

Protocolo de diafanización y tinción ósea específico para *Sceloporus grammicus* (Tschudi, 1845)

Specific protocol for diaphanization and bone staining in *Sceloporus grammicus* (Tschudi, 1845)

Oscar Jesús Romero-Oliva ^a

Abstract:

Introduction: Diaphanization, a specialized histological process that utilizes chemical substances such as potassium hydroxide (KOH), allows for the clarification of soft tissues without affecting hard tissues like bones and cartilage. This is of vital importance in anatomical, ecotoxicological, and comparative studies. **Materials and Methods:** Heuristic trials were conducted, adjusting the concentrations proposed by Romero and González [4], for the fish *Gymnocorimbis ternetzi*, specifically for *Sceloporus grammicus*. Two specimens of *S. grammicus* were used, each with different chemical and temporal concentrations. Subsequently, the transparency of each was analyzed using the opacity histogram with the distribution of values in the alpha channel, with the aim of finding significant differences through a Student's t-test. **Results:** A statistically significant difference in transparency between specimens A and B was identified ($t = 4.5017$, $p < 0.0001$). Lizard B showed a considerably higher average transparency (211.92) compared to Lizard A (157.71). The 95% confidence intervals, both parametric and bootstrap, strongly supported the importance of this disparity. **Conclusions:** Adapting existing techniques, as in this study, is crucial to optimize results and ensure applicability. The variation between eviscerated and intact specimens highlights the dilemma of balancing transparency and structural integrity. The rapid transparency in the eviscerated specimen may cause fragility, while the technique in the intact specimen is more gradual but potentially more effective in structural conservation. Given the lack of specific protocols for each species, this study contributes to the knowledge of histological techniques.

Keywords:

Alizarin Red, Diaphanization, Ecotoxicology, Opacity Histogram, Potassium Hydroxide

Resumen:

Introducción: La diafanización, un proceso histológico especializado que utiliza sustancias químicas como el hidróxido de potasio (KOH), permite la clarificación de tejidos blandos sin afectar los tejidos duros como huesos y cartílagos. Esto es de vital importancia en estudios anatómicos, ecotoxicológicos y comparativos. **Materiales y métodos:** Se realizaron ensayos heurísticos ajustando las concentraciones propuestas por Romero y González [4], para el pez *Gymnocorimbis ternetzi*, específicas para *Sceloporus grammicus*. Se trabajó con dos ejemplares de *S. grammicus*, cada uno con diferentes concentraciones químicas y temporales. Posteriormente se analizó la transparencia de cada uno con el histograma de opacidad con la distribución de valores en el canal alfa, con la finalidad de buscar diferencias significativas a través de una t de student. **Resultados:** Se identificó una diferencia estadísticamente significativa en la transparencia entre los ejemplares A y B ($t = 4.5017$, $p < 0.0001$). La Lagartija B mostró una media de transparencia considerablemente más alta (211.92) que la Lagartija A (157.71). Los intervalos de confianza al 95%, tanto paramétricos como mediante bootstrap, respaldaron de manera sólida la importancia de esta disparidad. **Conclusiones:** Adaptar técnicas existentes, como en este estudio, es crucial para optimizar resultados y garantizar aplicabilidad. La variación entre ejemplares eviscerados e intactos destaca el dilema de equilibrar transparencia y la integridad estructural. La rapidez en la transparencia del ejemplar eviscerado puede causar fragilidad, mientras que la técnica en el ejemplar intacto es más gradual pero potencialmente más efectiva en la conservación estructural. Dada la falta de protocolos específicos para cada especie, este estudio aporta al conocimiento de técnicas histológicas.

Palabras Clave:

Ecotoxicología, Diafanización, Hidróxido de potasio, Histograma de opacidad, Rojo de alizarina

^a Autor de Correspondencia, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería | Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo | Pachuca-Hidalgo, México, <https://orcid.org/0000-0003-4440-8932>, Email: oscar_romerol@uaeh.edu.mx

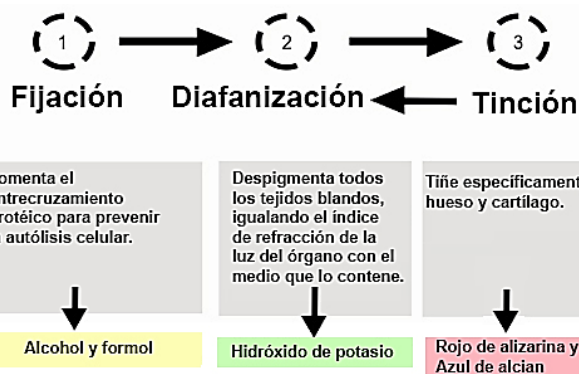


Figura 1. Esquema general de la técnica de diafanización y tinción, modificado de Romero-González (2019).

1. Introducción

El término "diáfano" es un adjetivo calificativo utilizado para caracterizar algo que es transparente, extremadamente claro o que permite que la luz lo atraviese fácilmente sin obstrucciones [4]. Se utiliza de manera figurada para denotar algo claro o comprensible, especialmente en el contexto de ideas o explicaciones.

La diafanización es un proceso histológico especializado que implica diversas etapas en las que se utilizan diferentes sustancias químicas, siendo el hidróxido de potasio (KOH) notablemente significativo debido a sus capacidades corrosivas.

La corrosividad característica del KOH facilita la clarificación de tejidos blandos en una muestra histológica, revelando detalles microscópicos dentro de estos tejidos [1].

Un aspecto particularmente ventajoso de la diafanización es que los tejidos duros, como los huesos y el cartílago, no se ven afectados por este proceso. Esto proporciona la ventaja de estudiar estos tejidos sin la necesidad de disecciones anatómicas que podrían comprometer la estructura original, especialmente en especies pequeñas [7, 8]. Existen varios métodos para diafanizar una muestra, algunos de los cuales tiñen específicamente tejidos duros como los huesos y el cartílago, además de volver transparente al organismo.

Esta técnica histológica encuentra diversas aplicaciones en el campo de la investigación biológica y la anatomía comparada. Una aplicación común es la identificación de centros de osificación en embriones y fetos de animales y humanos, proporcionando información crucial sobre el desarrollo óseo [2].

Además, se utiliza para realizar comparaciones detalladas de las características óseas entre diferentes especies, contribuyendo a una mejor comprensión de la evolución y las diferencias anatómicas entre ellas. El proceso de diafanización y la tinción específica generalmente siguen un patrón básico que consta de tres etapas fundamentales: fijación, diafanización y tinción específica, tal como se muestra en la Figura 1.

Estas etapas son cruciales para preparar adecuadamente las muestras y resaltar estructuras específicas para análisis posteriores. En cuanto a la tinción de tejidos óseos y cartilaginosos, se utilizan colorantes específicos como el rojo de alizarina para los huesos y el azul de Alcian para el cartílago para mejorar la visualización de estas estructuras. La transparencia se puede aplicar a diversos organismos, incluyendo peces, mamíferos, reptiles y otros taxones [3, 5, 6, 8, 9].

2. Materiales y métodos

Utilizando un enfoque heurístico, se llevaron a cabo iterativos ensayos de prueba y error para ajustar las concentraciones establecidas por Romero y González [4] específicamente para *S. grammicus*. Este proceso tuvo en cuenta la composición y estructura de las escamas, como se detalla en la Tabla 1. Cabe señalar que, a pesar de ciertas generalidades, la amplia diversidad entre peces y reptiles puede dar lugar a variaciones significativas en estas características entre diferentes especies.

Tabla 1. Cuadro comparativo entre escamas de peces y escamas de lagartijas, elaborada a partir de Kapoor y Khanna [10] y Zug *et al.* [11].

Característica	Escamas de peces	Escamas de lagartijas
Composición	Mayormente compuestas de dentina y esmalte.	Variedad de composiciones, incluyendo queratina en la mayoría.
Tipo de escamas	Ganoides, cicloides, ctenoides o placoides, según la especie.	Variadas, incluyendo escamas dérmicas y placoides (en algunos casos).
Ubicación	Cubren todo el cuerpo del pez, incluso la cabeza.	Cubren el cuerpo, pero a menudo dejan áreas más flexibles como el vientre.
Flexibilidad	Menos flexibles, proporcionan protección contra	Variedad en la flexibilidad, algunas

	depredadores y más rígidas y otras ayudan en la natación.	y la más flexibles.
Crecimiento	Crecimiento constante, con nuevas capas añadidas a medida que el pez crece.	Pueden cambiar o mudar las escamas para permitir el crecimiento.
Funciones principales	Protección contra depredadores, reducción de la resistencia al agua en la natación.	Protección contra depredadores, termorregulación, y algunas permiten cambios en el color.
Renovación de escamas	Algunas especies pueden perder y regenerar escamas. Formas y texturas variadas dependiendo de la especie.	Algunas especies pueden mudar o cambiar escamas. Variedad de formas y texturas, desde lisas hasta quilladas.
Forma y textura	Múltiples capas con estructuras específicas, como odontoides y ganoides.	Capas dérmicas con patrones característicos, a menudo sin odontoides.
Estructura microscópica	Pueden contribuir a la flotación y regulación de la flotabilidad.	Algunas especies utilizan escamas para camuflarse o comunicarse visualmente.
Funciones adicionales		

El estudio se llevó a cabo empleando dos ejemplares, ambos encontrados en estado de fase cadavérica fresca de autólisis en Mineral del Monte, Hidalgo, México (Figura 2).

La NOM-126-ECOL-2000, la cual establece las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional, no ofrece directrices específicas para abordar situaciones de este tipo. En consecuencia, se procedió a notificar a la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de Hidalgo (SEMARNATH) mediante el envío de un oficio de redacción libre, con fecha del 06/03/24, dirigido a la Dirección General de Recursos Naturales, con copia remitida a la Procuraduría Estatal de Protección al Ambiente (PROFEPA).

Cada uno de estos ejemplares fue inmerso en recipientes de plástico con distintas concentraciones de diversas sustancias químicas, cada una con intervalos de tiempo específicos, tal como se ilustra en la Tabla 2.

Tabla 2. Comparación de pasos metodológicos para la diafanización y tinción de dos ejemplares.

Ejemplar A (eviscerado)		Ejemplar B (intacto)	
Solución	Tiempo en días	Solución	Tiempo en días
Alcohol al 70%.	17	Alcohol al 70%.	17
50 mL de agua destilada + 7 mL de KOH + 20 mL de glicerina + 1 g de rojo de alizarina.	4	50 mL de agua destilada + 15 mL de KOH + 40 mL de glicerina + 2 g de rojo de alizarina.	4
Alcohol al 70%.	2	Alcohol al 70%.	2
12 mL de glicerina + 40 mL de agua destilada + 1 mL de agua oxigenada + 2.5 mL de KOH.	7	12 mL de glicerina + 40 mL de agua destilada + 1 mL de agua oxigenada + 2.5 mL de KOH.	7
		30 mL de glicerina.	7

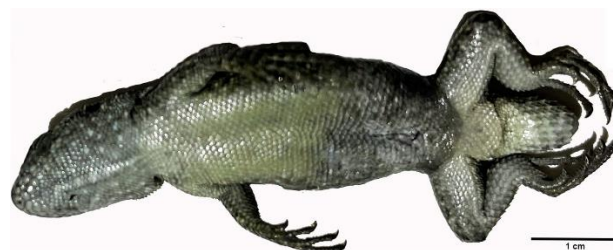


Figura 2. *Sceloporus grammicus* en vista ventral después de estar sumergido en alcohol al 70% por 17 días.

La mejora de la técnica de diafanización y tinción [4], se distingue por su capacidad para reducir significativamente los costos monetarios asociados. En el contexto de este estudio, queda patente que esta técnica, aplicada de manera extrapolada a *S. grammicus*, mantiene una alta eficiencia económica, como se detalla en la Tabla 3 y 4.

Tabla 3. Costos generales en dólares americanos de los reactivos en presentaciones comerciales populares (promedio de cinco proveedores de reactivos químicos).

Reactivo	Cantidad	Precio
Alcohol al 70%	500 mL	\$4.33 USD
Agua destilada	20 L	\$14.43 USD
Hidróxido de potasio	25 kg	\$103.86 USD
Rojo de alizarina	100 g	\$155.79 USD
Glicerina	1 L	\$11.54 USD
Agua oxigenada	480 mL	\$2.60 USD

Tabla 4. Costos en dólares americanos de los reactivos empleados para los dos ejemplares diafanizados de *S. grammicus*.

Reactivo	Cantidad	Precio
Alcohol al 70%	100 mL	\$0.87 USD
Agua destilada	180 mL	\$0.13 USD
Hidróxido de potasio	27 g	\$0.11 USD
Rojo de alizarina	3 g	\$4.67 USD
Glicerina	84 mL	\$0.97 USD
Agua oxigenada	2 mL	\$0.058 USD

Finalmente se llevó a cabo un análisis estadístico utilizando la prueba t de Student para dos variables independientes en el programa estadístico PAST, con el objetivo de identificar posibles diferencias significativas entre los ejemplares en términos de transparencia [12, 13, 14]. Las variables comparativas se extrajeron de las fotografías de cada ejemplar, utilizando el histograma de opacidad con la distribución de valores en el canal alfa en Adobe Photoshop CS6 [15, 16, 17]. Este enfoque meticuloso permitió una evaluación cuantitativa y objetiva de la transparencia, buscando discernir si uno de los ejemplares logró una mayor transparencia en comparación con el otro. Debido a que los valores más cercanos a 255 indican una mayor transparencia, en contraste, los valores más bajos indican lo contrario.

3. Resultados

Existe una diferencia estadísticamente significativa en el nivel de transparencia entre los dos ejemplares ($t = 4.5017$, $p < 0.0001$).

Específicamente, la Lagartija A (Figura 3) exhibió una media de transparencia notablemente menor (157.71) en comparación con la Lagartija B (211.92) (Figura 4).

Los intervalos de confianza al 95%, tanto paramétrico como mediante bootstrap, respaldaron de manera robusta la significancia de esta disparidad.

Este enfoque metodológico, que incorpora técnicas de diafanización y tinción ósea, proporciona una evaluación cuantitativa precisa de las diferencias técnicas entre cada paso metodológico.

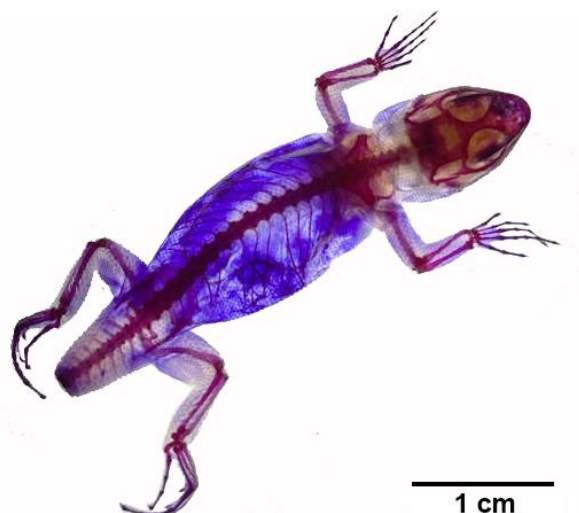


Figura 3. Lagartija A. Se conserva intacta estructuralmente, se encuentra diafanizada y teñida, pero en la zona abdominal aún existen manchas de colorante.

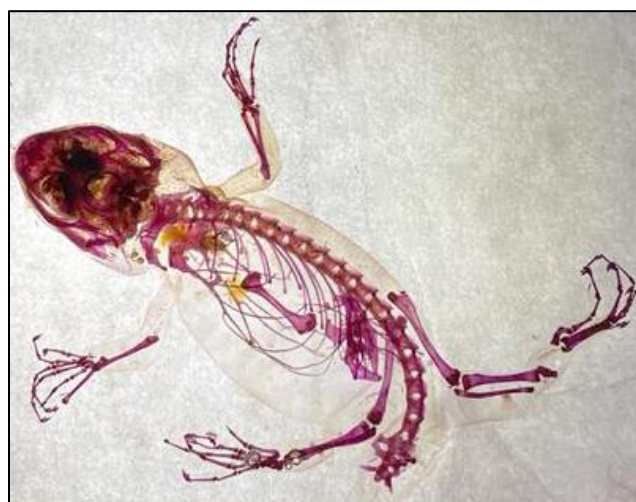


Figura 4. Lagartija B. Alterada estructuralmente pero se encuentra completamente diafanizada y teñida.

El análisis óseo resulta beneficioso en ambos ejemplares, si bien la lagartija B exhibe mayor claridad y transparencia (F), sufre daños estructurales que conllevan una pérdida de información valiosa. En contraste, a pesar de que el nivel de transparencia de la lagartija A es inferior, su visualización en estereoscopía resulta completamente útil para contribuir al estudio óseo (A, B, C, D y E) (Figura 5).

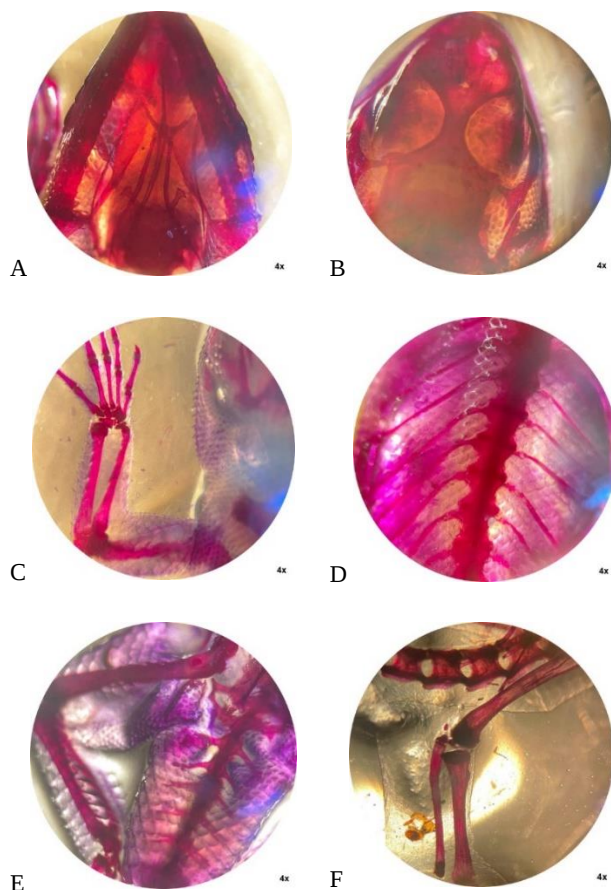


Figura 5. Microfotografías en estereoscopio Levenhuk 3ST con un aumento de 4x. A. Cráneo en vista ventral. B. Cráneo en vista dorsal. C. Miembro anterior izquierdo en vista dorsal. D. Región dorsal. E. Cola postanal en vista dorsal. F. Miembro inferior derecho.

4. Discusión

La variación en los resultados observados entre los dos ejemplares bajo estudio proporciona una perspectiva valiosa sobre la eficacia y las implicaciones de los procedimientos aplicados.

El ejemplar A, que experimentó un tratamiento que implicaba la evisceración y una concentración menos elevada de KOH, exhibió un aclaramiento gradual e imperfecto. Aunque el proceso fue más lento, se sugiere que podría ser más efectivo en términos de preservar la integridad estructural del espécimen.

En contraste, el ejemplar B, sometido a un tratamiento con una solución de KOH más elevada y evisceración toracoabdominal, logró una transparencia total de manera rápida. Sin embargo, este proceso resultó en una estructura extremadamente frágil, evidenciando una pérdida

significativa de integridad durante la manipulación en el laboratorio. Estos hallazgos destacan la importancia de equilibrar la rapidez en la transparencia con la preservación estructural al aplicar técnicas de diafanización y tinción ósea en lagartijas.

5. Conclusiones

La diafanización, combinada con la tinción ósea, es una herramienta valiosa en estudios morfológicos, permitiendo la visualización detallada de estructuras internas. Sin embargo, la efectividad de esta técnica varía según la especie y las condiciones específicas del estudio.

La adaptación de técnicas existentes, como se realizó en este estudio, es crucial para optimizar los resultados y garantizar la aplicabilidad a la especie de interés.

La variación en los resultados entre los ejemplares eviscerado e intacto destaca un dilema común en estudios de diafanización: el equilibrio entre lograr transparencia y mantener la integridad estructural. La transparencia rápida alcanzada por el ejemplar eviscerado puede ir acompañada de una fragilidad significativa, lo que subraya la importancia de considerar cuidadosamente la manipulación durante el proceso. Por otro lado, la técnica aplicada al ejemplar intacto demostró ser más gradual pero potencialmente más efectiva en la conservación de la integridad estructural.

Debido a la inexistencia de protocolos de diafanización y tinción específicos para cada especie, este estudio contribuye significativamente al conocimiento avanzado de técnicas histológicas.

Agradecimientos

A mi destacada alumna Yamila Becerril Vivar, por su aporte técnico en este trabajo.

Conflicto de intereses

El autor declara no tener conflictos de interés relevantes en relación con este artículo. Este trabajo se realizó de manera independiente y no ha recibido financiación específica de agencias en los sectores público, comercial o sin fines de lucro que pudiera haber influido en su contenido.

Referencias

- [1]. Sandoval D, Téllez J, Rivera G, Moreno S, Moreno F. Técnica de diafanización para describir el desarrollo embrionario del sistema óseo. Revisión de la literatura. Univ. Med. 2016; 57(4): 488-501.
- [2]. García A, Gómez FA. Técnica de diafanización con alizarina para el estudio del desarrollo óseo. Rev Colomb Salud Libre. 2015; 10(2):109-115.
- [3]. Labarta AB, Cuadros MV, Gualtieri A, Sierra LG. Evaluación de la morfología radicular interna de premolares inferiores mediante la técnica de diafanización, obtenidos de una población argentina. Rev Cient Odontol. 2016; 12(1):19-27.
- [4]. Romero-Oliva OJ, González-Rodríguez KA. Optimización de la técnica diafanización y tinción de Piovesana (2014), aplicada para el pez *Gymnocorymbus ternetzi*. Padi Boletín Cient Cienc Bás Ing ICBI. 2019; 7(13):41-46.
- [5]. Hernández-Gil Y, Lara-Uc M, Reséndiz E. Comparación de técnicas de diafanización para la observación de estructuras óseas de crías de *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1824) (Reptilia, Cheloniidae). Cienc Mar. 2015; 24(56):19-27.
- [6]. Gutiérrez-Pech GA, Sánchez-Fabila G, Moreno-Colín R, Del-Moral-Flores LF, Rodríguez-Trinidad IDLÁ, Torres-Salazar F. Diafanización dental de cuatro especies de seláceos (*Carcharhinus leucas*, *Galeocerdo cuvier*, *Rhizoprionodon longurio* y *Sphyrna* sp). Int J Morphol. 2020; 38(4):970-974.
- [7]. Oliva OJR, Sánchez EMO, Méndez JP, García FP. Técnica optimizada de diafanización y tinción: herramienta para estudios ecotoxicológicos en Actinopterygios. Manglar. 2021; 18(2):143-148.
- [8]. Rejala R, Ramírez TÁ, Alvarenga A, Coronel A, Alborn Á, Sirai P, Romero A. La diafanización como alternativa metodológica para el estudio anatómico de un pez. Rev Cient Estud Investig. 2019; 8:207-208.
- [9]. Torres Torres AM, Trespalacios C, Pachón Barbosa NA, Ruda N. Diafanización como alternativa metodológica para el estudio anatómico en reptiles de la clase Sauropsida. Mem. IV Cong. Nac. Bio. 2017; 689-699.
- [10]. Kapoor BG, Khanna B. Ichthyology handbook. Springer Science & Business Media; 2004.
- [11]. Zug GR, Vitt L, Caldwell JP. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. Academic press; 2001.
- [12]. González MAM, Villegas AS, Atucha ET, Fajardo JF (Eds.). Bioestadística amigable. Elsevier; 2020.
- [13]. Castro EM. Bioestadística aplicada en investigación clínica: conceptos básicos. Rev Med Clín Las Condes. 2019;30(1):50-65.
- [14]. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. [Software]. Universidad de Oslo. Disponible en: <https://folk.uio.no/ohammer/past/>
- [15]. Moya JA. Procesamiento y análisis de imágenes digitales. Instituto Tecnológico de Costa Rica; 2012.
- [16]. Pearson H. Image manipulation: CSI: cell biology. Nature. 2005; 434(7036):952-954.
- [17]. Adobe Systems Incorporated. Adobe Photoshop CS6 [Software]. Adobe Systems Incorporated.
- [18]. Tschudi JJ. Untersuchungen über die Fauna Perus. Arch Naturgesch. 1845;11(1):183-204.