



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala



Transparentación y Encapsulado en Resina Poliéster
de Especímenes de *Xenopus laevis* y *Dryophytes eximius*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

Alan Eduardo Rodriguez Grifaldo

DIRECTORA DE TESIS:

Biol. Dannya Shari Pérez Bautista

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2025.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICADA A:

Mi madre, Blanca Estela Grifaldo Guzmán, por darme la vida en más de un sentido.

Mi padre, Alfredo Rodríguez Muñoz, mi guía y mi maestro.

AGRADECIMIENTOS:

No soy una persona de muchas palabras, pero quiero agradecer brevemente a todos los que me han brindado su mano.

A mis profesores y asesora de tesis, quienes me orientaron y fortalecieron el amor que siento por esta carrera.

A mi familia, mi pareja y mis amigos, por reafirmar cada día una de mis creencias:

“La vida no es justa ni injusta; la vida simplemente es. Y para mí, la vida es la gente que me hace querer vivirla: quienes me enseñan a ser humano.”

ÍNDICE	PÁGINA
1. Resumen.....	6
2. Introducción	7
3. Antecedentes.....	11
4. Justificación	28
5. Hipótesis	29
6. Objetivo.....	30
7. Materiales y método.....	31
7.1 Ruta crítica	31
7.2 Obtención de los organismos	32
7.3 Sacrificio y fijación	33
7.4 Transparentación con doble tinción	33
7.5 Almacenamiento previo al encapsulado y deshidratación crítica	33
7.6 Encapsulado	34
7.7 Cuestionarios.....	38
8. Resultados y análisis de resultados	40
8.1 Resultados para <i>Xenopus laevis</i>	40
8.2 Análisis de costos	42

8.3 Resultados para <i>Dryophytes eximius</i>	44
8.4 Análisis de costos	46
8.5 Resultados de cuestionarios de opinión	48
8.6 Método propuesto para anfibios	51
9. Discusión.....	60
10. Conclusión	63
11. Referencias.....	64
Anexos	70
Anexo 1	70
Anexo 2	71

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

Figura 1: Diagrama de flujo del procedimiento general	32
Figura 2: Diagrama de flujo del proceso de Transparentación para ambos organismos	34
Figura 3: Diagrama de flujo del proceso de Encapsulado en anfibios.....	35
Figura 4: Esquema de la muestra encapsulada en resina cristal poliéster.....	36
Figura 5: Muestra de <i>Dryophytes eximius</i> terminada y etiquetada dentro de marco de madera ..	37
Figura 6: Muestra de <i>Xenopus laevis terminada</i> y etiquetada dentro de marco de madera.....	38
Figura 7: Muestra con daños en los tejidos de <i>Xenopus laevis</i>	40
Figura 8: Muestra con fracturas en el Encapsulado de <i>Xenopus laevis</i>	41
Figura 9: Muestra con calidad adecuada de <i>Xenopus laevis</i>	42
Figura 10: Muestra con daños en los tejidos de <i>Dryophytes eximius</i>	44
Figura 11: Muestra con fracturas en el Encapsulado de <i>Dryophytes eximius</i>	45
Figura 12: Muestra con calidad adecuada de <i>Dryophytes eximius</i>	46
Figura 13: Graficas de sectores circulares de las preguntas 1 a 5 del cuestionario tipo Linkert y sus respuestas	49
Figura 14: Graficas de sectores circulares de las preguntas 5 a 10 del cuestionario tipo Linkert y sus respuestas	50

Figura 15: Diagrama de flujo del nuevo método general propuesto para anfibios.....	52
Figura 16: <i>Xenopus laevis</i> sometida al nuevo tratamiento.....	53
Figura 17: <i>Xenopus laevis</i> sometida al nuevo tratamiento.....	54
Figura 18: <i>Dryophytes eximius</i> sometida al nuevo tratamiento	55
Figura 19: <i>Dryophytes eximius</i> sometida al nuevo tratamiento	56
Figura 20: Comparación entre las diferentes pruebas en <i>Xenopus laevis</i>	57
Figura 21: Comparación entre las diferentes pruebas en <i>Dryophytes eximius</i>	58

1. Resumen

En el presente trabajo se aplicó la técnica de transparentación con doble tinción seguida de la técnica de encapsulado en resina poliéster para ser empleadas en anfibios; El propósito de este trabajo fue evaluar la viabilidad, calidad y costos de este proceso en organismos de esta clase.

El procedimiento experimental fue desarrollado a partir del trabajo de Pérez (2019) “Estandarización del encapsulado con resina poliéster de especímenes transparentados de vertebrados”.

Se aplicaron ambas técnicas en dos grupos experimentales de anfibios, cada uno perteneciente a las especies *Xenopus laevis* con 20 individuos y *Dryophites eximius* con 19 individuos, las muestras obtenidas fueron evaluadas a través de encuestas enfocadas en la calidad, el uso como material didáctico y su importancia en el ámbito científico, estas encuestas fueron aplicadas a la comunidad de estudiantes de CCH Vallejo. Para finalizar se calculó el presupuesto con base al costo de los materiales y las horas de trabajo invertidas.

Los resultados mostraron ventajas como la observación directa de la posición de las estructuras óseas, la anatomía natural que mantienen los organismos al ser encapsulados, la preservación a largo plazo, el fácil almacenamiento y transporte, así como ser un método efectivo para evitar la contaminación de muestras por agentes biológicos, sin embargo, también reveló desventajas como los largos periodos de tiempo para obtener una muestra finalizada, la nula manipulación del organismo una vez encapsulado manteniendo una sola posición anatómica permanente.

Finalmente se concluyó que este nuevo procedimiento logra cumplir con los propósitos de esta investigación, demostrando ser un método asequible para un estudiante universitario, de calidad, de utilidad como material educativo y con valor científico.

2. Introducción

Romero y colaboradores (2021) definen a la transparentación como una técnica de conservación anatómica en la que se digieren los tejidos blandos y son sustituidos por un medio para equilibrar el índice de refracción de la luz dentro de un organismo y fuera de este, siendo acompañado de una tinción diferencial para visualizar los componentes esqueléticos y cartilagosos que constituyen al organismo.

Por su parte la Real Academia Española (RAE, 2023) define la palabra ‘diáfano’ como un cuerpo que deja pasar la luz a través de sí mismo casi en su totalidad o también como “algo claro o cristalino”. Romero y González (2019) hacen uso de la palabra ‘diafanización’ como sinónimo de transparentación o aclaramiento, sin embargo, algunos utilizan el término “transparentación” solo para la etapa de aclaramiento dentro de la técnica de diafanización.

Sandoval y colaboradores (2016) menciona que la técnica de diafanización se basa en cuatro etapas fundamentales: 1) la fijación en donde el organismo es conservado en formol o alcohol para impedir la degradación post mortem mediante la formación de enlaces cruzados entre las proteínas y la inactivación de enzimas manteniendo la cito morfología de las células; 2) La transparentación con la cual se aclaran los tejidos blandos por medio de enzimas o alguna solución alcalina altamente corrosiva conformada por algún hidróxido que deshidrata los tejidos mediante una reacción de óxido-reducción; 3) La tinción de los tejidos mineralizados que quedaron expuestos a colorantes con alta afinidad hacia estos, por lo general Rojo de alizarina para tejido óseo y Azul de alciano (etanol y ácido acético glacial) para tejido cartilagosos; y 4) La conservación de la muestra transparentada con los tejidos mineralizados teñidos en una solución de glicerina y alcohol.

Esta técnica ha sido empleada con éxito para teñir los huesos y cartílagos en diferentes grupos de vertebrados, así como en diferentes estados de desarrollo, entre ellos diversos especímenes de anfibios (Williams, 1941). Algunos de los diversos usos de la técnica de transparentación pueden ir desde el material para museos e instituciones educativas hasta estudios de daño teratogénicos como fue el caso de Whitaker y Dix (1979) quienes utilizaron la doble tinción en esqueletos de fetos de rata para observar malformaciones durante el desarrollo embrionario.

La técnica de diafanización ha sufrido diferentes modificaciones a través de los años para su uso en diferentes organismos y en la pigmentación de una o más estructuras óseas dependiendo de su origen, Dawson (1926) utilizó exclusivamente Rojo de alizarina para estructuras óseas, mientras que Williams (1941) combinó Rojo de alizarina para estructuras óseas y Azul de toluidina para el cartílago generando una doble tinción. De este modo la técnica varía en el procedimiento y en el uso de agentes químicos, como la adición de la digestión de tejidos o la inclusión del salicilato de metilo para el aclarado de los tejidos, mostrado ventajas y desventajas dependiendo de la finalidad de uso de la muestra. Algunas de las diferencias mostradas al inicio del desarrollo de esta técnica han sido, por ejemplo, el tipo de fijador y uso, como Dawson (1926) y Lipman (1935) que hicieron uso de alcohol al 95% o Gray (1929) que empleo yodo-alcohol seguido de alcohol absoluto, mientras que Williams (1941) posteriormente utilizó formalina al 10%, solo por mencionar algunas modificaciones de la técnica que generaron mejoras y diferencias en los resultados de la misma.

Para la tinción es necesario el uso de colorantes afines a las estructuras que se contempla observar una vez finalizada la transparentación. La Alizarina es uno de estos colorantes que se puede obtener de manera natural en las raíces de la planta *Rubia peregrina*, Hollister (1934)

menciona que la Alizarina es un colorante ácido que es soluble en agua y alcohol, este pertenece a las oxiquinonas que son un grupo de colorantes biológicos vitales para la tinción de huesos. Mientras que Romero y González (2019) señalan la afinidad de la alizarina por el calcio, la cual se da mediante un proceso de quelación en donde las moléculas de oxígeno de los grupos quinona y fenol de la Alizarina se comportan como dadores de electrones, estableciendo así dos anillos estables con el calcio.

En los huesos las sales de calcio absorben a la Alizarina según la cantidad presente en estos, por lo que en estructuras como los otolitos que contienen un bajo nivel de fosfato de calcio (principal constituyente de los huesos) la Alizarina no genera ninguna afinidad o reacción (Hollister, 1934).

Por ello para la tinción de estructuras con una menor presencia de calcio como lo son las estructuras cartilaginosas se utiliza Azul de alciano. El Azul de alciano es un colorante catiónico sintético derivado de la Ftalocianina caracterizado por poseer hasta 4 grupos tetrametil isotiuronio, estos grupos son los responsables de las cargas positivas del colorante que determinan la elevada afinidad por las moléculas polianiónicas como los glucosaminoglicanos sulfatados y carboxilados presentes en la matriz del tejido cartilaginoso (Scott, 1964, como se citó en Piovesana *et al.*, 2014). De esta manera se logra complementar la tinción de huesos y cartílagos para una muestra completa.

En cuanto al encapsulado, se emplearon resinas que no fueron desarrolladas específicamente para la conservación de material biológico, las cuales, sin embargo, se han empleado en el área de la taxidermia. Científicos como Kampmeier y Haviland (1948) vieron en la resina una manera práctica y eficiente de conservar materiales biológicos y reemplazar los frascos de vidrio como método de conserva.

La técnica de encapsulado ha sido probada desde el siglo pasado en diferentes organismos desde el montaje de grandes secciones de un cadáver humano (Kampmeier y Haviland, 1948) hasta la incrustación de insectos (Hocking, 1953).

A pesar de lo antes mencionado, tanto la técnica de transparentación con una o dos tinciones como la técnica de encapsulado han sido estudiadas mayormente de manera individual en diferentes organismos y estructuras. El estudio y uso de ambas técnicas en conjunto es escaso ya que representan un gasto elevado de dinero y tiempo debido a la adquisición de los agentes químicos, el material biológico y el equipo especializado para estos procesos como lo son las cámaras de vacío, los microtomos, las cámaras de luz UV, los tardados procesos de pulimento y el tiempo que implica la aplicación de ambas técnicas en una misma muestra.

3. Antecedentes

Grabe y Liebeman (1868) produjeron por primera vez alizarina de manera sintética. Actualmente se utiliza ampliamente en su forma de sal soluble, Rojo de alizarina S, Alizarina mono sulfato de sodio y Mono sulfato de alizarina (como se citó en Hollister, 1934).

Rohm (1901) considerado el padre de los plásticos realizó investigaciones fundamentales sobre la síntesis y polimerización de derivados del ácido acrílico, años después fundó la Rohm and Haas Company de Filadelfia quien en 1931 introdujo y produjo industrialmente el metacrilato de metilo (MMA) llamado comercialmente como “plexiglás”. El MMA se utilizó durante la Segunda Guerra Mundial para los periscopios de los submarinos, parabrisas de autos militares y en torretas de aviones. Actualmente es un material ampliamente empleado en distintas industrias e incluso en áreas como la ciencia médica en donde se fabrican prótesis y dispositivos aplicados a la nanotecnología (como se citó en Parra *et al.*, 2018).

Mall (1906) fue el primero en estudiar los centros de osificación sin realizar una disección directa, ya que el consideraba que esto dañaba e incluso arruinaba las muestras por su naturaleza delicada generando conclusiones erróneas. Buscaba estudiar el tiempo de aparición de los diferentes centros y estructuras óseas en embriones humanos, para esto sustituyó los métodos tradicionales como disecciones o rayos X por el método de transparentación de Schultze bajando la concentración de KOH en el proceso de digestión a 1% y sustituyendo la formalina por potasa para evitar la descalcificación y acelerar el proceso de aclaramiento; Finalmente conservo las muestras en glicerina. Intento teñir los huesos con carmín y hematoxilina sin embargo no obtuvo resultados satisfactorios.

Dawson (1926) utilizó un método de tinción selectivo para la tinción de huesos de ratas con Rojo de alizarina S. Para esto fijó a los organismos en alcohol al 95% durante 48 a 96 horas,

después colocó sus muestras en una disolución de KOH al 1% hasta que los huesos fueran visibles a través del tejido, posteriormente transfirió sus muestras a una disolución de alizarina diluida en KOH en una proporción de 1:10000 de KOH al 1%. Después de obtener la tonalidad deseada las muestras se limpiaron con solución de Mall la cual consiste en de agua destilada, glicerina, hidróxido de potasio (KOH) y agua oxigenada (H₂O₂). Dawson fue el primero en eliminar el método tradicional de sumergir a todo el organismo en una solución de Alizarina S en donde mediante una serie de decoloraciones se comprometía al organismo a la exposición solar y al uso de ácido sulfúrico que podrían dañar los centros de osificación. Dawson tiñó solo los huesos y no los tejidos que lo rodeaban, por lo que su método de tinción descrito fue progresivo y selectivo.

Hollister (1934) modificó el método de aclaramiento y tinción para la preparación rápida de 3000 peces del mar de las Bermudas. Algunas de las modificaciones fueron la inclusión de luz ultravioleta como método rápido para aclarar y limpiar los tejidos, el uso de alcohol al 70 % en sustitución del formol para fijar a los organismos (esto debido al efecto descalcificante del formol sobre los tejidos óseos) y la implementación de Alizarina diluida en ácido acético como colorante para la tinción de las estructuras óseas. También realizó anotaciones y recomendaciones importantes como evitar las bajas temperaturas para mejores resultados en la adición y permanencia del tinte, el no usar agua de grifo o no destilada para la dilución del tinte ya que generaba soluciones opacas o floculantes, el uso de Alizarina en una solución de hidróxido de potasio (KOH) con un alto porcentaje de glicerina en los huesos de especímenes delicados para obtener una mejor tinción y recomendó usar disoluciones débiles de KOH del 1% al 4% en organismos cuyos tejidos fueran delgados o débiles para evitar daños en las muestras.

Williams (1941) modificó el método de Dawson (1926) para realizar una doble tinción incorporando Azul de toluidina para la diferenciación del cartílago. Su método consistió en

eviscerar y fijar las muestras en formalina al 10%, luego las tiñó por una semana en una solución de Azul de toluidina y alcohol al 70%. Posteriormente incorporo un proceso de digestión en una solución de KOH al 2% y después realizo un contrateñido en una solución al 0.001 % de Rojo de alizarina S al 2% con KOH acuoso al 2% durante 24 horas. Finalmente deshidrató en cellosolve y realizó el aclarado en salicilato de metilo. Williams fue pionero en la aplicación de la doble tinción en anfibios (Urodelos) y otros organismos, además de sustituir el alcohol como fijador por la formalina, reduciendo el riesgo de daño por digestión en los tejidos blandos.

Kampmeier y Haviland (1948) fueron de los primeros investigadores que se plantearon el sustituir los frascos con formalina como método de conservación de muestras anatómicas y en su lugar usar encapsulados en polímeros, para ello embalsamaron secciones grandes de un cadáver adulto en formalina entre el 10 y 20%, las cortaron con una sierra hasta el grosor deseado y drenaron el exceso de líquido ejerciendo una presión ligera. Para la tinción utilizaron diferentes colorantes como carmín de bórax y carmín de alumbre hasta lograr la coloración adecuada de acuerdo a la estructura. Durante el encapsulado vertieron el monómero Castolite en moldes con las estructuras a polimerizar y colocaron las muestras en un horno de parafina entre los 50 y 60 °C, terminaron de cubrir la muestra con el monómero precalentado y catalizado, para solidificar las muestras se mantuvieron en un horno de parafina durante una noche a una temperatura de entre 40 y 45°C, finalmente se desmonto del molde y procedieron a pulir para dar un acabado cristalino. Ellos realizaron uno de los primeros trabajos de encapsulado de muestras anatómicas y sentaron las bases para el uso de estos resistentes polímeros como método de conservación de diferentes muestras biológicas, sin embargo, al ser de los primeros también tuvieron errores como lo fue las manchas de líquidos y colorantes liberadas por las muestras durante el encapsulamiento.

Kampmeier y Hospodar (1951) realizaron cortes de cerebro de perro y humano en el cual modificaron la técnica de encapsulado de Kampmeier y Haviland (1948) embalsamando las muestras con formalina y solución salina por perfusión, mejorando los resultados al disminuir la presencia de manchas en el encapsulado; A pesar de ello las sustancias utilizadas para el embalsamamiento afectaban a la mielina contenida en el cerebro generando decoloraciones en la tinción de la materia blanca y gris del cerebro, otro de los inconvenientes fue la difusión de pigmentos sanguíneos en la resina provocando la presencia de manchas; Por esto los autores recomendaron un secado extremo antes del encapsulamiento. Los autores también encontraron accidentalmente y sin poder explicarlo que al sumergir rebanadas de cerebro en jarabe de maíz se mantenía el contraste de los tintes, por lo que sustituyeron el jarabe de maíz por una solución saturada de azúcar en agua tibia para evitar las decoloraciones durante el encapsulado.

Kerns (1953) señaló las dificultades presentadas en los trabajos anteriores de Kampmeier (1948 y 1951) en donde la humedad o agua retenida en las muestras producía manchas o burbujas que perjudicaban la claridad de las muestras. Por esto se enfocó en el problema de retener suficiente agua en la muestra para preservar su apariencia natural, mientras que al mismo tiempo en deshidratar lo suficiente para evitar el enturbiamiento de la superficie. El problema lo resolvió con una deshidratación parcial de toda la muestra en glicerina al 50% y una deshidratación completa de la capa superficial con acetona. También implementó el uso de luz ultravioleta para reducir el tiempo de polimerización del plástico evitando manchones por una polimerización prolongada. La combinación de estos dos nuevos factores generó resultados favorables mejorando visualmente la técnica de encapsulamiento.

Hocking (1953) Utilizó un método de encapsulamiento en insectos desarrollado en la Universidad de Alberta. Para estos encapsulamientos se utilizaron metacrilatos de metilo y etilo,

mientras que el único material especializado que se utilizó fue una bomba de vacío y cristalería de marca Pyrex. En este método se sumergieron directamente a los organismos en las resinas sin catalizar y se sometieron al vacío, después de esto se les drenó la resina excedente y se repitió el proceso al menos 4 veces hasta que adquirieran una consistencia gelatinosa, finalmente se encapsularon en resina catalizada y se pulieron para mejorar la transparencia. Este método demostró ser eficiente para insectos sin embargo requiere de equipo especializado.

Deonarine y colaboradores (1972) lograron realizar la fijación y encapsulado en óptimas condiciones del cerebro mediante la perfusión de las arterias carótidas previo a la extirpación de este órgano, para esto los animales fueron heparinizados a través de las arterias carótidas con una solución salina y formalina antes de su sacrificio por desangramiento. Una vez sacrificados se extrajo el cerebro y se rebano para sumergirse en tres soluciones; La primera compuesta de 45 g. de fenol cristalino, 5 g de sulfato de cobre y 1,25 ml de ácido clorhídrico concentrado en 1000 ml de agua destilada, la segunda de 10 g de cloruro férrico en 1000 ml de agua destilada y la tercera de 10 g de ferrocianuro de potasio en 1000 ml de agua destilada. Para la tinción se utilizó Azul de Berlín para la materia gris y para su deshidratación los cortes de cerebro se sometieron a un tren de alcohol ascendente. Finalmente, los cortes se encapsularon en moldes bioplástico catalizado. Los autores aportaron mejoras en la técnica de encapsulamiento al deshidratar de las muestras mediante un tren de alcohol y mantuvieron la anatomía del cerebro mediante su técnica de perfusión previa a la extirpación. También notaron defectos en el uso del catalizador del bioplástico, ya que mencionaron que al usar poca cantidad este quedaba blando y si se usaba demasiado se quebrantaba o calentaba en exceso. Sus resultados fueron excepcionales mostrando muy pocas manchas en la muestra y una casi nula degradación del colorante.

Grimsrud y Dugstad (1975) sustituyeron el uso de resina poliéster o bioplástico por resina epoxi. En su método fijaron cerebros en formaldehído por 3 semanas, después lo cortaron en rebanadas y colocaron en moldes prefabricados de poliestireno y finalmente lo cubrieron con resina epoxi catalizada (3 partes de resina y 1 de catalizador). Su técnica proponía un proceso sencillo sin embargo los resultados que obtenidos no fueron óptimos con respecto al de sus antecesores, esto debido a la formación de manchas o neblina, de esta manera los autores destacaron la importancia de una deshidratación previa de las muestras a encapsular, a pesar de ello comprobaron la funcionalidad de la resina epoxi como medio encapsulante de muestras anatómicas.

Martinez y Astruc (1975) describieron un método simple y económico para observar las estructuras anatómicas del cerebro a través de un encapsulado en resina poliéster. Las secciones de cerebro fueron sumergidas en una solución de glicerina al 30% y formalina al 10% por un día, posteriormente se colocaron en una solución de glicerina al 50% y formalina al 10%, los ejemplares permanecieron en esta solución hasta saturarse y hundirse en la disolución. Para el proceso de encapsulado los autores prefabricaron moldes con las caras inferior y superior hechas de plexiglás ya que esto eliminaba el proceso de pulido final. Las muestras se polimerizaron en una mezcla de resina poliéster (1oz.) con 6 gotas de catalizador (peróxido de metil-etil cetona) a 21 °C, una vez endurecidas solo se retiraron del molde ahorrando tiempo y dinero al evitar el pulido.

Larsson (1975) se encargó de probar un método de incrustación de órganos, tejidos y patógenos animales en el monómero metil metacrilato llamado comercialmente como Plexit. El método propuesto por el autor consiste en cuatro pasos fundamentales: fijación, deshidratación, inclusión en plástico y tratamiento final. La fijación consistió en colocar las muestras en formalina,

sin embargo, Larsson noto una pérdida de color en los tejidos por lo que posterior a su fijación las muestras fueron colocadas en solución de Romhanyi para recuperar su coloración natural, esta solución se encuentra conformada por Formaldehido al 37% diluido en agua destilada con nicotina y ditionito de sodio. Para la deshidratación las muestras se enjuagaron y se colocaron en una solución de acetato de potasio, glicerol y agua destilada durante 3 semanas. Para la inclusión en plástico, se prepararon moldes de vidrio a los que previamente se les coloco películas de celofán para asegurar el correcto desprendimiento o desmolde de la muestra, después se colocó la muestra junto con el monómero Plexit que debió ser catalizado y sometido a luz ultravioleta para su polimerización. El autor notó las altas temperaturas (30°C) alcanzadas por el monómero durante el proceso de polimerización, por lo que optó por enfriar mediante un congelador a -5°C durante este proceso ya que de no ser así estas temperaturas podrían causar daños como la decoloración de la muestra y daños en los tejidos. Finalmente, su método concluye con el pulido de la muestra para una apariencia cristalina similar al vidrio.

Whitaker y Dix (1979) utilizaron la técnica de doble tinción para teñir esqueletos de fetos de rata en exámenes teratológicos, sin embargo ellos sustituyeron al alcohol bencílico como el agente de aclarado por el uso de alcohol etílico al 70% y glicerol puro, esto reducía el tiempo de aclarado y evitaba los vapores producidos por el alcohol bencílico los cuales eran desagradables, también aumentaron la concentración de hidróxido de potasio del 1% al 2% durante la digestión de tejidos y terminaron por almacenar el glicerol puro obteniendo buenos resultados.

Mawhinney y Ellis (1983) se propuso estudiar la eficiencia del método de encapsulamiento de huesos para el diagnóstico y estudio de las enfermedades relacionadas con el metabolismo de hueso, para esto su trabajo se basó en la distinción entre el hueso mineralizado y el hueso osteoide mediante segmentos de estos. Mawhinney fijo secciones delgadas de hueso en formalina al 10 %,

las deshidrato en varios cambios de cellosolve hasta que las sales fueron removidas y posteriormente las infiltró en un tren ascendente con proporciones de 75%/25%, 50%/50%, 25%/75%, 100% de cellosolve y resina respectivamente. Durante el encapsulado las muestras se incrustaron en resina (Polymaster 1209AC7) con catalizador (Butanox 50) mediante una cámara de vacío. Las muestras terminaron de polimerizar en un horno a 58°C por 48 horas y una vez terminado el proceso las muestras se seccionaron con un microtomo hasta un espesor máximo de hasta 5mm para su observación. Mawhinney fue de los primeros en incorporar el método de encapsulado en secciones de hueso para estudios comparativos y de diagnóstico, también en utilizar infiltraciones de resina para mejorar la calidad de la muestra antes de su incrustación en resina.

Chappard y colaboradores (1983) realizaron un análisis cuantitativo en la biopsia del hueso ilíaco para comprender los trastornos metabólicos esqueléticos. Desarrollaron un método de copolimerización con el uso de las resinas metacrilato de glicol (MMA) y metacrilato de glicol (GMA) un plástico miscible en agua, esto con el fin de probar el encapsulamiento de grandes biopsias de huesos no descalcificados a baja temperatura. Para este estudio utilizaron 183 núcleos de hueso transilíaco de pacientes con diversas enfermedades óseas metabólicas. Estas muestras se fijaron en formalina amortiguada por 5 horas, luego se deshidrataron en 3 cambios de acetona absoluta a 4°C por 36 horas. Posteriormente las muestras se sometieron a infiltraciones en el medio de encapsulado que consistió en una mezcla de GMA y MMA puras junto con catalizador (peróxido de benzoilo), este proceso consistió en sumergir las muestra en el medio de encapsulado a -20°C para luego ser colocadas en una desecadora al vacío por 10 minutos y después mantenerse en una temperatura de -20°C, las infiltraciones se repitieron por 3 días antes de pasar al encapsulado en donde se dejaron polimerizar a una temperatura de 4°C mediante un baño de agua.

Las muestras se cortaron en secciones de 15 μM de espesor mediante un microtomo y se tiñeron mediante las técnicas Von Kossa o Goldner con colorante de cianina de solocromo haciendo flotar las secciones en las soluciones de tinte; Finalmente las secciones se transfirieron a metil ciclohexano para almacenarse. Los autores observaron que los monómeros libres de agua producían muestras de mejor calidad y destacaron la importancia de las infiltraciones previas al encapsulado en donde deben penetrar profundamente en las biopsias para mejores resultados, también mencionaron que las bajas temperaturas reducen el tiempo de catalización durante la polimerización por lo que debe elevarse por lo menos a 4°C para que la catalización continúe de forma correcta, otra forma que mencionan para obtener polimerizaciones a baja temperatura es el uso de luz UV pero se descubrió que la irradiación UV inducía anomalías en tinción de ADN y ARN. Uno de los puntos más importantes a destacar dentro de sus resultados fue el oxígeno como fuerte inhibidor de la polimerización, recomendando que se evite exponer o tener contacto al aire de las muestras.

Bloot y colaboradores (1984) utilizaron el método de tinción con acetilcolinesterasa (AChE) para teñir el sistema nervioso periférico total en fetos de rata. Los fetos de entre 14 y 16 días de gestación se sumergieron en solución salina para favorecer el desangramiento, posteriormente para favorecer la penetración del tinte en los fetos se tuvieron que cortar en plano sagital, ambas mitades se sumergieron en AChE y se deshidrataron en por medio de trenes de glicerina hasta conservarse en glicerina pura, las muestras se transfirieron a alcohol al 100%, y luego en diclorometano hasta que los tejidos fueron completamente penetrados. Para el encapsulamiento las muestras se impregnaron con resina epoxi previo a su encapsulamiento en donde las muestras se polimerizaron en moldes a 20°C hasta su endurecimiento, el material final fue pulido y utilizado como material didáctico que facilitó a los estudiantes la comprensión del

órgano de manera tridimensional. Fueron los primero en utilizar AChE como colorante en un sistema complejo y que este fuera teñido en su totalidad mediante una disección en un plano sagital.

Boardman y colaboradores (1984) trabajaron con fetos de rata para la tinción de su cartílago. Los fetos se fijaron en alcohol y se desollaron previo a su tinción cuando aún se encontraban frescos, Boardman y sus colaboradores evitaron el uso de Azul de alciano para la tinción del cartílago debido a la baja flexibilidad que muestran los especímenes por lo que optaron por sumergir las muestras en Rojo de alizarina para después someterlas a una solución de ácido acético al 3% durante un periodo de 4 a 13 días. Las muestras se transfirieron a tren ascendente de glicerina diluida hasta llegar a la glicerina pura en donde se mantuvieron por 2 semanas. Los resultados arrojaron que la mayoría de los fetos mostraron tonalidades rojizas para estructuras óseas y purpuras en las estructuras más cartilaginosas; Por lo que Boardman y sus colaboradores fueron los primeros en utilizar un solo tinte con degradación en acido para realizar una tinción diferencial del esqueleto y cartílago en fetos de rata.

Chappard y colaboradores (1986) utilizaron fetos humanos obtenidos de abortos espontáneos para estudiar su tinción y encapsulamiento en resina poliéster. Los fetos se fijaron en formalina al 10%, se desollaron y evisceraron para digerirse en KOH acuoso al 5%, después a esta solución se le agrego Rojo de alizarina S y cuando las muestras finalmente se mostraron blandas y transparentes se retiraron y enjuagaron durante dos días. Posterior a esto se realizó una deshidratación crítica en acetona pura para un mejor encapsulado las muestras se sumergieron en resina con acetona en proporción de 3:1 respectivamente. Las muestras se conservaron en infiltración a temperaturas de 4°C para evitar la auto polimerización y una vez obtenida la calidad deseada se colocaron en resina pura para después ser encapsuladas en moldes. En los resultados

los fetos humanos presentaron tonos violetas en los huesos debido a la adición del tinte durante la digestión, el encapsulado fue exitoso y se logró simplificar la técnica, sin embargo, los autores recomendaron realizar el encapsulado en temperaturas de 20 °C o inferiores, ya que capas gruesas de monómero podrían presentar fracturas o quebraduras debido a la reacción exotérmica de la polimerización, por lo que recomiendan reducir las temperaturas por medio de la refrigeración cuando las capas de monómero son excesivamente gruesas.

Lataster y Drukker (1986) trabajaron con embriones de pollo de diferentes estadios de desarrollo para encapsularlos en resina y utilizarlos como material de didáctico, la resina con la que experimentaron fue 2-hydroxy-ethylmetacrylato o Technovit 7100 como se le conoce comercialmente. Durante la experimentación los embriones se sometieron a una solución salina de NaCl al 0.9 % para la remoción de albumina y otras membranas presentes, todos los estadios se fijaron en líquido de fijación Bodian durante 24 horas para después pasar a la etapa de deshidratación por un tren de alcohol ascendente hasta llegar al alcohol absoluto. Cuando las muestras se encontraron deshidratadas se procedió a encapsular con Technovit 7100 catalizado en moldes prefabricados, la duración del proceso de polimerización tomo un total de una hora. Debido a la fragilidad del Technovit fue necesario volver a encapsular en una segunda inmersión en el polímero Polypol PS 230, al finalizar la polimerización se retiraron las imperfecciones mediante pulido. Los autores resaltaron la importancia de utilizar Technovit como medio encapsulador debido a sus bajas temperaturas de polimerización que van de los 35 a los 38 °C, ya que otras que resinas como la poliéster suelen ser más agresivas durante la polimerización llegando a alcanzar los 85°C, por esto los autores recomiendan usar este tipo de resinas para organismos de baja vulnerabilidad o que se encuentren en estadios de desarrollo mayores en donde sus tejidos puedan soportar el proceso de polimerización. Lataster and Drukker fueron los primeros en utilizar

Technovit como medio de encapsulamiento, así como de introducir el doble encapsulado de una sola muestra en dos polímeros diferentes.

Trueman y colaboradores (1998) estudiaron el efecto tóxico de químicos y fármacos que pudiesen comprometer el desarrollo del esqueleto en fetos de rata y conejo. Para esto propusieron una técnica automatizada de transparentación y doble tinción mediante el uso de un “Shandon Pathcentre”, que es un procesador cerrado que permitió el uso de químicos volátiles como el ácido acético glacial y las diferentes soluciones, mecanizando y facilitando el proceso. El procedimiento comenzó con la preparación de los fetos mediante desollado y evisceración, posteriormente los fetos fueron fijados en alcohol al 70% por 18 horas, y colocados en cestas para ser procesados dentro del “Shandon Pathcentre” con una solución Azul de alciano, alcohol industrial metilado, ácido acético glacial, Rojo de alizarina en hidróxido de potasio, glicerol en hidróxido de potasio y glicerol. Los resultados mostraron estructuras con una buena tinción y rasgos detallados, pudiendo demostrar los efectos negativos de algunos fármacos sobre el desarrollo de los esqueletos fetales como la fusión de las apófisis espinosas adyacentes en algunos fetos de rata. Trueman y Jackson fueron los primeros en sistematizar y mecanizar el proceso de transparentación y doble tinción por medio de un procesador cerrado.

Peker y colaboradores (2003) busco conservar la distribución del patrón nervioso en músculos mediante un proceso de transparentación, tinción y encapsulado, su método busco eliminar las imperfecciones como manchas o palidez de las muestras al ser almacenadas en glicerol, así como generar el rastreo exacto de las fibras nerviosas desde las ramas extra musculares a las intramusculares y a las ramas terminales, para esto uso la técnica de tinción de Sihler la cual consiste en debilitar todo el órgano en hidróxido de potasio, descalcificar en ácido acético, teñir en hematoxilina de Ehrlich, decolorar en ácido acético y aclarar en glicerina. El método propuesto

por el autor inicia con la tinción de Sihler, seguido de una deshidratación en acetona absoluta, esta deshidratación es indispensable para que las proteínas de las muestras no manchen el polímero durante el encapsulado ya que en este paso las grasas se eliminan y las proteínas aumentan su índice de refracción. El siguiente paso fue la infiltración de la muestra mediante una serie de disoluciones graduadas de monómero de poliéster comercialmente llamado Dewilux y acetona pura en proporciones de 1:3, 1:1, 3:1 y 1:0 respectivamente. Para el encapsulado las muestras se colocaron en moldes a los que se les agrego Dewilux con 3 gotas de catalizador (peróxido de benzoilo) y 3 gotas endurecedor (octoato de cobalto). Los resultados fueron favorables ya que al examinarse las muestras bajo un estereoscopio las fibras y nervios eran claramente visibles, pudiéndose apreciar con detalle. Mediante este estudio se prueba la eficacia de la tinción de Sihler en conjunto con el encapsulado en resina como medio de conservación alternativo al glicerol.

Piovesana y colaboradores (2014) optimizaron la técnica de diafanización y tinción diferencial con el fin de evidenciar malformaciones en la columna vertebral de los peces bagre americano y pejerrey, esto debido a las complicaciones por choques térmicos durante el desarrollo larval. La técnica desarrollada para realizar este proceso consto de siete pasos, el primero fue la fijación en donde las muestras fueron sacrificadas por medio de una sobredosis anestésica y fijadas en formol taponado al 10% para después se transferirse a alcohol al 70% durante un mínimo de 24 horas. El segundo paso fue la tinción del cartílago mediante una solución de Azul de alciano, etanol al 96° y ácido acético. El tercer paso fue una neutralización en etanol absoluto por un lapso de tres días. El cuarto paso consistió en una digestión con concentraciones variables de KOH del 1%, 3% y 5% dependiendo del tamaño de la muestra, con un tiempo de exposición que podía varias de 3 a 12 días hasta que las estructuras óseas fueran claramente distinguibles. El quinto paso consistió en colocar las muestras en una solución de Rojo de alizarina y KOH 0.5% durante 30 minutos. El

sexto paso fue la transparentación mediante la solución de Mall al 1% o 3% por 3 días aproximadamente hasta que los tejidos sean completamente transparentes y finalmente en el séptimo paso se acondicionaron las muestras para su almacenamiento mediante soluciones ascendentes de glicerina y KOH al 0.5% en proporciones 1:3, 1:1 y 3:1 respectivamente hasta poderse almacenar en glicerina pura. Los autores generaron su propia versión de la técnica de transparentación con tinción diferencial logrando disminuir los tiempos de tinción y obteniendo resultados exitosos para la visualización de malformaciones en las estructuras óseas y cartilaginosas.

Romero y González (2019) desarrollaron una modificación de la técnica de diafanización y tinción ósea (Piovesana *et al.*, 2014) para aplicarla en el pez monja (*Gymnocorymbus ternetzi*) con el fin de optimizar el tiempo y los costos del proceso, este método consistió en 5 fases: la primera fase; La eutanasia de los organismos en donde no se alteró estructuralmente, solo se fijó y deshidrato por 40 horas en alcohol al 70%. Segunda fase; Se despigmentó al organismo por medio de agua destilada con hidróxido de potasio (KOH) por 50 horas. Tercera fase; La muestra se tiñó en una disolución de agua destilada con de hidróxido de potasio y de Rojo de alizarina por 20 horas, se enjuago y se neutralizó con alcohol al 70% por 2 horas. Cuarta fase; Los peces se sumergieron en solución de Mall por 3 días y quinta fase; Se sumerge la muestra en un tren ascendente de KOH y glicerina, finalmente la muestra se conservó en glicerina pura en la cual puede permanecer hasta 5 años sin requerir un cambio del medio. Los autores lograron modificar el método de Piovesana reduciendo costos y tiempo al omitir pasos, agentes químicos y concentraciones. El costo total para un solo pez monja fue de \$27.25 pesos mexicanos en el año 2019, sin embargo, la adquisición de todos los productos químicos tuvo un costo de \$4,366 pesos mexicanos para 2019 lo cual representa un gasto menor ya que todos estos productos pueden ser

aplicados a más de un ejemplar. Durante el trabajo se redujo el tiempo total de experimentación de Piovesana de 25 días a tan solo 7 días para completar el proceso, sin embargo, las muestras perdieron cualidades del método original como lo fue la doble tinción ya que en el nuevo método propuesto se elimina el uso de Azul de alciano para enfocarse únicamente en el uso de una tinción con Rojo de alizarina S.

Pérez (2019) experimento con crías de ratón *Mus musculus* y pollitos *Gallus gallus domesticus* con el fin de estandarizar la técnica de encapsulado de especímenes transparentados con doble tinción y a su vez evaluar los costos de esta técnica de conservación. El método utilizado por Pérez consistió en 9 pasos y dos grupos diferenciados por una diafanización completa y una incompleta. En el primer paso los organismos se sacrificaron en una cámara letal con cloroformo. El segundo paso consistió en la fijación, tinción y digestión de los organismos previo a su diafanización según la técnica de Gersenowies y mediante los colorantes Rojo de alizarina S y Azul de alciano. En el tercer paso los organismos se separaron en 2 grupos (grupo control y grupo experimental) para cada especie. Durante el cuarto paso solo el grupo control de ambas especies completo el proceso de diafanización mediante un tren ascendente de glicerina hasta alcanzar la glicerina pura y ser almacenados. En el quinto paso se realizó un proceso de deshidratación crítica con acetona pura. En el sexto paso se realizó el encapsulamiento de los ejemplares en resina cristal poliéster catalizada, para este paso se utilizaron moldes prefabricados a los que se les colocó una hoja de tereftalato de polietileno al fondo con la finalidad de evitar el pulido. En el séptimo paso se evaluó el nivel de refracción de las muestras mediante un luxómetro para verificar la existencia de diferencias en la opacidad de las muestras. Para el octavo paso se realizó el presupuesto de la técnica de encapsulado en base al costo de todos los materiales utilizados y el tiempo invertido en horas laborales según el salario promedio de un Biólogo para 2019. Finalmente, en el noveno paso

las muestras se enmarcaron, etiquetaron y evaluaron por la comunidad estudiantil de la carrera de Biología mediante un cuestionario con escala tipo Likert. Los resultados de Pérez arrojaron que no existen diferencias perceptibles o significativas entre los grupos control y experimental para ambas especies, sin embargo si existe una diferencia abismal en cuanto al costo de materiales y tiempo invertido entre ambos grupos, siendo más económico el grupo experimental que omite no solo un paso si no también 10 días de trabajo y cuesta una tercera parte de los gastos del grupo control, por lo que el grupo experimental resulta ser un método fiable, rápido y económico. Pérez también menciona la importancia de mantener niveles óptimos y bajos de catalizador para evitar que las muestras se dañen, también resalta la ventaja del uso de películas de tereftalato de polietileno para evitar el proceso de pulido reduciendo gastos y tiempo. La autora del trabajo recomienda que después de la deshidratación y previo al encapsulamiento los ejemplares sean sumergidos en una mezcla de resina y acetona en una proporción de 3:1 respectivamente para su infiltración por difusión y obtener una mejor definición al momento del encapsulado.

Romero y colaboradores (2021) generaron una plataforma digital híbrida para enseñar la técnica de diafanización con doble tinción enfocada en la ecotoxicología. La función principal de este proyecto fue ofrecer conocimientos de osteología comparada de manera masiva y gratuita. En este trabajo los autores hacen uso de herramientas tecnológicas y pedagógicas llamadas MOOCs (Massive Open Online Course), estas herramientas poseen características similares a una clase presencial (tienen fecha de comienzo/finalización y recursos evaluativos) y son aptas para todo el público. Mediante esta plataforma los autores hacen uso de conceptos como diafanización, tinción específica y osteología comparada, explicando cada uno de los pasos que las conforman y sus aplicaciones enfocadas en la ecotoxicología. De esta manera los autores crearon herramientas de

aprendizaje a través de modelos educativos a distancia como lo son los MOOCs y así poder complementar los conocimientos de los estudiantes o iniciar el interés del público general.

4. Justificación

La técnica de transparentación con doble tinción combinada con la técnica de encapsulado es una buena alternativa para generar materiales didácticos que puedan ser consultados y almacenados de manera práctica. La combinación de ambas ha sido pobremente explorada por lo que la estandarización de este método no ha sido establecida en diversos grupos de vertebrados. En el presente trabajo buscamos estandarizar la técnica de transparentación con doble tinción y encapsulado en anuros, se utilizó a las especies *Xenopus laevis* y *Dryophytes eximius* que son de fácil acceso en establecimientos comerciales a un bajo costo.

5. Hipótesis

La técnica de transparentación con doble tinción y encapsulado se puede aplicar de manera exitosa en la preservación de esqueletos transparentados de anfibios.

6. Objetivo

Estandarizar la técnica de transparentación con doble tinción y encapsulado en resina poliéster en anuros de las especies *Xenopus Laevis* y *Dryophytes eximius*.

7. Materiales y método

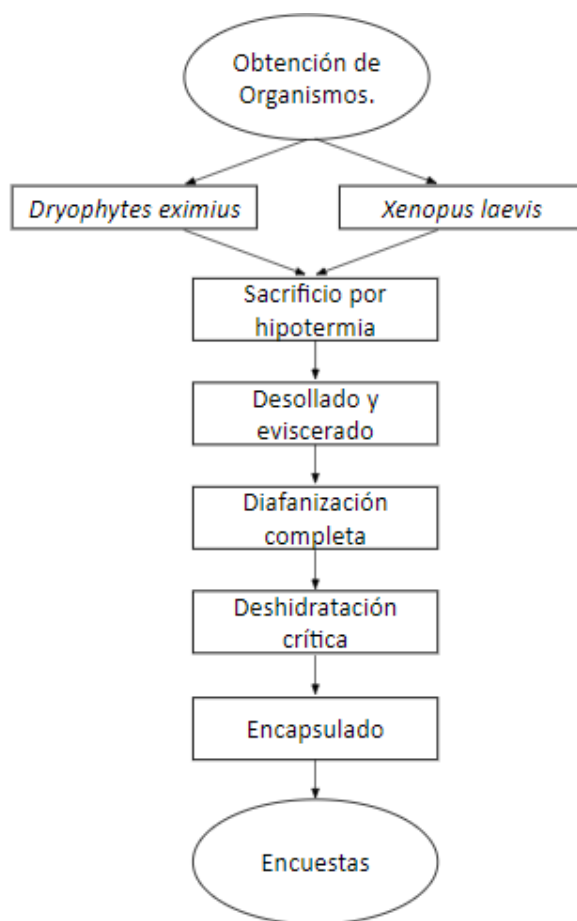
El método de transparentación con doble tinción aplicado fue el de Gersenowies, 2023 (comunicación personal, 14 de abril de 2023).

7.1 Ruta crítica

En el siguiente diagrama de flujo (Figura 1) se muestra el procedimiento general realizado que contempla tanto la técnica de transparentación como la técnica de encapsulado, los pasos intermedios para la conservación de los organismos y su evaluación.

Figura 1

Diagrama de flujo del procedimiento general.



Nota. Representación gráfica del proceso de Transparentación y Encapsulado propuesto para anfibios.

7.2 Obtención de los organismos

Se adquirieron 20 ejemplares de *Xenopus Laevis* y 19 de *Dryophytes eximius* comprados en el Mercado de Morelos, Ciudad de México, en ambos casos se rectificó que todos los organismos coincidieran con la especie solicitada y se encontraran con vida para posteriormente ser sacrificados.

7.3 Sacrificio y fijación

Posterior a la obtención de los organismos estos fueron sacrificados por hipotermia y después se les realizó un desollado y eviscerado cuidando meticulosamente la integridad del esqueleto para evitar desmembramientos. Finalmente se fijaron en formol al 4%.

7.4 Transparentación con doble tinción

Los organismos se enjuagaron en agua previamente al proceso de tinción. La tinción inicio deshidratando a los organismos por medio de un tren de alcohol ascendente del 40% al 100% seguido de una tinción con Azul de alciano en un ambiente de oscuridad por 24 horas, a continuación, los organismos se rehidrataron por medio de un tren de alcohol inverso del 100% al 40%, se enjuagaron con agua y se tiñeron con Rojo alizarina por 24 horas. Una vez finalizado el proceso de tinción se les realizó una digestión alcalina en KOH al 4% hasta que los tejidos se observaron traslúcidos.

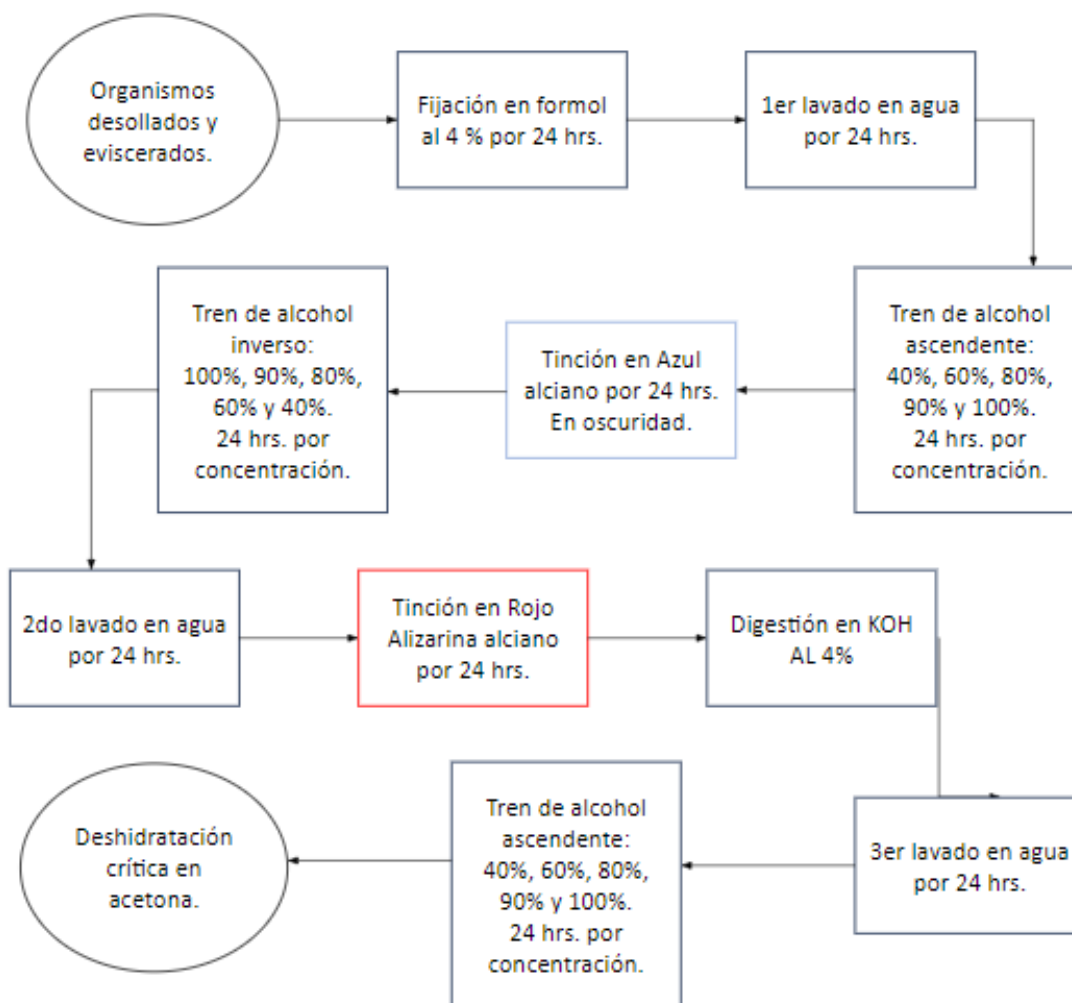
7.5 Almacenamiento previo al encapsulado y deshidratación crítica

Posterior a la digestión de los tejidos se optó por una preparación directa previa al encapsulado en base a lo documentado en el trabajo de Pérez (2018), para esta preparación los organismos se lavaron en agua corriente y se sometieron a una deshidratación crítica comenzando con un tren de alcohol ascendente del 40% al 100%, después se sumergieron en acetona pura para almacenarse dentro de un congelador por una semana.

A continuación, se muestra un diagrama de flujo (Figura 2) que muestra tanto el proceso de transparentación con doble tinción como el de almacenamiento y deshidratación crítica.

Figura 2

Diagrama de flujo del proceso de Transparentación para ambos organismos.



Nota. Representación gráfica del proceso de transparentación propuesto para anfibios.

7.6 Encapsulado

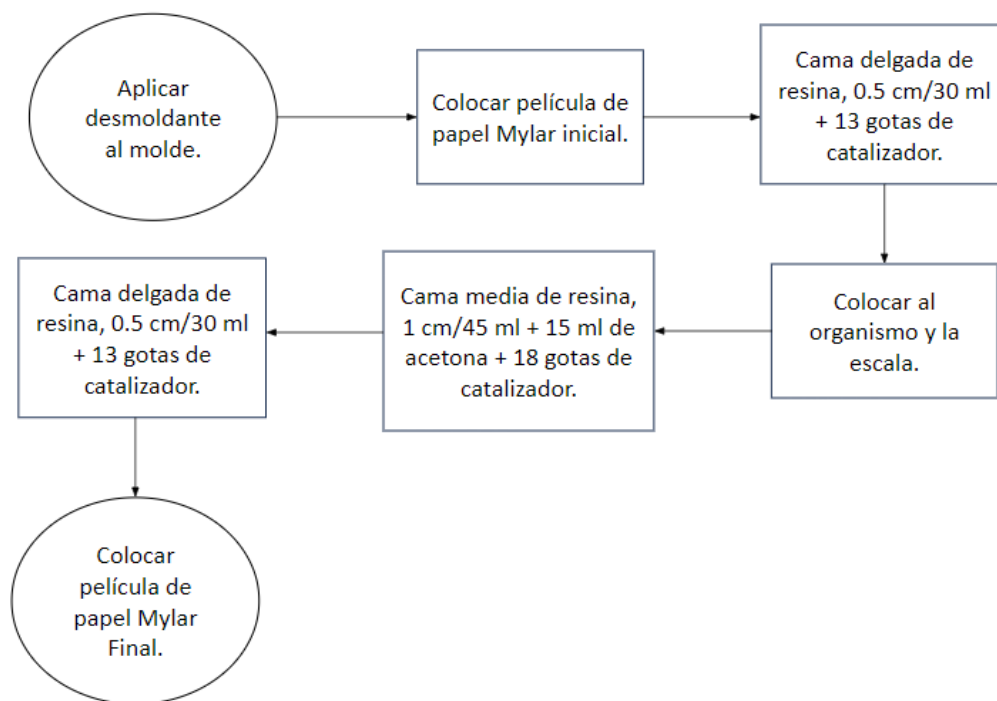
El encapsulado se realizó con resina poliéster cristal de la marca Poliformas plásticas. El proceso comenzó aplicando una capa de desmoldante sobre las paredes de un molde cubico prefabricado, después se colocó una película de papel de tereftalato de polietileno (papel BoPET o comúnmente conocido como papel mylar) en la cara interna inferior, sobre la película se vertió una cama de resina con catalizador (KM-2000), cuando esta estaba por finalizar su polimerización y aun se

encontraba ligeramente fresca se colocó al organismo junto con una escala de papel previamente elaborada, sobre estos se aplicó una segunda cama de resina con acetona en una proporción de 3:1 respectivamente y catalizador. Finalmente, cuando la segunda cama polimerizó, se cubrió con una tercera cama de resina con catalizador y se selló con una película de papel de tereftalato de polietileno. Una vez polimerizada la muestra se procedió a desmoldar el encapsulado y retirarle las hojas de tereftalato de polietileno.

En el siguiente diagrama de flujo (Figura 3) se muestra el proceso de encapsulamiento que fue aplicado para ambos grupos de organismos.

Figura 3

Diagrama de flujo del proceso de Encapsulado en anfibios.

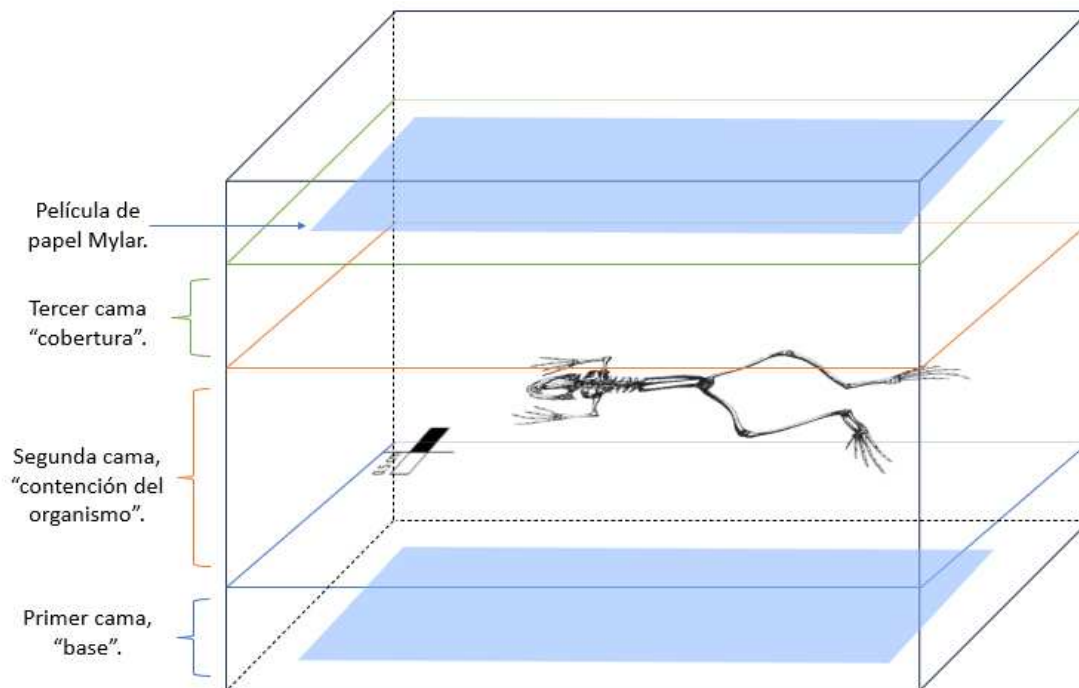


Nota. Representación gráfica del proceso de encapsulado propuesto para anfibios.

En la siguiente imagen (Figura 4) se muestra una representación del molde y las capas de resina colocadas dentro de él, así como las películas de papel de tereftalato de polietileno o papel mylar colocadas.

Figura 4

Esquema de la muestra encapsulada en resina cristal poliéster.



Nota. Representación gráfica del proceso y orden de encapsulado según la metodología de este trabajo.

Una vez obtenidos los organismos encapsulados, se elaboraron marcos de madera para su presentación, así como un correcto etiquetado de identificación de su especie, el elaborador y la institución (Figuras 5 y 6).

Figura 5

Muestra de Dryophytes eximius terminada y etiquetada dentro de marco de madera.



Nota. Fotografías de la parte frontal y lateral de una muestra de *Dryophytes eximius* terminada y etiquetada.

Figura 6

Muestra de Xenopus laevis terminada y etiquetada dentro de marco de madera.



Nota. Fotografías de la parte frontal y lateral de una muestra de *Xenopus laevis* terminada y etiquetada.

7.7 Cuestionarios

Se aplicó un cuestionario de opinión escala Likert de 5 puntos a 80 estudiantes de nivel bachillerato del plantel CCH-Vallejo para valorar la calidad de las preparaciones y su utilidad como material didáctico en distintas instituciones de nivel medio superior, superior y materias de ciencia (Figura 13 y Figura 14). Las encuestas se aplicaron de manera presencial a alumnos de diferentes grupos durante sus clases de Biología y ciencias, previo a la aplicación del cuestionario se realizó una breve introducción y explicación de la técnica de doble tinción, así como de la técnica de encapsulado en resina poliéster. Posterior a la explicación se mostraron algunas muestras de

manera física para que los alumnos las observaran de manera directa y respondieran de acuerdo a su perspectiva y entendimiento, al final de la sesión se incentivó a los alumnos realizar preguntas sobre el tema y se aclararon cualquier tipo de dudas para una mejor comprensión de la técnica.

Se selecciono la escala tipo Likert por ser un instrumento de medición que facilita la recolección de datos mediante una serie de respuestas graduales preestablecidas, estas abarcan temas de conformidad, frecuencia o probabilidad y se plantean de manera ordinal; esto evita caer en la elección forzada de una valoración bipolar con respuestas extremas y ayuda a contabilizar las opiniones dándoles un valor cuantitativo.

8. Resultados y análisis de resultados

8.1 Resultados para *Xenopus laevis*

Se obtuvieron 9 muestras de la especie *Xenopus laevis* con daños en los tejidos por falta de infiltración, Figura 7.

Figura 7

Muestra con daños en los tejidos de Xenopus laevis.



Nota. Fotografías con vista dorsal y ventral de una muestra de *Xenopus laevis* con daños en los tejidos.

Se obtuvieron 10 muestras de la especie *Xenopus laevis* con fracturas en la capa media del encapsulado por exceso de catalizador, Figura 8.

Figura 8

Muestra con fracturas en el encapsulado de Xenopus laevis.



Nota. Fotografías con vista dorsal y ventral de una muestra de *Xenopus laevis* con daños por fractura durante el encapsulado.

Se obtuvo 1 muestras de la especie *Xenopus laevis* con la calidad adecuada para considerarse un material didáctico apreciable, Figura 9.

Figura 9

Muestra con calidad adecuada de Xenopus laevis.



Nota. Fotografías con vista dorsal y ventral de una muestra de *Xenopus laevis* con calidad adecuada para material didáctico.

8.2 Análisis de costos

Para Julio de 2024 los costos de los materiales utilizados fueron los siguientes:

- Resina PP cristal preparada Poliformas plásticas 4kg. \$512.00 MXN.
- Película separadora 900 g. \$ 52.50 MXN
- Catalizador K-2000 250 g. \$ 65.50 MXN
- Papel de tereftalato de metilo o Mylar 1kg/10 m. \$500.00 MXN.
- Moldes prefabricados Cubo Grande de 10x10 cm (6 unidades) \$ 165.00 MXN.
- Alcohol etílico 100% 10 L. \$849.00 MXN.

- Formaldehído de 4L. 40% \$ 1,447.80 MXN.
- Azul de alciano 1 g. \$980.00 MXN
- Rojo de alizarina S 5 g. \$730.00 MXN.
- Acetona 5 L. \$500.00 MXN.
- KOH 500g. \$750.00 MXN.
- Marcos de madera \$300.00 MXN

El salario promedio mensual de Investigadores y Especialistas en Ciencias Exactas, Biológicas, Ingeniería, Informática y en Telecomunicaciones durante el primer trimestre de 2024 fue de \$10,300 MXN en un horario laboral de 5 días a la semana con 8 horas al día (\$58.50 MXN la hora) según la Encuesta Nacional de Ocupación y Empleo (ENOE). Para este trabajo se invirtieron 26 días de trabajo con 5 horas de trabajo por día aproximadamente para 6 organismos, esto desde que los organismos ingresan al laboratorio hasta que se encuentran completamente polimerizados al finalizar el proceso de encapsulado, por lo que se estima que el coste laboral por día rondaría los \$292.50 MXN. y de \$7,605.00 MXN para un total de 6 organismos completados en 26 días.

Costos totales.

Costo total de los materiales = \$ 6,851.80 MXN para 40 organismos.

Costo total de materiales por organismo = \$171.29 MXN aproximadamente.

Costo laboral para la elaboración de 6 organismos = \$7,605.00 MXN.

Costo laboral para la elaboración de un organismo = \$1,267.50 MXN.

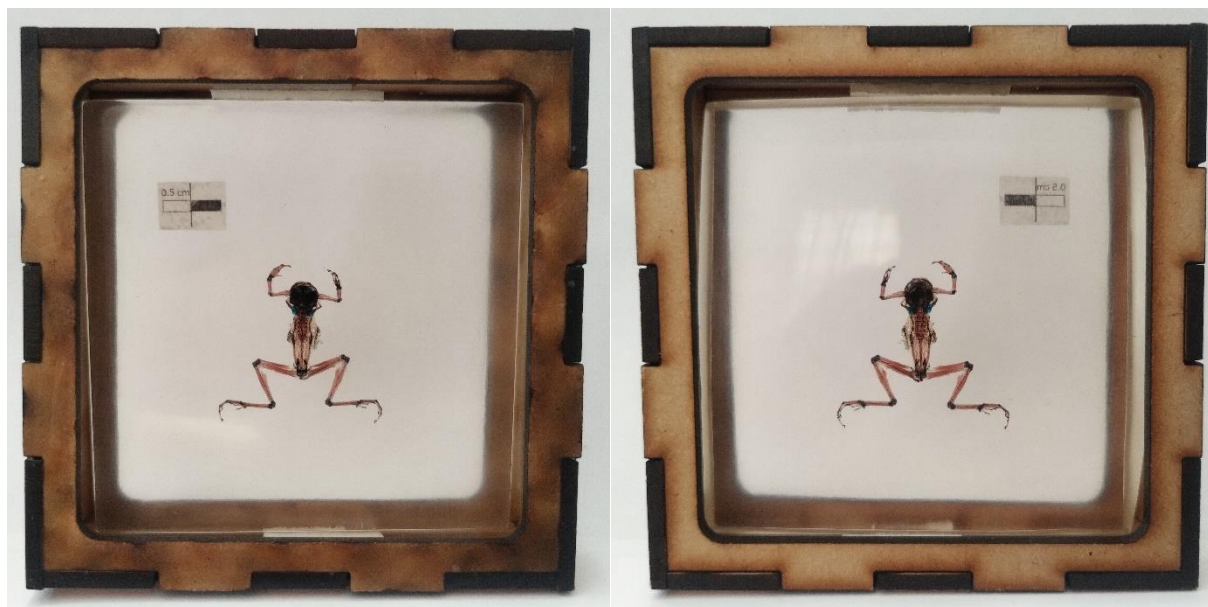
Costo total laboral y material por organismo unitario = \$1,438.79 MXN.

8.3 Resultados para *Dryophytes eximius*

Se obtuvieron 8 muestras de la especie *Dryophytes eximius* con daños en los tejidos por falta de infiltración, Figura 10.

Figura 10

Muestra con daños en los tejidos de Dryophytes eximius.



Nota. Fotografías con vista dorsal y ventral de una muestra de *Dryophytes eximius* con daños en los tejidos.

Se obtuvieron 10 muestras de la especie *Dryophytes eximius* con fracturas en la capa media del encapsulado por exceso de catalizador, Figura 11.

Figura 11

Muestra con fracturas en el encapsulado de Dryophytes eximius.



Nota. Fotografías con vista dorsal y ventral de una muestra de *Dryophytes eximius* con daños por fractura durante el encapsulado.

Se obtuvieron 1 muestras de la especie *Dryophytes eximius* con la calidad adecuada para considerarse un material didáctico apreciable, Figura 12.

Figura 12

Muestra con calidad adecuada de Dryophytes eximius.



Nota. Fotografías con vista dorsal y ventral de una muestra de *Dryophytes eximius* con calidad adecuada para material didáctico.

8.4 Análisis de costos

Para Julio de 2024 los costos de los materiales utilizados fueron los siguientes:

- Resina PP cristal preparada Poliformas plásticas 4kg. \$512.00 MXN.
- Película separadora 900 g. \$ 52.50 MXN
- Catalizador K-2000 250 g. \$ 65.50 MXN
- Papel de tereftalato de metilo o Mylar 1kg o 10 m. \$500.00 MXN.
- Moldes prefabricados Cubo Grande de 10x10 cm (6 unidades) \$ 165.00 MXN.
- Alcohol etílico 100% 10 L. \$849.00 MXN.

- Formaldehído de 4L. 40% \$ 1,447.80 MXN.
- Azul de alciano 1 g. \$980.00 MXN
- Rojo de alizarina S 5 g. \$730.00 MXN.
- Acetona 5 L. \$500.00 MXN.
- KOH 500g. \$750.00 MXN.
- Marcos de madera \$300.00 MXN.

El salario promedio mensual de Investigadores y Especialistas en Ciencias Exactas, Biológicas, Ingeniería, Informática y en Telecomunicaciones durante el primer trimestre de 2024 fue de \$10,300 MXN en un horario laboral de 5 días a la semana con 8 horas al día (\$58.50 MXN la hora) según la Encuesta Nacional de Ocupación y Empleo (ENOE). Para este trabajo se invirtieron 26 días de trabajo con 5 horas de trabajo por día aproximadamente para 6 organismos, esto desde que los organismos ingresan al laboratorio hasta que se encuentran completamente polimerizados al finalizar el proceso de encapsulado, por lo que se estima que el coste laboral por día rondaría los \$292.50 MXN. y de \$7,605.00 MXN para un total de 6 organismos completados en 26 días.

Costos totales.

Costo total de los materiales = \$ 6,851.80 MXN para 40 organismos.

Costo total de materiales por organismo = \$171.29 MXN aproximadamente.

Costo laboral para la elaboración de 6 organismos = \$7,605.00 MXN.

Costo laboral para la elaboración de un organismo = \$1,267.50 MXN.

Costo total laboral y material por organismo unitario = \$1,438.79 MXN.

8.5 Resultados de cuestionarios de opinión

Con los datos obtenidos en los cuestionarios de opinión se realizó una hoja de datos en Excel en la cual se realizó un análisis de frecuencias y se realizaron gráficas (Figura 13 y Figura 14).

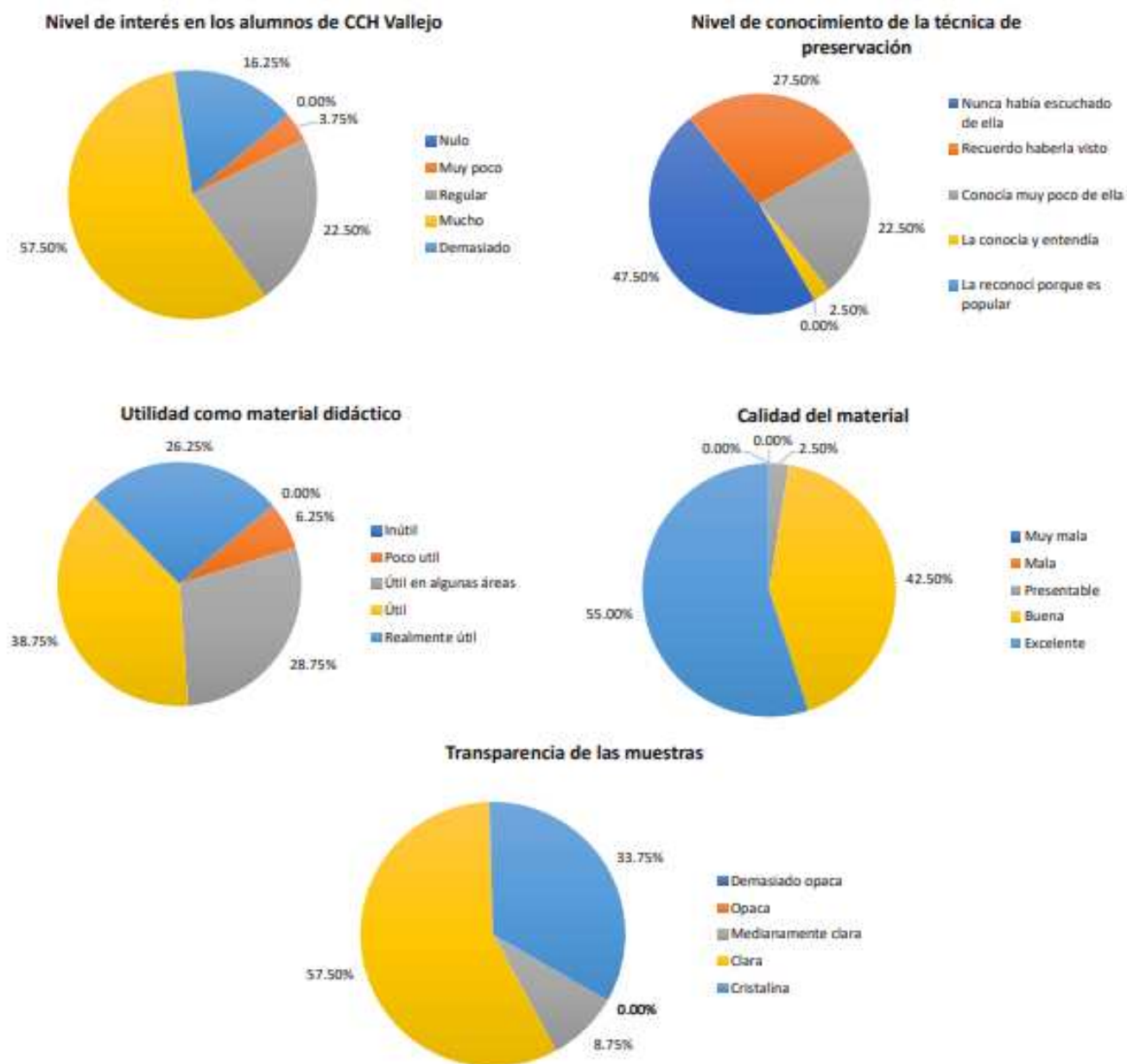
De acuerdo a la Figura 13 la mayoría de los alumnos de CCH Vallejo (47.5 %) desconocían la técnica de transparentación con doble tinción y encapsulado en resina poliéster, solo algunos cuantos (22.5 %) tenían un breve acercamiento o conocimiento de esta y no entendían realmente el principio de esta técnica. Sin embargo, la mayoría de los alumnos mostraron interés y asombro durante la presentación lo cual se ve reflejado en la Figura 13, en donde el 57.5 % contestaron con “Mucho” al nivel de interés y el 38.75 % consideraron a estas muestras como “Útiles” para su uso como material didáctico, así como calificaron a las muestras con una calidad Excelente (55%) y con transparencia “Clara” (57.5 %).

En la Figura 14 un gran porcentaje de los alumnos (56.25 %) distinguió casi todas las estructuras óseas en la muestra, considero al material como “Costoso” (46.25 %) y asumió que sería resistente y sufriría menos daños con respecto a otras conservaciones (36.25 %).

Finalmente, los alumnos consideraron en su mayoría como “Muy valioso” a este tipo de conservaciones en el área de la ciencia (46.25%) y como un material que “Definitivamente ayudaría” a la difusión de la técnica (45 %).

Figura 13

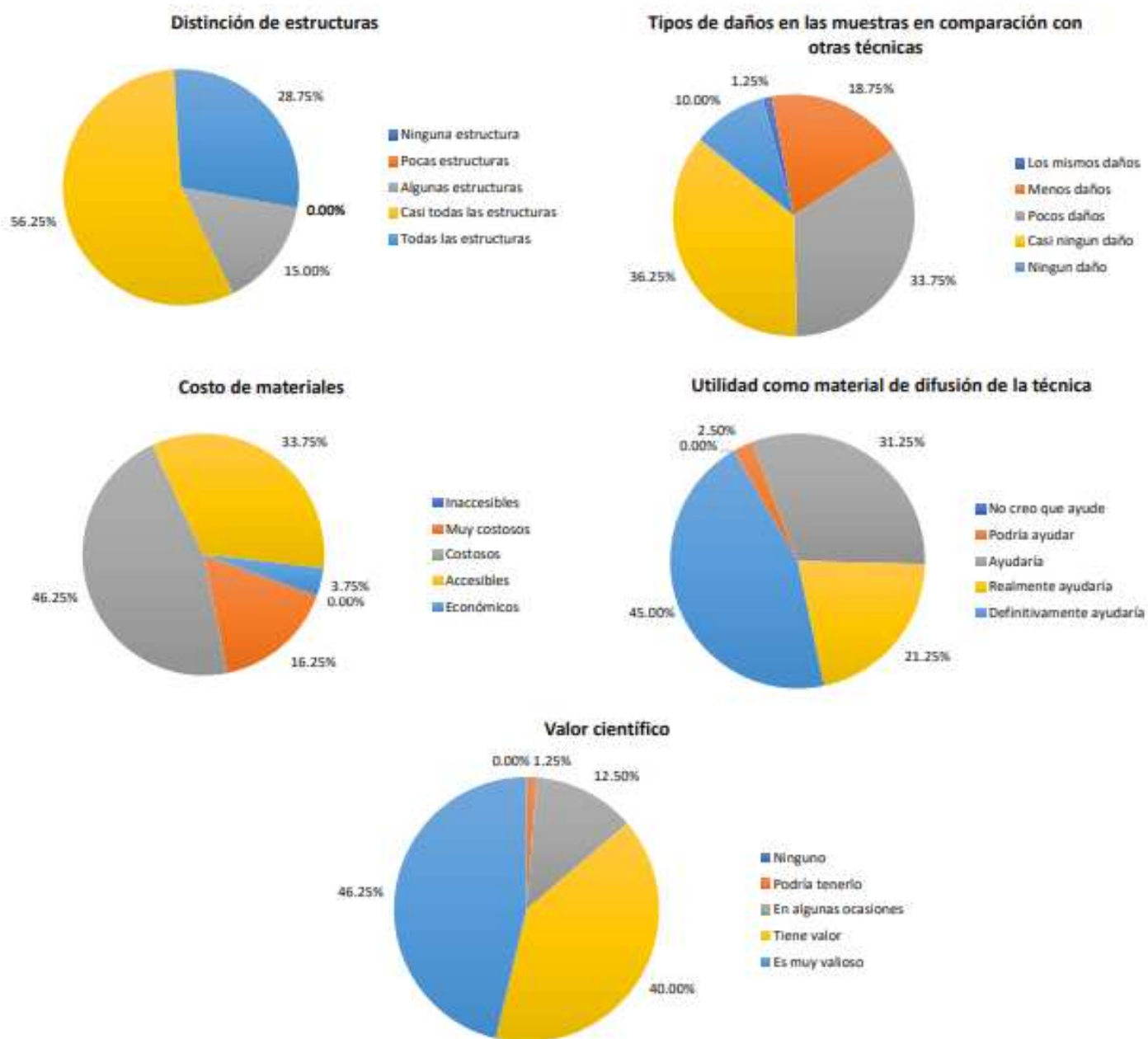
Graficas de sectores circulares de las preguntas 1 a 5 del cuestionario tipo Linkert y sus respuestas.



Nota. Representación gráfica de las respuestas obtenidas en las preguntas 1 a 5 de acuerdo a lo contestado por alumnos de CCH Vallejo.

Figura 14

Graficas de sectores circulares de las preguntas 5 a 10 del cuestionario tipo Linkert y sus respuestas.



Nota. Representación gráfica de las respuestas obtenidas en las preguntas 5 a 10 de acuerdo a lo contestado por alumnos de CCH Vallejo.

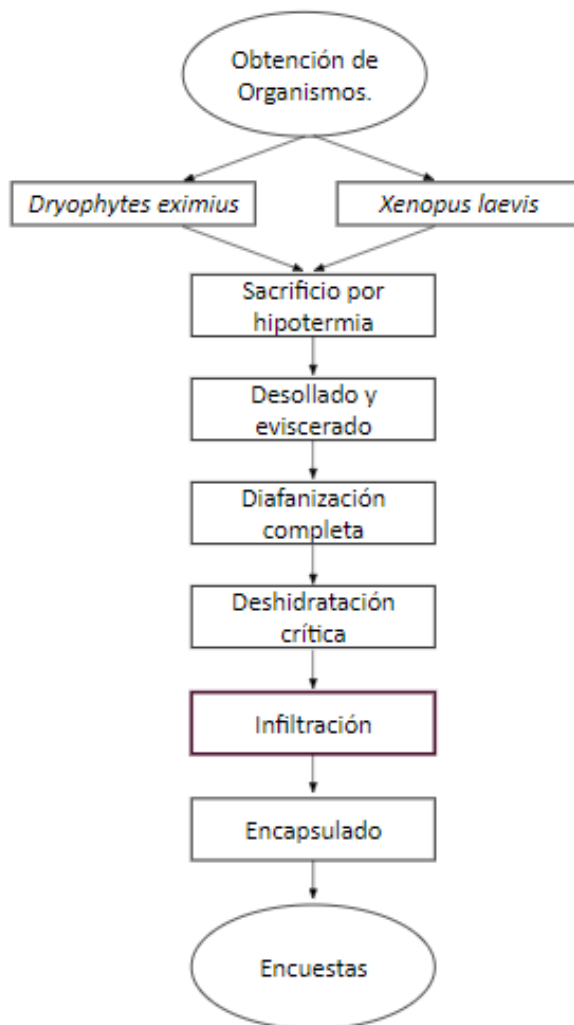
8.6 Método propuesto para anfibios

De acuerdo a los resultados obtenidos y los daños presentados se propone un nuevo método para mejorar la técnica de diafanización con doble tinción y encapsulado en anfibios. Dentro de este nuevo método se adiciono un paso extra previo al encapsulamiento el cual consistió en sumergir a los organismos después del “Almacenamiento previo al encapsulado y deshidratación crítica” en una solución 3:1 de resina y acetona por una semana, lo cual ayudo a permear los tejidos con el medio de encapsulado disminuyendo los daños durante la polimerización.

En el siguiente diagrama de flujo (Figura 15) se muestra el nuevo método general realizado.

Figura 15

Diagrama de flujo del nuevo método general propuesto para anfibios.



Nota. Representación gráfica del nuevo método general propuesto para anfibios.

Este nuevo método mostro ser eficaz en organismos con menor masa muscular como lo son los anuros, obteniendo una mejor definición de las estructuras teñidas y claridad en los tejidos como se observa en las siguientes muestras sometidas a este tratamiento (Figuras 16, 17, 18 y 19).

Figura 16

Xenopus laevis sometida al nuevo tratamiento.



Nota. Vista dorsal de una muestra de *Xenopus laevis* sometida al nuevo tratamiento.

Figura 17

Xenopus laevis sometida al nuevo tratamiento.



Nota. Vista ventral de una muestra de *Xenopus laevis* sometida al nuevo tratamiento.

Figura 18

Dryophytes eximius sometida al nuevo tratamiento.



Nota. Vista dorsal de una muestra de *Dryophytes eximius* sometida al nuevo tratamiento.

Figura 19

Dryophytes eximius sometida al nuevo tratamiento.

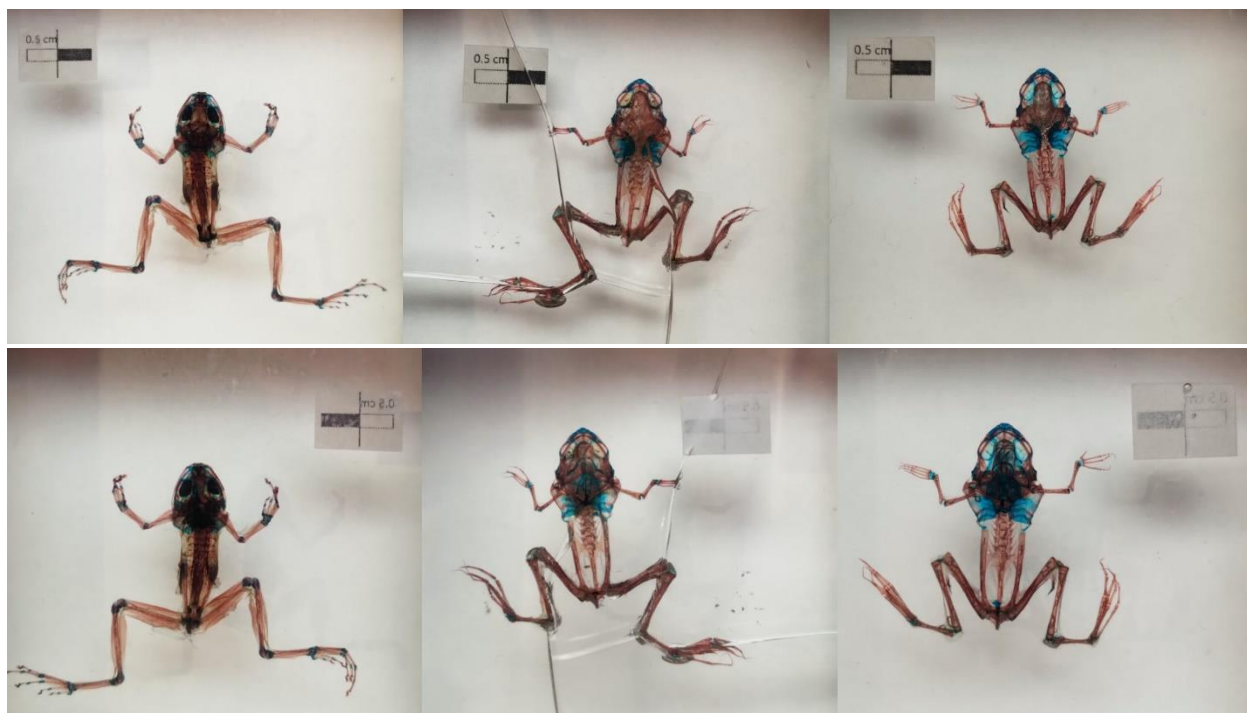


Nota. Vista ventral de una muestra de *Dryophytes eximius* sometida al nuevo tratamiento.

También se propone una disminución de la cantidad de catalizador (KM-2000) de 21 gotas iniciales a 17-18 gotas para evitar fracturas en la capa media (capa contenedora del organismo), ya que al implementarse se reflejan mejorías en comparación con pruebas anteriores (Figuras 20 y 21).

Figura 20

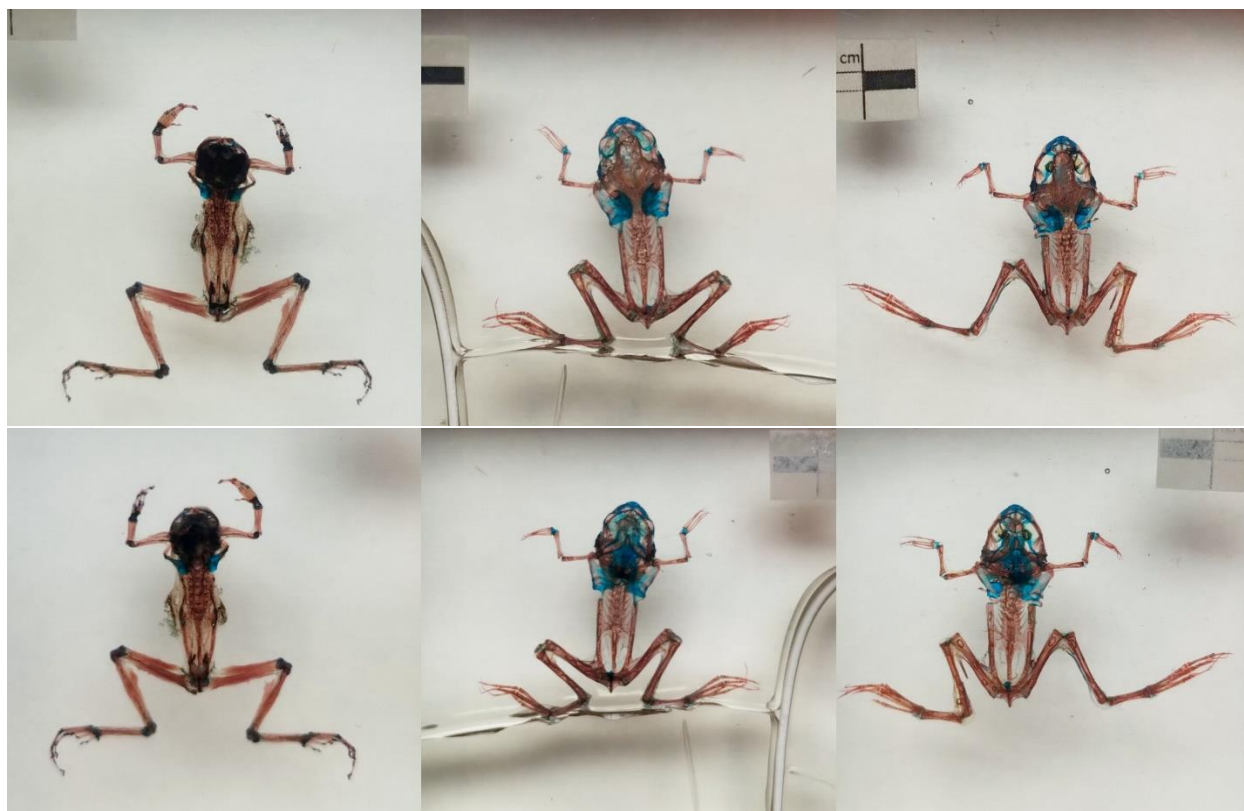
Comparación entre las diferentes pruebas en Xenopus laevis.



Nota. Comparación entre una muestra con tejidos dañados, otra con fracturas y una de calidad adecuada de *Xenopus laevis*.

Figura 21

Comparación entre las diferentes pruebas en Dryophytes eximius.



Nota. Comparación entre una muestra con tejidos dañados, otra con fracturas y una de calidad adecuada de *Dryophytes eximius*.

Algunas de las recomendaciones que se sugieren para evitar daños en el material de acuerdo a las modificaciones en la metodología son:

- Realizar el proceso de encapsulado en un periodo no mayor a un día para evitar infiltraciones de capas superiores.
- Usar catalizador y resina poliéster cristal completamente nuevas al iniciar el proceso.
- No usar cámaras de luz UV por periodos prolongados para acelerar el proceso polimerización.
- No conservar a los organismos en acetona pura por grandes periodos de tiempo para evitar el daño de los tejidos.
- Calcular la cantidad de catalizador adecuada con respecto a la relación de masa muscular del organismo ya que el fabricante no contempla su uso en material biológico.

9. Discusión

Durante en proceso experimental ocurrieron perdidas de material debido a errores en la técnica por la que esta requirió de modificaciones adecuadas según lo reportado por autores como Larsson (1975), Chappard (1986), Lataster (1986), Pérez (2019) entre otros. Algunos de los errores presentados fueron los daños en el tejido durante en el proceso de encapsulado (Figuras 9 y 6), ya que como menciona Lataster y Drukker (1986) resinas como la poliéster suelen ser más agresivas durante el proceso exotérmico de polimerización en donde pueden llegar hasta los 85°C , por lo que es recomendable usar este tipo de resinas solo con los organismos que sean menos vulnerables a sus efectos o se encuentren en estadios de desarrollo mayores en donde sus tejidos puedan soportar el proceso de polimerización. Los anfibios al poseer muy poco tejido muscular pueden dañarse durante el proceso de polimerización para su encapsulamiento como fue demostrado en este trabajo (Figuras 7 y 10). Este problema se corrigió agregando un paso previo al encapsulamiento, el cual consistió en la infiltración pasiva del medio encapsulante en los tejidos como lo reportaron Chappard (1983), Bloot (1984), Chappard (1986), Peker (2003) y Pérez (2019), este último recomienda que los ejemplares sean sumergidos en una mezcla 3:1 de resina y acetona para su impregnación por difusión, generando una mejor definición durante y después del encapsulado. Este nuevo paso consistió en exponer a los organismos a una disolución de resina y acetona 3:1 por un tiempo estimado de una semana, lo cual ayudo a permear los tejidos con la mezcla que posteriormente pasaría a formar parte del medio encapsulante del organismo, ayudando de esta manera a reducir el daño en los tejidos, mejorando la definición y transparencia de las estructuras óseas con doble tinción de los anfibios (Figuras 14, 15, 16 y 17).

Cabe mencionar que esta afectación ocurrió de forma más agresiva en los organismos de la especie *Dryophytes eximius*, lo cual es razonable debido al bajo nivel de tejidos musculares en

comparación con *Xenopus laevis* y con respecto a lo anteriormente mencionado por Lataster y Drukker (1986).

Otro de los problemas suscitados durante la etapa experimental fue la lentitud del proceso de polimerización de cada una de las camas en el encapsulado, debido a esto se atrasó el tiempo promedio para conseguir una muestra terminada y genero problemas como la infiltración de las camas superiores en estado semilíquido a las camas inferiores a través de los costados del molde, ya que al polimerizarse la cama inferior en un tiempo mayor a un día, esta se expandía durante el proceso exotérmico y se contraía al enfriarse, lo cual generaba una holgura entre las paredes interiores del molde y la cama endurecida, permitiendo que las camas superiores lograran infiltrarse a través de las paredes y que estas lograran cubrir la película de papel de tereftalato de polietileno colocada al inicio del proceso, imposibilitando su retiro de manera adecuada.

Se intento acelerar el proceso de polimerización mediante una cámara de luz UV como lo implementaron en sus trabajos Kerns (1953), Larsson (1975) y Chappard (1983) sin embargo los resultados no fueron favorables ya que promovió la aparición de fracturas en la resina en conjunto con un exceso de catalizador (Figuras 8 y 11).

Finalmente, este error fue identificado debido al uso de un catalizador proporcionado por el laboratorio el cual ya se encontraba abierto y con tiempo de uso antes del proceso, por lo que se procedió a comprar uno completamente nuevo, notándose mejoras en el tiempo de polimerización de la resina cristal poliéster.

Como se menciona en el punto anterior uno de los errores que causaron más pérdidas fueron las quebraduras presentadas en los encapsulados al final del proceso de polimerización, incluso después de días de finalizado el encapsulamiento, por lo que se redujeron las medidas de catalizador recomendadas por el fabricante de 15 gotas de KM-2000 para las camas inferior y

superior (30 ml), y 21 gotas de KM-2000 para la cama media (45 ml), estas medidas se redujeron a 13 gotas de KM-2000 para las camas inferior y superior, y 18 gotas de KM-2000 para la cama media con respecto a lo mencionado en trabajos como el de Deonarine (1972) quien menciona que hubo defectos debido al uso del catalizador, ya que si se usaba poca cantidad el polímero quedaba blando y si se usaba demasiado se quebraba o calentaba en exceso, esta situación afectaba al organismo dañando los tejidos cuando las temperaturas eran elevadas. Se intentaron replicar las medidas de catalizador con base al trabajo de Pérez (2019) quien utilizo 1 gota de catalizador por cada 20ml de resina para un proceso menos agresivo, sin embargo, no hubo resultados favorables ya que representaba tiempos de polimerización excesivos, teniendo que recurrir a las medidas del fabricante para posteriormente reducirlas. Es importante mencionar que las quebraduras por exceso de catalizador solo ocurrieron en la segunda capa de resina la cual contenía una mezcla en proporciones de 3:1 de resina poliéster y acetona, esto puede ocurrir por diversos factores uno de ellos fue la temperatura ambiente que fue cambiante y superior a los 20°C y que autores como Larsson (1975) y Chappard (1983) mantuvieron estable de forma estricta al bajar las temperaturas durante el proceso de polimerización, esto con la finalidad de evitar daños en los tejidos. De esta manera no resulta extraño que la cama media del proceso de encapsulado resultara fracturada, ya que se encontraba diluida con acetona y fue la más gruesa al contener al organismo, este argumento se puede soportar con lo mencionado por Chappard (1986) quien recomienda realizar el encapsulado en temperaturas de 20 °C o menos, ya que las capas gruesas de monómero podrían presentar fracturas durante la polimerización al reaccionar de manera exotérmica, por lo que también recomiendan bajar las temperaturas por medio de la refrigeración cuando las capas de monómero son excesivamente gruesas.

10. Conclusión

Las especies *Dryophytes eximius* y *Xenopus laevis* se pueden preservar de manera adecuada mediante la aplicación de la técnica de transparentación y encapsulado.

Se estandarizó la técnica de encapsulado en resina poliéster en anfibios transparentados con doble tinción.

Se complementó el método y técnica propuesta por Pérez (2019), bajo el argumento de “los anfibios, así como otros animales con menor masa muscular deben pasar por una difusión pasiva de resina previa al encapsulado”.

El encapsulado como método de preservación es una alternativa práctica, duradera y de fácil transporte, así como un material didáctico de utilidad en el área educativa.

El encapsulado y transparentado de anuros puede realizarse a bajo costo con resina poliéster de uso comercial en comparación con materiales adquiridos a través de compañías especializadas en la distribución de materiales didácticos y escolares de índole científico.

El proceso de polimerización de la resina poliéster puede dañar a organismos con poco tejido muscular.

11. Referencias

- Bloot, J., Boekelaar, A. B., & Baljet, B. (1984). A simple acetylcholinesterase method for staining in toto the nervous system in rat fetuses and a procedure for embedding stained fetuses in transparent epoxy resin. *Stain Technology*, 59(4), 246-249.
DOI: <https://doi.org/10.3109/10520298409113864>
- Boardman, J. P., Mitala, J. J., Carrano, R. A., & Iuliucci, J. D. (1984). Cartilage-staining technique for the examination of unskinned fetal rat specimens previously processed with alizarin red S. *Teratology*, 30(3), 383-384.
DOI: <https://doi.org/10.1002/tera.1420300310>
- Chappard, D., Alexandre, C., Camps, M., Montheard, J. P., & Riffat, G. (1983). Embedding iliac bone biopsies at low temperature using glycol and methyl methacrylates. *Stain Technology*, 58(5), 299-308.
DOI: <https://doi.org/10.3109/10520298309066802>
- Chappard, D., Alexandre, C., Palle, S., & Riffat, G. (1986). Permanent preservation of whole alizarin red s skeletons by clearing and embedding in polyester resins. *Stain Technology*, 61(3), 145-149.
DOI: <https://doi.org/10.3109/10520298609110724>
- Dawson, A. B. (1926). A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Stain Technology*, 1(4), 123-124.
DOI: <https://doi.org/10.3109/10520292609115636>

- Deonarine, V., Potts, D. G., Deck, M. D., & Grossman, C. B. (1972). Preparation of plastic mounted brain specimens. *Neuroradiology*, 4(4), 197-201.
DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02469129>
- Gray, P. (1929). The preparation of alizarin transparencies. *Museums Journal*, 28(11).
- Grimsrud, O. K., & Dugstad, G. (1975). A simple method for embedding anatomical specimens. *Neuroradiology*, 10(3), 143-145.
DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00341815>
- Hocking, B. (1953). Plastic Embedding of Insects-A Simplified Technique. *The Canadian Entomologist*, 85(1), 14-18.
DOI: <https://doi.org/10.4039/Ent8514-1>
- Hollister, G. (1934). Clearing and dyeing fishes for bone study. *Zoologica*, 12, 89-101.
DOI: <https://doi.org/10.5962/p.203729>
- Kampmeier, O. F., & Haviland, T. N. (1948). On the mounting of anatomical museum specimens in transparent plastics. *The Anatomical Record*, 100(2), 201-231.
DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.1091000205>
- Kampmeier, O. F., & Hospodar, E. W. (1951). Mounting of stained serial slices of the brain as wet specimens in transparent plastic. *The Anatomical Record*, 110(1), 1-15.
DOI: <https://doi.org/10.1002/ar.1091100102>
- Kerns, J. L. (1953). An improved technique of embedding specimens in transparent plastic. *The Anatomical Record*, 117(3), 345-351.

Larsson, S. Å. (1975). A new method for the embedding of small animals and organs in plastic. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section A Pathology*, 83(1), 77-79.

DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1975.tb01359.x>

Lataster, L. M. A., & Drukker, J. (1986). Embedding in plastic of early embryonic stages of the chicken for teaching purposes. *Journal of Audiovisual Media in Medicine*, 9(1), 17-21.

DOI: <https://doi.org/10.3109/17453058609156013>

Lipman, H. J. (1935). Staining the skeleton of cleared embryos with alizarin red S. *Stain Technology*, 10(2), 61-63.

DOI: <https://doi.org/10.3109/10520293509116011>

Mall, F. P. (1906). On ossification centers in human embryos less than one hundred days old. *American Journal of Anatomy*, 5(4), 433-458.

DOI: <https://doi.org/10.1002/aja.1000050403>

Mawhinney, W. H., & Ellis, H. A. (1983). A technique for plastic embedding of mineralised bone. *Journal of clinical pathology*, 36(10), 1197.

DOI: <https://doi.org/10.1136/jcp.36.10.1197>

Martinez, A. J., & Astruc, J. (1975). Embedding brain specimens in transparent plastic. *American Journal of Clinical Pathology*, 63(2), 199-202.

DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcp/63.2.199>

Parra-Castañeda, R., Rivera-Gonzaga, J. A., Ancona-Meza, A. L., Ávila, A. M., Morales, S. L., & Calderón, J. Z. (2018). Polimetilmetacrilato, una alternativa viable para la fabricación de prótesis craneal. *Educación y Salud Boletín Científico Instituto de Ciencias de la*

Salud Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 7(13), 49-53.

DOI: <https://doi.org/10.29057/icsa.v7i13.3463>

Peker, T., Gülekon, N., Anıl, A., Turgut, H. B., & Liman, F. (2003). Clearing and embedding in polyester resin for demonstrating the nerve distribution pattern of skeletal muscles.

Biotechnic & Histochemistry, 78(3-4), 187-190.

DOI: <https://doi.org/10.1080/10520790310001594026>

Pérez-Bautista, D. S. (2019) Estandarización del encapsulado con resina poliéster de especímenes transparentados de vertebrados. [Tesis para obtener el título de: Biólogo, Universidad Nacional Autónoma de México].

Repositorio institucional de la Universidad Nacional Autónoma de México

URL: <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3459506>

Piovesana, M., Gerbasi, J. R., & Vigliano, F. A. (2014). Diafanización: Una técnica que permite la visualización diferencial de cartílago y hueso para el estudio del desarrollo y malformaciones en peces [Archivo PDF].

URL: <http://dp000393.ferozo.com/Revista/Revista%202014.pdf>

Real Academia Española, Diccionario de la lengua española. (2023) *diáfano*, *na*. Recuperado el 2 de Julio de 2024 de <https://dle.rae.es/di%C3%A1fano>

Romero-Oliva, O. J., & González-Rodríguez, K. A. (2019). Optimización de la técnica diafanización y tinción de Piovesana (2014), aplicada para el pez *Gymnocorymbus ternetzi*. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 7(13), 41-46.

DOI: <https://doi.org/10.29057/icbi.v7i13.3424>

- Romero-Oliva, O. J., Sánchez, E. M. O., Méndez, J. P., y García, F. P. (2021). Técnica optimizada de diafanización y tinción: herramienta para estudios ecotoxicológicos en Actinopterigios. *Manglar*, 18(2), 143-148.
DOI: <http://dx.doi.org/10.17268/manglar.2021.019>
- Sandoval, D., Téllez, J., Rivera, G., Moreno, S., & Moreno, F. (2016). Técnica de diafanización para describir el desarrollo embrionario del sistema óseo. Revisión de la literatura. *Universitas Médica*, 57(4), 488-501.
DOI: <https://doi.org/10.11144/Javeriana.umed57-4.tddd>
- Secretaría de Economía, DataMéxico. (s.f.). *Investigadores y Especialistas en Ciencias Exactas, Biológicas, Ingeniería, Informática y en Telecomunicaciones*. Recuperado el 2 de Julio de 2024 de <https://www.economia.gob.mx/datamexico/es/profile/occupation/investigadores-y-especialistas-en-ciencias-exactas-biologicas-ingenieria-informatica-y-en-telecomunicaciones?typeJob3=formalOption>
- Trueman, D., Jackson, S. W., & Trueman, B. (1998). An automated technique for double staining rat and rabbit fetal skeletal specimens to differentiate bone and cartilage. *Biotechnic & histochemistry*, 74(2), 98-104.
DOI: <https://doi.org/10.3109/10520299909066484>
- Williams, T. W. (1941). Alizarin red S and toluidine blue for differentiating adult or embryonic bone and cartilage. *Stain technology*, 16(1), 23-25.
DOI: <https://doi.org/10.3109/10520294109106191>

Whitaker, J., & Dix, K. M. (1979). Double staining technique for rat foetus skeletons in teratological studies. *Laboratory animals*, 13(4), 309-310.

DOI: <https://doi.org/10.1258/002367779780943233>

Anexos

Anexo 1

Etiquetas utilizadas para la identificación y señalización de las muestras.

*Laboratorio de Anatomía
Animal Comparada*



Técnica de conservación : transparentación con doble tinción y encapsulado en resina poliéster cristal.

Nombre científico: *Dryophytes eximius*.

Elaborado por: Alan Eduardo Rodriguez Grifaldo.

Fecha: Agosto 2024

FES IZTACALA UNAM

*Laboratorio de Anatomía
Animal Comparada*



Técnica de conservación : transparentación con doble tinción y encapsulado en resina poliéster cristal.

Nombre científico: *Xenopus laevis*.

Elaborado por: Alan Eduardo Rodriguez Grifaldo.

Fecha: Agosto 2024

FES IZTACALA UNAM

Anexo 2

Cuestionarios implementados para la evaluación de las muestras.



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Iztacala



Cuestionario de opinión

1. ¿Cómo consideras la calidad de este material?

- Muy mala
- Mala
- Presentable
- Buena
- Excelente

2. ¿Crees que te sería útil durante la carrera?

- Inútil
- Poco útil
- En algunas materias
- Útil
- Realmente útil

3. ¿Puedes diferenciar estructuras esqueléticas a través de la tinción?

- Ninguna estructura
- Pocas estructuras
- Algunas estructuras
- Casi todas las estructuras
- Todas las estructuras

4. **¿Cuál es el tipo de transparencia de la muestra?**

- Demasiado opaca**
- Opaca**
- Medianamente clara**
- Clara**
- Cristalina**

5. **¿Consideras que tiene valor para la ciencia?**

- Ninguno**
- Podría tenerlo**
- En algunas ocasiones**
- Tiene valor**
- Es muy valioso**

6. **¿En qué nivel este material cautiva tu curiosidad e interés?**

- Nulo**
- Muy poco**
- regular**
- Mucho**
- Demasiado**

7. **¿Cuáles daños crees que existan con respecto a las muestras en frascos?**

- Los mismos daños**
- Menos daños**
- Pocos daños**
- Casi ningún daño**
- Ningún daño**

8. **¿Crees que son materiales costosos de realizar?**

- Inaccesibles**
- Muy costosos**
- Costosos**
- Accesibles**
- Económicos**

9. ¿Habías visto o escuchado de esta técnica de preservación?

- Nunca había visto o escuchado de ella**
- Recuerdo haberla visto**
- La conocía, pero sabía muy poco de ella**
- La conocía y entendía**
- La reconocí porque es realmente popular**

10. ¿Crees que este material ayudaría a difundir estas técnicas de conservación?

- No creo que ayude**
- Podría ayudar**
- Ayudaría**
- realmente ayudaría**
- Definitivamente ayudaría**