

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA
Y ZOOTECNIA

TÉCNICAS DE DIAFANIZACIÓN DE FETOS DE RATA
(RATTUS NORVEGICUS ALBICANS): ESTUDIO DE REVISIÓN
(RECOPILOACIÓN BIBLIOGRÁFICA)

TESIS

QUÉ PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA

ELADIO GONZÁLEZ

Asesor:

MVZ Santiago Aja Guardiola

México, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIA

A MI MADRE MARIA SOLEDAD GONZALEZ JAIME Y A MI ABUELA

INES JAIME PANTOJA: (FINADAS).

QUE CONTRIBUYERON PARA MI SUPERACION.

A MI COMPAÑERA:

JOANNA KRYSTINA ROSTANNSKA QUIEN ME BRINDO SU
APOYO, COMPRENSIÓN Y AMOR PARA REALIZAR ESTA
TESIS.

A MIS MAESTROS:

QUE ME ENSEÑARON, INSTRUYERON Y ORIENTARON

DURANTE MIS ESTUDIOS. EN ESPECIAL AL DOCTOR

SANTIAGO AJA GUARDIOLA.

AGRADECIMIENTOS

A FERNANDO ALLIER HERNÁNDEZ: QUIEN ME ORIENTO PARA SALIR
ADELANTE Y LOGRAR REALIZAR ESTA TESIS.

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
FUNDAMENTOS E HISTORIA DE MEDIOS REFRINGENTES, PROCEDIMIENTO DE SPALTEHOLS	3
VISUALIZACIÓN DEL DESARROLLO ÓSEO EN FETOS POR LA TÉCNICA MODIFICADA DE DAWSON	9
DIAFANIZACIÓN COMPLICADA CRISTAL DUTY	18
MÉTODO PARA TRANSPARENTAR ANFIBIOS Y COLOREAR SUS ESQUELETOS	22
DIAFANIZACIÓN	27
PREPARACIONES ANATÓMICAS	29
ACLARADO ANATOMICO DE ESPECIMENES	40
COLORACIÓN DE PUNTOS DE OSIFICACIÓN	47
DIAFANIZACIÓN POR MACERACIÓN	48
DISCUSIÓN	53
OBJETIVOS DE LA TÉCNICA DE DIAFANIZACIÓN EN LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS ORGANICAS	54
TIEMPO QUE SE REQUIERE PARA REALIZAR LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE DIAFANIZACIÓN	56
COSTO DE LAS SUSTANCIAS QUE SE UTILIZAN PARA REALIZAR LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE DIAFANIZACIÓN	59
CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61

RESUMEN

GONZÁLEZ ELADIO. Técnicas de diafanización de rata. (*Rattus Norvegicus Albicans*): Estudio de revisión. (Recopilación Bibliográfica) (Bajo la dirección de: MVZ. Santiago Aja Guardiola.

En este trabajo se presentan diferentes técnicas de diafanización; esto se utiliza para transparentar piezas anatómicas, fetos humanos y de animales, así como de anfibios. El creador de éste método fue SPALTEHOLZ y otros autores la mejoraron. Las técnicas en conjunto proporcionan los elementos básicos, para lograr la producción de gran variedad de estas preparaciones. Por otra parte se recomiendan medidas de precaución, ya que el uso de éstas sustancias pueden provocar daños a la salud, si no se manejan adecuadamente, como aquí se indica. Al mismo tiempo se menciona, el tiempo necesario para realizar cada una de las preparaciones. También se busca ser lo más explícito, con el fin de cualquier persona interesada en el área, pueda realizarlas.

INTRODUCCIÓN

La técnica de diafanización que se utiliza para transparentar las partes del cuerpo y los huesos de fetos humanos y de animales, que fue creada por Spalteholz en 1906, cuando intentó hacer el estudio de la circulación de las arterias coronarias y sus anastomosis,¹ así como las modificaciones que años después, le hicieron los diferentes autores, como fue el caso de Dawson que la modificaron, al aumentar el porcentaje de una de las sustancias y substituyó las restantes por otras, más económicas pero igual de efectivas, para lograr en el menor tiempo posible su objetivo.² Otra técnica, de diafanización, es la que creo Complucad Internacional S.A. esta se hace con dos sustancias, una llamada Complucad Duty y la otra Complucad Cristal.³ Mayorga, modificó la de Davis y Gore.⁴ Quiroz transparentó el segmento de un cuerpo con la diafanización. Otra técnica es la de Arroyo, esta se utiliza para la coloración de puntos de osificación y tinción de sales de calcio.⁵ Miller Hildebrand, Tompsett e Ismael Concha, modificaron la técnica, utilizando las mismas sustancias pero a diferentes grados de concentración, y a diferentes cantidades o, suprimiéndolas.^{6,7,8} Al revisar estos trabajos, encontramos que la finalidad de los autores, era mejorar la técnica para disminuir el tiempo de transparentación.¹ Se hace una recopilación de las diferentes técnicas de diafanización para la conservación de piezas anatómicas para su utilización en la enseñanza en la asignatura de anatomía.

FUNDAMENTOS E HISTORIA DE MEDIOS REFRINGENTES, PROCEDIMIENTO DE SPALTEHOLZ.

En referencia al origen de la diafanización, el creador de la técnica original fue Spalteholz en 1906. Se basa en que los tejidos vegetales o animales, refractan la menor cantidad de luz y alcanzan el máximo de transparencia cuando están rodeados e inhibidos de una sustancia cuyo índice de refracción es igual al índice medio de dichos tejidos. (Salaverri)

Otro concepto de los métodos de diafanización consiste en dar transparencia a los tejidos animales o vegetales opacos aumentar la de los que la tienen en algún grado. El efecto se consigue unificando los índices de refracción de los tejidos, en sus distintos elementos y de los medios que han de rodearles (Mezquita).

La demostración se hace de la siguiente forma: si tres huesos largos tratados y descalcificados se colocan en tres diferentes líquidos, por ejemplo: uno en salicilato de metilo, que tiene un índice de refracción de 1.538 otro en benzoato de bencilo, con un índice de refracción de 1.570 y el último en una mezcla de cinco partes en peso de salicilato de metilo, con tres partes en peso de benzoato de bencilo, que en su conjunto tiene un índice de refracción de 1.547; como el índice de refracción que tiene el tejido óseo es 1.547, el hueso que se colocó en, la última mezcla, se aclaró completamente, lo que no sucedió con el que se colocó en el salicilato de metilo y aún mucho menos el que estuvo en el benzoato de bencilo. Esto significa que la transparencia disminuye cuando más se desvía el índice de refracción del líquido del índice del hueso. Esto debe admitirse, porque al mezclarse los líquidos, sus propiedades químicas no cambian, porque aquí solo se toman en cuenta las

propiedades ópticas. Esto es que tanto el índice de refracción de los líquidos que rodean e inhiben los tejidos, en ellos no concuerden con el de éstos, sea más alto o más bajo una parte de esta luz será refractada, apareciendo los tejidos blanquecinos. (Salaverri). El procedimiento en su aplicación debe ser ordenado y sistemático, esta es una de las condiciones en la técnica macroscópica, pues aunque se empleaba para dar traslucidez a las membranas y láminas de tejidos orgánicos (Lacaba Olóriz), los efectos que se obtenían, eran mínimos y de poca intensidad en cuanto a la transparencia, y de igual manera de poca utilidad en cuanto a los estudios que permitían hacer; las sustancias empleadas eran la esencia de trementina y la glicerina algunas otras. Esto en lo que se refiere, a la técnica macroscópica.

Fue hasta con Spalteholz, en 1906, cuando este intentó hacer el estudio de la circulación de las arterias coronarias y sus mutuas anastomosis con los procedimientos corrientes de disección, corrosión y rayos X, pero al no darle los resultados que él buscaba, se le ocurrió estudiar un nuevo procedimiento (con soluciones refringentes), que pudieran demostrar las anastomosis vasculares más pequeñas (Salaverri).

Medios refringentes. Son los líquidos que se emplean para llevar a cabo la inhibición orgánica, que realicen la transparencia y son los siguientes:

Salicilato de metilo, índice de refracción de 1.538

Isosafrol, con un índice de refracción de 1.577

Safrol, con un índice de refracción 1.534

Benzoato de bencilo, con un índice de refracción de 1.570

Sulfuro de carbono con índice de refracción de 1.628

Xilol con un índice de refracción de 1.497

Benzol con un índice de refracción de 1.501

El inconveniente de trabajar con algunas de estas sustancias es que exige cierto cuidado por ser algunas venenosas e inflamables: como el sulfuro de carbono, que además de tener un olor muy desagradable es de acción incierta, porque al descomponerse cambia su índice de refracción.

Con estos líquidos de índices de refracción distinta se hacen mezclas cuyo índice de refracción que se aproxima al de los tejidos orgánicos que se desee transparentar (Salaverri).

El siguiente es el procedimiento que empleó Spalteholz, según (Salaverri).

Procedimiento de Spalteholz

1. - Fijación de las piezas en solución de formalina al 10%, durante algún tiempo variable según el tamaño del tejido (añadiendo al líquido unas gotas de amoníaco si los tejidos contienen huesos que no hayan sido descalcificados).
2. -Descalcificación de la pieza que tenga tejido óseo (siempre y cuando no sobre pase lo necesario) en una solución de ácido nítrico purísimo al 15%, cambiando el líquido varias veces, hasta que obtenga por completo el objetivo deseado.
3. - Lavado en agua corriente durante 24 horas.
4. - Colocación de las piezas durante un día en una solución de alumbre al 5%, para que reduzca su volumen aumentado durante la descalcificación.
5. - Lavado en agua corriente por 24horas.
6. - Sumergir las piezas nuevamente en una solución de formalina al 10% durante dos o tres días.
7. - Sumergir las piezas en agua oxigenada que se cambiará cada dos o tres días, hasta que se produzca un completo blanqueo de los tejidos.

8. Lavado en agua corriente durante 24 horas.
9. - Sumergir durante dos días en alcohol de 50°
10. -Sumergir durante dos días en alcohol de 70°
11. -Sumergir durante dos o tres días en alcohol de 96°
12. -Sumergir durante dos días en alcohol absoluto.
13. - Sumergir en benzol hasta que se vea la transparencia algo acentuada; hay que cambiar el líquido por dos veces.
14. -Colocación de las piezas en la mezcla conservadora final, que es la que producirá la transparencia completa.
15. -Evacuación del aire y del benzol por medio de la bomba neumática y cierre hermético de la vasija, en que la pieza se conserve.

Un aspecto que conviene advertir, es que los tejidos, a su paso por los alcoholes se endurecen y tienden a permanecer en la forma que adquieren al manejar las piezas. Por eso es conveniente hacer que esta sea la que vayan a conservar definitivamente. Los tejidos preparados deben de conservarse en frascos prismáticos transparentes de paredes paralelas, para que la imagen de los objetos encerrados no sufran deformidades de refracción.

Mezclas conservadoras finales según la pieza punto (14).

1. -Para el tejido óseo y dentario: cinco partes en peso de salicilato de metilo o de safrol y tres de benzoato de bencilo; o también tres partes de salicilato de metilo una de safrol y una de isosafrol.
2. -Para cerebro y medula: una parte de salicilato de metilo o de safrol y una de benzoato de bencilo; o también nueve partes de salicilato de metilo o de safrol y cinco de isosafrol

3. -Para fetos (también puede emplearse en anfibios y peces): tres partes en peso de salicilato de metilo o de safrol y una de benzoato de bencilo; o también 27 partes de salicilato de metilo o de safrol, con cinco de isosafrol.

Las cantidades de estas sustancias no tienen un carácter definitivo, sino que algunas a veces será necesario modificar su proporción por tanteo, añadiendo un líquido u otro, debido a que los tejidos orgánicos tienen un índice de refracción intermedio a los índices de los reactivos empleados que se hace hasta que se consiga una transparencia más perfecta por la aproximación del índice de la mezcla al del tejido. La transparencia perfecta del tejido en algunas ocasiones no se consigue sino hasta varias semanas después.



Spaltehols el creador de la técnica de diafanización

**VISUALIZACIÓN DEL DESARROLLO ÓSEO EN FETOS POR LA TÉCNICA
MODIFICADA DE DAWSON.**

Autores: Sánchez Sánchez Iván, Terreros Vargas Víctor, Zevallos García Juan, Carpio Cari Jessica, Suero Beltrame Saúl. (Estudiantes del quinto año de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Católica de Santa María. (Arequipa Perú).

Resumen.

La diafanización por la técnica de Dawson nos permite la visualización *in situ* de los centros de osificación en embriones y fetos tiñéndolos con alizarina.

La modificación de esta técnica consistió en el uso de xilol disolvente de grasa y el carmín alcohólico como colorante del tejido óseo, en lugar de acetona y alizarina respectivamente. Así como el aumento de la concentración de Hidróxido de Potasio (KOH) para disminuir el tiempo de transparentación. También para este trabajo se utilizaron tres fetos humanos de diferentes edades, logrando visualizar con éxito el desarrollo óseo en forma secuenciada y diferenciar la osificación endocondral de la membranosa.

Palabras Claves: Diafanización, Osificación, Técnica de Dawson.

Introducción:

La osificación del ser humano comienza al final del período embrionario, a partir de la séptima semana de la vida intrauterina. Se inicia a partir de los centros primarios de osificación que aparecen en una forma secuenciada, los cuales van evolucionando para llegar a completar el desarrollo óseo en la edad adulta. Existen cuatro tipos de osificación: membranosa o desmal, endocondral o intra cartilaginosa, marginal y metaplásica. Los dos primeros tipos de osificación son más frecuentes, los dos últimos son raros.

Es posible visualizar el esqueleto de los fetos humanos coloreándolos con alizarina, pudiendo diferenciar la osificación membranosa de la endocondral. La técnica de

Dawson permite la visualización del esqueleto de los fetos y embriones, transparentándolos con (KOH) y tiñendo el tejido óseo con alizarina y su conservación con glicerina alcohólica. Pero debido a que la fase de transparentación era muy prolongada, un grupo de estudiantes decidieron modificarla para evitar este contratiempo. Reemplazaron dos de las sustancias que originalmente se utilizaban además de aumentar la concentración de (KOH). Con estos cambios se plantearon los siguientes objetivos: 1) modificar la técnica de Dawson para intentar reducir el tiempo de transparentación. 2) visualizar el desarrollo óseo en forma secuenciada para diferenciar la osificación membranosa de la endocondral.

Material y Métodos.

Se emplearon tres fetos humanos, cuyas edades en semanas variaban entre 9 a 12, 13 a 16 y 17 a 20, considerando el índice del vértice de la nalga.

La técnica de Dawson emplea (KOH) al 1%. Esta concentración se aumentó al 15% para disminuir el tiempo de transparentación, experimentándose previamente con soluciones al 5,10, 15 y 20%, siendo la acertada la de 20%.

De igual manera la acetona se reemplazó por xilol y la alizarina por carmín alcohólico.

Descripción de la técnica modificada de Dawson.

En cada una de las etapas que se señalan a continuación, el embrión o feto de ser sumergido en la solución indicada y debe retirarse de la solución antes del paso siguiente, teniendo en cuenta que el feto debe ser colocado desde el inicio en su recipiente definitivo, con el fin de evitar la manipulación excesiva que pueda dañar la muestra.

1. - Preparación de la muestra para la transparentación:

1.1) fijación I alcohol al 95%

1.2) disolución de la grasa en xilol.

1.3) fijación II en alcohol al 95%.

2. - Diafanización:

2.1) transparentación en (KOH) al 15%.

2.2) el lavado se realiza sustituyendo él (KOH) en agua destilada, cuidadosamente con una jeringa, con el objetivo de retirar él (KOH) de la muestra, la muestra lo que se consigue con el recambio de agua destilada hasta que se vea completamente clara.

2.3) deshidratación en alcohol en de 50% y de 70% progresivamente.

3. - Tinción 3.1) coloración carmín alcohólico al 20%.

3.2) aclaración para quitarle el exceso de colorante en una solución de (KOH) al 1%, agua destilada 79% y glicerina al 20%.

4. -Conservación en una solución de alcohol al 95%, con glicerina a una concentración de 20% que ira aumentando la concentración, gradualmente a 40%, 60% y 80%, agregando a esta unos granitos de timol.

Duración del desarrollo de la técnica modificada de Dawson.

Feto número. 1 va de 9 a 12 semanas.

1. -preparación:

1.1) fijación I: 5 días.

1.2) disolución de grasa 2 días.

1,3) fijación II: 5 días.

2. -Diafanización.

2.1) transparentación:

2 días 2.2) lavado: 3 días.

2.3) deshidratación alcohol al 50% 4 días, alcohol al 70%, 4 días.

3. -Tinción:

3.1) coloración: 5 días.

3.2) aclaración: 2 días.

4. - Conservación: en glicerina al 20%: 2 días, 40%: 3 días 60%: 4 días, 80%: 5 días.

Feto número. 2: de 13 a 16 semanas.

1. - Preparación:

1.1) fijación: I: 4 días.

1.2) disolución de grasa 3 días.

1.3) fijación II: 4 días.

2. -Diafanización: 2.1) transparentación: 7 días 2.2) lavado: 6 días.

2.3) deshidratación: alcohol 50%: 6 días, alcohol 70%: 6 días.

3. - Tinción:

3.1) coloración: 7 días.

3.2) aclaramiento: 4 días.

4. - Conservación: glicerina 20%: 4 días, 40%: 5 días, 60%: 6 días, 80%: 7 días.

Feto Número. 3 de 17 a 20 semanas.

1. -Preparación:

1.1) fijación I: 4 días.

1.2) disolución de la grasa. 4 días.

1.3) fijación II: 4 días.

2. -Diafanización:

2.1) transparentación: 9 días.

2.2) lavado 8 días 2.3) deshidratación alcohol al 50%: 8 días, alcohol al 70%: 8 días.

3 Tinción:

3.1) coloración: 9 días

3.2) aclaramiento: 6 días.

4. - Conservación: en glicerina 20%: 6 días, 40%: 7 días, 60%: 8 días, 80%: 9 días.

Resultados.

La técnica modificada de Dawson, según los resultados ha permitido disminuir el tiempo para la transparentación, aumentando la concentración de (KOH) y reemplazando la alizarina y acetona por carmín alcohólico y xilol respectivamente, para visualizar parte del desarrollo óseo en forma secuenciada y diferenciar la osificación membranosa de la endocondral.

En la tabla número: 1 se aprecian los diferentes grados de osificación en que se encuentran los huesos en formación de los tres fetos empleados, y los tipos de osificación.

Clasificación de los grados de osificación, considerando la extensión de la superficie teñida.

Grado I: la superficie teñida abarca los centros primarios de osificación. Los de grado II: la superficie teñida abarca menos del 75% de la extensión total del hueso en formación (osificación membranosa) o del molde cartilaginoso (osificación endocondral). Los de grado III: la superficie teñida abarca menos del 75% de la extensión total del hueso en formación (osificación membranosa) o del molde cartilaginoso (osificación endocondral).

Tabla núm. 1. - Grados y tipos de osificación

Hueso	Feto	Feto	Feto	Tipo de Osificación
-------	------	------	------	---------------------

	Núm. 1	Núm. 2	Núm. 3	
Bóveda Craneal	Grado II	Grado III	Grado III	Membranosa
Base	Ausente	Grado III	Grado III	Endocondral
Cara	Grado II	Grado III	Grado III	Endocondral
Mandíbula	Grado II	Grado III	Grado III	Endocondral 1
Columna	Grado I	Grado II	Grado III	Endocondral
Esternón	Ausente	Ausente	Ausente	Endocondral
Costillas	Grado II	Grado III	Grado III	Endocondral
Clavícula	Grado II	Grado III	Grado III	Endocondral
Escápula	Grado II	Grado III	Grado III	Endocondral
Humero	Grado II	Grado III	Grado III	Endocondral
Cubito Radio	Grado II	Grado III	Grado III	Endocondral
Carpo	Ausente	Ausente	Ausente	Endocondral
Metacarpo	Grado I	Grado III	Grado III	Endocondral
Falange Proximal	Grado I	Grado II	Grado III	Endocondral
Falange Med	Ausente	Grado II2	Grado III	Endocondral
Falange Dist.	Grado I	Grado III	Grado III	Endocondral3
Ilion	Grado I	Grado II	Grado II	Endocondral
Isquion	Ausente	Ausente	Grado I	Endocondral
Pubis	Ausente	Ausente	Ausente	Endocondral
Fémur	Grado II	Grado III	Grado III	Endocondral
Tibia peroné	Grado II	Grado III	Grado III	Endocondral
Tarso	Ausente	Ausente	Ausente	Endocondral
Metatarso	Grado I	Grado III	Grado III	Endocondral
Falange Proximal	Ausente	Grado I	Grado II	Endocondral
Falange Media	Ausente	Ausente	Ausente4	Endocondral
Falange Distal	Grado I	Grado II	Grado III	Endocondral3

1. - Este tipo de osificación marginal se observa como endocondral.
2. - En la falange medial del quinto dedo se observa el centro de osificación primario.
3. - Este tipo de osificación es metaplásica, pero que se observa como endocondral
- 4.- En la falange medial del segundo dedo se observa el centro de osificación primaria

Discusión.

Para la realización de este trabajo se han empleado tres fetos, pero a pesar del limitado número de muestras, se pudo visualizar parte del desarrollo óseo en una forma secuencial.

La técnica secuenciada base de Dawson emplea (KOH) al 1% para conseguir la transparentación de las muestras durante un tiempo prologado (un mes aproximadamente); pero en la técnica modificada el tiempo se redujo a una semana, con el incremento de (KOH) al 15%, y sin deteriorar las muestras.

De igual manera se efectuaron los siguientes cambios: carmín alcohólico, por alizarina (como colorante) y xilol como disolvente de grasas, en lugar acetona.

Tanto las técnicas que emplean alizarina para teñir el tejido óseo, referidas en la literatura, como también la técnica modificada de Dawson, permitieron la visualización del esqueleto en embriones y fetos, pudiendo diferenciar la osificación membranosa de la endocondrial.

En la mandíbula macroscópicamente se aprecia una osificación aparente endocondral, que en realidad, es marginal. en las falanges se aprecia a simple vista una aparente osificación endocondral, cuando es en realidad una osificación metaplásica. Estos tipos de osificación se pueden llegar a diferenciar correctamente al microscopio.

Conclusiones.

La técnica modificada de Dawson, acorta el tiempo de transparentación y permite reemplazar algunos reactivos por otros.

Recomendaciones finales.

Acorde a los resultados del estudio, es recomendable trabajar con un mayor número de fetos humanos, considerando las edades que faltan, para que en esta forma se pueda apreciar el desarrollo óseo en una forma secuenciada y completa.

Diafanizado de fetos humanos con centros de osificación



FOTO 1



FOTO 2

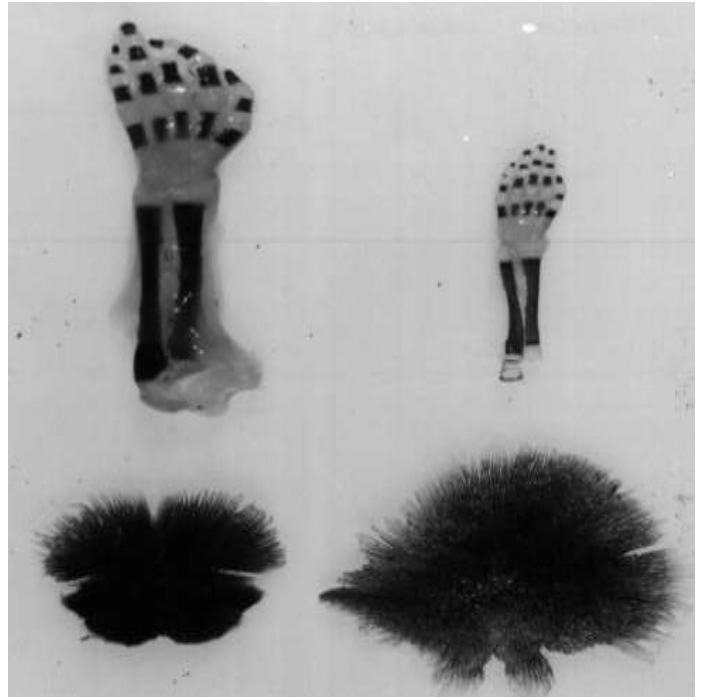


FOTO 3

DIAFINIZACIÓN COMPLUCAD CRISTAL DUTY.

De acuerdo al autor de esta técnica los preparados que él presenta son los idóneos para la diafanización, por la especial calidad de la transparentación que aporta.

Porque dice que hasta este momento, la técnica más utilizada para la diafanización era la de Spalteholz, la que dijo, que era muy precaria e imperfecta, porque estaba basada en el empleo de formol y necesitaba para su conservación la inmersión en glicerina.

El autor nos dice que con el empleo de *COMPLUCAD CRISTAL*[®], la diafanización se consigue en pocos días, pudiéndose mantener las piezas al medio ambiente.

Diafanización del cartílago.

Una vez fijadas las arterias con *COMPLUCAD CRISTAL*[®] mediante la inmersión durante un periodo de veinticuatro a cuarenta y ocho horas, tiempo en el que se puede observar su transparentación.

Diafanización de grandes piezas.

Técnica válida para grandes piezas humanas y animales: pulmones, corazón etc. Se pondrá a fijar la pieza con *COMPLUCAD CRISTAL*[®] mediante inyección arterial y venosa, proceso que demorará un periodo de cuarenta y ocho horas.

Posteriormente se inyectará *COMPLUCAD CRISTAL*[®] con la coloración que corresponda para la identificación de arterias y venas. Después se sumergirá la pieza por completo durante un periodo de cuarenta y cinco a sesenta días en una solución

de: 38.46 gr de Hidróxido de Potasio.

913 de ml, de Alcohol a 80°

87 ml, de Glicerina.

Transcurrido ese tiempo se sumergirá nuevamente en *COMPLUCAD CRISTAL*[®] durante dos días para su conservación.

Diafanización de embriones humanos y animales.

Se utilizarán dos procedimientos en función del tamaño de la pieza.

Las piezas de 3 a 7 cm se fijaran mediante en *COMPLUCAD CRISTAL*[®], durante un período, no inferior a 48 hrs.

Posteriormente se sumergirá la pieza durante cinco o diez minutos en una solución al 4% de alizarina en alcohol de 50°.

Después la pieza se lavará y se introducirá en alcohol de 50° durante un lapso de 3 a 5 hrs. según su tamaño.

A continuación, la pieza se sumergirá totalmente en la misma solución que se indica en el apartado de grandes piezas, transparentándose, en función de su volumen, entre 2 y 4 hrs.

Posteriormente, la pieza sumergirá nuevamente en *COMPLUCAD CRISTAL*[®], durante un día. Cuando la pieza a diafanizar sea superior a 20 cm. o mayor, se observara el siguiente proceso.

Primeramente se fijará mediante una inyección de 2 ml de *COMPLUCAD CRISTAL*[®], en ambos lados de las cavidades torácicas y abdominales.

Sumergiéndola posteriormente en *COMPLUCAD CRISTAL*[®] durante un periodo no inferior a cuarenta y dos horas ni superior a 7 días. Posteriormente se sumergirá la pieza durante cinco a diez minutos en una solución al 4% de alizarina en alcohol al 50%. Pasado ese tiempo, la pieza se introducirá en alcohol al 50% durante un período de 3 y 5 hrs.

Posteriormente la pieza se lavará y se introducirá en alcohol de 50° durante tres a cinco horas.

A continuación la pieza se sumergirá en la solución de hidróxido de potasio, antes descrito y en cantidad proporcional a su volumen.

La pieza introducida en la solución anterior se transparentará, en función de su volumen, entre uno y dos días. Transcurrido ese tiempo se sumergirá nuevamente en *COMPLUCAD CRISTAL*[®] durante dos días.

En caso de disminución de la diafanización, por su exposición prolongada en ambientes calurosos, deberá de procederse nuevamente a su inmersión durante uno o dos días en *COMPLUCAD CRISTAL*[®], tiempo suficiente para su recuperación.



Las arterias Cartílago del tabique de las fosas nasales fueron diafanizadas, con ***COMPLUCAD DUTY***[®]



Feto de conejo diafanizado con ***COMPLUCAD Cristal***.

MÉTODO PARA TRANSPARENTAR ANFIBIOS Y COLOREAR SUS ESQUELETOS.

Mayorga dice que el conocimiento de técnicas para aclarar y colorear tejidos orgánicos y aún cuerpos enteros, es indispensable y de un gran valor para los profesionales de la Biología.

También dice que recientemente se hizo un estudio comparativo de esqueletos de los anfibios, que ha establecido relaciones taxonómicas evidentes y bien fundadas. Pero, a veces sucede, como bien dijeron Davis y Gore (1953), en el trabajo que ha servido de base al presente, “la preparación del material osteológico ha sido constantemente una serie de molestias para el anatomista.”

Porque en la literatura sobre esta obra de maestros y especialistas de la microtecnia muy pocos indican técnicas para preparaciones *in toto*, y cuando así lo hacen éstas resultan ser complicadas, porque requieren materiales costosos y sobre todo requieren mucho tiempo para realizarlas.

Sigue diciendo que, sin pretender ser original, él presenta a continuación un método que al ser llevado al laboratorio, demostró en el número de preparaciones que se hicieron (30), el bajo costo y la accesibilidad de los materiales usados, además de la rapidez con la que obtienen claras y precisas preparaciones.

Así mismo comenta que en el citado trabajo de Davis y Gore (1953), existe una completa revisión histórica de las técnicas y de todos los materiales que se usan para obtener las preparaciones para transparentar esqueletos de pequeños vertebrados y de embriones humanos. La preparación y montaje en seco de esqueletos de animales pequeños, como los anfibios. En lo que aquí se señala, se dificulta por el

inconveniente de no poder preservar los huesos pequeños o los cartílagos, de la acción destructora de los diferentes reactivos.

Sanders en 1953 indico el uso de hipoclorito de sodio clorox y purex, en sus formas comerciales, pero este método no dio resultado, por el peligro de destruir una parte o todo un ejemplar valioso. Por lo cual a este método solo se le dio un valor relativo.

Antecedentes: de entre los proyectos de investigación, del Dr. J.A. Rivero y del autor figura en un lugar preponderante un estudio anatómico comparativo de osteología de las especies de "Eleutherodactylus sp." de Puerto Rico.

Para complementar este trabajo, se le encomendó al autor la preparación de material osteológico aceptable, a los fines del mencionado estudio.

Desde luego, que hubo muchos fracasos, pero se probaron varias técnicas hasta la saciedad, sin obtener resultados satisfactorios.

Lo único importante que se logró al final, fue la experiencia que se obtuvo en esta etapa del trabajo, que fue de gran utilidad para juzgar los resultados posteriores.

Material y Métodos.

El "Eleutherodactylus sp."(portoricensis) es el anfibio (salientia) más común y abundante, además de ser el de más fácil obtención en toda la isla. Con esta especie fue con la que se realizaron todos los métodos fallidos, como el que más adelante se describe.

En general se puede afirmar que éste método es una modificación a la técnica señalada por Davis y Gore y que se basa principalmente en la sustitución del hidróxido de potasio (KOH) por el de hidróxido de sodio (NaOH), eliminándose el uso

del peróxido de hidrógeno y de la luz solar, así como los agentes decolorantes y los blanqueadores.

Aparentemente la acción del hidróxido de (NaOH) es más benigna sobre el tejido muscular, además de que es el que lleva a cabo la acción blanqueadora, que hace innecesario el uso del peróxido de hidrógeno y la luz solar.

Además de reducir el tiempo de trabajo y eliminar el uso el peróxido de hidrógeno, se evita la formación de burbujas en los músculos. Lo cual es una de las principales objeciones, por lo que no se usa.

Para lo planteado es necesario que hidróxido de sodio (NaOH) sea de muy alta pureza química.

Se usó agua destilada para preparar las soluciones como una medida de precaución. Se comenzó usando a una concentración de (NaOH) al 10%. Pruebas posteriores demostraron que una solución al 1.5% es la óptima y suficiente para obtener resultados satisfactorios.

La solución colorante que se utilizó, fue la que de acuerdo con la formula de Hollister, indican Davis y Gore: alizarina roja S. Solución Saturada en:

Ácido acético glacial..... 5 ml

Glicerina..... 10 ml

Hidrato de cloral solución al 1%. 60 ml

La solución de (NaOH) al 1.5% se utilizó con la finalidad de: a) transparentar los ejemplares: b) como medio para teñir: c) como solución limpiadora para disolver y extraer del músculo el exceso de tinte.

Procedimiento. Los ejemplares preservados en alcohol al 75% son procesados más rápidamente que los preservados en formol en las concentraciones usuales.

Los ejemplares frescos requieren ser fijados en alcohol al 75% por 3 ó 5 días dependiendo de su tamaño. Una vez que se cuenta con material debidamente fijado, se procede como sigue:

- 1) Evisceración completa del ejemplar.
- 2) Remoción completa y cuidadosa de la piel y los ojos.
- 3) Inmersión en la solución de (NaOH) al 1.5%, con objeto de transparentar los músculos y dejar visible el esqueleto.
- 4) Una vez que las partes óseas sean completamente visibles, se añade a la solución 1 ml de solución colorante por cada 20 ml de (NaOH) al 5%.
- 5) Después de 5 ó 10 minutos en estas soluciones dependiendo del tiempo del grado de la intensidad del color que se usa en el esqueleto, se transfiere el ejemplar a una solución limpia de (NaOH). A medida que la solución va tomando el colorante se hacen tantos cambios como son requeridos para obtener una proporción en que el esqueleto se destaque en forma precisa y clara.
- 6) Finalmente el material obtenido se almacenó en glicerina pura.

Ninguna distorsión en los músculos se observó al preservar el material directamente en glicerina.

A continuación, se describe el procedimiento seguido en un ejemplar de "Eleutherodactylus" portoricensis el día 6 de Diciembre de 1963.

Hora	Temperatura	Reacción
10:00	70°F	Se depositó el ejemplar en 20ml de (NaOH) al 1.5%
10:05 a.m.		Las primeras capas musculares comienzan a hacerse transparentes. cintura pélvica, columna vertebral. Tibio-fibula, astrágalo y calcáneo y falanges; radio, ulna, húmero, méta carpales y falanges; parte de la cintura escapular, ileón y urostilo, comienzan a ser visibles.
10:15 a.m.		Se puede observar bien el fémur, y algunos huesos de la cabeza.
10:20 a.m.		El esqueleto completo se puede ver perfectamente
10:25 a.m.	70°F	Está listo para ser teñido.
10:30 a.m.		Se añade 1 ml de colorante al recipiente en donde esta el ejemplar.
10:40 a.m.		x Se transfiere a (NaOH) al 1.5%, con él objeto de limpiar exceso de tinta de los músculos.
11:30 a.m.		Se cambia la solución de (NaOH).
12:50 p.m.		Se hace otro cambio de (NaOH).
2:30 p.m.		Se repite la operación. Anterior.
3:30 p.m.		Se transfiere el ejemplar a una cajita de plástico transparente cuyas medidas son de 4,5 x 4.5 cm por 1.8 cm de profundidad que contiene glicerina pura, siendo así almacenado. Al almacenar ejemplares es recomendable la posición, horizontal, para evitar roturas en los huesos.

Es fácil observar en lo anotado anteriormente, que el método aquí descrito está libre de complicaciones y dificultades y se puede y se puede llevar a efecto en un solo día un gran número de ejemplares.

DIAFANIZACIÓN

Este método consiste en volver transparente o traslucido un segmento del cuerpo donde las arterias han sido previamente inyectadas con sustancias colorantes. Lograda la diafanización, las piezas anatómicas conservan su forma anterior y a través de los tejidos transparentes se pueden observar los vasos sanguíneos.

Técnica:

1. - Fijar las piezas en solución de formol al 10% por un tiempo variable, según su tamaño.
2. - Descalcificación de las piezas que contienen tejido óseo, colocándolas en solución de ácido nítrico al 15%, este se cambia las veces que sea necesario hasta conseguir el efecto deseado.
3. - Lavado de la pieza con agua corriente durante 24 hrs.
4. - Coloración de la pieza. Para esto se coloca durante 12 hrs. en una solución de alumbre al 5%; con este tratamiento también se logra que disminuya su tamaño, la que aumento durante la descalcificación.
5. - Lavado de nueva cuanta con agua corriente durante 24 hrs.
6. - Colocar las piezas durante 48 horas en una solución de formol al 10%.
7. - Sumergir las piezas en agua oxigenada de 3 volúmenes que se cambia cada 2 ó 3 días, hasta que se consiga aclarar completamente los tejidos.
8. - Lavado con agua corriente durante 24 hrs.

9. - Deshidratación de la muestra con alcohol:

2 días alcohol 50°

2 días alcohol 70°

3 días alcohol 96°

2 días en alcohol absoluto

10. – La Diafanización se obtiene al colocar la pieza en benceno, el que puede ser renovado hasta lograr la mayor transparencia posible.

11. - Por último, la pieza se sumerge en la mezcla conservadora y se expulsa el aire y el benceno por medio de una bomba de vacío. Después se cierra herméticamente la vasija que contiene la pieza con el líquido conservador.

Las soluciones conservadoras que se utilizan en esta técnica son las siguientes: (11)

1. – Para la conservación de los fetos se utiliza: Salicilato de metilo 3 partes; Benzoato de bencilo 1 parte.

2. – Si la pieza tiene óseo dentario bien desarrollado utilizar las siguientes soluciones: Salicilato de metilo 5 partes; Benzoato de bencilo 3 partes; o bien safrol (colorante natural que da una coloración amarilla) 5 partes, con 3 partes de benzoato de bencilo o 1 parte de isosafrol.

3. - Cuando se trate del sistema nervioso central, se puede utilizar una parte de safrol o de salicilato de metilo con una parte de benzoato de bencilo, o bien 9 partes de safrol o salicilato de metilo, con 5 partes de isosafrol. (Quiroz 1981).

PREPARACIONES ANATÓMICAS

Tinción y Aclaración de los Huesos del Esqueleto.

La alizarina roja, es una tinción que se utiliza para teñir el tejido calcificado. Los pequeños vertebrados, se pueden teñir intactos para estudiar y circundar sus tejidos. Primero se deben transparentar para que queden claros a detalle y después se almacenaran en glicerina.

Entre los especímenes más apropiados, para llevar a cabo la técnica de teñido y aclarado se encuentra el ratón o animales más pequeños.

Los anfibios y reptiles que tienen mucho pigmento y requieren un tratamiento especial para obtener un resultado óptimo. Los materiales grasos o aceitosos, son difíciles de manejar. Los ratones recién nacidos son ideales para practicar, la técnica. Con la misma es posible demostrar la naturaleza y la secuencia de los centros de osificación del embrión (incluidos los de la salamandra y sus fetos). Se pueden preparar sin distorsionarse pese a las vicisitudes que a veces resultan de la preparación seca.

Las partes del esqueleto que son difíciles de ver de otro modo, ya que por lo delicado de su naturaleza o por lo aislado de su posición. Un ejemplo de esto es el anillo de la esclerótica del ojo de un pollito, o el de un lagarto o la base en donde se apoya el esqueleto de la faringe de un ratón, los huesos intermusculares de los pescados pequeños y los sesamoideos y el hueso hioides. De igual manera los esqueletos enteros de los adultos pequeños, como son la musaraña y el colibrí.

La fijación: la técnica ofrece diversas preferencias y cada una es considerada la mejor por el autor. Pero en realidad ninguna fórmula es la mejor ya que dependerá, de lo versátil que sea el técnico.

La primera opción siempre se relaciona con la fijación del espécimen, cuando está siendo aclarado y macerado sin destruirlo. La fijación endurece los tejidos, ayuda a controlar la maceración y prolonga el proceso de la aclaración.

Crary y Green omitieron la fijación y obtuvieron buenos resultados esto les proveyó de práctica porque los especímenes tenían muy poco pigmento y grasa.

Sin embargo la fijación la recomiendan las personas que han trabajado esto, porque mejora el producto final. La mayoría preparara la fijación con alcohol etílico al 70% o al 95% (excepto al autor de este trabajo) otros prefieren formalina al 10%; en éste trabajo se evitó el ácido fórmico porque daña el esqueleto. Pero finalmente si se omite la fijación el tiempo requerido para la aclaración, se acorta la mitad. Pero si la fijación se hace en formalina el tiempo para la aclaración puede ser el doble o el triple.

Extracción de vísceras y retiro de la piel.

Para un excelente terminado del espécimen, no depende únicamente de la integridad con que se aclaran los tejidos, sino también sobre la cantidad del tejido presentado.

Los especímenes de más de 15 mm de longitud, deberán ser eviscerados. (se puede hacer una excepción cuando es necesario mostrar las tripas pigmentadas de ciertos peces junto con el esqueleto). Comúnmente las especies de 20 mm de longitud, se les debe de desollar para lograr un buen plano, para ello es necesario hacerlo en fresco (para que el fijador penetre rápidamente en el tejido) y sellarlo después de la fijación (cuando el tejido aun no este duro), terminado este proceso el esqueleto se toma con cuidado para no dañarlo. Para hacer esto se debe cortar la piel del dorso y jalarlo con unas pinzas. Esto permite desollar hacia atrás las especies frágiles para que resistan la maceración.

Si no se ha retirado la piel de la salamandra y la lagartija, se debe cortar longitudinalmente lejos de la base por los extremos, para que no se rompa la cola.

Remoción de la grasa y el pigmento.

Algunos autores mencionan que se debe retirar la grasa y el pigmento del espécimen, para continuar con la fijación y conservarlo en alcohol y acetona durante varios días. (él autor de esta técnica no encontró un resultado satisfactorio).

Un método correcto para retirarle la grasa a los pollitos, es utilizar pepsina y celulosa. La grasa debe de quitarse en la disección, inicial al momento del desollamiento y cada parte termina eliminando a mano las partes que queden, para evidenciar cada parte. El pigmento más oscuro de los mamíferos, es la melanina que se encuentra en la retina del ojo y esta puede ser extraída.

El hígado de los anfibios y reptiles comúnmente esta pigmentado y presenta melanina ampliamente distribuida, en sus cuerpos. La melanina se encuentra en forma gradual e imperfecta y se debe de remover con los métodos usuales, para aclararlos (los cuales se describen frecuentemente como la orbita de la luz). El fijado y eviscerado del espécimen con agua con 2% o 3% de peróxido de hidrógeno. Con esto el blanqueado es rápido, porque tarda de 10 minutos a una hora dependiendo del espécimen. Observar la pigmentación peritoneal del revestimiento, a fin de que el blanqueado sea completo. Trasladar al espécimen lo antes posible y luego lavarlo con agua corriente. Si en el espécimen se forman burbujas durante el blanqueado, (el tratamiento puede destruirlas). Las burbujas más grandes pueden retirarse suavemente pellizcándolas ó picándolas con una aguja. Terminado esto el espécimen se pone en plato cubierto con agua y se mete en la cámara de Vacumm.

El método para blanquear de Slower y Milder es más leve, ya que el espécimen solo necesita una solución de 10 ml de formalina, 10 ml de ácido oxalacético al 30% y alcohol al 70% y 95%. Taylor desarrolló un proceso más largo en donde utilizó la tripsina, para digerir un pescado.

El aclaramiento y la tinción inicial se realiza remojando al espécimen en una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 1 ó 2 % gr en 100 ml de agua, esta solución también es adecuada para larvas de rana en metamorfosis así como para renacuajos y cetáceas. Para otros especímenes delicados como pollitos y ratones se puede utilizar al 3% y para ranas adultas y lagartos al 4%.

Los tejidos más viejos se reafirman y se hacen más fuertes en la solución, (la solución ligeramente más débil, es adecuada para unificar el material o utilizando la formalina a una concentración del 10% para fijar el espécimen. Humedecer en hidróxido de potasio los huesos largos hasta que lleguen a ser algo visibles.

Para una rata recién nacida fijada en alcohol, puede tomar media hora; y para fijar un lagarto en formalina 3 días o más, (el tiempo requerido disminuye, si la solución se calienta.) Los tejidos llegan a quedar suavizados como gelatina, y la solución se torna un poco café por la liberación de pigmentos (es importante cambiar varias veces la solución, hasta que se observe clara no viscosa y el espécimen ya no libere pigmento). Después se transfiere de la anterior a una nueva solución, evitando manipular el espécimen con los dedos. Se puede enjuagar con agua sin dañarlo. Cuando los huesos se empiezan a ver es el momento para teñirlos, la tinción se puede hacer también en una solución de hidróxido de potasio (KOH) a la misma concentración o a una más alta. Es mejor utilizarlo a una concentración de 0.5 % o

1% para que durante la tinción el espécimen no se macere demasiado, y por la presencia del colorante no se pueda observar.

La mayor parte de las tinciones de alizarina son muy específicas con respecto al vehículo o al colorante, porque entre ellas puede haber una gran diferencia (el autor en el presente trabajo combino una solución saturada y acuosa, para estas también el alcohol se puede utilizar). Esta solución no se recomienda guardarla por largos periodos. Para su preparación se utilizan 8 gotas por 100 ml; la tinción se hace en cuatro horas o varios días, dependiendo del tamaño y clase del espécimen y la concentración de la solución.

Algunas veces se realiza un cambio a la solución para tenerla diario, en todo caso evalué al espécimen en varias ocasiones, para evitar que el colorante penetre en los tejidos, mantenga el recipiente de lado. Si la tinción es adecuada, el esqueleto tendrá un rojo intenso. El punto para poder evaluarlo puede ser difícil a menos que el espécimen se cubra con agua, para inspeccionarlo. Afortunadamente, el tiempo no es un factor crítico.

Aclarado final y Almacenaje.

Cuando se completa la tinción, remuévalo del colorante y enjuague con agua fría, después sumerja el espécimen fresco en una solución nueva de (KOH) a una concentración del 0.5 % para un aclaramiento inicial. Al principio los tejidos se observan de color rosa, por el aclarado. Cambiar de solución de vez en cuando, hasta que se decolore. El músculo no se aclara completamente, pero debe estar libre de alizarina y cuando así suceda no deberá de quedar de color castaño.

Se debe desteñir lentamente, hasta que quede suficientemente aclarado, antes de teñirlo nuevamente. Si queda castaño por los pigmentos residuales, agregar 8 gotas

de peróxido de hidrógeno al 3% (únicamente porque hace burbujas) por 100 ml de solución de (KOH). Lo importante es aclarar lo más posible, pero sin permitir la maceración. Media hora es suficiente para un delicado embrión; considerando que se necesitan varias semanas para fijar un pescado en formalina por el aceite, si el avance es temporal se pone en duda y no se avanza a la próxima solución de hidróxido de potasio. La siguiente solución se prepara con una parte de KOH al 1% en agua y una parte de glicerina (algunos técnicos le agregan un poco de alcohol).

El espécimen puede dejarse en esta solución, por algunos días semanas o meses (depende del tamaño). Este paso se completa cuando el aclaramiento es bueno y la solución no se decolora más. Ahora las grandes especies pueden ser mejoradas adicionalmente con la disección de los músculos desde la pared abdominal, así como con los músculos largos y la lengua. Después de haberles quitado la grasa, para este proceso a los fetos se les extrae el cerebro por el foramen.

A los pescados primero se les retiran las escamas, friccionándolos suavemente para después fijarlos. La disección se realizó con pinzas y tijeras y un microscopio pulido y se colocó en glicerina diluida al 50%.

Es común que se almacene en glicerina pura, o en una parte de glicerina y una de alcohol al 70%. También se utilizan líquidos alternativos como (metil salicilato y benceno aceite con naftaleno) para darle más claridad, se deben tener diversas recipientes de plástico. Crary's describe y sostiene un método para combinar las mejores cualidades de todas las soluciones para almacenar: después del teñido enjuagar con agua, limpiar y conservar en agua, durante un día no más. Para depositarse en una solución preparada con 2 partes de glicerina y 2 partes de alcohol etílico al 70% y una parte por volumen de alcohol benzílico. Siguiendo este

tratamiento, el espécimen está preparado para almacenarse en glicerina pura, pero Crary's prefiere una mezcla de glicerina y alcohol etílico.

Muchos técnicos se adelantan a la primera etapa y fijan los especímenes en glicerina e (KOH), como solución final para almacenarlos.

En el presente trabajo se concuerda con Crary's y Green, los que encontraron que este paso es innecesario. Un paso intermedio es utilizar glicerina al 80%, esto es útil para poder reducir la concentración de KOH con agua, en la solución final.

El espécimen flota en glicerina a una menor concentración, si es completa se puede cambiar el recipiente para mezclar de vez en cuando, para que se moldee aunque no es necesario. Evite taparlo con un corcho porque se decolora con la glicerina.

Resumen: Debido a que se utilizan diferentes materiales y / o procedimientos alternativos para un mismo material. Siguiendo de acuerdo a la siguiente formula no se debe de seguir estrictamente, si no se tiene la comprensión y la habilidad y los requisitos que se han tenido antes.

Transparentación y Tinción de huesos.

1 – Evisceración.

2. - Fijación en alcohol al 70%.

3. -- Retirar la piel (excepto en pies y los rabos en anfibios y reptiles).

4. - Disecar y retirar la grasa del cuerpo.

5. - Blanquear la melanina con peróxido de hidrógeno al 3%, lavar y remover las burbujas aspirándolas.

6. - Remojar unos días en KOH al 1% para especímenes pequeños y delicados y al 4% para especímenes grandes y maduros, cambiando la solución varias veces.

7. - Teñir 1 ó 2 días en KOH al 0.5% combinadas con 8 gotas saturadas de solución acuosa de alizarina en 100 ml de solución para teñir.
8. - Lavar y remojar por 1 ó 2 días en KOH a una concentración de 1 al 4 % en agua cambiando la solución varias veces. Evitando el ablandamiento.
9. - Remojar durante una semana en una solución compuesta por glicerina y KOH a partes iguales, a una concentración de 1% y cambiar la solución una o dos veces a la semana.
10. – Disecar los músculos largos y retirar la grasa que aun permanezca ahí.
11. - Remojar por un día en glicerina combinada al 80%.
12. - Almacenar en glicerina pura.

Comentarios: Los esqueletos teñidos con alizarina, destacan óptimamente más en cajas transparentes iluminados desde abajo.

La técnica de aclaramiento descrita anteriormente puede ser utilizada para mostrar los órganos o sistemas en su lugar, o en conjunto con el esqueleto.

Los embriones que han sido aclarados parcialmente pueden mostrar varios órganos internos. Se pueden mostrar los órganos del aparato digestivo, introduciendo un pigmento. También vasos sanguíneos y pulmones se pueden mostrar después de inyectar látex plástico o tinta con gelatina.

Después del aclaramiento los especímenes pequeños pueden dejarse en alcohol y tolueno, para finalmente montarlas en bálsamo y laminillas gruesas semi seccionadas, para describir sus diferencias, las hemisecciones se montan de la misma manera.

Teñido y aclaración del cartílago.

Hay varias técnicas para teñir las partes cartilaginosas de las vertebras de esqueletos pequeños y estas, queden intactas. Teñidas debe de verse a través de ellas y alrededor el tejido claro. La técnica para teñir, puede ser combinada selectivamente utilizada el hueso teñido se verá rojo y el cartílago azul, para finalmente almacenarlo en glicerina. El método general para teñir el cartílago, ya se conocía desde hace mucho tiempo. Pero es mucho menos utilizado, para teñir el hueso con alizarina.

Pocos autores han descrito la técnica, y reportan colores brillantes y resultados uniformes. Algunos autores han usado sus propias formulas sin embargo (el autor se incluye en este grupo) teñir adecuadamente el cartílago puede ser muchas veces impredecible y decepcionante.

Seguir una formula puede no dar el resultado adecuado y en ocasiones se puede modificar la técnica para obtener mejores resultados, por lo que resulta experimentar algunas variables. Da Rocha establece que el cartílago adulto tiene una mayor afinidad para la tinción, que el inmaduro y que el hialino sobre los demás cartílagos.

Procedimiento: Eviscerar el espécimen, retirar la piel enseguida o después de la fijación. Antes de la fijación enjuague la sangre.

Noback y Williams, prefieren fijar el espécimen en formalina al 10%. Miller prefiere alcohol al 95%. Burdi sugiere fijar con una parte de formalina al 1% y una parte de ácido acético, (el autor asume que cada una de las dos tiene sus ventajas) y 8 partes de alcohol etílico al 70%. (El autor se cuestiona, si un esqueleto delicado puede guardarse por largo tiempo en ácido sin descalcificarse).

El autor sugiere evitar el uso de formalina, en los huesos del esqueleto que se van a teñir. Esto muestra que algunas fijaciones, se pueden hacer. En futuros experimentos

en orden. Al parecer uno de estos o aquellos fijadores que se pueden trabajar en experimentos cuidando el orden.

Siguiendo la fijación, el espécimen se lava durante 30 minutos en agua simple Burdí, en agua ácida Noback en agua alcalina Williams Son diversas las tinciones de toluidina azul, la más estable según autores.

Para 100 ml de alcohol etílico al 70%, añadir 2 ml de ácido clorhídrico al 0.5% y agregar el tinte. Toda la formula anterior requiere de 0.25 gr de toluidina azul, pero Burdí experimento ampliamente y concluyó que 0.06 gr era suficiente para teñir fetos de ratón recién nacidos, por 48 hrs; para ratones más viejos se utilizó 0.12 gr. La solución debe prepararse y filtrarse 24 hrs. antes de utilizarse.

La misma solución debe de prepararse a 20 volúmenes para el espécimen. Los primeros autores tiñeron por dos semanas especímenes y fue una sobresaturación de colorante, en todos los tejidos.

Miller tiñó especímenes de 3 y 10 días dependiendo del tamaño del espécimen. Burdí tiñó ratas recién nacidas por 48 hrs. Para Desteñirlas se necesita retirar el colorante azul oscuro de otros tejidos, pero no del cartílago. Este es uno de los pasos más difíciles, del procedimiento.

Novack y Miller los destiñeron utilizando alcohol ácido, por una o dos semanas cambiando el alcohol, cuando este estaba ya fuertemente coloreado.

William especifica, que deben de realizarse cuatro cambios en alcohol ácido al 95% en 72 hrs.

Burdí hizo un procedimiento más rápido, pero más controlado llevándolo a cabo por etapas. Primero utilizó alcohol al 35% durante 20 hrs, después alcohol al 50% durante 28 hrs, y finalmente alcohol al 70% por 8 hrs. Si los especímenes no se tiñeron con

alizarina pueden lavarse en alcohol absoluto y almacenarse en una mezcla de una parte de bencina y una de alcohol absoluto.

En su método Noback los aclaró con hidróxido de potasio y los almacenó en glicerina.

Si los huesos del esqueleto también teñidos se transfieren a la alizarina, después del proceso de la aclaración están preparados para almacenarse.

Por lo tanto el azul del cartílago del espécimen va a ser menos brillante, mientras la especie este en una solución alcalina.

ACLARADO ANATÓMICO DE ESPECIMENES

El nombre de Spalteholz siempre se asocia con la técnica para aclarar, los tejidos blandos y descalcificar huesos. Esta técnica ya se había practicado por más de un siglo, cuando Spalteholz en 1914 publicó su trabajo. Desde entonces se ha desarrollado un buen número de métodos, para su uso en algunas anatomías partes tales como en la cabeza del fémur que fue diseccionado en capas delgadas de tejidos blando. Así como fetos con huesos teñidos con alizarina, que pueden ser aclarados en glicerina. Para deshidratarlos es necesario impregnarlos con salicilato de metilo, esto es necesario para aclarar cráneos y masas de tejido suave relativamente grandes. Para hacer esto Spalteholz recomendó una mezcla de 5 partes salicilato de metilo y 3 partes benzoato de benzilo (petrolato de wintergreen) para lograr un máximo de aclaramiento, con la adición de benzoato de benzilo. La adición de este es pequeña la diferencia en el aclaramiento. Por eso en la mayoría de trabajos, se utiliza únicamente el salicilato de metilo

Para su estudio los vasos más pequeños se disecan, para una mayor satisfacción histológica, el trabajo a sido demostrado por medio de la inyección y aclarado de los tejidos. En particular, se ha estudiado de esta manera la vascularidad de los huesos. Los huesos relativamente grandes como las vértebras humanas, no pueden ser aclarados muy bien, a menos que el hueso haya sido macerado para remover todo el material orgánico, excepto el colágeno de la matriz, antes de descalcificar el hueso. Los vasos sanguíneos del hueso pueden ser tratados de esta manera se puede utilizar una inyección masiva la cual es lo suficiente mente fuerte, mientras que los vasos sanguíneos son destruidos.

Sin embargo, se pueden inyectar los vasos sanguíneos con colorante en los huesos, no muy macerados observar su trayecto. Los huesos preparados de esta manera no están listos para su exhibición en el museo, es necesario realizar cortes y montar las mitades lado a lado. Los especímenes aclarados en glicerina pueden colocarse de manera normal en frascos en perspex, pero este método no puede ser utilizado con los especímenes que se aclaran en metil salicilato ya que este ataca la perspex rápidamente. Hasta ahora las únicas vasijas disponibles para montar modelos, aclarados en salicilato, son frascos de vidrio, pero son difíciles de cerrar, porque tenían salicilato. Como alternativa se utilizan recipientes de resina, en lugar de los de vidrio. Los recipientes de resina eventualmente se pueden utilizar, deben de ser remplazados aunque su vida útil, puede considerarse preferencial mente más en años que en meses.

El Cráneo Humano.

El cráneo y el esqueleto pueden ser preparados por el método descrito en este capítulo. Alternativamente los cráneos se pueden comprar en las tiendas, que abastecen de esqueletos a los estudiantes de medicina.

Los dientes flojos se fijan en su base con cemento de celulosa, de secado rápido.

El cráneo se fija por una semana en formalina al 10% y se seca. Se descalcifica sumergiéndolo en ácido nítrico al 5% y urea al 0.1% para impedir que el cráneo se haga café durante la descalcificación. El tiempo que se requiere para la descalcificación, varía de una a seis semanas. El proceso de descalcificación se comprueba introduciendo una aguja en el hueso. Cuando la aguja atraviesa la parte más gruesa, del cráneo, es el momento de dejarlo una semana en más en el ácido para asegurar que la descalcificación ha sido completa. Al término de esta última

semana el cráneo se saca del ácido y se lava en una corriente de agua fría durante una semana para quitarle el ácido. Si los huesos están descoloridos, para blanquearlos sumergirlos en peróxido de hidrógeno. Si algún hueso ha quedado flojo asegurarlo pegándolos con clavos, y una solución de gelatina caliente al 25%. Después si la gelatina ha sido usada el cráneo será sumergido en Éter etílico, que contiene formalina al 10% esto será por 24 hrs. Para que la gelatina se endurezca y la mandíbula se fije al cráneo con alambre de acero inoxidable.

Por ello se le hacen al cráneo, cuatro agujeros longitudinales para pasar por ellos alambre. Este permitirá fijar y montar el cráneo, para poder colocarlo en una placa.

Para deshidratar el cráneo sumergirlo en dos cambios de Éter etílico en un intervalo de dos semanas. Seguido de tres cambios de alcohol absoluto en un intervalo de tres semanas. Si el tratamiento de vacío es utilizado para remover el aire de los huesos, la presión a la atmósfera tiene que ser devuelta gradualmente por los fuertes y continuos movimientos que el aire le pueda causar, por ello el alcohol absoluto absorberá una gran cantidad de vapor de agua. Después el cráneo se coloca en un lugar cerca de un evaporador durante un minuto, para que el alcohol se evapore, posteriormente sumergirlo en dos ocasiones en benceno en un intervalo de tres semanas. Después se drena el excedente de bencina del cráneo para colocarlo en metil salicilato. El benceno puede ser extraído del metil salicilato por un tratamiento de vacío, el cual acelera la penetración del salicilato de metilo. Inicialmente se aclara rápido, pero la translucidez continúa para seguir aclarándose mientras más tiempo pase; terminado el proceso, el cráneo aclarado debe guardarse en una urna de vidrio y deberá cubrirse con una tela elástica, para proteger al espécimen del polvo. Una

vez montado y cubierto, la urna deberá colocarse en donde se conserve por meses y en donde la bencina se evapore.

La cabeza del fémur.

Después de fijar la cabeza del fémur, raspar hasta que quede libre de carne, para disecarla sobre una sierra haciéndole un corte recto. Es más fácil si el hueso se adosa parcialmente para que en el borde derecho se le haga un parche, para poder orientar el hueso hacia la sierra. Posteriormente el hueso es ablandado desangrado y blanqueado, con el mismo método como se prepara un esqueleto.

Si la grasa está presente después del ablandado, esta se puede disolver hirviendo el hueso, en xileno a una temperatura de 110°C. La siguiente etapa es sumergir el hueso en benceno para evaporar el xileno del hueso. Descalcificado y blanqueado se fija en formalina al 10% durante una semana, posteriormente lavarlo con agua corriente por 48 hrs. Y finalmente se conserva en glicerina primero al 25% y después en glicerina al 50% y finalmente se transfiere a glicerina pura en donde alcanzara el máximo aclaramiento que se logra en seis meses.

La glicerina no aclara el espécimen, pero el metil salicilato acelera y muestra la estructura del hueso.

Tinción de los fetos.

Muchos trabajos han mejorado la técnica original, para mostrar los huesos de los fetos aclarando los tejidos blandos. Los tejidos blandos se vuelven traslucidos, por el ablandamiento parcial en hidróxido de potasio. Los huesos se tiñen con alizarina y el modelo, se aclara y se almacena en glicerina.

Para que los resultados sean satisfactorios se deben utilizar fetos humanos, hasta de 20 semanas de edad. El secreto del éxito, está en calcular bien el tiempo entre

ablandar y teñir, esta varía dependiendo del tamaño, del feto. Si el ablandamiento se prolonga el feto se hace pedazos, y si el tiempo no es el adecuado, los tejidos no se suavizan lo suficiente, y los huesos solo se manchan con la alizarina y el feto no queda aclarado adecuadamente.

Si se realiza un corte en el tórax y en el abdomen del feto que aún no está fijado se extrae en las vísceras. La fijación se hace en dos cambios de Éter etílico, uno cada siete días. Este tratamiento va seguido de dos cambios de alcohol absoluto, uno cada siete días. La grasa se extrae del feto con dos baños en acetona, cada baño deberá de hacerse con un intervalo de siete días cada uno. Después el mismo feto se mete en hidróxido de potasio al 2%, combinado con agua destilada y permanecerá ahí hasta que se vean claramente los huesos a través de los músculos. Este proceso dura entre una y cuatro semanas dependiendo del tamaño del feto. Terminado el proceso el feto se somete a un tratamiento de tinción en una solución de alizarina al 0.0001%, constituida con hidróxido de potasio al 1%. Para alcanzar la tonalidad deseada, mantener el feto en la solución entre uno y cuatro días. Para desteñir el espécimen si se tiñó demasiado, se remoja en ácido clorhídrico al 1% unos minutos. Después el espécimen se someterá al siguiente tratamiento, por cuatro días en la Solución "A":

Hidróxido potasio	0.8 gr
Glicerina	20 ml
Agua destilada	80 ml

La inclusión de la glicerina y el hidróxido de potasio, retrasa el porcentaje del ablandamiento, se desagua el fluido excedente y después se deja por 24hrs en la

siguiente solución “B”:

Glicerina	2 partes
Éter al 70%	2 partes
Alcohol benzílico.	1 parte

El alcohol benzílico acelera la clarificación del feto en glicerina. Después de este tratamiento el feto se regresa a la solución “A” por una semana. Posteriormente el espécimen se sumerge glicerina al 50% y después en glicerina al 75%, para finalmente conservarlo en glicerina pura.

Los periodos de la inmersión dependerán del tamaño del espécimen, el cual se dejara en cada solución hasta que se hunda. El máximo aclarado se logra, varios meses después.

Tejidos inyectados.

Los tejidos delgados, pueden ser aclarados en glicerina. Con este método de aclaramiento cualquier cuerpo, puede ser inyectado a través en los vasos sanguíneos y ductos. La coloración opaca tiene la ventaja de que es coloreada, radio opaca. El micro llenado fluye adecuadamente a través de los lechos capilares, por lo que es importante evitar una sobre inyección.

El látex neoprene 572 es de fácil adquisición, no es caro y circula fácilmente dentro de los vasos sanguíneos pequeños; pero se detiene espontáneamente, en los capilares. Si los tejidos van a ser aclarados en salicilato de metilo no debe utilizarse látex, porque se vera afectado por el salicilato de metilo.

La vasculatura de huesos relativamente pequeños, pueden ser estudiados inyectando un volumen adecuado y después descalcificando y aclarando los huesos en salicilato metilo. De esta manera se ha estudiando el aporte sanguíneo, que abastece la

cabeza del fémur del conejo y del hombre. La resina cristic 700 puede ser utilizada para inyectar huesos, con vasos sanguíneos relativamente grandes. Por ejemplo el aporte vascular del cráneo y de la columna vertebral en el hombre, se puede mostrar inyectando la artería aorta y en la vena cava la resina coloreada.

Posteriormente los tejidos suaves son macerados en pancreatina, y los huesos pueden ser descalcificados y coloreados con salicilato metilo por el método anteriormente mencionado. A condición de que una parte importante de la aorta y la vena cava se conserven intactas, cuando la columna vertebral es separada en unidades de 2 ó 3 vértebras la pérdida de los discos, intervertebrales durante la maceración en la pancreatina.

No es relevante, debido a que los vasos sanguíneos más largos son suficientemente fuertes, para mantener a las vértebras en su posición original.

COLORACIÓN DE PUNTOS DE OSIFICACIÓN.

(Técnica de Spalteholz).

Material y Método.

1. - Antes de iniciar el proceso previamente se debe de preparar una solución madre de alizarina, compuesta por 0.25 ml de alizarina, disuelta en 300 ml de alcohol al 98°
2. - Se recolecta el material, que consiste principalmente en esqueletos o huesos de fetos, que no hayan llegado a termino; y hay que descarnar bien el material óseo.
3. - Después se colocan las piezas en un recipiente de cristal que contiene un litro de formol al 10%, que se le agregó una cucharada de bicarbonato de sodio, con la finalidad de neutralizar la acidez, que debe controlarse con papel tornasol. Si se comprueba que la solución quedo demasiado ácida, se debe desechar el material utilizado.
- 4- En el formol y en el bicarbonato se dejan las piezas por tres días, para después comenzar con la deshidratación progresiva por pases sucesivos, en alcohol, a diferentes graduaciones, hasta llegar al de 98° grados.
5. – Una vez comprobada la deshidratación de las piezas, se sumergen en una solución compuesta de:

Solución madre de alizarina ...	10 ml
Alcohol absoluto	390 ml
Ácido acético glacial.	50 gotas

6. - El material se deja en esta solución durante 5 días, tiempo suficiente para que la alizarina tiña las sales de calcio, que se encuentren en los proyectos del hueso.

Para esta técnica se puede utilizar alizarina roja o azul, según las preferencias.

(Arroyo 1962)

DIAFANIZACIÓN POR MACERACIÓN

Ejemplos de diafanización realizados por Ismael Concha y personal docente técnico de los laboratorios de las Universidades, de Santo Tomás y de los Andes, Santiago de Chile.

Objetivo:

La diafanización es el proceso por el cual una muestra se hace diáfana o transparente, mediante técnicas que igualan los índices de refracción de la luz del interior del órgano con el medio que lo contiene. En este caso la técnica de diafanización fue por Maceración.

Diafanización por Maceración

Esta técnica es de Dawson y Schultz.

1- Fijación de la muestra (en fetos se recomienda formol al 10%)

2- Técnica de tinción de centros de osificación y o repleción.

3- El siguiente esquema se aplica, para la diafanización.

A) Se utiliza una solución de Hidróxido de Potasio (KOH) al 2% ó 3%, esta solución se puede renovar varias veces según el espesor. Para fetos pequeños, se recomienda de 1 a 2 pases de (KOH).

B) Solución el 75% de (KOH al 2%) + 25% de glicerina técnica.

C) Solución de 50% de (KOH al 2%) + 50% de glicerina técnica.

D) Solución de 25% de (KOH al 2%) + 75% de glicerina técnica.

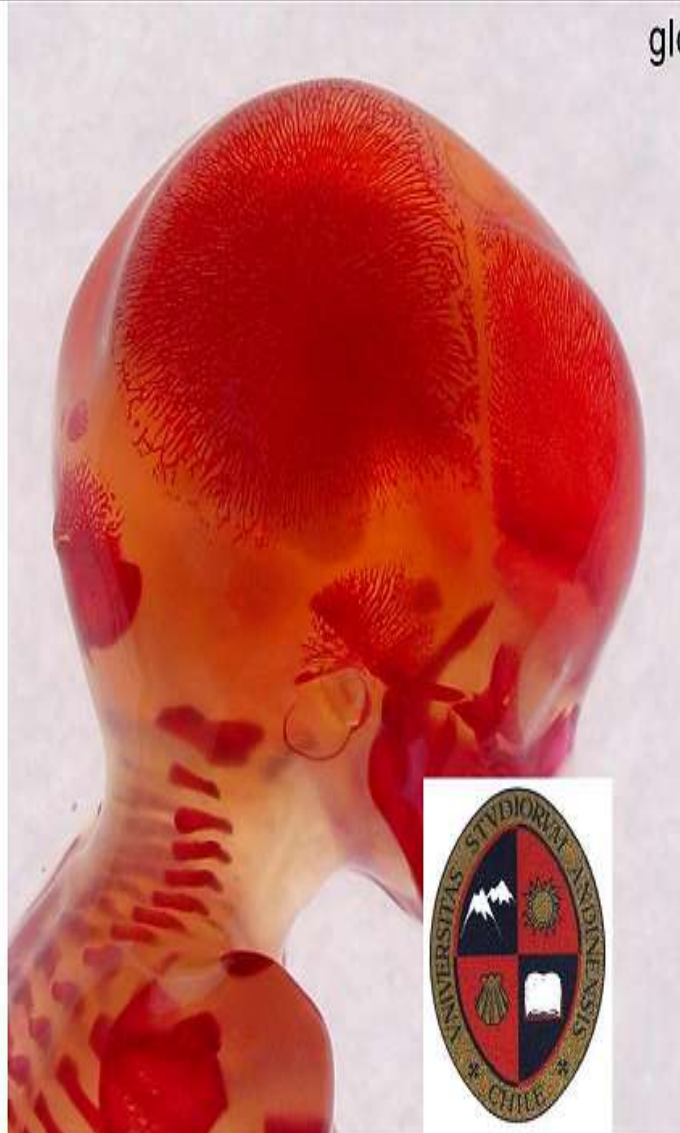
E) Solución de 100% de glicerina técnica. Si en esta etapa la muestra no se torna transparente se puede volver, a los puntos c o d. Por lo general se requiere cambiar varias veces la solución en glicerina para obtener una transparencia adecuada.

lo.otsns.lsdolp

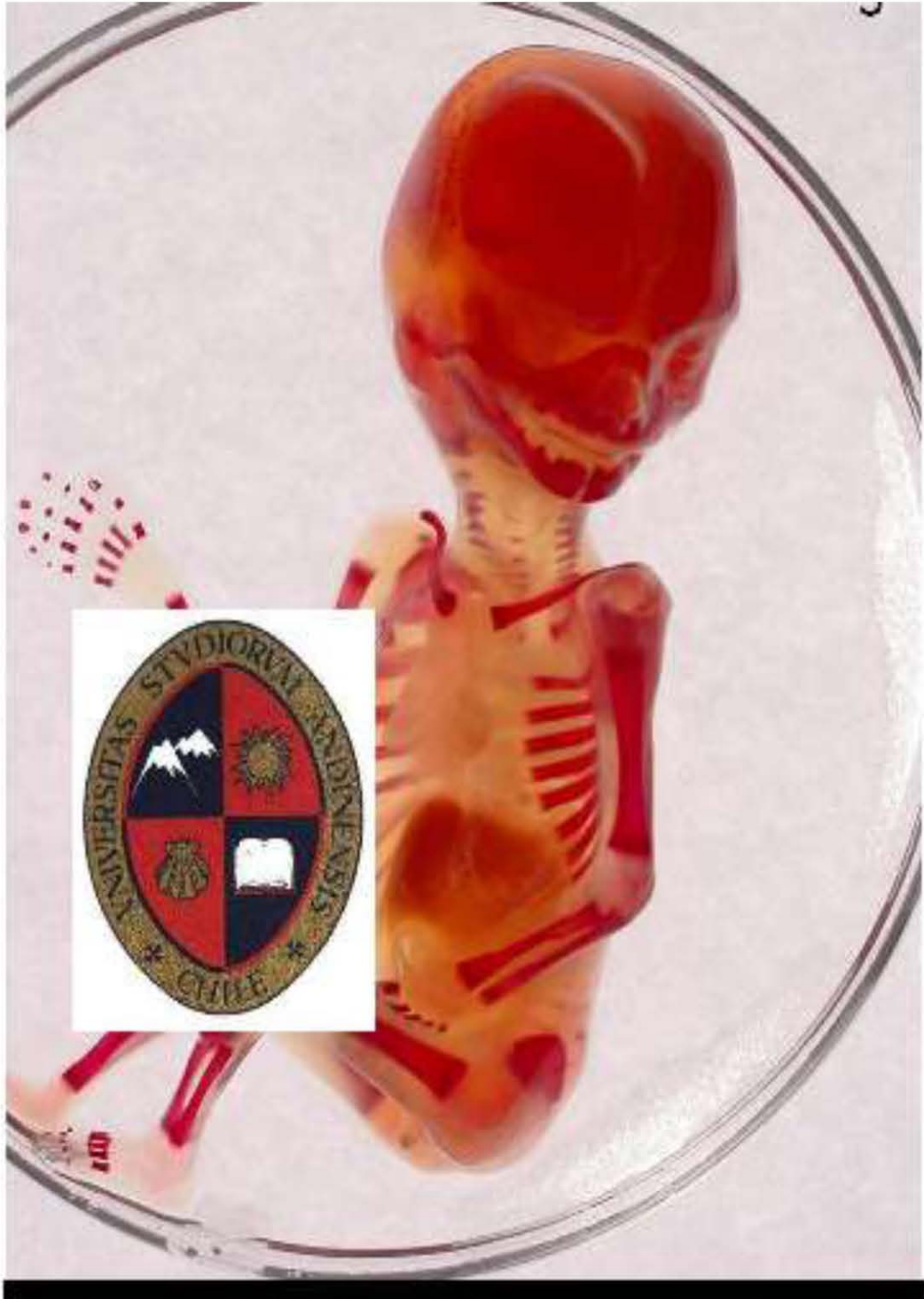


Diafanizado de feto de perro Foto 3

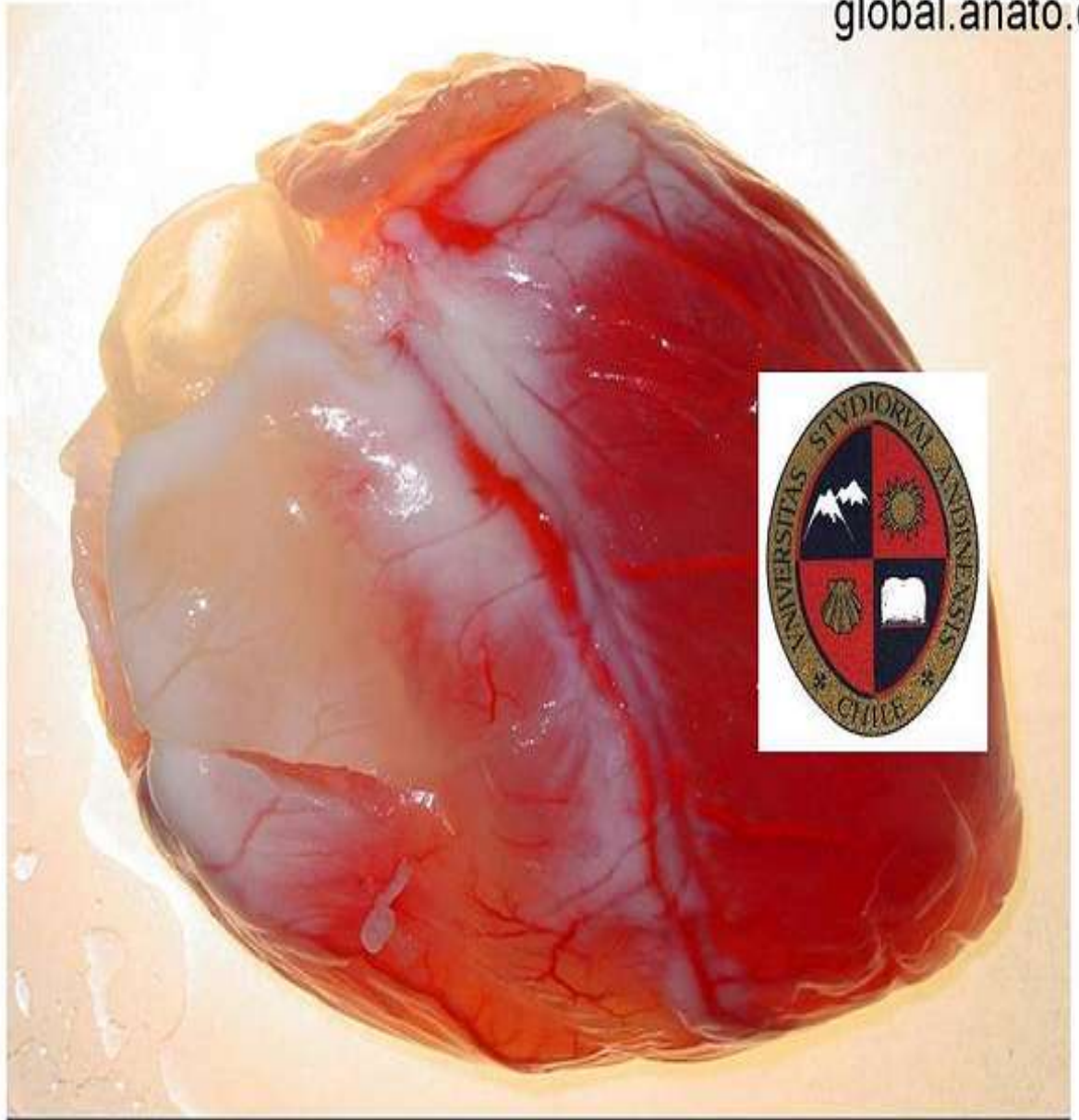
global.anato.cl



Diafanizado de feto humano de centros de osificación foto 1



Diafanizado de feto humano de centros de osificación foto 2



Diafanizado de corazón de cerdo foto 4

DISCUSIÓN

Con referencia al origen de la diafanización, el creador de la técnica original fue Spalteholz en 1906 (Salaverri) Se basa en que los tejidos vegetales o animales, refractan la menor cantidad de luz y alcanzan el máximo de transparencia cuando están rodeados e inhibidos de una sustancia cuyo índice de refracción es igual al índice medio de dichos tejidos. Al realizar estas técnicas deberá tenerse especial cuidado con las sustancias que son tóxicas, venenosas, inflamables o cancerígenas. Como el sulfuro de carbono (Salaverri) y otras como el Hidróxido de potasio que causa quemaduras o el xilol que es inflamable y cancerígeno. Así mismo el xilol, como la mayoría de los solventes polares utilizados en dichas técnicas, son neurotóxicos; por esta razón se recomiendan trabajar, en la campana de extracción. En el caso del hidróxido de sodio causa quemaduras y el alcohol etílico es inflamable. En otro plano esta la acetona que irrita la nariz y la garganta. Así como el Amoniaco que tiene un olor penetrante y venenoso. También esta el benceno que causa somnolencia y el ácido nítrico, que es toxico. De acuerdo con los hallazgos de este trabajo, la mejor técnica es la de Complucad Cristal, por la calidad de la transparentación que obtenida. Otra de las ventajas es que la pieza diafanizada no necesita estar inmersa en glicerina, como sucede en otras técnicas para su conservación, porque terminado el proceso la pieza puede mantenerse al medio ambiente. Con la diafanización se pueden preparar diferentes estructuras de origen orgánico para su conservación, con fines didácticos, en la enseñanza en la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ya que con la difusión y la descripción de todas estas técnicas, se busca darle un impulso a la producción de estos materiales orgánicos.

OBJETIVOS DE LAS TÉCNICAS DE DIAFANIZACIÓN EN LAS DIFERENTES ESTRUCTURAS ORGANICAS.

1) Medios refringentes, procedimiento de Spalteholz.

- 1) Se utiliza para demostrar las anastomosis vasculares más pequeñas.
- 2) Así como la transparentación del tejido óseo, dentario, cerebro, medula, fetos, anfibios y peces.

2) Visualización del desarrollo óseo en fetos por la técnica modificada de Dawson.

- 1) Se utiliza para la visualización in situ de los centros de osificación en embriones y fetos, tiñéndolos con alizarina.

3) Diafanización Complucad Cristal Duty.

- 1) Se utiliza para: transparentar los cartílagos humanos y animales.
- 2) Así como para transparentar pulmones, corazones y embriones humanos y animales.

4) Método para Transparentar Anfibios y Colorear sus Esqueletos.

- 1) Se utiliza para transparentar al anfibio *salientia* "Eleutherodactylus sp." (portoricensis) Puerto Rico.

5) Diafanización: 1) Se utiliza para volver transparente, un segmento del cuerpo donde las arterias han sido previamente inyectadas con sustancias colorantes.

- 2) Así como para la conservación de fetos, del tejido óseo dentario bien desarrollado, o para la conservación del sistema nervioso central.

6) Preparaciones Anatómicas: 1) Se utiliza para la tinción y aclaración de los huesos del esqueleto de animales pequeños, como ratones, anfibios, reptiles y pescado.

2) Así como para la transparentación y tinción de huesos.

3) Y para el teñido del cartílago.

7) Aclarado Anatómico de Especímenes: 1) Se utiliza para aclarar el cráneo humano, el esqueleto, la cabeza del fémur y para la tinción de fetos.

Así como para mostrar el tejido blando de los huesos.

8) Coloración de Puntos de Osificación: 1) Se utiliza para teñir con alizarina las sales de calcio, que se encuentran en los proyectos del hueso.

9) Diafanización por Maceración: 1) Esta técnica muestra como se igualan los índices de refracción de la luz del interior del órgano con el medio que lo contiene.

TIEMPO QUE SE REQUIERE PARA REALIZAR LAS DIFERENTES TÉCNICAS DE DIAFANIZACIÓN

Fundamentos e Historia de Medios Refringentes, Procedimiento de Spalteholz

- 1) Se requieren 16 Días

Visualización del desarrollo óseo en los fetos por la Técnica modificada de Dawson.

- 1) Para el feto núm. 1 que tiene una edad de 09 a 12 semanas: 43 días.
- 2) Para el feto núm. 2: que tiene una edad de 13 a 16 semanas: 69 días
- 3) Para el feto Núm. 3 que tiene una edad de 17 a 20 semanas: 90 días.

Diafanización Complucad Cristal Dutty.

Diafanización de cartílago.

- 1) Aproximadamente 24 a 48 horas.

Diafanización de grandes piezas. Humanas y animales: pulmones, corazón etc.

- 1) Se lleva acabo aproximadamente en 64 días

Diafanización de embriones humanos y animales, cuando la pieza mide de 3 a 7 cm.

- 2) El tiempo aproximado es de 7 días -9 horas -10 minutos.

Cuando la pieza la pieza mide 20 cm.

- 3) El tiempo aproximado es de 13 días –10 horas – 10 minutos.

Método para Transparentar Anfibios y Colorear sus Esqueletos.

Esta técnica es una de las más sencillas pues su preparación solo tarda 1 día.

Diafanización.

- 1) Esta técnica requiere para su preparación, aproximadamente. 14 días y 12 horas

Preparaciones Anatómicas.

- 1) Para el blanqueado de un espécimen de diez minutos a una hora.
- 2) Fijar ratones recién nacidos y un lagarto requieren de 30 minutos ó 3 días o más.
- 3) Para la tinción de huesos de ratón recién nacido se requiere de 4 horas o varios días más depende del tamaño del espécimen la concentración de la sustancia.
- 4) Para teñir fetos de ratón recién nacido y viejos se requiere de 48 horas.
- 5) Para su aclarado final depende del tamaño del espécimen, media hora o varias semanas.
- 6) Para su almacenaje depende del tamaño del espécimen algunos meses o semanas o días.

Fijación, teñido y aclaración del cartílago.

- 7) Requiere de 3 semanas – 140- 30 minutos.

Aclarado Anatómico de Especímenes.

El cráneo humano.

- 1) Requiere de 17 semanas.

La cabeza del fémur

- 2) Requiere de 6 meses 9 días aproximadamente.

Tinción de fetos.

- 3) Se requiere de 9 semanas 2 días, aproximadamente.

Coloración de puntos de osificación.

4) Se requiere de 8 horas, aproximadamente.

Diafanización por maceración.

5) El tiempo es variable hasta lograr el objetivo, deseado.

COSTO DE LAS SUSTANCIAS QUE SE UTILIZAN PARA REALIZAR ESTAS TÉCNICAS DE DIAFANIZACIÓN.

Para realizar estas técnicas se requiere de las siguientes sustancias, que varían en su precio. A continuación se presenta una lista de los precios, de cada una de ellas.

La finalidad de proporcionar esta información, es para realizar el presupuesto de la técnica que se realice.

Los precios son del 2011

DESCRIPCIÓN	Precio	Unidad
Ácido nítrico 68 a 70 % (de 1 LT)	\$ 182.00	Pieza
Alumbre de amonio (de 500 GR)	\$ 306.00	“
Ácido Acético Glacial (de 1 LT.)	\$ 117.00	“
Hidróxido de Amonio (Amoniaco) (de 1 LT.)	\$ 109.00	“
Agua Oxigenada al 3% (de 1 LT.)	\$ 75.00	“
Alcohol Benzilico Ra. (de 1 LT.)	\$ 282.00	“
Hidróxido de Sodio Lentejas (500 GR)	\$ 114.00	Pieza
Glicerina (de (1 LT.)	\$ 176.00	“
Hidróxido de Potasio (de 500 GR)	\$ 182 .00	
Alizarina. I.C. 58000 (de 25 GR)	\$ 645.00	“
Alcohol Eílico Absoluto Anhidro (de 1 LT.)	\$ 87.00	“
Urea Cristales RA. (de 500 GR)	\$ 123.00	“
Benceno Ra. (de 1 LT.)	\$ 407.00	Pieza

CONCLUSIONES.

En el presente trabajo, se cumplió el objetivo que inicialmente se planteó al lograr reunir las principales técnicas de diafanización.

Este conjunto de técnicas brindará una buena base a aquellos estudiantes y profesores de la carrera de Médico Veterinario Zootecnista y a los interesados en general que decidan conocer y realizar cada una de las técnicas de diafanización, de piezas anatómicas con la finalidad de que puedan utilizarse y tengan aplicación en las asignaturas que lo requieran como: Anatomía veterinaria I, Anatomía veterinaria II, reproducción, fisiología veterinaria, patología, terapéutica quirúrgica, Anatomía animal y Embriología, así como, en demostraciones prácticas, de laboratorio, de investigación y de difusión de la cultura.

BIBLIOGRAFÍA.

1. DANIEL M M. Métodos de diafanización cap. XVI. en: Daniel M M. Manual de Técnica Anatómica. 2º ed. Madrid España: edit. Estades, Capitulo.1957; 105-108.
2. SANCHEZ S I. TIERREROS V V CEVALLOS G J. SUERO B S. (página principal en Internet) Visualización del Desarrollo Óseo en Fetos por la Técnica Modificada de Dawson. Revista Medica del C.I.E.M.; Vol. 1 no.1. 1996 [citado: 2011 septiembre 29] Disponible en [http:// www.ucsm.edu. pe/ciemucsm/larev/desos.htm](http://www.ucsm.edu.pe/ciemucsm/larev/desos.htm)
3. Diafanización Complucad Cristal Duty. (página principal en Internet) COMPLUCAD INTERNACIONAL S.A 1997. [citado: 2011 septiembre 29]. Disponible en :[http:// www.complucad. Com. / tdd. htm](http://www.complucad.Com./tdd.htm)
4. MAYORGA H. Método para Transparentar Anfibios y Colorear sus Esqueletos. Departamento de Biología Universidad de Puerto Rico Mayagüez P.R. Caribe Journal Science 4(1) march 1964; 323 - 325.
5. TREJO MAYA MB. Técnicas de preparación y conservación de piezas anatómicas para docencia e investigación (Tesis de Licenciatura). Cuautitlan Izcalli (Edo. De México) Universidad Nacional Autónoma de México,1994.
6. HILDEBRAND M. Anatomical Preparations. ed. Los Angeles University of California, Press, Berkley 1968: 44 - 51

7. TOMPSETT H D. Cleared anatomical specimens, Chapter 35. in TOMPSETT DH Anatomical Techniques, Edinburgh and London. Editors, E. & S. Livingstone, May 1972; 248- 254.

8. CONCHA ISMAEL. (página principal de Internet) Diafanización por Maceración. Las Universidades de Santo Tomás y de los Andes, Santiago Chile. [citado 2011 septiembre 30]. Disponible:[http:// www.anato.cl](http://www.anato.cl) (trabajos realizados publicados en tu laboratorio de anatomía) (global.anato.cl).