



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Laboratorio de Anatomía Animal Comparada

*Evaluación de la técnica de transparentación con doble tinción
en un medio libre de ácidos, en charal *Chirostoma jordani*:
(*Osteichthyes: Atherinidae*).*

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGA

Presenta

CINTIA LUCERO OROPEZA BUENO

Dr. Jorge Ricardo Gersencowies Rodríguez

Director de Tesis

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla 2012



Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión,
de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores.

Julius Robert Oppenheimer

A mi director de tesis el Dr. Jorge Ricardo Gersenowies Rodríguez y a mis sinodales la M. en C. Gabriela Sánchez Fabila, la M. en C. Alba Felipa Marquez Espinosa, el Biol. Antonio Edmundo Cisneros Cisneros y al M. en C. Samuel Meras Martínez por su paciencia, comprensión y apoyo para realizar esta tesis.

A Doña Teresa Herrera Madrid de Bueno, mi abuelita quien siempre ha tenido la paciencia de escucharme y aconsejarme.

A mi madre María de la Luz Bueno Herrera a quién le debo su esfuerzo, comprensión y apoyo en esta hermosa carrera.

A mis hermanos Rocky, Wendy, Iztel Oropeza Berni y Herber, Irving Abinabi,
Harold y Helaman Oropeza López, porque la vida me dio la oportunidad de
conocerlos y recibir su apoyo moral.

ÍNDICE

Resumen.....	8
1. Introducción.....	9
1.1. Introducción a la técnica de transparentación.....	9
1.2. Historia de la técnica de transparentación.....	10
1. 3. Técnicas de manejo y estudio del esqueleto de vertebrados.....	11
1.4. El sistema esquelético.....	13
1. 5. Biología del organismo.....	13
2. Antecedentes.....	17
3. Justificación.....	20
4. Objetivo general.....	21
5. Material y Método.....	22
6. Resultados y Análisis.....	28
6.1. Aspectos cualitativos.....	28
6.2. Análisis de datos.....	30
7. Discusión.....	45
7.1 Consideraciones.....	45
7.2 Caracteres cualitativos de los peces.....	45
7.3 Análisis de varianza unifactorial.....	46
8. Conclusión.....	49
9. Sugerencias.....	49
10. Bibliografía.....	50

Resumen

En el presente estudio se evaluó una técnica experimental para la transparentación en peces comparándola con la técnica tradicional y la de doble tinción, se utilizaron 333 especímenes de charales (*Chirostoma jordani*) que se dividieron al azar en tres grupos. Se utilizó el porcentaje de deformación del cuerpo para evaluar la calidad de la técnica. Se encontró que las tres técnicas poseen básicamente la misma calidad.

Abstract

In the present study, an experimental technique for transparentation in fish compared with the traditional technique and the double staining, we used 333 specimens of chub (*Chirostoma jordani*) were divided randomly into three groups. We used the rate of deformation of the body to evaluate the quality of the technique. It was found that all three techniques have basically the same quality.

1. Introducción:

La preparación de muestras para colecciones de historia natural y exposiciones con posibilidades ilimitadas. Los avances en la tecnología es más marcada en el campo de los museos. La preparación de los esqueletos requiere de mucha paciencia y tiempo. Los huesos preparados forman parte integral de las colecciones de animales vertebrados y los esqueletos montados son los más beneficiosos para el estudio de los efectos de visualización (Hangay y Dingley, 1985).

El esqueleto se puede macerar, desengrasar, blanquear, hacer un secado, hacer un acabado, con el fin de articular y montar el esqueleto. Sin embargo, se puede trabajar con el esqueleto usando la técnica de transparentación sin desarticular el esqueleto (Hangay y Dingley, 1985).

1.1. Introducción a la técnica de transparentación.

La técnica de transparentación consiste en la tinción de estructuras óseas, donde el rojo de alizarina "S" es afín al calcio. Así mismo, también se aplica la tinción del cartílago utilizando azul de toluidina, azul de alciano o azul de metileno. Muchas especies de vertebrados son teñidos con rojo de alizarina "S", pero se puede hacer un buen contraste si se tiñen también el cartílago (Hangay y Dingley, 1985). Para efectuar el aclarado en tejidos blandos se utiliza la glicerina, hidróxido de sodio e hidróxido de potasio (Hollister, 1930) haciendo que la muestra se haga diáfana, igualando los índices de refracción de luz tanto del interior del espécimen como con el medio que lo contiene (Concha. 2006).

Existen dos tipos de técnicas de transparentación, la primera es para teñir estructuras del esqueleto y la segunda es para teñir elementos cartilaginosos (Hangay y Dingley, 1985). En la técnica de transparentación, con rojo de alizarina "S" tiene compatibilidad con las sales de calcio, disolviéndose

fácilmente en agua o alcohol debido a que es un tinte ácido (Hollister, 1934). Durante el procedimiento, los especímenes son sometidos constantemente en ácido, desmineralizando los elementos óseos descalcificando las estructuras óseas. El azul de metileno, azul de totuidina y el azul de alciano tiñe principalmente mucopolisacáridos, que al exponerse en ácidos, se disuelve y se ioniza el pigmento en el cartílago, obteniendo una mejor fijación (Dingerkus y Uhler, 1977).

1.2. Historia de la técnica de transparentación.

Desde la antigüedad hasta los comienzos del siglo XX, el estudio del esqueleto siempre consistió en el desmembramiento de los especímenes y su posterior descarnamiento y limpieza que incluía su desengrasado concluyendo con su montaje. Para grandes vertebrados, las diferentes técnicas que se tienen para lograr este objetivo son: una sencilla disección desollando al organismo retirando piel y músculo del hueso, o bien empleando derméstidos para remover la carne del cadáver; así mismo, se entierra el cadáver en un lugar seguro dejado actuar bajo tierra a los hongos, bacterias, insectos e invertebrados los cuales removerán la carne del esqueleto (Baeza, 2008).

El uso de sustancias con propiedades tintoriales, se remonta al siglo XVI. El informe más antiguo del uso del rojo de Alizarina "S" aparece en *De Miraculis Ocultis Naturae* (1559) publicado por L. Lemnius, quien anota que la raíz de la rubia teñía el hueso y en 1736 fue confirmado por John Belchier con dicha raíz (Estrada, 1977). En 1826, los franceses químicos Colin y Robiquet identificaron a la alizarina y la purpurina como los ingredientes activos de la raíz de rubia (Depew. 2009). En 1853, Beale utilizando hidróxido de sodio transparentó el primer embrión humano. En 1866, Strecher descubrió la fórmula de la alizarina, la cual fue confirmada por Graebe y Lieberman en 1968, quienes produjeron alizarina sintética (Estrada, 1977).

En 1897, con los trabajos de O. Schultze, se inicia la técnica de maceración y clarificación de los tejidos blandos de los especímenes, por medio de hidróxido de potasio al 1% y glicerina (Estrada, 1977). En 1905, Since Lundvall fue el primero en utilizar la alizarina para teñir huesos en especímenes se despellejaron, desde entonces se han modificado varias veces la técnica. El método posee los siguientes pasos básicos (Selby, 1987):

- 1) La eliminación del exceso fijador.
- 2) El uso de soluciones de KOH para la maceración.
- 3) Desarrollo de una solución de glicerina, alcohol bencílico, etanol y agua para la limpieza adicional y el endurecimiento después de la tinción.

En 1906, Mall introdujo la técnica de Schulze en América, tratando los especímenes con solución de 1 parte de alizarina en 10,000 partes de KOH 1%. En 1914, se le reconoce a Gottlieb en la relación entre la coloración de los huesos por la rubia y la tinción de calcio. En 1929, Ignalsi usó formol como fijador y Hollister (1934) trabajó con peces grandes y observó que la penetración de la alizarina en los huesos densos es más lenta y que los peces de aguas profundas. En 1948 en vista de los problemas que para su tinción representaban especímenes como aves, debido a la gran cantidad de grasas y proteínas que poseen, True ideó una técnica para eliminarlas por medio de: glicerina, agua destilada y alcohol al 95%, en partes iguales, además de usar una solución acuosa de pepsina al 10%, incubación a 40 °C e inyección de cellosolve (Estrada, 1977).

1. 3. Técnicas de manejo y estudio del esqueleto de vertebrados.

Existen técnicas especializadas para el manejo del sistema esquelético, con el fin de facilitar su estudio, donde su preparación es la maceración, separando los tejidos blandos de las estructuras óseas y en ocasiones desarticular el esqueleto para su posterior reconstrucción (Moreno, 2005). La técnica de

maceración es una secuencia de pasos que se ajusta al tipo de organismo a tratar, para eso existen seis tipos de maceración (Hangay y Dingley, 1985):

- 1) Maceración con agua fría para preparar ligamentos del esqueleto.
- 2) Maceración de agua caliente, tanto la maceración con agua fría como este tipo de maceración son similares exceptuando a que este tipo solo se aplica a cadáveres recientes.
- 3) Maceración por cocido, sin embargo existe el riesgo de decolorar los huesos permanentemente.
- 4) Maceración en seco aunque es una técnica que requiere de mucho tiempo.
- 5) Maceración química del cual se aplica el amonio e hipoclorito de sodio solo en esqueletos adultos, perborato de sodio para especímenes pequeños, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, tripsina, pepsina y papaína.
- 6) Maceración para preservar a un espécimen por medio de antiformalina. Particularmente la maceración química suele ser una técnica peligrosa por el cuidado de las soluciones químicas.

Wassersug sugiere que la maceración debe ser cuidadosamente controlada para evitar la desintegración de las muestras (Wassersug, 1976). Así mismo, existen organismos que tienen una gran cantidad de grasa dificultando realizar maniobras con el esqueleto, por lo que el desengrasado se maneja con o sin instrumentos, con el fin de remover y retirar la grasa para manipular mejor el esqueleto. Los métodos de blanqueado, depende del tipo de maceración o si el esqueleto fue desengrasado cambia el procedimiento. La inmersión del esqueleto en peróxido de hidrógeno, se le debe dar un especial cuidado a estructuras como dientes y colmillos para que preserven su color (Hangay y Dingley, 1985).

Teñir los especímenes vertebrados es importante para estudios de la embriogénesis, morfogénesis, anatomía comparada o para estudios teratogénicos, debido a que es un procedimiento rápido y sencillo que puede manejar una gran cantidad de ejemplares siendo útil para evaluaciones estadísticas de las malformaciones osteológicas (Park y Kim. 1984). Así mismo, dicha técnica permite detectar caracteres importantes en el establecimiento de relaciones filogenéticas, y ontogénicas, mediante la evaluación de las estructuras morfológicas con el fin de comprender mejor las funciones de los sistemas anatómicos, e incluso volver a evaluar las explicaciones sobre la estructura corporal en varias especies de vertebrados (Cortés, *et al*, 2009).

1.4. El sistema esquelético.

El sistema esquelético se compone de un exoesqueleto y un endoesqueleto. El exoesqueleto se forma del tegumento: la dermis dá lugar al hueso y la epidermis a la queratina. Los tejidos que contribuyen a la formación del endoesqueleto incluyen al tejido conjuntivo fibroso, cartílago y hueso (Kardong, 1999). Otros componentes menos frecuentes del esqueleto el esmalte, la dentina, la vitrodentina, la ganoina y la cosmina (Ruíz, 1993). El endoesqueleto se divide en dos unidades craneal y poscraneal, donde este último abarca columna vertebral, extremidades, cintura y estructuras asociadas, como costillas y caparazones (Kardong, 1999).

1. 5. Biología del organismo.

Existen varias subfamilias reconocidas para los Atherinidae. Sin embargo, no se sabe si la familia es monofilética de ahí la inclusión de cuatro subfamilias. La subfamilia Menidiinae es un grupo limitado a América y se presenta principalmente en las zonas de agua dulce con muchos miembros en México y

América Central. Contiene seis géneros de la tribu Menidiini, del cual se ubica el género *Chirostoma*, *Labidesthes*, *Meridia* y *Poblana* (Maya y Cortes, 1995).

Su morfología general es: una longitud máxima de 60 cm, dos aletas dorsales muy separadas, la primera con espinas flexible y la segunda con una espina seguida de radios blandos, aleta anal con una espina seguida de radios flexibles, las aletas pectorales, la boca pequeña y terminal, carente de línea lateral, en su lugar, las laterales son plateadas; aletas pélvicas usualmente abdominal; escamas relativamente grandes (por lo general 31-50 en series laterales más en *Labidesthes*); vértebras 32-60 (menos en *Stenatherina*).

La mayoría de los atherinidos son marinos y alrededor de 50 especies están confinadas en las aguas dulces. Los atherinidos del género *Chirostoma* habitan en la línea de agua dulce en la parte sur del altiplano mexicano y existen 18 especies en total (Maya y Cortes, 1995).

1. 5. 1. Clasificación de Nelson (1994):

Phyllum: Chordata

Subphylum: Vertebrata (Craniata)

Superclase: Gnathostomata

Clase: Actinopterygii

Subclase: Neopterygii

División: Teleostei

Subdivisión: Euteleostei

Superorden: Acanthopterygii

Series: Atherinomorpha

Orden: Lophiiformes

Suborden: Atherinoidei

Familia: Atherinidae

Subfamilia: Menidiinae

Tribu: Menidiini

Género: *Chirostoma*



Figura 1. Muestra la imagen del *Chirostoma jordani*.

Nombre Científico: *Chirostoma jordani* (Woolman, 1894) (Figura 1)

Su descubridor fue Woolman en 20 de noviembre de 1894. Se les puede encontrar en el municipio de Briseñas en la localidad de El Capulín, en el Estado de Michoacán, a una latitud de 20.2203 y una longitud de -102.4842 (Instituto de Biología, 2006).

1. 5. 2. Importancia.

En el grupo Jordani se encuentran los llamados peces blancos de los lagos del altiplano mexicano, que pertenecen al género *Chirostoma*, los cuales tienen una importancia cultural, económica y alimenticia para los habitantes indígenas de estos lagos (Martínez *et al.*, 2006), considerándose como una de las pesquerías más antiguas y de mayor tradición. Los lagos de Chapala y Pátzcuaro presentan el mayor número de especies del género con relación a otros embalses de la región así como problemáticas similares: Introducción de especies de otros embalses y sobreexplotación pesquera, así como deterioro ambiental producto de la actividad humana, lo cual ha repercutido directamente sobre las poblaciones de especies locales a través del tiempo, provocando la disminución de éstas e incluso la posible subdivisión intralacustre de poblaciones (Pérez, 2005).

En el presente trabajo, se evaluará la técnica de doble tinción en solución neutra, con el fin de evitar que las estructuras óseas se descalcifiquen a causa de la exposición a ácidos débiles, el modelo biológico será el charal (*Chirostoma jordani*), debido a que se han hecho diversos estudios sobre el género *Chirostoma*, por la fácil obtención de grandes cantidades de la misma especie, por lo que será más significativo al observar los resultados.

2. Antecedentes:

- Hollister (1934), experimentó con peces para el desarrollo de la técnica de transparentación, tiñendo con alizarina e hidróxido de potasio. La alizarina se fija perfectamente en el calcio, disolviéndose con facilidad en agua o alcohol ya que es un tinte ácido. La alizarina pertenece al grupo de las oxiquinonas, denominadas tintes biológicos. Realizó varias pruebas con aceites, glicerina, KOH y NaOH, obteniendo buenos resultados con alcohol y KOH.
- Mayorga (1964) presentó un método rápido para transparentar el esqueleto de los anfibios el cual consiste en la preservación de los ejemplares en alcohol a 30% y los ejemplares frescos se fijan en formol al 4%, de 3 a 5 días dependiendo de su tamaño. Son eviscerados, así como desollados y se eliminan los ojos. Se sumergen en NaOH al 1.5%, donde se transparentan los tejidos blandos, hasta que se observen las partes óseas, se le añade 1 ml de solución colorante por cada 20 ml de NaOH. Después de transcurrir un lapso de tiempo de 5 a 10 minutos, dependiendo del grado de intensidad de color que se desee en el esqueleto, se transfiere a una solución de NaOH, para llevar a cabo los cambios necesarios para obtener una preparación en donde el esqueleto destaque en forma precisa y clara. Por último, el material obtenido se almacena en glicerina pura. Mayorga sugiere que este método puede procesar un gran número de ejemplares.
- Pulchter y sus colaboradores (1969) recopilaron la historia de la técnica de transparentación con Alizarina, así como los procedimientos progresivos que llegaron a perfeccionar la técnica. Desde la antigüedad, el ser humano ha teñido fibras de origen animal como la seda, lana, etc. con fines textiles. Conforme fue avanzando la tecnología, mediante el uso de los datos espectroscópicos, se descubrió entre los depósitos de calcio, tejido y compuestos salinos no quelatos, donde mediante el rojo de alizarina "S" era sensible a estos compuestos y de fácil disolución en ácido acético, tiñendo sólo los depósitos de calcio.

- Dingerkus y Uhler (1977) propusieron que la técnica de transparentación no solo funciona para teñir las estructuras óseas. También es funcional para las estructuras cartilaginosas usando azul de alciano en una solución ácido acético-alcohol, usando pequeños vertebrados como peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Durante la digestión utilizaron tripsina obteniendo especímenes más firmes que los autorizados exclusivamente con KOH.
- En 1983, Miquelarena y Arámburu realizaron el análisis osteológicos y lepidológicos de *Gymnocharacinus bergi*. A sí mismo, se utilizó la técnica de transparentación, propuesta por Hollister (1934) con algunas modificaciones.
- Ruíz (1993) realizó un estudio osteológico de elasmobranquios hipotremados del Golfo de México a través de la técnica de transparentación. La técnica de transparentación fue adecuada en hipotremados deprimidos de talla de 10 cm de longitud total y 5 cm de diámetro en disco hasta 50 cm de longitud total por 8 cm de diámetro en disco, ya que permite obtener un esqueleto que puede ser trabajado y analizado. Considera que para estudios futuros de sistemática, se pueden encontrar caracteres osteológicos diacríticos aún no encontrados.
- Webb y Byrd en 1994, realizaron un trabajo con fetos de roedores para teñir huesos y cartílago mediante la técnica de doble tinción, para su estudio toxicológico, reemplazando el ácido acético glacial con ácido ftálico de potasio.
- Maya y Cortes en 1995, estudiaron la osteología de *Atherinella balsana* (Meek) el charal del río Balsas en México, donde a nivel especie, las diferencias son la aparición del postcleitro superior, una tercera epural y la laminilla ocasional en el foramen del nervio vago. Utilizaron tres técnicas: disección manual, transparentación de Hollister y por medio de derméstidos.

- Gavaia, y sus colaboradores en 1999, estandarizaron la técnica de doble tinción en etapas tempranas de peces teleósteos, reconociendo que este método es adecuado para los estudios ontogénicos, cuyas larvas en eclosión a menudo son solo de unos pocos milímetros de largo y para la detección de anomalías en el esqueleto en larvas pequeñas.
- Borrego en 2001, estudió el esqueleto del charal de Xochimilco *Chirostoma humboldtianum* (Osteorhynchiformes: Atherinidae) y los comparó con el charal del río Balsas *Atherinella balsana* (Meek) (Pisces: Atherinidae). Transparentó a los organismos con hidróxido de potasio y fueron teñidos con rojo de alizarina "S", separando las diferentes regiones del esqueleto sin encontrar diferencias drásticas, excepto en su porción caudal.
- Sánchez (2001) estudió las relaciones de similitud entre ocho especies de Pleuronectiformes mexicanos, analizando el esqueleto postcraneal. Proporcionó evidencia suficiente que dos de las especies se asocian en la misma familia y mientras que dos especies se aíslan de este grupo, gracias a las diferencias que presentaron. En la técnica de transparentación sólo modificó las cantidades de ácidos y el tren de glicerina.
- Barreto y Maya en 2005, realizaron estudios anatómicos en especies de *Chirostoma*, evaluando las diferentes morfometrías de 11 piezas osteológicas de la región mandibular de cuatro especies de *Chirostoma*. Utilizaron el método de Hollister para teñirlos y transparentarlos.
- Walker y Kimmel en 2008, realizaron un trabajo sobre la técnica de transparentación doble tinción en un medio libre de ácidos en cartílago y huesos en larvas de pez cebra, considerando que el ácido desmineraliza los huesos causando un efecto negativo en la tinción en los elementos óseos.

3. Justificación:

Los investigadores dedicados al estudio del esqueleto modifican constantemente las técnicas de montaje para obtener muestras de mejor calidad para realizar su trabajo. Sin embargo, los investigadores constantemente manipulan a los organismos o terminan almacenados por largo tiempo, concluyendo en su deterioro. Esto conlleva a modificar la técnica para obtener preparaciones más eficientes y manejables como un auxiliar en la investigación (Baeza, 2008).

Se desconoce el grado de descalcificación que presentan las estructuras óseas ante las exposiciones de un medio ácido. Por esta razón, al modificar la técnica de transparentación y usar una base, se evitará la desmineralización de las estructuras óseas.

4. Objetivo:

Objetivo general:

Evaluar la técnica de transparentación, con doble tinción y solución neutra, comparándola con las técnicas tradicionales en el charal *Chirostoma jordani* (*woolman*): (Osteichthyes: Atherinidae).

Objetivos particulares:

-  Evaluar la técnica de transparentación con doble tinción y solución neutra, comparándola con las técnicas tradicionales en el charal *Chirostoma jordani* (*woolman*), en el aspecto cualitativo.
-  Evaluar la deformación de las medidas morfométricas antes y después de la técnica de transparentación entre los tres métodos.
-  Comparar la alometría entre la predeformación y postdeformación entre los tres métodos.

5. Material y Método:

En la siguiente ruta crítica se muestra el método utilizado para la preparación de los especímenes:

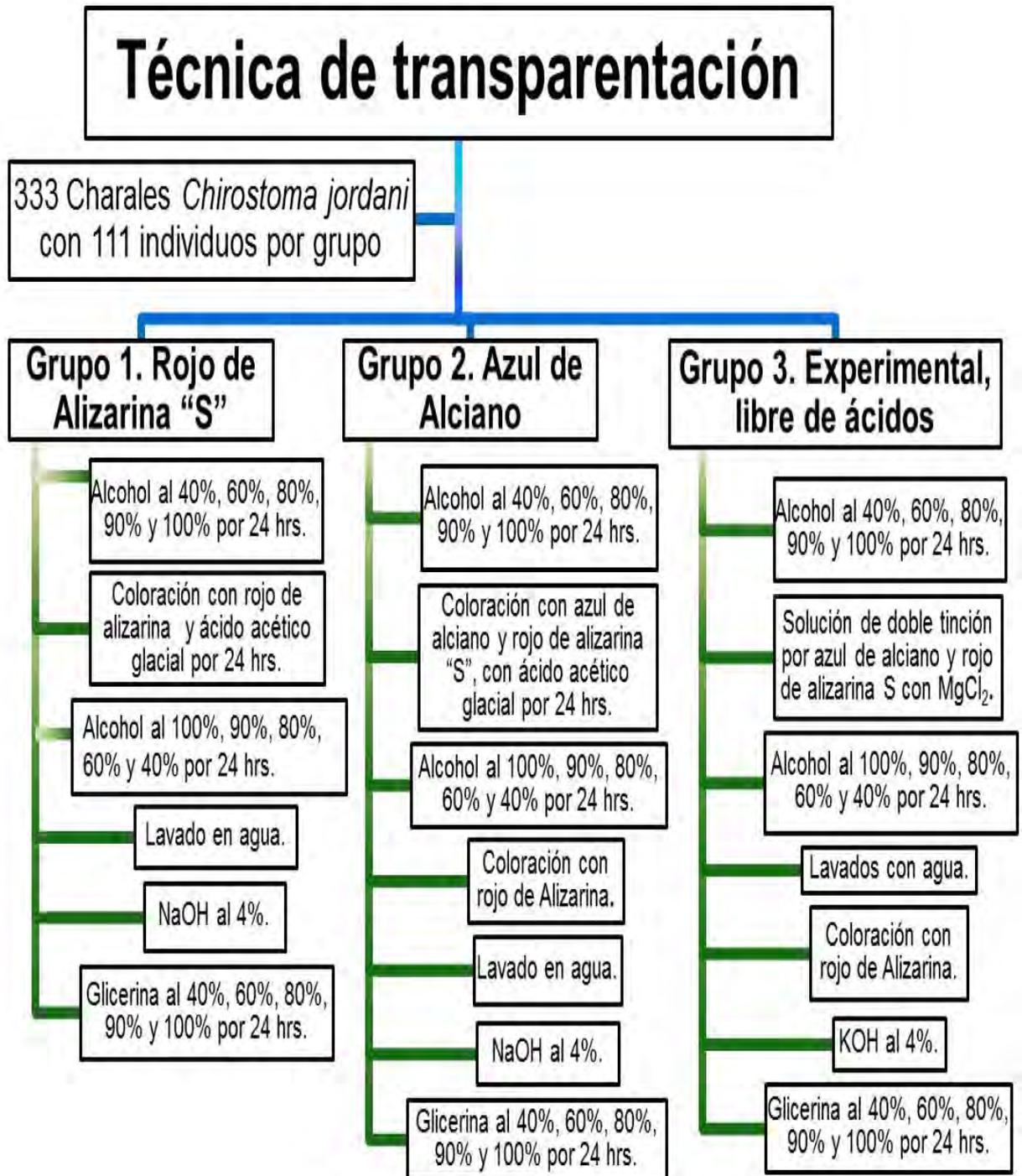


Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología

Los peces se obtuvieron en la Central de Abastos de Pescados y Mariscos “La nueva viga”, provenientes del estado de Michoacán. Los charales fueron identificados con ayuda de las claves de Alvarez (1970), determinándolos como *Chirostoma jordani*. Se congelaron y fueron transportados al laboratorio de anatomía animal comparada de la FES Iztacala.

Se contaron los charales y en total fueron 333 individuos. Se obtuvieron los datos morfométricos antes de fijarlos (Tabla 1 y Figura 3):

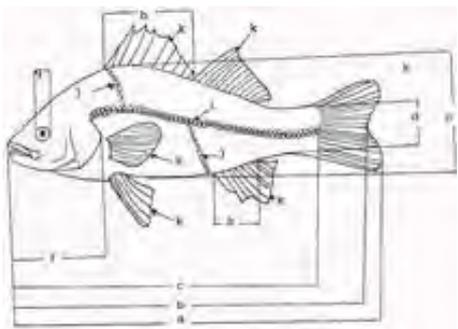
Medidas morfométricas y medidas merísticas		
a) Longitud total	i) Número de escamas de la línea lateral	
b) Longitud furcal	j) Número de escamas de la serie transversal (de la línea lateral hasta el inicio de la aleta dorsal y de la línea lateral hasta el inicio de la aleta anal)	
c) Longitud patrón	k) Número de radios duros y suaves de cada aleta (Pectoral, pélvica, anal, caudal, dorsal)	
d) Altura mínima	l) Peso	
e) Altura máxima		
f) Longitud cefálica		
g) Diámetro interocular		
h) Longitud de la base de las aletas (dorsal y anal)		

Tabla 1

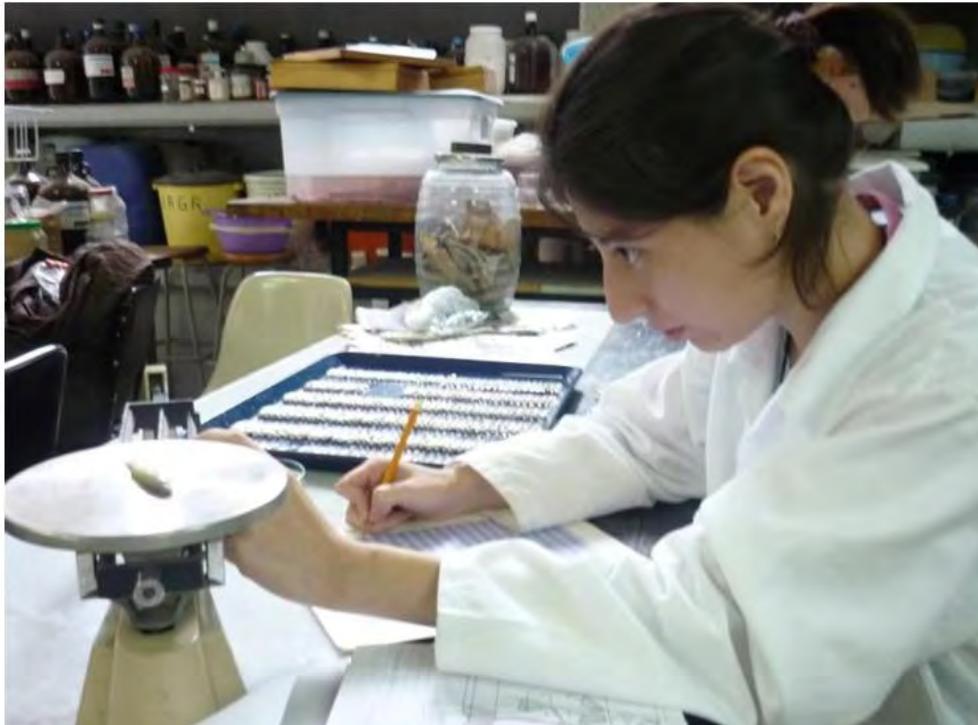


Figura 3.

Se fijaron en formol al 4% neutralizado durante 3 días, separando aleatoriamente a los especímenes en tres grupos. Después, se realizaron lavados durante 24 hrs (Figuras 4a, 4b y 4c). Posteriormente, se retiraron las escamas y vísceras procurando no dañar los elementos esqueléticos.



Figura 4a. Depositando los charales en formol al 4%.



Figura 4b. Depositando los charales en agua para el lavado.



Figura 4c. Los 333 charales divididos en tres grupos.

Primer grupo: Se deshidrataron 111 especímenes en un tren de alcohol al 40%, 60%, 80%, 90% y 100% por 24 horas en cada uno. Después, se utilizó el Rojo de Alizarina "S" (fórmula química es $C_{14}H_8O_4$) al 0.01% y ácido acético glacial para teñir los elementos óseos y nuevamente se lavarán en agua corriente durante 24 hrs. Más tarde, se sumergirán en una solución de NaOH al 4%

(Figura 5) en un periodo de 24 a 32 semanas hasta quedar completamente traslúcidos. Los organismos se volvieron a lavar en agua corriente durante 24 hrs para posteriormente introducirlos en un tren de glicerina (40%, 60%, 80%, 90% y 100%) de dos a tres semanas en cada solución (Borrego, 2001).



Figura 5. Preparando la solución de NaOH al 4%.

Segundo grupo: Los 111 especímenes se deshidrataron en un tren de alcohol al 40%, 60%, 80%, 90% y 100% por 24 horas, para posteriormente sumergirlos en una solución preparada con 10 mg de Azul de Alciano (8GN) (su fórmula química es $C_{56}H_{68}C_{14}CuN_{16}S_4$), 80 ml de alcohol etílico al 95% y 20 ml de ácido acético glacial, durante un periodo de 24 a 48 hrs. Se realizarán dos cambios con alcohol etílico al 100%, durante 2 a 3 hrs en cada cambio. Posteriormente, se trasladarán a alcohol etílico del 90%, 80%, 60% y 40% de 2 a 3 hrs. Más tarde, los organismos se trasladaron en agua destilada durante 2 a 3 días. Después, los organismos se transfirieron a una solución acuosa de NaOH al 4%, con Rojo de Alizarina "S", hasta teñir las estructuras óseas de rojo y posteriormente se colocaron en una solución de NaOH al 4% de 2 a 3 semanas. Posteriormente, se lavaron con agua y se trasladaron a un tren de agua glicerina (3:1, 1:1, 1:3) hasta glicerina pura (Figura 6). Por último, los charales fueron almacenados en glicerina pura (Dingerkus y Uhler, 1977).



Figura 6. Los charales del grupo 2, después de ser transparentados.

Tercer grupo: Los 111 especímenes se deshidrataron en un tren de alcohol al 40%, 60%, 80%, 90% y 100% por 24 horas, sumergiéndose en una solución preparada con 0.1 g de azul de alciano (IGN), 1000 ml de etanol al 70% y 6.8 g de $MgCl_2$, durante 24 a 48 hrs. Se realizaron dos cambios con alcohol etílico del 90%, 80%, 60% y 40% de 2 a 3 hrs Posteriormente, los especímenes se transfirieron a una solución acuosa de KOH al 4%, con Rojo de Alizarina "S", hasta teñir las estructuras óseas de rojo y posteriormente se colocaron en una solución de KOH al 4% de 2 a 3 semanas. Después, se lavaron con agua y se trasladaron a un tren de glicerina (40%, 60%, 80% y 90% y 100%) hasta conservarlos en glicerina pura (Figura 7) (Walker M. y Kimmel C, 2007).



Figura 7. Los charales del grupo experimental después de ser transparentados.

Posteriormente, se volvió a tomar todas las medidas morfométricas una vez completado el proceso de transparentación aplicada en los tres grupos y solo a los individuos que conservaron sus etiquetas. Más tarde, se le retiraron los ojos de los especímenes. Se tomaron fotos con cámara de 8.1 megapíxeles, apoyándose en el negatoscopio (Figuras 8a y 8b).



Figura 8a. Retirando los ojos a los charales.



Figura 8b. Tomando fotos al charal.

6. Resultados y Análisis:

6.1. Aspectos cualitativos

De los 111 charales por cada grupo, del método clásico se obtuvieron 28 charales que conservaron sus etiquetas, del método de doble tinción se obtuvieron 23 individuos y del método experimental se obtuvieron 37 individuos. Los grupos del método clásico y método de doble tinción no se observó ninguna complicación durante el procedimiento. Carecen de daños visibles en los tejidos o esqueleto y en cuanto al tacto se podían manipular por la rigidez que presentaban, no así las aletas (pectorales, pélvicas, dorsales y caudal) que mostraban ser frágiles en el momento de manipular a los organismos (Figuras 9 y 10 respectivamente).

Durante el procedimiento en el método experimental no tuvo ninguna anomalía, el tejido se puso blanquizco (Figura 7) hasta transparentarse. Sin embargo, en el momento manipular a los organismos, mostraban una gran fragilidad y flacidez (Figura 11).

En las figuras 9, 10 y 11, se muestran un ejemplo de los especímenes por tratamiento, se presentan en las fotos.



Figura 9. *Chirostoma jordani jordani* del grupo 1, del método de transparentación clásica.



Figura 10. Se muestra un individuo de *Chirostoma jordani jordani* del grupo 2, del método de transparentación de doble tinción.



Figura 11. Un individuo de *Chirostoma jordani jordani*, en la que se aplicó el método experimental.

Se procedió a analizar y obtener los datos con ellos. Se obtuvo la deformación producida por el tratamiento utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de deformación} = \frac{\text{Post} - \text{Pre}}{\text{Pre}} \times 100\%$$

Donde:

% de deformación = porcentaje de deformación

Pre = Valor morfométrica previo al tratamiento.

Post = Valor morfométrica posterior al tratamiento.

Dado que la diferencia puede ser positiva o negativa, esto representa dos tipos diferentes de deformación, incremento de la magnitud de la medida si el signo es positivo y decremento si el signo es negativo.

6.2. Análisis de datos:

6.2.1 Comparación de los métodos.

Se analizó el % de deformación utilizando un análisis de Varianza Unifactorial (ANOVA I) teniendo como factor el método, utilizando el programa STATISTICA versión 8.0.

6.2.1.1 Análisis de Varianza Unifactorial.

6.2.1.1.1 Análisis de la deformación de la longitud total.

El análisis de la deformación de la longitud total, se llevó a cabo contrastando las siguientes hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre los métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre dos métodos.

Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2 Medida de la deformación de la longitud total. Análisis de varianza unifactorial del factor método utilizando las deformaciones observadas.					
ANOVA PARA LA DEFORMACIÓN DE LONGITUD TOTAL					
	SC	GL	CM	F	p
"METODO"	179.46	2	89.73	4.31	0.016
Error	1769.54	85	20.82		
SC = Suma de cuadrados, GL = Grados de libertad, CM = Cuadrado medio, F = Estadístico de pruebas y p					

= Probabilidad observada.

En esta tabla se observa que la probabilidad es menor a 0.05 ($p = 0.016$) indicando que hay diferencias significativas entre los métodos. Se procedió a aplicar la prueba de varianzas protegidas (LSD de Fisher), contrastando las siguientes hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre ambos métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre ambos métodos.

Se obtuvo la tabla 3.

Tabla 3

PRUEBA LSD DE FISHER PARA LA DEFORMACIÓN POR MÉTODO			
	{CLASICA}	{DOBLE TINCION}	{EXPERIMENTAL}
	- 3.21%	- 6.78%	- 5.73%
CLASICA		0.0066	0.029
DOBLE TINCION	0.0066		0.39
EXPERIMENTAL	0.029	0.39	

En esta tabla podemos observar que no hay diferencias en la deformación entre el método experimental y con doble tinción, disminuyendo la deformación (\bar{y} exp = - 5.73%; \bar{y} doble tinción = - 6.78%; $p = 0.039$).

También se observa que el método clásico es diferente a ambos métodos teniendo una menor deformación (\bar{y} clásico = - 3.21%; \bar{y} doble tinción = - 6.78%; \bar{y} experimental = 5.73%; $p = 0.066$ y $p = 0.029$ respectivamente).

6.2.1.1.2 Análisis de la deformación de la longitud furcal.

Se analizó la deformación de la longitud furcal, contrastando las siguientes hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre los métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre dos métodos.

Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Medida de la deformación longitud furcal. Análisis de varianza unifactorial del factor método utilizando las deformaciones observadas.					
ANOVA PARA LA DEFORMACIÓN DE LONGITUD FURCAL					
	SC	GL	CM	F	p
"METODO"	63.17	2	31.58	2.39	0.097
Error	1119.45	85	13.17		
SC = Suma de cuadrados, GL = Grados de libertad, CM					

= Cuadrado medio, F = Estadístico de pruebas y p = Probabilidad observada.

En la tabla 4 se muestra que la probabilidad es mayor al 0.05 ($p = 0.097$) indicando que no hay diferencias en los métodos por lo que no fue necesario aplicar la prueba de varianza protegidas (LSD de Fisher). En la tabla 5, se observa que en los tres métodos disminuye el tamaño del tejido al tener deformaciones negativas (\bar{y} clásico = - 4.24%; \bar{y} doble tinción = - 3.31%; \bar{y} experimental = - 2.26%).

Tabla 5

{CLASICA} $\bar{y} = - 4.24\%$	{DOBLE TINCION} $\bar{y} = - 3.31\%$	{EXPERIMENTAL} $\bar{y} = - 2.26\%$
--------------------------------	--------------------------------------	-------------------------------------

6.2.1.1.3. Análisis de la deformación de la longitud patrón.

Se analizó la deformación de la longitud patrón, contrastando las siguientes hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre los métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre dos métodos.

Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Medida de la deformación de la longitud patrón. Análisis de varianza unifactorial del factor método utilizando las deformaciones observadas.					
ANOVA PARA LA DEFORMACIÓN DE LONGITUD PATRÓN					
	SC	GL	CM	F	p
"METODO"	1829.3	2	914.65	0.52	0.59
Error	147928.3	85	1740.33		
SC = Suma de cuadrados, GL = Grados de libertad, CM = Cuadrado medio, F = Estadístico de pruebas y p = Probabilidad observada.					

En la tabla 6 se muestra que no hay diferencia en la deformación ($p = 0.59$) entre los métodos. En la tabla 7, indica que en dos de los tres métodos disminuye el tamaño del tejido y en el método de doble tinción se incrementa. Así mismo, disminuyó la deformación en el método clásico y en el método experimental (\bar{y} clásico = - 2.29%; \bar{y} doble tinción = 4.81%; \bar{y} experimental = - 6.53%). No fue necesario aplicar la prueba de Varianza protegidas (LSD de Fisher).

Tabla 7

{CLASICA} $\bar{y} = - 2.29\%$	{DOBLE TINCION} $\bar{y} = 4.81\%$	{EXPERIMENTAL} $\bar{y} = - 6.53\%$
--------------------------------	------------------------------------	-------------------------------------

6.2.1.1.4. Análisis de la deformación de la altura mínima.

Se analizó la deformación de la altura mínima, contrastando las siguientes hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre los métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre dos métodos.

Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Medida de la deformación de la altura mínima. Análisis de varianza unifactorial del factor método utilizando las deformaciones observadas.					
ANOVA PARA LA DEFORMACIÓN DE ALTURA MÍNIMA					
	SC	GL	CM	F	p
"METODO"	4433.79	2	2216.89	3.86	0.025
Error	48821.06	85	574.36		
SC = Suma de cuadrados, GL = Grados de libertad, CM = Cuadrado medio, F = Estadístico de pruebas y p = Probabilidad observada.					

La tabla 8 se observa que la probabilidad es menor al 0.05 ($p = 0.025$) indicando que hay diferencias entre los métodos. Se procedió a aplicar la prueba de varianzas protegidas (LSD de Fisher), contrastando la siguiente hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre ambos métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre ambos métodos.

Se obtuvo la tabla 9.

Tabla 9

PRUEBA LSD DE FISHER PARA LA DEFORMACIÓN POR MÉTODO			
	{CLASICA}	{DOBLE TINCION}	{EXPERIMENTAL}
	- 3.41%	- 0.35%	- 17.83%
CLASICA		0.056	0.46
DOBLE TINCION	0.056		0.0073
EXPERIMENTAL	0.46	0.0073	

En la tabla anterior podemos observar que no hay diferencias en la deformación entre el método experimental y con el clásico (\bar{y} exp = - 17.83%; \bar{y} clásica = - 3.41%; \bar{y} doble tinción = - 0.35%; $p = 0.46$ y $p = 0.56$ respectivamente).

También se observa que del método experimental es diferente al método de doble tinción (\bar{y} experimental = - 17.83%; \bar{y} doble tinción = - 0.35%; $p = 0.025$). Presentan de una mayor deformación asociada con la disminución de tamaño.

6.2.1.1.5. Análisis de la deformación de la altura máxima.

Se analizó la deformación de la altura máxima, contrastando las siguientes hipótesis:

$H_0: p \geq 0.05 =$ No hay diferencias entre los métodos.

$H_a: p < 0.05 =$ Hay diferencias al menos entre dos métodos.

Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Medida de la deformación de la altura máxima. Análisis de varianza unifactorial del factor método utilizando las deformaciones observadas.					
ANOVA PARA LA DEFORMACIÓN DE ALTURA MÁXIMA					
	SC	GL	CM	F	p
“MÉTODO”	26.87	2	13.43	0.097	0.91
Error	12453.21	85	146.508		
SC = Suma de cuadrados, GL = Grados de libertad, CM = Cuadrado medio, F = Estadístico de pruebas y p = Probabilidad observada.					

En la tabla 10 se muestra que la probabilidad es mayor al 0.05 ($p = 0.91$) indicando que no hay diferencias en los métodos. En la tabla 11, indica que en los tres métodos disminuye el tamaño del tejido en porcentaje al ser negativa la deformación (\bar{y} clásico = - 4.82%; \bar{y} doble tinción = - 4.68%; \bar{y} experimental = - 5.87%), por lo que no fue necesario aplicar la prueba de Varianza protegidas (LSD de Fisher).

Tabla 11

{CLASICA} $\bar{y} = - 4.82\%$	{DOBLE TINCIÓN} $\bar{y} = - 4.68\%$	{EXPERIMENTAL} $\bar{y} = - 5.87\%$
--------------------------------	--------------------------------------	-------------------------------------

6.2.1.1.6. Análisis de la deformación de la longitud cefálica.

Se analizó la deformación de la longitud cefálica, contrastando las siguientes hipótesis:

$H_0: p \geq 0.05 =$ No hay diferencias entre los métodos.

$H_a: p < 0.05 =$ Hay diferencias al menos entre dos métodos.

Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Medida de la deformación de la longitud cefálica. Análisis de varianza unifactorial del factor método utilizando las deformaciones observadas.					
ANOVA PARA LA DEFORMACIÓN DE LONGITUD CEFÁLICA					
	SC	GL	CM	F	p
"METODO"	359.92	2	179.96	2.39	0.098
Error	6400.33	85	75.30		
SC = Suma de cuadrados, GL = Grados de libertad, CM = Cuadrado medio, F = Estadístico de pruebas y p = Probabilidad observada.					

En la tabla 12 se muestra que la probabilidad es mayor al 0.05 ($p = 0.098$) indicando que no hay diferencias en los métodos. En la tabla 13, se observa que en los tres métodos aumenta el tamaño del tejido en porcentaje al ser positiva la deformación (\bar{y} clásico = 18.23%; \bar{y} doble tinción = 21.94%; \bar{y} experimental = 16.96%), por lo que no fue necesario aplicar la prueba de Varianza protegidas (LSD de Fisher).

Tabla 13

{CLASICA} $\bar{y} = 18.23\%$	{DOBLE TINCION} $\bar{y} = 21.94\%$	{EXPERIMENTAL} $\bar{y} = 16.96\%$
-------------------------------	-------------------------------------	------------------------------------

6.2.1.1.7. Análisis de la deformación del diámetro interocular.

Se analizó la deformación del diámetro interocular, contrastando las siguientes hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre los métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre dos métodos.

Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Medida de la deformación del diámetro interocular. Análisis de varianza unifactorial del factor método utilizando las deformaciones observadas.					
ANOVA PARA LA DEFORMACIÓN DEL DIÁMETRO INTEROCULAR					
	SC	GL	CM	F	p
"METODO"	1943.8	2	971.901	0.72	0.49
Error	114997.5	85	1352.91		
SC = Suma de cuadrados, GL = Grados de libertad, CM = Cuadrado medio, F = Estadístico de pruebas y p = Probabilidad observada.					

En la tabla 14 se muestra que la probabilidad es mayor al 0.05 ($p = 0.49$) indicando que no hay diferencias en los métodos. En la tabla 15, se indica que el método de doble tinción y clásica disminuye el tamaño del tejido en porcentaje y hay deformación negativa; mientras que en el método experimental aumenta el tamaño del tejido y la deformación es positiva (\bar{y} clásico = 0.86%; \bar{y} doble tinción = 1.37%; \bar{y} experimental = 8.41%), por lo que no fue necesario aplicar la prueba de Varianza protegidas (LSD de Fisher).

Tabla 15

{CLASICA} $\bar{y} = - 0.86\%$	{DOBLE TINCION} $\bar{y} = - 1.37\%$	{EXPERIMENTAL} $\bar{y} = 8.41\%$
--------------------------------	--------------------------------------	-----------------------------------

6.2.1.1.8. Análisis de la deformación de la longitud de la base de la primera aleta dorsal.

Se analizó la deformación de la longitud de la base de la primera aleta dorsal, contrastando las siguientes hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre los métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre dos métodos.

Los resultados se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Medida de la deformación de la longitud de la base de la primera aleta dorsal. Análisis de varianza unifactorial del factor método utilizando las deformaciones observadas.					
ANOVA PARA LA DEFORMACIÓN DE LA LONGITUD DE LA BASE DE LA PRIMERA ALETA DORSAL					
	SC	GL	CM	F	p
"METODO"	13751.9	2	6875.97	3.63	0.031
Error	160970.3	85	1893.77		
SC = Suma de cuadrados, GL = Grados de libertad, CM = Cuadrado medio, F = Estadístico de pruebas y p = Probabilidad observada.					

La tabla 16 se observa que la probabilidad es menor al 0.05 ($p = 0.031$) indicando que hay diferencias entre los métodos. Se procedió a aplicar la prueba de Varianzas protegidas (LSD de Fisher), contrastando la siguiente hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre ambos métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre ambos métodos.

Se obtuvo la tabla 17.

Tabla 17

PRUEBA LSD DE FISHES PARA LA DEFORMACIÓN POR MÉTODO			
	{CLASICA} - 18.77%	{DOBLE TINCION} 14.18%	{EXPERIMENTAL} - 5.26%
CLASICA		0.0086	0.22
DOBLE TINCION	0.0086		0.096
EXPERIMENTAL	0.22	0.096	

En la tabla 17 podemos observar que no hay diferencias en la deformación entre el método experimental y el método clásico (\bar{y} exp = - 5.26%; \bar{y} clásico = - 18.77%; $p = 0.22$). Tampoco hay diferencias entre el método experimental y el método de doble tinción (\bar{y} exp = - 5.26%; \bar{y} doble tinción = 14.15%; $p = 0.096$). Sin embargo, el método clásico y experimental disminuyó la deformación a diferencia del método de doble tinción que aumentó.

También se observa que el método de doble tinción es diferente al método clásico (\bar{y} doble tinción = 14.18%; \bar{y} clásico = - 18.77%; $p = 0.0086$).

6.2.1.1.9. Análisis de la deformación de la longitud de la base de la segunda aleta dorsal.

Se analizó la deformación de la longitud de la base de la segunda aleta dorsal, contrastando las siguientes hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre los métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre dos métodos.

Los resultados se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Medida de la deformación de la longitud de la base de la segunda aleta dorsal. Análisis de varianza unifactorial del factor método utilizando las deformaciones observadas.					
ANOVA PARA LA DEFORMACIÓN DE LA LONGITUD DE LA BASE DE LA SEGUNDA ALETA DORSAL					
	SC	GL	CM	F	p
"METODO"	3857.04	2	1928.52	4.47	0.014
Error	36698.42	85	431.75		

SC = Suma de cuadrados, GL = Grados de libertad, CM = Cuadrado medio, F = Estadístico de pruebas y p = Probabilidad observada.

La tabla 18 se observa que la probabilidad es menor al 0.05 ($p = 0.014$) indicando que hay diferencias entre los métodos. Se procedió a aplicar la

prueba de Varianzas protegidas (LSD de Fisher), contrastando las siguientes hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre ambos métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre ambos métodos.

Se obtuvo la tabla 19.

Tabla 19

PRUEBA LSD DE FISHER PARA LA DEFORMACIÓN POR MÉTODO			
	{CLASICA}	{DOBLE TINCION}	{EXPERIMENTAL}
	14.07%	15.35%	28.02%
CLASICA		0.83	0.0088
DOBLE TINCION	0.83		0.024
EXPERIMENTAL	0.0088	0.024	

En esta tabla 19 podemos observar que no hay diferencias en la deformación entre el método de doble tinción y el método clásico (\bar{y} doble tinción = 15.35%; \bar{y} clásico = 14.07%; $p = 0.83$), aumentando la deformación entre los tres métodos (\bar{y} clásico = 14.07%; \bar{y} doble tinción = 15.35%; \bar{y} experimental = 28.02%; $p = 0.0088$).

6.2.1.1.10 Análisis de la deformación de la longitud de la base de la aleta anal.

Se analizó la deformación de la longitud de la base de la aleta anal, contrastando las siguientes hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre los métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre dos métodos.

Los resultados se muestran en la tabla 20.

Tabla 20. Medida de la deformación de la longitud de la base de la aleta anal. Análisis de varianza unifactorial del factor método utilizando las deformaciones observadas.					
ANOVA PARA LA DEFORMACIÓN DE LA LONGITUD DE LA BASE DE LA ALETA DORSAL					
	SC	GL	CM	F	p
" METODO "	1481.23	2	740.61	4.37	0.016
Error	14413.68	85	169.57		

SC = Suma de cuadrados, GL = Grados de libertad, CM = Cuadrado medio, F = Estadístico de pruebas y p = Probabilidad observada.

En la tabla anterior, se observa que la probabilidad es menor al 0.05 ($p = 0.016$) indicando que hay diferencias entre los métodos. Se procedió a aplicar la prueba de Varianzas protegidas (LSD de Fisher), contrastando la siguiente hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre ambos métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre ambos métodos.

Se obtuvo la tabla 21.

Tabla 21

PRUEBA LSD DE FISHES PARA LA DEFORMACIÓN POR MÉTODO			
	{CLASICA}	{DOBLE TINCION}	{EXPERIMENTAL}
	7.14%	- 3.19%	- 0.018%
CLASICA		0.0059	0.0309
DOBLE TINCION	0.0059		0.36
EXPERIMENTAL	0.0309	0.36	

En esta tabla podemos observar que no hay diferencias en la deformación entre el método experimental y con doble tinción (\bar{y} exp = - 0.018%; \bar{y} doble tinción = - 3.19%; $p = 0.36$), con menor deformación.

Así mismo, se observa que el método clásico es diferente tanto al método de doble tinción como al experimental teniendo una menor deformación (\bar{y} clásico = 7.14%; \bar{y} doble tinción = - 3.19%; \bar{y} experimental = - 0.018%; $p = 0.0309$).

6.2.1.1.11 Análisis de la diferencia de masa.

Se analizó la deformación de peso, contrastando las siguientes hipótesis:

Ho: $p \geq 0.05$ = No hay diferencias entre los métodos.

Ha: $p < 0.05$ = Hay diferencias al menos entre dos métodos.

Los resultados se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Medida de la deformación en la masa. Análisis de varianza unifactorial del factor método utilizando las deformaciones observadas.					
ANOVA PARA LA DIFERENCIA DE MASA					
	SC	GL	CM	F	p
"METODO"	24707	2	12354	1.209	0.303
Error	868548	85	10218		

SC = Suma de cuadrados, GL = Grados de libertad, CM = Cuadrado medio, F = Estadístico de pruebas y p = Probabilidad observada.

En la tabla 22 se muestra que es mayor al 0.05 ($p = 0.303$) indicando que no hay diferencias en los métodos. En la tabla 23, indica que en los tres métodos aumenta de peso en porcentaje teniendo una mayor diferencia (\bar{y} clásico = 179.7%; \bar{y} doble tinción = 137.4%; \bar{y} experimental = 170.6%), por lo que no fue necesario aplicar la prueba de Varianza protegidas (LSD de Fisher).

Tabla 23

{CLASICA} $\bar{y} = 179.7$	{DOBLE TINCION} $\bar{y} = 137.4$	{EXPERIMENTAL} $\bar{y} = 170.6$
-----------------------------	-----------------------------------	----------------------------------

Esto se le puede atribuir a que los fluidos tisulares fueron sustituidos por glicerina, la cual posee una mayor densidad (Tabla 23).

6.2.2 Comparación entre los métodos a través del Análisis alométrico.

Se analizaron pendientes comparándolas entre sí de los datos morfométricas utilizando la Prueba “t” de Student, que comprende la pendiente α (coeficiente alométrico) teniendo como factor el método, utilizando el programa STATISTICA versión 8.0.

6.2.2.1 Comparación de la alometría entre predeformación y postdeformación del tratamiento.

6.2.2.1.1 Análisis alométrico previo al tratamiento.

En la tabla 24, muestra el resultado del análisis alométrico de la tinción clásica previa al tratamiento.

Medidas	Coefficiente de alometría “ α ”	Factor de Condición	Coefficiente de correlación	T observada	Comportamiento
A-B	0.97387213	0.8779	0.98517414	0.78558371	Isométrico
A-C	0.98129118	0.9798	0.99089404	0.71544366	Isométrico
A-D	1.38659343	0.0382	0.72578353	-1.49988922	Isométrico
A-E	0.95510005	0.1789	0.90061836	0.49673401	Isométrico
A-F	0.84193279	0.2604	0.94152	2.67489029	Isométrico
A-G	0.54971769	0.1311	0.58739438	3.03145858	Alométrico negativo
A-Hd1	1.65293168	0.0106	0.7586776	-2.34565879	Alométrico positivo
A-Hd2	1.43591675	0.0473	0.89164997	-3.04874054	Alométrico positivo
A-Ha	1.00325183	0.2069	0.88199963	-0.03093292	Isométrico
A-L	3.08861417	0.0054	0.96873516	-13.4637038	Alométrico positivo

Tabla 24

En la tabla 25, muestra el resultado del análisis alométrico de doble tinción previo al tratamiento.

Medidas	Coefficiente de alometría " α "	Factor de Condición	Coefficiente de correlación	T observada	Comportamiento
A-B	0.97387213	0.8779	0.98517414	0.78558371	Isométrico
A-C	0.98129118	0.9798	0.99089404	0.71544366	Isométrico
A-D	1.38659343	0.0382	0.72578353	-1.49988922	Isométrico
A-E	0.95510005	0.1789	0.90061836	0.49673401	Isométrico
A-F	0.84193279	0.2604	0.94152	2.67489029	Isométrico
A-G	0.54971769	0.1391	0.58739438	3.03145858	Alométrico negativo
A-Hd1	1.65293168	0.0106	0.7586776	-2.34565879	Alométrico positivo
A-Hd2	1.43591675	0.0473	0.89164997	-3.04874054	Alométrico positivo
A-Ha	1.00325183	0.2069	0.88199963	-0.03093292	Isométrico
A-L	3.08861417	0.0052	0.96873516	-13.4637038	Alométrico positivo

Tabla 25

En la tabla 26, muestra el resultado del análisis alométrico del grupo experimental previo al tratamiento.

Medidas	Coefficiente de alometría " α "	Factor de Condición	Coefficiente de correlación	T observada	Comportamiento
A-B	0.96416901	0.8899	0.99386413	1.97551725	Isométrico
A-C	0.88958335	1.1427	0.97437577	3.18103211	Alométrico negativo
A-D	1.17347833	0.0546	0.89807764	-1.78577334	Isométrico
A-E	0.87519687	0.1989	0.82238387	1.21945898	Isométrico
A-F	0.86228337	0.2492	0.91807376	2.18828471	Alométrico negativo
A-G	0.54481715	0.1317	0.57496149	3.47343194	Alométrico negativo
A-Hd1	2.31015156	0.0035	0.86460454	-5.77347344	Alométrico positivo
A-Hd2	1.0663373	0.0928	0.80028363	-0.49120621	Isométrico
A-Ha	0.98725397	0.2175	0.75215696	0.08717939	Isométrico
A-L	3.23130387	0.0041	0.97602394	-18.3185226	Alométrico positivo

Tabla 26

6.2.2.1.2 Análisis alométrico del postdeformación

En la tabla 27, muestra el resultado del análisis alométrico de la tinción clásica posterior a la deformación.

Medidas	Coefficiente de alometría " α "	Factor de Condición	Coefficiente de correlación	T observada	Comportamiento
A-B	0.91978115	0.9528	0.9608491	1.54220046	Isométrico
A-C	0.95273756	1.0388	0.96251967	0.89769831	Isométrico
A-D	0.80850251	0.0904	0.70097933	1.18706217	Isométrico
A-E	0.7348306	0.2557	0.7963533	2.42266888	Alométrico negativo

A-F	0.69099504	0.4097	0.83523451	3.46343239	Alométrico negativo
A-G	0.528223	0.1363	0.71027477	4.59522109	Alométrico negativo
A-Hd1	0.80474266	0.0367	0.39794487	0.53665697	Isométrico
A-Hd2	0.76016463	0.1778	0.69202053	1.54222422	Isométrico
A-Ha	0.65140511	0.4182	0.79013366	3.51757181	Alométrico negativo
A-L	1.39911667	0.2942	0.84943744	-2.34145436	Alométrico positivo

Tabla 27

En la tabla 28, muestra el resultado del análisis alométrico de doble tinción posterior a la deformación.

Medidas	Coefficiente de alometría	Factor de Condición	Coefficiente de correlación	T observada	Comportamiento
A-B	0.91978115	0.9528	0.9608491	1.54220046	Isométrico
A-C	0.95273756	1.0388	0.96251967	0.89769831	Isométrico
A-D	0.80850251	0.0904	0.70097933	1.18706217	Isométrico
A-E	0.7348306	0.2557	0.7963533	2.42266888	Alométrico negativo
A-F	0.60155686	0.4985	0.80475203	4.1149007	Alométrico negativo
A-G	0.59192574	0.1259	0.57453443	2.21763159	Alométrico negativo
A-Hd1	0.53085391	0.0832	0.22928075	0.9539743	Isométrico
A-Hd2	0.75660917	0.1970	0.75380829	1.69112378	Isométrico
A-Ha	0.6614326	0.3679	0.36233902	0.91189908	Isométrico
A-L	1.20476735	0.3481	0.84646702	-1.23824218	Alométrico positivo

Tabla 28

En la tabla 29, muestra el resultado del análisis alométrico del grupo experimental posterior a la deformación.

Medidas	Coefficiente de alometría " α "	Factor de Condición	Coefficiente de correlación	T observada	Comportamiento
A-B	0.97252189	0.9082	0.98932088	1.13458886	Isométrico
A-C	1.02917828	0.8537	0.35953985	-0.06462613	Isométrico
A-D	0.86795024	0.0786	0.71537147	0.92148891	Isométrico
A-E	0.93369352	0.1772	0.71565069	0.43047331	Isométrico
A-F	1.0491563	0.2244	0.93650257	-0.7402781	Isométrico
A-G	1.08547924	0.0569	0.57598394	-0.32825889	Isométrico
A-Hd1	1.80213233	0.0085	0.71287049	-2.67671924	Alométrico positivo
A-Hd2	0.88016782	0.1704	0.75270002	0.92086951	Isométrico
A-Ha	0.91760132	0.2568	0.9062108	1.1385906	Isométrico
A-L	1.34808322	0.2815	0.8546322	-2.51429741	Alométrico positivo

Tabla 29

6.2.2.1.3 Prueba de comparación de los coeficientes de alometría entre la predeformación y posdeformación.

Las pruebas de comparación del coeficiente de alometría, se llevó a cabo en base contrastando las siguientes hipótesis:

Ho: $p \leq 0.05 = \alpha$ pre = α post = No hay cambio de forma.

Ha: $p > 0.05 = \alpha$ pre \neq α post = Hay cambio de forma.

En la tabla 30, muestra los resultados de aplicar la prueba de “t” comparado con las pendientes del método de rojo de Alizarina, donde solo las medidas A-C y A-G no existió el cambio de forma. El resto de las medidas en donde hubo cambio de forma.

Método clásica			
Medidas	t	P	Conclusión
A-B	2.37505023	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-C	1.30442572	P ≥ 0.05	No hay cambio de forma
A-D	5.39744811	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-E	4.25738266	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-F	3.82939077	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-G	0.33637409	P ≥ 0.05	No hay cambio de forma
A-Hd1	5.06059414	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-Hd2	8.82546475	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-Ha	6.77102809	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-L	20.2137244	P < 0.05	Hay cambio de forma

Tabla 30

Calculando el porcentaje de relaciones alométricas con cambios de forma:

$$\% \text{ Cambio de forma} = \frac{\# \text{ de relaciones alométricas}}{\# \text{ total de relaciones alométricas}} \times 100$$

En la siguiente tabla (tabla 31) muestra los resultados de aplicar la prueba de “t” comparado con las pendientes del método de doble tinción, en donde las medidas presentaron un cambio de forma.

Método de doble tinción			
Medidas	t	P	Conclusión
A-B	9.87124231	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-C	-3.74287368	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-D	10.1107754	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-E	3.21476557	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-F	4.81129558	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-G	-2.16008922	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-Hd1	7.40020558	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-Hd2	2.42627633	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-Ha	3.05849295	P < 0.05	Hay cambio de forma
A-L	26.8087874	P < 0.05	Hay cambio de forma

Tabla 31

En la tabla 32, muestra los resultados de aplicar la prueba de “t” comparado con las pendientes del método experimental, del cual, las medidas A-C, A-E y A-Ha no hubo cambio de forma. Con respecto al resto de las medidas hubo cambio de forma.

Método del grupo experimental			
Medidas	t	P	Conclusión
A-B	-0.65529743	$P < 0.05$	Hay cambio de forma
A-C	-0.72554728	$P \geq 0.05$	No hay cambio de forma
A-D	4.18462315	$P < 0.05$	Hay cambio de forma
A-E	-0.74988056	$P \geq 0.05$	No hay cambio de forma
A-F	-4.86213136	$P < 0.05$	Hay cambio de forma
A-G	-4.38569172	$P < 0.05$	Hay cambio de forma
A-Hd1	3.20848901	$P < 0.05$	Hay cambio de forma
A-Hd2	2.36555615	$P < 0.05$	Hay cambio de forma
A-Ha	1.02463537	$P \geq 0.05$	No hay cambio de forma
A-L	24.2881125	$P < 0.05$	Hay cambio de forma

Tabla 32

7. Discusión:

Walker y Kimmer realizaron la fijación con paraformaldeídos por la cantidad de cloruro de magnesio para diferenciar la tinción del cartílago y el almacenamiento de los especímenes, afectando negativamente la tinción de los huesos por rojo de alizarina. No así en el presente trabajo, la tinción de rojo de alizarina y azul de alciano fijó las estructuras óseas y cartilaginosas respectivamente mediante el cloruro de magnesio.

Con respecto a la deformación total de las tres técnicas de transparentación; clásica, doble tinción y experimental, se observó que no hay diferencia en la deformación producida en las medidas de longitud furcal, longitud patrón, altura máxima, longitud cefálica y diámetro interocular, donde se redujo la medida y la deformación es negativa, solo en la longitud furcal y en la altura máxima el tamaño del tejido en porcentaje y la deformación aumentó en la longitud cefálica y masa corporal; en la longitud patrón en la clásica y experimental disminuyó el tamaño del tejido en porcentaje y la deformación, pero no así en la doble tinción del cual aumentó; y en el diámetro interocular la clásica y la doble tinción aumentó el tamaño de tejido en porcentaje y la deformación a diferencia del experimental que disminuyó.

7.1 Consideraciones.

En la actualidad, no existen estudios previos con respecto a la deformación generada por la técnica de transparentación en las diferentes fuentes consultadas y por tal motivo, no es posible comparar los resultados obtenidos debido a la escasez de información dentro de la presente discusión, proponiendo futuros trabajos sobre el tema para obtener la mejor forma de aplicar la técnica.

7.2 Caracteres cualitativos de los peces.

Richmond y Bennett usaron KOH al 10% hace que los tejidos se vuelvan demasiado blandos provocando que los apéndices se desprendan, aplicado en embriones y fetos humanos; y Baeza utilizó KOH al 4% obteniendo como resultado organismos con una gran fragilidad y flacidez al tacto, haciéndolos poco manipulables usando como modelo al *Chirostoma humboldtianum*, por lo que el grupo experimental al usar KOH al 4% en *Chirostoma jordani* se obtuvo el mismo resultado.

Por otro lado, las etiquetas lesionaron a los charales afectando solo en la altura mínima y debido a que se pesaron sin etiquetas durante la obtención de los datos morfométricos antes de ser transparentados, se obtuvo datos significativamente variados al pesarlos después de ser transparentados, tomando en cuenta que durante el procedimiento se deshidrataron.

7.3 Análisis de varianza unifactorial.

Con respecto a la deformación provocada por las tres técnicas estudiadas se encuentra:

a) Para las medidas de longitud furcal, longitud patrón, altura máxima, longitud cefálica, diámetro intraocular y masa corporal, todos los tratamientos provocan el mismo efecto exceptuando a la longitud cefálica y a la masa las deformaciones de las restantes medidas es mucho menor al 20%, dicho valor es aprobado ante los morfólogos con respecto a las técnicas de preservación (Gersenowies comunicación personal). Mientras que la deformación con la disminución de la longitud considerada, es probablemente por deshidratación provocada durante el proceso de digestión (Hangay y Dingley, 1985).

Sin embargo, en la longitud cefálica, se observa un incremento en las medidas mostrando una deformación positiva cercana al 20%, indicando que el método experimental al tener la menor deformación sería el más apropiado que los otros dos métodos conocidos, por lo tanto, se sugiere realizar más investigaciones en relación a esta longitud. La razón por el que hay un incremento es al tipo de unión en los huesos del dermocráneo del pez, ya que son principalmente sindesmosis, es decir, que los huesos están unidos por fibras de colágena las cuales son degradadas durante el proceso de digestión promoviendo la separación de los elementos (Hildebrand, 1991).

En cuanto a la masa el incremento es significativo y se le atribuye a la sustitución de agua por glicerina en el proceso de aclarado, considerando que la glicerina posee una mayor densidad (1.261 g/cm^3) a diferencia del agua tisular (1 g/cm^3), propiciando que la deformación sea mayor de lo esperado (126.1%) (Collieu y Powney, 1997). Es probable que exista una deformación en el volumen la cual no fue cuantificada. Sin embargo, es factible de estimar si consideramos la siguiente proporción:

$$\text{Deformación real} = \left(\frac{\text{Deformación observada}}{\text{Deformación esperada}} - 1 \right) \times 100$$

Corrección de la deformación del volumen a partir de las masas.		
Clásica	Doble Tinción	Experimental
42.5	9.0	35.3

Tabla 33

En la tabla 33 se observa un incremento en el volumen de todos los tratamientos entre el 9 % y 42.5%.

- b) Con las medidas de la longitud total, altura mínima, base de la primera aleta dorsal, base de la segunda aleta dorsal, base de la aleta anal, se observa que la deformación es distinta entre los tres métodos.

Directo con la longitud total se observa que la menor deformación se ubica en el método clásico, mientras que en los métodos de doble tinción y experimental muestran la misma deformación, revelando que todos son mucho menor al 20%, esto sugiere que los tres métodos son adecuados.

En cuanto a la altura mínima, la deformación observada en el método clásico es igual al de doble tinción, mientras que la máxima deformación del grupo tres (método experimental) es próxima al 20%, revelando que dicha medida es inapropiada.

Finalmente, para la base de la primera aleta dorsal se observó que la menor deformación se encuentra en el método experimental a diferencia del método clásico y de doble tinción que fue una deformación mayor, propiciando que dichas medidas son inadecuados. Por otro lado, la base de la segunda aleta dorsal se observan diferencias, mostrando una gran deformación, comprobando que es inadecuado para los tres métodos, en particular para el método experimental.

Pese a ser diferentes en cuanto a la deformación producida observamos que la deformación experimental es más cercana a la deformación que produce el método clásico, por lo que hay evidencia de una menor deformación.

Esto implica que:

- 1.- El método clásico produce cambio de forma en el 80% de las relaciones alométricas estudiadas.

2.- El método de doble tinción produce cambio de forma en el 100% de las relaciones alométricas estudiadas.

3.- El método propuesto produce cambio de forma en el 70% de las relaciones alométricas estudiadas.

Esto implica que el método propuesto es el que menor cambio de forma produce.

8. Conclusión:

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos afirmar que:

-  Los métodos de transparentación a vertebrados producen deformaciones en los especímenes estudiados.
-  Las medidas morfométricas que se pueden utilizar para un análisis morfométricos en peces son la longitud total, longitud furcal, longitud patrón, altura mínima, altura máxima, diámetro ocular y base de la aleta anal.
-  Las medidas morfométricas que no se pueden utilizar son la longitud cefálica, base de la primera aleta dorsal, base de la segunda aleta dorsal y la masa.
-  El método experimental fue el que presentó menor cambio de forma, propuesto en el presente trabajo.

9. Sugerencias:

Dado que el trabajo se realizó exclusivamente en el pez *Chirostoma jordani* es necesario:

- 1.- Replicarlo a un mayor número de especies de peces óseos.
- 2.- Replicarlo en especímenes de otras clases de vertebrados.

10. Bibliografía:

- Alvarez del Villar J. (1970). Peces mexicanos (claves). Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras. Comisión Nacional Consultiva de Pesca. 120-128 pp
- Baeza. A. M. E. (2008). Implementación y evaluación de la transparentación del charal (*Chirostoma humboldtianum*) con soluciones alcoholicas. Carrera de biología. UNAM. FES-Iztacala. México. 1, 3-4, 26 pp
- Barreto. M. S. y Maya. J. P. (2005). Morfometría comparada del aparato mandibular en especies de *Chirostoma* (Atheriniformes: Atherinopsidae) del lago de Pázcuaro, Michoacán, México. Hidrobiológica. UAM-Iztapalapa Distrito Federal. 161-168 pp
- Borrego V. A. (2001). Contribución al estudio osteológico de charal *Chirostoma humboldtianum*: (Osteoichthyes: Atherinidae). Carrera de Biología. FES-Iztacala. UNAM. 29 pp
- Collieu. A. M., y Powney. D. J. (1977). Propiedades mecánicas y térmicas de los materiales. Edit Reverté. Barcelona. 282 pp
- Concha. A. I. 2006. Diafanización. Global.anato.cl. Unidad de Anatomía Veterinaria Santiago. Universidad Santo Tomás, Chile. 2 pp
- Cortés. D. N., Pérez. T. J. and Hoyos. J. M. (2009). Staining procedure of cartilage and skeleton in adult bats and rodents. UNESIS. Bogotá. 1163 pp
- Dawson. A. B. (2011). A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red s. Biotech histochem. New York. 123 pp
- Depew. M. J. (2009). Analysis of skeletal ontogenesis through differential stainig of bone and cartilage. Edit 2. Methods in molecular biology, vol 461. 42 pp
- Dingerkus. G. and Uhler. L. D. (1977). Enzyme clearing of alcian blue statned, whole small vertebrates for demonstration of cartilage. Stain Technology. U.S.A. Vol. 52. No. 4. 229-232 pp
- Estrada. G. (1977). La alizarina en el estudio y clasificación de las escamas su utilidad en el estudio del sistema esquelético de peces, anfibios y aves. Depto, de Biología, Universidad de Antioquía, Medellín, Colombia. 80-81 pp

- Gavaia. P. J., Sarasquete. C and Cancela. M. L. (1999). Detection of mineralized structures in early stages of development of marine teleostei using a modified alcian blue-alizarin re double staining technique for bone and cartilage. *Biotechnic & histochemistry*. Vol 75. No. 2. Portugal. 79 pp
- Hangay G. and Dingley M. (1985). *Biological museum methods*. Academic Press. Vol 1. Australia. 326, 334-349, 360-363 pp
- Hildebrand. M. (1991). *Anatomía y embriología de los vertebrados*. Edit. Limusa. México. 546 pp
- Hollister G. (1934). Clearing and dyeing fish for bone study. *Zoologica*. Vol. 7 89-101 pp
- Instituto de Biología. (2006). "Chirostoma jordani Woolman, 1894 – IBUNAM: CNPE: PE 10501". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2006-03-16. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2011-6-6. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:CNPE:PE10501>
- Kardong, K. V. (1999). *Vertebrados: Anatomía comparada, función, evolución*. 2da edición. Ed. McGraw-Hill. Internamericana. México. 217-218 pp
- Martinez. P. C. A., Ríos-Durán. M. G., Campos. M. A., Toledo. C. M. y Ross. L. G. (2002). *Avances en el cultivo del pescado blanco de Pátzcuaro Chirostoma estor estor*. Instituto de Investigaciones Sobre los Recursos Naturales. Michoacán. México. .337 pp
- Martinez. P. C. A., Toledo. C. M., Racotta D. E., Ríos-Durán. Ma. G., Palacios. M. E., Fonseca. M. J., Campos. M. A y Ross. L. G. (2006). *Aspectos nutricionales del pescado blanco de Pátzcuaro (Chirsotoma estor estor Jordan, 1879)*. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Instituto de Recursos Naturales. Michoacán. 526 pp
- Maya P y Cortes M. T. (1995). Osteología de *Atherinella balsana* (Meek) (Pisces: Atherinidae). *El charal del río Balsas, México*. An. Esc. nac. Cienc. biol., Méx., 41: 65-106 pp
- Mayorga H. (1964). Método rápido para transparentar anfibios y colorear sus esqueletos. *Carib. J. Sci.* 4(1). 323-325 pp

- Miquelarena. A. M. y Arámburu. R. H. (1983). Osteología y lepidología de *Gymnocharacinus bergi* (pisces Characidae). *Limnobiós. La Plata. Vol. 2. Fasc. 7.* 491-512 pp
- Moreno, G. M. (2005). La contribución del Laboratorio de Arqueozoología del IPA para el desarrollo de la Arqueozoología en Portugal. Homenaje a Jesús Altura. Lisboa. 527 pp
- Nelson. J. S. (1994). *Fishes of the world. Ed. 3.* Edit John Wiley & Sons, Inc. New York. 19, 23, 34, 76, 83, 88, 124 252, 255, 258, 260-261 pp
- Park. E. H. and Kim. D. S. (1984). A procedure for staining cartilage and bone of whole vertebrate larvae while rendering all other tissues transparent. *Biotech histochem. Korea.* 269 pp
- Pérez. R. H. M. (2005). Discriminación morfológica, molecular y determinación de la variación genética de peces blancos (Atherinopsidae: *Chirostoma*). Maestría. UAM-Unidad Iztapalapa. México. 3 pp
- Puchtler. H., Meloan. S. N. and Terry. M. S. (1969). On the history and mechanism of Alizarin and Alizarin Red S stains for calcium. *The Journal of Histochemistry and Histochemistry.* Vol. 17. No. 3. U. S. A. 110-124 pp
- Richmond G. W. and Bennett L. 2011. Clearing and staining of embryos for demonstrating ossification. Instituto de biología. Stanford. 78 pp
- Ruíz C. A. J. (1993). Contribución al estudio osteológico de Elasmobranquios hipotremados del Golfo de México a través de la técnica de transparentación. Carrera de Biología. FES-Iztacala. UNAM. 1 pp
- Sanchez, F. G. (2001). Relaciones de similitud entre ocho especies de Pleuronectiformes mexicanos a partir del análisis del esqueleto postcraneal. Carrera de Biología. FES-Iztacala. UNAM. 1 y 11 pp
- Selby. P. B. (1987). A rapid method for preparing high quality alizarin stained skeletons of adult mice. *Biotech histochem.* Vol 62, No. 3. Tennessee. 143 pp
- StatSoft, Inc. (2008). STATISTICA (data analysis software system), version 8.0. www.statsoft.com.
- Walker, M. and Kimmel, C. (2008). A two-color acid-free cartilage and bone stain for zebrafish larvae. *Biotechnic & Histochemistry.* 82(1): 23-28 pp.

- Wassersug. R. J. (1976). A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates. *Biotech histochem.* Chicago. 132 pp
- Webb. G. N and Byrd. R. A. (1994). Simultaneous differential staining of cartilage and bone in rodent fetuses: an alcian blue and alizarin red s procedure without glacial acetic acid. *Biotechnic & histochemistry.* Vol. 69. No. 4. Indiana. 181 pp