alcohol rinde compuestos coloridos brillantes cuando hace contacto con óxidos metálicos. Estos se utilizan con fines de teñido (Carcedo, 2001).

**2.2.2 Tintes Hematoxilina-Eosina:** En términos generales, la técnica de HE se usa en histología porque permite apreciar detalles estructurales, aunque no evidencia adecuadamente ciertos componentes como la elastina, fibras reticulares, membranas basales y lípidos, pero sin embargo aunque no especializada, resulta funcional, proporcionando información detallada acerca de un tejido y sus componentes extracelulares adyacentes. Los componentes texturales que no se pierden durante dicha técnica de tinción, son las moléculas grandes que no se disuelven con facilidad, en especial después de la acción del fijador, sobre los grandes agregados insolubles como proteínas intracelulares del citoesqueleto y aquellas asociadas con moléculas vecinas similares a través de enlaces cruzados como las fibras de colágenas además de otras. Un procedimiento adicional que se emplea en conjunto con las tinciones a pH controlado, es la digestión enzimática selectiva de sustratos del corte histológico antes de proceder a la coloración.

La hematoxilina, aunque no es un colorante básico, posee propiedades tintoriales muy semejantes a las de las anilinas básicas (con una o más cargas positivas en su porción coloreada) y el término basofilia, por las características del tejido que reacciona con dichos colorantes, se utiliza para relacionarlos, mientras que la eosina es un colorante ácido y sus propiedades tintoriales, como en toda acción de las anilinas ácidas, lleva una carga negativa en la porción coloreada de la molécula.

(Robinson y Fayer, 1991)



## 2.3 RESINAS

En forma genérica las resinas son sustancias sólidas o pseudosólidas pertenecientes a la química orgánica que se incluyen dentro de los materiales poliméricos y frecuentemente son de elevado peso molecular y da productos plásticos, por su procedencia se pueden clasificar en resinas naturales o de origen vegetal y raramente de origen animal, resinas artificiales procedentes de la modificación química de ácidos grasos, resinas naturales o sustancias macromoleculares y por último resinas sintéticas que proceden de reacciones químicas controladas. La elegida para el presente trabajo fue la resina poliéster (Granados, 1989).

### 2.3.1 RESINA POLIÉSTER

Pertenecen a las resinas sintéticas termoestables, llamadas también durómeros, o duroplastos, las cuales son materiales poliméricos que son curables mediante la acción de calor o endurecedores apropiados. En este trabajo se usó el catalizador específico llamado Peróxido de metil-etil-cetona (Ir a curado o endurecido, Anexo 3 técnica 4.2).

## 2.4 CATALIZADORES

Agentes de reticulación son productos químicos tales como catalizadores o endurecedores que se añaden en algunos casos a las resinas termoendurecibles, en el momento de su utilización, para iniciar la reticulación de la misma; este proceso puede favorecerse mediante tratamientos térmicos, fotoquímicos o químicos mediante el empleo de aceleradores para favorecer la acción del catalizador. También se pueden utilizar inhibidores para retardar la reticulación que puede tener lugar durante el almacenamiento de la resina.

### 2.4.1 CATALIZADOR ESPECÍFICO.

El catalizador utilizado en este estudio fue el: PERÓXIDO DE METIL-ETIL-CETONA.- Es un peróxido orgánico.

[solución de aproximadamente 50%]

- I. Utilización Fabricación de poliésteres y resinas acrílicas.
- II. Peligros Líquido combustible. Alto riesgo de incendio y explosión. Fuerte agente oxidante. Se descompone lentamente a temperatura ambiente, rápidamente si está



contaminado. Se puede producir una violenta ignición si se mezcla con materiales fácilmente oxidables o aceleradores, o bien si se calienta. Los incendios son difíciles de extinguir, ya que el peróxido de metil etil cetona contiene oxígeno. Tóxico, fuertemente irritante a la piel, los ojos y otros tejidos del cuerpo humano.

<p>III. <u>Características</u> Fórmula: C 8 H 16 O 4 .</p> <p>Otro nombre producto: peróxido de etil metil cetona</p> <p>Estado físico: líquido incoloro diluido en ftalato de dimetilo u otros disolventes</p> <p>Punto de inflamación: 50 a 95°C</p>	<p>Temperatura descomposición autoacelerada: aproximadamente 60°C</p> <p>Punto fusión: Por debajo de -10°C</p> <p>Peso específico(agua=1): 1,1</p> <p>Miscible con: casi insoluble en agua</p> <p>Toxicidad/valor límite umbral: 0,2 ppm</p>
--	--

Reacciones químicas: se descompone lentamente a temperatura ambiente, sobre todo si está contaminado, desprendiendo oxígeno. Se descompone catalíticamente por la acción de metales como acero dulce, cobre, cromo y plomo. Puede inflamarse en contacto con naftenato de cobalto.

Solución del 50% o menos presencia de oxígeno > 10% ; Solución del 60% o menos presencia de oxígeno 3/4 10%

Número ONU: 2563 2550 2127      Catálogo CEA: G1 B Ex

[Autor Anónimo. 2000]



## ANEXO NO. 3

### 3.1 TÉCNICAS.

#### 3.1.1.- TÉCNICA DE FIJACIÓN CON FORMOL SEGÚN EL ÍNDICE DE MERCK

La solución de formaldehído, aproximadamente 40% de gas formaldehído en agua, el cual se neutraliza con un buffer para evitar los llamados “artefactos” de la fijación, y algunos de sus posibles daños en los usuarios.

Debido a su oxidación con el ácido fórmico, no debe permanecer en contacto con los cromatos a efecto de contrarrestar el efecto del ácido fórmico, se puede bufferear con fosfato de sodio monobásico y dibásico.

Las reacciones del formol con las proteínas de los tejidos son numerosos y complejos, pero de hecho se acepta que no precipitan proteínas y sólo precipitan ligeramente los otros constituyentes celulares.

La formalina ni preserva ni destruye grasa, y es buena con los lípidos complejos pero no genera efectos sobre grasas neutrales.

El formol no es fijador de carbohidratos, preserva las proteínas, las cuales a su vez, retienen glicógeno, por lo que no se disuelven fácilmente.

Solución de formol buffereado o neutralizado

Formol al 37%-40%.....	100 ml
Agua destilada.....	900 ml
Fosfato de sodio monobásico.....	0.4 gm
Fosfato de sodio dibásico (anhidro).....	6.5 gm

[Moret, 1990]



### 3.1.2.- TRANSPARENTACIÓN:

La transparentación consta básicamente de dos fases: Tinción y diafanización.

#### I) TINCIÓN

La alizarina tiñe las sales de calcio color rojo, pero también puede teñir otras sustancias.

Los oxalatos de calcio pueden demostrarse por su refringencia bajo luz polarizada.

(Hollister, 1934; Martoja y Martoja, 1970; Gibaja 1998).

#### II) DIAFANIZACIÓN.

PREPARACIÓN DE LAS PIEZAS. Se introcen en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 4% y Rojo de Alizarina "S" al 0.01%, por un período de 20 días, revisándolos diario para que los elementos óseos se tiñan de este color [entre rojo y morado intenso].

(Hollister, 1934)

#### 3.1.2.1 TÉCNICA GLORIA HOLLISTER.-

Según Hollister, para evitar la alteración exagerada en los tejidos, se debe incrementar alcohol al 70% a la solución de hidróxido de potasio, pero la duración de su aplicación no debe ser larga, o los tejidos óseos pueden resultar perjudicados por descalcificación, aunque en menor grado que con la reacción del formol sobre los mismos.

La alizarina es soluble en agua y alcohol , y es un tinte ácido en una solución alcalina y es esencial en tinción ósea.

Solución Saturada de Alizarina:

Ácido acético glacial, al 50%.....	5 cc
Glicerina.....	10 cc
Cristales de Cloro hidratados en solución al 1%.....	60 cc

El uso de agua destilada es conveniente y absolutamente necesaria para soluciones de alizarina.



La solución ordinaria del tinte de alizarina es:

Tinte de alizarina..... 1 cc

Hidróxido de potasio al 1 O 2%..... 1000 cc

(Hollister, 1934).

### 3.1.2.2 TÉCNICA GUIDO DINGERKUS Y LOWELL D. UHLER.-

Procedimiento.

1.-Fije material fresco en formalina al 10% por 2 o 3 días o más. Para especímenes listos en formalina o alcohol, ignorar el paso 1 e ir directamente al 2.

2.- Lave en varios cambios de agua destilada, por 2 o 3 días. Desolle y eviscere ejemplares y escame a los peces.

3.- Ponga directamente en una mezcla de azul de alciano RGN, 80 ml de alcohol etílico al 95% y 20 ml de ácido glacial acético, durante 24 a 48 horas.

4.- Transfiera a 2 cambios del alcohol etílico, de 2 a 3 horas por cada cambio.

5.- Transfiera a través de soluciones de alcohol etílico al 75%, 40% y 15% de 2 a 3 horas en cada caso o hasta que el ejemplar se hunda.

6.-Haga pasar al ejemplar por agua destilada de 2 a 3 horas o hasta que el espécimen baje y se sumerja completamente.

7.- Colóquelo en una solución acuosa saturada y enzimática de borato de sodio, con agua destilada de 7 ml y 1 g [aproximadamente 1/4 de cucharadita cafetera] tripsina (4x pancreatina, bioquímico nutricional). Cambie la solución cada 2 o 3 días o más pronto si la solución se torna azulosa. Continúe hasta que los huesos y cartílagos sean claramente visibles y la carne no retenga color azul. Puede tomar de 2 a 3 semanas.

8.- Transfiera a KOH acuoso al 0.5%, al cual se haya añadido suficiente rojo de alizarina "S" y cuya solución se haya vuelto púrpura profundo. Deje 24 horas, o hasta que los huesos sean notoriamente rojos.



9.-Hágalos pasar a través de un tren de KOH-glicerina desde el 5% , por tres series que son (3:1, 1:1 y 1:3) hasta glicerina pura. Para la primeras dos soluciones KOH-glicerina, se pueden adicionar de 3 a 4 gotas de agua oxigenada al 3% por cada 100 ml de solución para aclarar los pigmentos de especimenes oscuros. Los ejemplares pueden dejarse en el paso de aclarado por varios días o hasta que los pigmentos oscuros se remuevan.

10.- Almacenar los ejemplares en glicerina pura a la cual se hayan añadido uno cuantos cristales de timol, el cual inhibe el crecimiento de mohos y bacterias.

[Dingerkus y Uhler, 1977]

### **3.1.2.3 TÉCNICA GOSTONYI.-**

El uso de reabsorción en base a enzimas para llevar a cabo una digestión de tipo alcalino y así transparentar pequeños vertebrados por medio de la técnica de teñido de huesos y tejidos afines con rojo de alizarina se basó en una prueba y mejora de la técnica de Hollister y de Schultze . Sugiere que los cartílagos se tiñan con azul de alciano en una solución de alcohol ácido, para provocar una digestión al mismo tiempo que la tinción de dichos cartílagos por afinidad del tinte con los carbohidratos y mucoproteínas, constituyentes de los mismos.

[Gostonyi, 1984]

### **3.1.2.4 TÉCNICA PARK Y SOO KIM.-**

Como parte de su demostración de la importancia de la transparentación y tinción en los estudios de malformaciones osteológicas, probó la técnica en embriones donde utiliza también hidróxido de potasio con rojo de alizarina y alcohol ácido con azul de alciano al igual que sus contemporáneos como Gostonyi [Park y Soo Kim, 1984].

### **3.1.2.5 TÉCNICA MODIFICADA DE GERSENOWIES, GONZÁLEZ, (1993), UTILIZADA EN EL PRESENTE TRABAJO.-**

A.- Lave en varios cambios de agua corriente, por 2 o 3 días. Desolle y eviscere ejemplares.

B.- Ponga directamente en una mezcla de rojo de alizarina "S" al 1%, y KOH al 2-4% durante 24 a 48 horas.



**C.-** Transfiera a 2 cambios de KOH al 2–4%, de 2 a 3 días por cada cambio (hasta que la digestión alcalina se haya completado).

**D.-** Transfiera a través de un tren de soluciones de glicerina al 20%, 40%, 60%, 80% y 90% de 2 a 3 días en cada solución.

Puede tomar de 2 a 3 semanas.

**E.-** Almacenar los ejemplares en glicerina pura, la cual inhibe el crecimiento de mohos y bacterias debido a su acción altamente higroscópica.

(Gersenowies y González, 1993)

### **3.1. 3.- INCLUSIÓN EN RESINAS**

Se realiza mediante el empleo de materias plásticas transparentes, duras que se retraigan lo menos posible al secado (Correa, 2002). Las resinas poliéster poseen esas propiedades pero en comparación con otras resinas pueden resultar con desventajas, como la transparencia o translucidez obstruida por el teñido de ciertas resinas metalacrílicas (Baset, 1947).

#### **Se realiza en cuatro tiempos:**

**1.- Preparación de la pieza.-** Las muestras o piezas deben ser limpiadas y luego enjuagadas en acetona. Las muestras blandas son fijadas y deshidratadas, pero esto puede alterar los colores. El molde que se necesita para la inclusión puede ser de cartón, que no sirve más que para una vez, otros pueden ser de placas de cristales unidas por cintas adhesivas (esparadrapo), otras de plástico flexible, etc., según afirma Correa (2002), los moldes de goma son los mejores ya que se pueden utilizar con mayor frecuencia.

**2.- Recubrimiento o envoltura.-** Una capa de resina es polimerizada en el fondo del molde de placa de base sobre la cual se coloca el objeto (pieza o muestra). El resto de la sustancia se vierte enseguida en el molde, en capas sucesivas para evitar que la pieza flote. Cuando está recubierta se deja secar al resguardo del polvo, mediante cubiertas que pueden ser de celofán. Estas distintas operaciones se hacen en intervalos de 7 a 20 horas cuando menos.



**3.- Vaciado.-** Cuando la resina está dura, los bloques se desmoldan y luego se cortan en las medidas deseadas.

**4.- Pulido.-** Cada cara del bloque se pasa por papel de lija fina, hasta retirar la capa superficial, y hasta eliminar todas las ralladuras. La utilización de pastas para pulir, propician la nitidez del bloque [Correa, 2002].

### **3.1.4.- TÉCNICA DE PLASTINACIÓN**

#### **3.1.4.1 TÉCNICA DE VON HAGENS**

Esta práctica mencionada, consta de 4 fases:

##### **I) Fijación.-**

El ejemplar se fija y se deshidrata en la forma usual, con formol bufferado al 4%.

##### **II)Deshidratación.-**

Por medio de un tren de alcohol-acetona.

##### **III) Impregnación forzada.-**

Se transfiere el ejemplar en una solución de resina no polimerizada, totalmente inmerso.

##### **IV) Curación.-**

Se inyecta con gelatina coloreada que penetra capilarmente, dándole otra apariencia al tejido. Siguiendo la coloración del ejemplar, se fija con formalina y se deshidrata con acetona.

El deshidratado y la saturación de los ejemplares con acetona, se transfieren a un equipo de vacío que contiene solución de silicón. Se conecta por medio de una manguera flexible a una bomba de vacío cuyo nivel se incrementa, la acetona se evapora en forma gradual



permitiendo al silicón moverse a través del tejido del ejemplar e impregnarlo. Dependiendo de la temperatura, esto toma hasta 3 semanas.

Cuando se remueve al ejemplar del equipo de impregnación se permite el secado por algún tiempo para evitar que el exceso de silicón se derrame. Se limpia la superficie y se efectúan ajustes cosméticos.

El silicón líquido entonces, se endurece, colocando al ejemplar en un recipiente, con humo, exponiéndolo a catalizadores.

El catalizador es líquido pero se nebuliza con aire comprimido y BLOWN sobre la superficie del espécimen. (Von Hagens, 1979, Karow, 2000).

#### **Los polímeros para la plastinación deben tener las siguientes propiedades:**

- Baja viscosidad con facilidad de penetración
- El polímero usado para la impregnación debe tener un tiempo de proceso largo ó mejor indefinido
- Alta presión de vapor de todos sus componentes
- Adecuadas propiedades mecánicas y ópticas
- No separarse de los diferentes ingredientes durante la impregnación

El cuerpo se embalsama con un inyector arterial y se somete a una temperatura de  $-50^{\circ}$  en acetona, para eliminar la grasa que pudiera tener. Se realiza una succión y aplica una solución de plástico líquido que luego adquiere una consistencia dura, hasta dejar la piel con su apariencia natural" (Arráez 1997).



### 3.1.4.2.- TÉCNICA DE PLASTINACIÓN. ESTANDARIZACIÓN PARA LA DIAFANIPLASTINACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO

De acuerdo a la modificación de la técnica de Plastinación por impregnación pasiva de Gersenowies y González, (1993), los pasos principales para llevar a cabo la modificación requerida en este trabajo son los siguientes:

**a) DESHIDRATACIÓN.** Se lleva a cabo con diversas sustancias, aquí se utilizó principalmente el alcohol isopropílico o isopropanol.

**b) INMERSIÓN EN SUSTANCIAS MISCIBLES CON RESINA.** Se produce sumergiendo a los ejemplares en trenes de sustancias que los hacen afines a la resina facilitando el paso de la misma en su proceso de impregnación pasiva.

**c) IMPREGNACIÓN PASIVA.** Se sumergieron en un recipiente con solución de resina poliéster no polimerizada. La resina se infiltra en forma gradual a través del tejido del ejemplar y lo impregna. Dependiendo de la temperatura del ambiente, este es entonces un proceso relativamente lento, sin embargo, por económico es más accesible. Después se tiene que preparar para el curado, aquí se pasó por el tren: (40%, 80%, y 100%) de resina poliéster/acetona 1:1 (Gersenowies y González, 1993).

**e) CURADO O ENDURECIDO.** También llamado gelación o vulcanización. En los procesos de polimerización se pueden producir ramificaciones en la moléculas formadas. Esto sucede cuando en el baño de la reacción se encuentran unidades con funcionalidad (número de enlaces covalentes con otras unidades) mayor a dos. La reacción a niveles altos forma una molécula infinita tipo red con tamaño igual al recipiente que la contiene.

Al proceso de formación de la red infinita se le conoce como gelación (vulcanización, si se trata de curado de hule por introducción de azufre). La gelación es una transición de fase geométrica, debajo de cuyo punto de transición existen solo moléculas finitas, mientras que arriba de él las moléculas finitas coexisten con la molécula infinita y el punto mismo de transición, marca la aparición de la molécula macroscópica.



Según González (1986), el método de Flory, que consiste en moléculas lineales que poseen  $N$  unidades monoméricas, formando por uniones covalentes, una cadena polimérica reticular, donde cierto número "X" de agentes vulcanizantes se hacen reaccionar, conectando pares de unidades monoméricas al azar. Se define "p" como la fracción de monómeros que reaccionaron con los agentes vulcanizantes.

$P = 2X/nN$ , [Dos monómeros por cada agente vulcanizante, donde  $n$  es el número total de cadenas en el sistema]

En pocas palabras, en contacto con el catalizador disuelto al 10% en acetona, las macromoléculas que forman la estructura polimérica de la resina, se encuentran reticuladas en el espacio y durante el proceso de endurecimiento o curado, se reticulan más estrechamente.

[González, 1986]

### 3.1.4. 5.- TÉCNICA HISTOLÓGICA DE INCLUSIÓN EN PARAFINA

Según Lynch y Colaboradores (1972), consiste en deshidratar trozos de tejido con alcohol etílico o acetona, transparentar con diversas sustancias como xileno, tolueno, cloroformo, etc. Y pasar por una serie de parafinas con un punto de fusión cada vez mayor hasta llegar a la de máxima dureza [generalmente entre 57-60 ° C de Punto de Fusión], la fijación se realiza entonces por la absorción pasiva y el revestimiento de parafinas reemplazando los líquidos tisulares de los cuales se hacen bloques que se cortarán posteriormente [Lynch et al., 1972; Correa, 2002].

Para inclusión de animales completos:

1. Al ejemplar que se desee conservar, se le puede dar la forma adecuada con ayuda de alfileres, clavos, tablas, etc.
2. Se fija en formol al 10% durante un mínimo de 72 horas.
3. Se lava con agua corriente para quitar el exceso de formol 2 veces por 24 horas.
4. Se deshidrata con alcohol etílico al 7% por 24 horas.



5. Se coloca en alcohol etílico al 80% durante 24 horas.
6. Se cambia a alcohol etílico al 90% durante 24 horas.
7. Se coloca en alcohol etílico absoluto durante 24 horas.
8. Se cambia a una mezcla de alcohol etílico absoluto- xilol [1:1] por 48 horas (se pueden usar otros solventes como tolueno, cloroformo, benceno, etc.).
9. Se introduce en xilol por 48 horas.
10. Se mete a una estufa incubadora a 60° C en una mezcla de Xilol-parafina P:F: 56-58° C durante 48 horas.
11. Se coloca inmerso en parafina pura (P: F: 56-58° C) dentro de la estufa a 60° por 72 horas.
12. Se extrae de la parafina e inmediatamente se coloca, aún dentro de la estufa, sobre una charola con abundante papel para escurrir el exceso de parafina, por 2 o 3 hors.
13. Se enfría con agua lo más rápidamente posible para evitar deformaciones debidas a la contracción que la parafina sufre cuando se enfría.

Los ejemplares así tratados se pueden usar para fines didácticos y museos, de igual manera que los tratados por taxidermia o incluidos en resinas. Esta técnica es útil, ya que tiene la ventaja sobre el curtido y relleno con aserrín, algodón y otros materiales que se usan en taxidermia, de que no existe el problema de que se generen polillas. También tiene la ventaja de que se puede aplicar en moluscos, anélidos y otros organismos blandos que generalmente no se disecan y solo se pueden preservar inmerso en líquidos o incluidos en resinas (García-Domínguez, 1987).