



**UNIVERSIDAD DEL MAR  
CAMPUS PUERTO ESCONDIDO**

---

---

**EVALUACIÓN DE TRES TÉCNICAS DE DIAFANIZACIÓN  
EN ESPECIES DE VERTEBRADOS PARA LA COLECCIÓN  
DEL LABORATORIO DE COLECCIONES BIOLÓGICAS**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
LICENCIADO EN ZOOTECNIA**

**PRESENTA**

**JONATHAN ESAU LAZARO JUAREZ**

**DIRECTOR**

**DR. JESÚS GARCÍA GRAJALES**

**PUERTO ESCONDIDO, OAXACA 2021**

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo se lo dedicó a mis padres Gustavo Everardo Lázaro Godínez y Silvia Brígida Juárez Martínez, agradeciéndoles siempre por su cariño, paciencia, consejos y valores. Así como, por estar al pendiente de mí pese a la distancia y por la motivación constante en todo momento.

A mi hermana Evelyn, que siempre estuvo apoyándome y me motiva para seguir adelante.

A mis abuelos por su cariño y apoyo en todo momento de mi vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia en general y en especial a mis padres por su apoyo incondicional durante esta etapa, ya que me han impulsado a cumplir mis metas.

Al Laboratorio de Colecciones Biológicas de la Universidad del Mar, campus Puerto Escondido. Por el espacio y las facilidades para llevar a cabo este proyecto.

A mi director de tesis, el Dr. Jesús García Grajales por su amistad, enseñanzas, consejos, tiempo y paciencia en la revisión de este trabajo.

A la M.C. Alejandra Buenrostro Silva por su amistad, enseñanzas, consejos, tiempo y paciencia en la revisión de este trabajo.

Al M.V.Z Samuel Uriel Villagómez Durán por compartir sus conocimientos, la amistad, enseñanzas, recomendaciones y consejos durante la revisión del trabajo.

Al Dr. José Luis Arcos García por los consejos, comentarios y experiencia que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Juan Francisco Meraz por sus consejos, sugerencias y apoyo al presente trabajo.

A mis compañeros de generación 2012-2017 y mis grandes amigos Alejandro Méndez Reyes y Julio Orlando Gonzales Ramos.

A los alumnos que se agregaron como voluntarios en el Laboratorio de Colecciones Biológicas.

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE ANEXOS.....	vi
RESUMEN.....	vii
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Estrategias de Enseñanza-Aprendizaje para el estudio de la anatomía animal .....	1
2. ANTECEDENTES .....	2
2.1 Técnicas y métodos de conservación en anatomía .....	2
2.1.1 Osteotecnia.....	3
2.1.2 Plastinación .....	3
2.1.3 Repleción vascular.....	4
2.1.4 Glicerinado fenolado .....	4
2.1.5 Método de Walther-Thiel.....	5
2.1.6 Diafanización .....	5
2.2 Origen de la diafanización.....	6
2.3 Diafanización como técnica anatómica .....	7
2.3.1 Proceso de diafanización .....	8
2.4 Estudios de diafanización en México .....	10
3. JUSTIFICACIÓN .....	11
4. HIPÓTESIS .....	12
5. OBJETIVOS .....	13
5.1 Objetivo general.....	13
5.2 Objetivos específicos .....	13
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	14
6.1 Área de estudio .....	14
6.2 Trabajo de laboratorio .....	15
6.2.1 Origen de los especímenes .....	15
6.2.2 Procesamiento previo de los especímenes .....	16
6.2.3 Agrupamiento de los especímenes.....	16

6.3 Tratamientos evaluados .....	18
6.3.1 Técnica de Dawson (TA) .....	18
6.3.2 Técnica de Taylor (TB) .....	19
6.3.3 Técnica de Dawson modificada (TC) .....	20
6.4 Trabajo de gabinete .....	22
6.4.1 Aplicación de la evaluación cualitativa .....	22
6.4.2 Diseño experimental y análisis estadístico .....	24
7. RESULTADOS .....	25
7.1 Aves (Grupo uno) .....	25
7.1.1 Evaluación cualitativa del grupo de aves .....	28
7.2 Peces (Grupo dos) .....	29
7.2.1 Evaluación cualitativa del grupo de peces .....	31
7.3 Mamíferos (Grupo tres) .....	32
7.3.1 Evaluación cualitativa del grupo de mamíferos .....	34
7.4 Anfibios (Grupo cuatro) .....	35
7.4.1 Evaluación cualitativa del grupo de anfibios .....	38
7.5 Reptiles (Grupo cinco) .....	39
7.5.1 Evaluación cualitativa del grupo de reptiles .....	42
8. DISCUSIÓN .....	44
8.1 Técnica de Dawson (A) .....	46
8.2 Técnica de Taylor (B) .....	47
8.3 Técnica de Dawson modificada (C) .....	49
9. CONCLUSIÓN .....	52
10. RECOMENDACIONES .....	53
11. LITERATURA CITADA .....	54
12. ANEXOS .....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I.</b>	Distribución de los especímenes en los tratamientos a evaluar.....	16
<b>Tabla II.</b>	Pesos promedio de los especímenes por grupos.....	17
<b>Tabla III.</b>	Escala Likert utilizada en la evaluación visual.....	22
<b>Tabla IV.</b>	Esquema del experimento.....	24
<b>Tabla V.</b>	Resultados y características observadas en las aves diafanizadas.....	25
<b>Tabla VI.</b>	Resumen de los resultados de costo (pesos) y tiempo (días) para el grupo de aves.....	26
<b>Tabla VII.</b>	Resultados de la evaluación cualitativa para el grupo de aves.....	28
<b>Tabla VIII.</b>	Resultados y características observadas en los peces diafanizados.....	29
<b>Tabla IX.</b>	Resumen de los resultados de costo (pesos) y tiempo (días) para el grupo de peces.....	30
<b>Tabla X.</b>	Resultados de la evaluación cualitativa para el grupo de peces.....	31
<b>Tabla XI.</b>	Resultados y características observadas en los mamíferos diafanizados.....	32
<b>Tabla XII.</b>	Resumen de los resultados de costo (pesos) y tiempo (días) para el grupo de mamíferos.....	34
<b>Tabla XIII.</b>	Resultados de la evaluación cualitativa para el grupo de mamíferos.....	35
<b>Tabla XIV.</b>	Resultados y características observadas en los anfibios diafanizados.....	36
<b>Tabla XV.</b>	Resumen de los resultados de costo (pesos) y tiempo (días) para el grupo de anfibios.....	38
<b>Tabla XVI.</b>	Resultados de la evaluación cualitativa para el grupo de anfibios.....	39

<b>Tabla XVII.</b>	Resultados y características observadas en los reptiles diafanizados.....	40
<b>Tabla XVIII.</b>	Resumen de los resultados de costo (pesos) y tiempo (días) para el grupo de reptiles.....	42
<b>Tabla XIX.</b>	Resultados de la evaluación cualitativa para el grupo de reptiles.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Ubicación del Laboratorio de Colecciones Biológicas (marca en rojo) dentro de las instalaciones de la Universidad del Mar, campus Puerto Escondido (polígono en rojo) .....	14
<b>Figura 2.</b>	Aves diafanizadas, mostrándose en vista ventral (izquierda) y vista dorsal (derecha).....	27
<b>Figura 3.</b>	Peces diafanizados, mostrándose en vista lateral.....	30
<b>Figura 4.</b>	Mamíferos diafanizados, mostrándose en vista ventral (izquierda) y vista dorsal (derecha).....	33
<b>Figura 5.</b>	Anfibios diafanizados, mostrándose en vista ventral (izquierda) y vista dorsal (derecha).....	37
<b>Figura 6.</b>	Reptiles diafanizados, mostrándose en vista ventral (izquierda) y vista dorsal (derecha).....	41

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo I.</b>	Diseño de encuestas.....	65
<b>Anexo II.</b>	Diagrama del proceso de la técnica de Dawson.....	66
<b>Anexo III.</b>	Diagrama del proceso de la técnica de Taylor.....	67
<b>Anexo IV.</b>	Diagrama del proceso de la técnica de Dawson modificada.....	68
<b>Anexo V.</b>	Presupuesto de reactivos químicos.....	69
<b>Anexo VI.</b>	Descripción del procedimiento de diafanización para el grupo uno.....	70
<b>Anexo VII.</b>	Descripción del procedimiento de diafanización para el grupo dos.....	71
<b>Anexo VIII.</b>	Descripción del procedimiento de diafanización para el grupo tres.....	72
<b>Anexo IX.</b>	Descripción del procedimiento de diafanización para el grupo cuatro.....	73
<b>Anexo X.</b>	Descripción del procedimiento de diafanización para el grupo cinco.....	74
<b>Anexo XI</b>	Fotografías que ilustran el proceso de diafanización en los diferentes especímenes de vertebrados.....	75

## RESUMEN

Las técnicas para la conservación de piezas anatómicas tienen como objetivo el preservar las características morfológicas de los tejidos por un tiempo prolongado, implementándose como material de apoyo para la enseñanza y el aprendizaje de la anatomía macroscópica en las ciencias médicas y biológicas. La diafanización es una técnica anatómica que nos permite obtener un grado de transparentación en los tejidos blandos mediante el uso de sustancias corrosivas, con el objetivo de visualizar a través de los músculos estructuras óseas teñidas. En el presente trabajo se realizó una evaluación y estandarización de tres técnicas de diafanización aplicadas a cinco grupos de vertebrados; los especímenes fueron procesados y evaluados en el Laboratorio de Colecciones Biológicas de la Universidad del Mar. Para evaluar el grado de transparentación y tinción de las muestras, se realizó una evaluación cualitativa, aplicando una encuesta fundamentada en la escala Likert a una fracción de los estudiantes de la Universidad; los resultados fueron analizados por el estadístico de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ), demostrando que los procedimientos de mayor atractivo visual fueron la técnica de Dawson y Dawson modificada. Para evaluar el costo y tiempo de las técnicas se realizó un análisis de varianza por la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ), señalando como el procedimiento más eficiente la modificación realizada a la técnica de Dawson, seguida de la técnica de Dawson y finalmente la técnica de Taylor. La diafanización demostró ser una técnica de accesible elaboración, visualmente atractiva y que genera material de apoyo para las asignaturas relacionadas con la anatomía animal.

**Palabras clave:** Anatomía, Transparentación, Óseo, Tinción, Vertebrados.

## **1. INTRODUCCIÓN**

La anatomía es la ciencia que describe la forma y estructura de los organismos, etimológicamente la palabra anatomía significa “cortar”, “separar” o “disociar” partes del cuerpo; existiendo una estrecha relación con la fisiología, la cual detalla las funciones del organismo (Sisson *et al.* 1982, Frandson *et al.* 2009). La asignatura de anatomía animal se incluye en la etapa inicial de los planes de estudio de las Licenciaturas en Medicina Veterinaria y Zootecnia así como en Biología, debido a que provee las bases necesarias para comprender las estructuras y funciones de los organismos (Cunningham & Bradley 2009, Aspinall & Cappello 2015, Vélez-García & Ruiz-Lozano 2017), brindando los conocimientos básicos para ser aplicados en semiología, fisiología, inmunología, histología, cirugía, patología, farmacología, toxicología y técnicas quirúrgicas, entre otras (Cunningham & Bradley 2009, Aspinall & Cappello 2015, Vélez-García 2016)

El entendimiento y comprensión de los procesos biológicos del animal, permite maximizar la producción y diagnosticar oportunamente alteraciones anatómicas con el fin de tratarlas o evitarlas (Krahmer & Schröder 1982); así como, la correcta inspección de las canales destinadas para el consumo humano, con el objetivo principal de prevenir la aparición de enfermedades zoonóticas (Ashdown & Done 2012); de ahí, la enorme importancia del aprendizaje de la anatomía en animales domésticos (Krahmer & Schröder 1982, Sisson *et al.* 1982, Ashdown & Done 2012).

### **1.1 Estrategias de Enseñanza-Aprendizaje para el estudio de la anatomía animal**

Para el aprendizaje de la anatomía, el método más eficiente es la interacción con cadáveres o partes de animales; no obstante, el primer contacto del estudiante universitario con temas de anatomía animal es usualmente por medio de imágenes, estas tienden solo a mostrar una porción del espectro gráfico del organismo, provocando un alejamiento de la realidad y creando una limitación en la tridimensionalidad de su representación mental en el estudiante (Fernández *et al.* 2007, Peresan & Adúriz-Bravo 2010); como consecuencia, algunos estudiantes

tendrán dificultades para extraer información relevante de las imágenes complejas (Llorente 2000), esto debido a la inmadurez cognitiva para analizar, describir, identificar, comparar, clasificar, explicar, definir e interpretar las estructuras visuales (Peresan & Adúriz-Bravo 2010).

Para los procesos de enseñanza-aprendizaje, se sugieren diversos recursos como: utilización de materiales multimedia, prácticas frecuentes de disección con cadáveres y uso de técnicas para la conservación de piezas anatómicas (Vélez-García & Ruiz-Lozano 2017); las técnicas de conservación destinadas al aprendizaje de la anatomía permiten una reducción de la dependencia del aprendizaje en el aula, otorgando la posibilidad de manipular las piezas y facilitando la revisión tridimensional de los elementos teóricos del organismo animal (Llorente 2000, Sandoval *et al.* 2015); con ello los estudiantes serán capaces de integrar el conocimiento de las asignaturas relacionadas con la anatomía animal (Fernández *et al.* 2007).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Técnicas y métodos de conservación en anatomía**

La conservación y preparación de piezas anatómicas consiste en la selección, fijación, preparación, conservación, mantenimiento y protección de órganos, segmentos o el espécimen completo, con el objetivo de mantener el color, consistencia y morfología en un estado semejante a lo observado en vida (Olivares *et al.* 2005, Lone *et al.* 2017). Las diferentes técnicas que se mencionarán a continuación se han desarrollado para apoyar el estudio y la investigación de la anatomía macroscópica animal y humana (Jiménez & Isaza 2005, Audisio *et al.* 2013, Cury *et al.* 2013, Lone *et al.* 2017); generando piezas de accesible elaboración y que además puedan ser usadas repetidamente (Jiménez & Isaza 2005, Arruda *et al.* 2011, Rivera *et al.* 2014); estas técnicas dependerán en gran medida de los elementos disponibles y del propósito específico que se busque (Muñetón & Ortiz 2011).

### **2.1.1 Osteotecnia**

Se refiere al conjunto de procedimientos biológicos, químicos y físicos, a los cuales se puede someter un espécimen con el fin de obtener un hueso, segmentos o esqueletos limpios, facilitando la observación de las estructuras óseas (Rodríguez & Ramírez 2009, Riquelme *et al.* 2018). Consta de varios pasos: iniciando con la maceración, limpieza, blanqueado y ensamble del esqueleto (Cañete *et al.* 2014). Gran parte del éxito de la preparación del espécimen será dada por la experiencia del ejecutor, ya que el tiempo excesivo en las soluciones empleadas pueden provocar descalcificación y daño en las piezas (Riquelme *et al.* 2018). La técnica permite el estudio de las articulaciones y su relación con otras estructuras (Vélez-García 2016); puede ser empleada como recurso didáctico y de exhibición, para laboratorios de anatomía, colecciones biológicas o museos (Rodríguez & Ramírez 2009, Cañete *et al.* 2014).

### **2.1.2 Plastinación**

La técnica de plastinación fue creada por el anatomista alemán Gunther von Hagens en la década de los 70's (Jiménez & Isaza 2005, Muñetón & Ortiz 2012, Peralta *et al.* 2017). En este procedimiento, el agua y los lípidos presentes en los tejidos son reemplazados por polímeros curables (silicona epóxica, poliéster o resinas) a través de una impregnación forzada al vacío, seguido de un proceso de endurecimiento (Rivera *et al.* 2009, Arias *et al.* 2013, Audisio *et al.* 2013, Vélez-García 2016, Peralta *et al.* 2017); el tipo de polímero utilizado determinará las propiedades visuales, mecánicas y de costo en las piezas elaboradas (Arias 2012), por ello han surgido modificaciones orientadas a disminuir los costos del proceso con variaciones en los polímeros y en algunas fases del procedimiento (Muñetón & Ortiz 2012); no obstante, se mantienen las cuatro etapas de la técnica: fijación, deshidratación, impregnación forzada y curado (Rivera *et al.* 2009, Muñetón & Ortiz 2012). Este método ha representado una revolución en el campo de la conservación de piezas anatómicas, pues mantiene las dimensiones óptimas con todos los detalles anatómicos (Rivera *et al.* 2009, Arias 2012, Muñetón & Ortiz 2012); siendo de gran utilidad para actividades educativas e investigación médica (Audisio *et al.* 2013, Peralta *et al.* 2017).

### **2.1.3 Repleción vascular**

Este método es apropiado para la identificación del sistema respiratorio o circulatorio de un órgano en particular o de una región corporal (Olivares *et al.* 2005, Muñetón & Ortiz 2011); brinda la posibilidad de manipular y observar la distribución *in situ* de los vasos venosos, arteriales y los alveolos pulmonares (Vélez-García 2016). Los órganos son llenados con soluciones sintéticas (látex o silicona) para reemplazar la sangre u oxígeno, seguido de un endurecimiento para mantener y conservar la estructura de manera artificial (Olivares *et al.* 2005, Arruda *et al.* 2011), resaltando el trayecto y distribución de los vasos sanguíneos o del árbol bronquial (Navarrete *et al.* 2015). La repleción se efectúa eficientemente sobre material cadavérico fresco y sin fijar (Olivares *et al.* 2005, Cury *et al.* 2013, Navarrete *et al.* 2015). Sin embargo, para hacer una correcta repleción, hay que tener en cuenta los índices de viscosidad, calibre del vaso y la resistencia del material a utilizar (Arruda *et al.* 2011, Rivera *et al.* 2014).

### **2.1.4 Glicerinado fenolado**

Consiste en introducir gradualmente fenol al 5% diluido en glicerina a un segmento corporal o un organismo; los cuales, actúan como fungicidas y bactericidas prolongando la durabilidad de las piezas (Arias *et al.* 2013, Muñetón & Ortiz 2013, Rivera *et al.* 2014). Las piezas presentan rasgos semejantes al tejido vivo, permitiendo a los usuarios la manipulación de los órganos o especímenes (Carvalho *et al.* 2013), incluso es posible resaltar algunas zonas con pinturas acrílicas, para facilitar la identificación de tejidos u órganos (Cury *et al.* 2013, Muñetón & Ortiz 2013). Esta técnica de conservación es de las más convenientes para reutilizar piezas anatómicas deterioradas y que en un primer momento habían sido fijadas en formol (Olivares *et al.* 2005).

### **2.1.5 Método de Walther-Thiel**

El método de embalsamamiento de Walther-Thiel o Solución de Thiel fue desarrollado en 1992 por el profesor Walther Thiel en Austria (Benkhadra *et al.* 2009); consiste en la aplicación de una fórmula inyectada vía intravascular a órganos o cadáveres, posteriormente la pieza es sumergida en una solución específica, para finalmente almacenarla en un contenedor sellado (Ottone *et al.* 2016). Consta de tres procesos: fijación, desinfección, conservación/preservación (Rivera *et al.* 2014, Ottone *et al.* 2016). El procedimiento da como resultado piezas bien conservados en color y propiedades táctiles similares a especímenes vivos (Benkhadra *et al.* 2009, Lone *et al.* 2017).

### **2.1.6 Diafanización**

La diafanización es una técnica en la cual los tejidos de un espécimen se someten a una despigmentación o transparentación, para visualizar a través del músculo estructuras óseas o cartilaginosas teñidas con un colorante específico, manteniendo el esqueleto íntegro, facilitando el estudio del tejido óseo o del tejido cartilaginoso (Dawson 1926, Tamayo *et al.* 2012, Coronado 2014, Rivera *et al.* 2015, Bohn *et al.* 2017). El esqueleto se identifica visualmente en tonalidades de rojo a morado, producto de la fijación del pigmento rojo de alizarina sobre el hueso y de color azul el cartílago hialino debido al colorante azul de alción (Tamayo *et al.* 2012); independientemente del tipo de colorante ambos tienen el mismo fundamento, el cual consta de los siguientes pasos: fijación, tinción, corrosión, transparentación y conservación (Dawson 1926, Taylor 1967, Coronado 2014, Bohn *et al.* 2017).

El método puede utilizarse para observar el proceso de osificación, estructura ósea, malformaciones congénitas, así como la relación-comparación ósea evolutiva entre especies (Coronado 2014, Rivera *et al.* 2015). Las piezas preservadas tienen un alto valor académico y didáctico, gracias a la imagen tridimensional que ofrecen del esqueleto animal sin alterar su conformación original (Rueda-Esteban *et al.* 2017). Este método se usa principalmente en investigación, pero puede ser una herramienta de gran utilidad para la enseñanza de anatomía y fisiología (Rivera *et al.* 2016, Bohn *et al.* 2017).

## 2.2 Origen de la diafanización

La palabra diafanización proviene del latín *diaphanus* “transparente”, hace referencia a un material o cuerpo a través del cual pasa la luz casi en su totalidad (RAE 2018); aludiendo al término descrito anteriormente, se definiría como la observación de estructuras a través del tejido blando transparente del organismo (Sandoval *et al.* 2016). Inicialmente fue desarrollada por Schultze (1897) quien utilizó potasa (sales de potasio solubles en agua) y glicerina para transparentar embriones humanos; Lundvall (1905) y Spalteholz (1914) introdujeron el uso de una solución de alcohol concentrado con rojo de alizarina para teñir los huesos, seguido de una decoloración diferencial.

Dawson (1926 y 1939) publicó la técnica de transparentación de tejidos, utilizando una solución de hidróxido de potasio (KOH), seguida de una tinción con rojo de alizarina diluida en KOH, para finalmente aclarar el ejemplar usando una mezcla de KOH con concentraciones crecientes de glicerol; posteriormente, Burdi (1965) emplea el colorante azul de toluidina; Taylor (1967) implementó el uso de enzimas para aclarar el tejido de peces de tamaño pequeño; así mismo Hungar (1969) y Simons & Van Horn (1971) introdujeron un nuevo procedimiento durante la tinción, utilizando azul de alcian para teñir el esqueleto cartilaginoso de embriones de pollo. Posteriormente Wassersug (1976) modificó el procedimiento de Simons & Van Horn (1971), empleando formalina como fijador.

Dingerkus & Uhler (1977) utilizaron la enzima tripsina para aclarar pequeños vertebrados; posteriormente Whitaker & Dix (1979) reemplazaron el azul de toluidina descrito por Burdi (1965) por azul de alcian para la tinción diferencial del tejido cartilaginoso. Potthoff (1984) desarrolló un método de diafanización para el estudio de larvas y juveniles de peces con rango desde 3 mm hasta más de 500 mm; Webb & Byrd (1994) desarrollaron un protocolo de doble tinción utilizando rojo de alizarina y azul de alcian; más tarde Song & Parenti (1995) compararon protocolos de transparentación y tinción, utilizando la enzima tripsina para el estudio de huesos, cartílagos y nervios en peces, ranas, tortugas, aves y mamíferos.

Como se ha mostrado, el proceso de diafanización ha experimentado modificaciones con la intención de macerar y transparentar de forma más eficiente los tejidos blandos, por lo que no se tiene una metodología estricta (Green 1952, Estrada *et al.* 2009, Coronado 2014, Sandoval *et al.* 2016, Hernández-Gil 2017); actualmente debido a la calidad de la transparentación y disponibilidad de reactivos, las técnicas de diafanización de mayor uso son la técnica Dawson con sus respectivas variantes y la maceración enzimática de Taylor (Sandoval *et al.* 2016). La diafanización demuestra ser un método simple que utiliza productos químicos inocuos, que genera un contraste entre huesos y músculo, de elaboración rápida y de bajo costo; siendo referencia en la actualidad de numerosos trabajos toxicológicos y de morfología (Darias *et al.* 2010, Sandoval *et al.* 2016).

### **2.3 Diafanización como técnica anatómica**

Durante el proceso de diafanización los especímenes previamente fijados en alcohol etílico de 96° o formaldehído (4-10%) se someten a una despigmentación y transparentación de los tejidos blandos mediante el uso de sustancias corrosivas como el hidróxido de potasio (KOH) o enzimas, con el objetivo de equilibrar el índice de refracción intersticial e intracelular del organismo con el espectro del líquido de inmersión, posteriormente las muestras se someten a una tinción diferencial para visualizar los componentes óseos y cartilagosos (Green 1952, Taylor 1967, Rubio 2011, Coronado 2014, Rivera *et al.* 2016, Sandoval *et al.* 2016, Rueda-Esteban *et al.* 2017).

La tinción del esqueleto se realiza con rojo de alizarina, el cual tiñe específicamente los fosfatos de calcio del tejido óseo o el azul de alcian o aliciano que tiene afinidad por los glucosaminoglicanos componentes del tejido cartilaginoso (Rivera *et al.* 2016, Tsandev *et al.* 2017); ambas tinciones pueden ser combinadas; sin embargo, se requiere de un protocolo particular para realizarlas en conjunto (Estrada *et al.* 2009, Tamayo *et al.* 2012). El empleo de la técnica de doble tinción genera un contraste entre el tejido óseo y cartilaginoso, útil para observar la morfogénesis embrionaria, a partir de los centros de osificación intramembranosa y endocondrial (Whitaker & Dix 1979, Carril 2015, Sandoval *et al.* 2016).

Los especímenes diafanizados se usan ampliamente para estudios osteológicos en pequeños vertebrados (Dawson 1939, Taylor 1967, Whitaker & Dix 1979, Estrada *et al.* 2009, Coronado 2014); son útiles para establecer el momento de aparición de los puntos de osificación durante el desarrollo embrionario y fetal (Song & Parenti 1995, Tamayo *et al.* 2012, Carril 2015, Rivera *et al.* 2015, Bohn *et al.* 2017, Hernández-Gil 2017); favorecen el análisis de anatomía comparada entre vertebrados y sus implicaciones evolutivas (Coronado 2014); además de facilitar la observación de deformaciones óseas y expresión del gen de la osteocalcina (Darias *et al.* 2010, Costa *et al.* 2018).

### **2.3.1 Proceso de diafanización**

El proceso se desarrolla en varias etapas, en cada fase se usan soluciones con reactivos que varían en concentración y proporción (Rivera *et al.* 2015). El fundamento de la técnica se basa en cinco etapas:

*Fijación:* Inicialmente el espécimen se fija en alcohol o formaldehído, la concentración dependerá del tamaño del espécimen (Song & Parenti 1995, Sandoval *et al.* 2016). El objetivo es detener la destrucción del tejido por la autólisis de las enzimas liberadas por los lisosomas, así también eliminar el agua del tejido y ejercer un efecto microbicida (Muñetón & Ortiz 2011, Sepúlveda *et al.* 2017). Esta fase deshidratará al espécimen, aumentando la resistencia del tejido durante el procedimiento (Datovo & Bockmann 2010, Schnell *et al.* 2016). Se recomienda fijar especímenes frescos (Taylor 1967); al finalizar, los especímenes se lavan y evisceran (Song & Parenti 1995, Carril 2015, Tsandev *et al.* 2017).

*Corrosión:* Esta fase se realiza utilizando KOH o la enzima tripsina, diluidas en agua para facilitar su ingreso en la piel y demás tejidos (Sepúlveda *et al.* 2017). El KOH efectúa una reacción de óxido-reducción sobre los tejidos (Sandoval *et al.* 2016, Rueda-Esteban *et al.* 2017), provocando una epidermólisis química, formando fisuras y poros a nivel de la dermis, facilitando el paso del colorante a las estructuras óseas o cartilaginosas y posteriormente de la glicerina (Rivera *et al.* 2015, Sepúlveda *et al.* 2017). La enzima tripsina desnaturaliza las proteínas del músculo, aclarándolo sin dañar extremadamente los ligamentos que mantienen unidos los

huesos (Collete & Smith 2005). Durante este proceso el espécimen experimentará un edema generalizado y una disminución de la rigidez muscular (Rivera *et al.* 2015); la solución deberá ser supervisada diariamente, una inmersión prolongada y no controlada puede lesionar o destruir el tejido blando e incluso los cartílagos de los especímenes (Rueda-Esteban *et al.* 2017).

*Tinción:* A continuación, las muestras son sumergidas en una solución de rojo de alizarina diluida en alcohol o KOH; el azul de alcian se diluye en alcohol o ácido acético (para fines de este trabajo solo se empleará el colorante rojo de alizarina; Green 1952, Taylor 1967, Estrada *et al.* 2009, Rivera *et al.* 2016). Los colorantes tienen alta afinidad por los tejidos mineralizados o cartilagosos (Sandoval *et al.* 2016); sin embargo, la inmersión debe ser total para lograr una buena impregnación del pigmento en los tejidos del espécimen; estos deben ser retirados al observar una tinción generalizada (Rivera *et al.* 2015).

*Transparentación:* Se sumergen las muestras en una solución ascendente de glicerina, pudiendo adicionar KOH para terminar el aclarado (Sandoval *et al.* 2015, Sepúlveda *et al.* 2017), el proceso tiene como objetivo final la visualización de los centros de osificación y cartílago (Rivera *et al.* 2015). Puede adicionarse a la solución peróxido de hidrógeno para ayudar a mejorar la transparencia (Cortés-Delgado *et al.* 2009, Tsandev *et al.* 2017). La duración de esta fase estará condicionada por el progreso de la transparentación, así como la despigmentación o descamación del espécimen, estos serán los principales factores para realizar cambios sucesivos de las soluciones de glicerina (Rivera *et al.* 2015, Tsandev *et al.* 2017).

*Conservación:* El producto final diafanizado debe ser conservado en glicerina pura más cristales de timol o fenol (Cortés-Delgado *et al.* 2009, Rivera *et al.* 2015, Sandoval *et al.* 2015). El alto índice de refracción de la glicerina favorece al contraste de la técnica, además de contar con la capacidad antiséptica e higroscópica que permite la deshidratación, evitando cambios en la concentración iónica celular y funcionando como un excelente conservador (Muñetón & Ortiz 2013, Reed *et al.* 2019).

## 2.4 Estudios de diafanización en México

En México la técnica de diafanización ha sido empleada principalmente como herramienta para la observación de estructuras óseas, encontrando registro de su utilización por Ruiz (1993) quien usando la diafanización realizó una descripción del sistema esquelético de diferentes especies de *Elasmobranchios* del Golfo de México; posteriormente Kirwan (2004) utilizó una combinación de diafanización y plastinación para generar piezas destinadas al estudio de la morfología en vertebrados; así mismo Baeza (2008) modificó la técnica de diafanización con el objetivo de obtener piezas con una mayor resistencia y una mejor manipulación; Estrada *et al.* (2009) generaron una colección didáctica de vertebrados, transparentados mediante la técnica de Dawson; en el mismo año, Mendoza (2009) realizó un estudio sobre el desarrollo embrionario y morfología del tiburón azul en la costa occidental de Baja California Sur, observando la embriogénesis con tinciones diferenciales para tejido óseo y cartilaginoso.

Rubio (2011) en la Paz, Baja California: examinó, describió e identificó caracteres óseos y merísticos de diversos ejemplares de peces linterna de la familia *Myctophidae* del género *Triphoturus*, utilizando la técnica de diafanización; Hernández-Gil (2017) en Baja California Sur, comparó tres técnicas de diafanización para estandarizar un protocolo de transparentación para crías de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*); posteriormente Martínez (2019) utilizando la diafanización describió y comparó la anatomía de dos especies de anuros; por último Romero & Gonzáles (2019), modificaron la técnica realizada por Piovesana (2014), con el objetivo de optimizar el costo y tiempo del procedimiento para peces monja (*Gymnocorymbus ternetzi*).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El Laboratorio de Colecciones Biológicas de la Universidad del Mar, campus Puerto Escondido, es un espacio académico designado a colaborar con la actividad docente y de investigación; adicionalmente, brinda la posibilidad de generar, preservar, manipular y exhibir especímenes obtenidos por medio de la técnica de diafanización; estas piezas podrán ser usadas para reforzar los procesos de enseñanza-aprendizaje de las asignaturas relacionadas con la anatomía animal en las diferentes licenciaturas que se imparten en la Universidad. Así también, debido a que la técnica suele aplicarse y describirse para un grupo en particular; se aplicará, documentará y describirá el efecto de la técnica de manera simultánea en más de una especie.

Por estas razones, se pretende implementar y valorar la técnica de diafanización como método de preservación de piezas anatómicas, examinando tres variantes de esta sobre cinco grupos de vertebrados (aves, peces, mamíferos, anfibios y reptiles); evaluando la concentración de reactivos, costos y tiempo de elaboración. Esto servirá para establecer una primera colección de organismos diafanizados que sirvan como material didáctico (Arruda *et al.* 2011, Muñetón & Ortiz 2012, Arias *et al.* 2013, Carvalho *et al.* 2013, Carril 2015, Rueda-Esteban *et al.* 2017). Además, su uso y estandarización en la Universidad permitirá elaborar modelos de desarrollo embrionario (Tamayo *et al.* 2012); la observación de deformaciones óseas (Coronado 2014, Rivera *et al.* 2016, Rueda-Esteban *et al.* 2017) posiblemente influenciadas por deficiencias de nutrientes o cambios en la dieta (Darias *et al.* 2010, Costa *et al.* 2018).

#### **4. HIPÓTESIS**

El incremento de la concentración de hidróxido de potasio mezclado con glicerina, así como la dilución de alizarina en una mezcla de alcohol, acetona y KOH; optimizaran la modificación realizada a la técnica de Dawson, generando especímenes diafanizados de calidad, con un menor costo y tiempo de diafanización con respecto a los procedimientos estandarizados de Dawson y Taylor.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

- Evaluar tres técnicas de diafanización en especies de vertebrados para la colección del Laboratorio de Colecciones Biológicas de la Universidad del Mar.

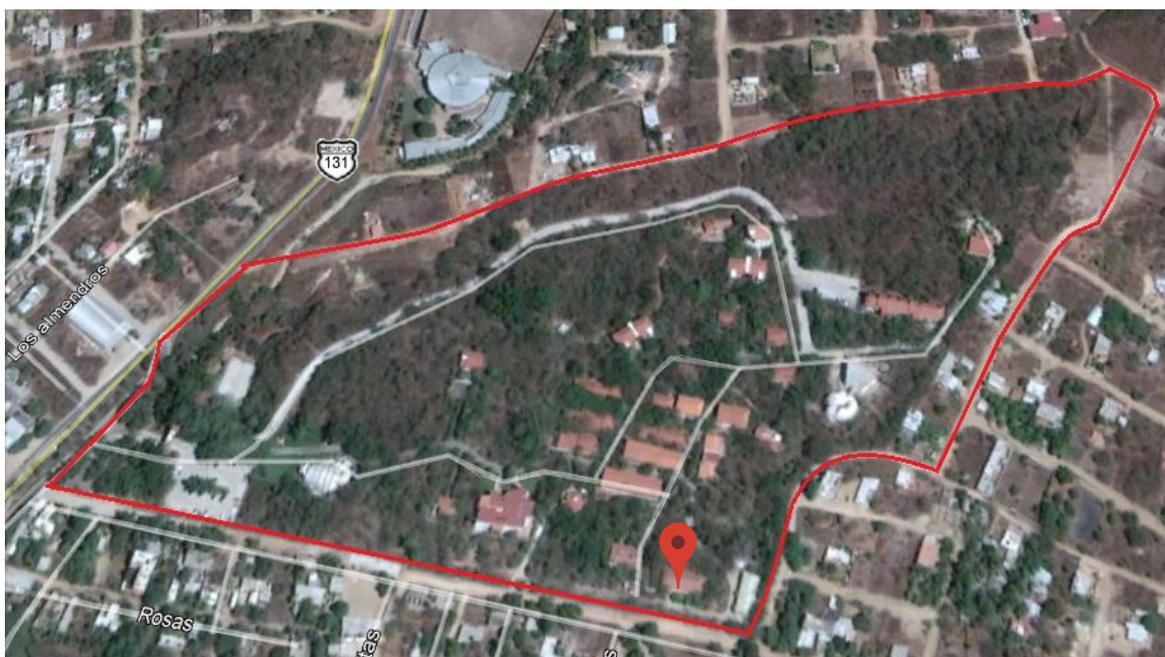
### **5.2 Objetivos específicos**

- Implementar y evaluar tres técnicas de diafanización en cinco grupos de vertebrados para determinar la eficiencia de sus resultados.
- Realizar una evaluación cualitativa por los alumnos de la Universidad acerca de la eficiencia de las técnicas implementadas.
- Comparar los costos y tiempos de implementación de las técnicas evaluadas en los cinco grupos de vertebrados.
- Elaborar una colección de vertebrados diafanizados para el Laboratorio de Colecciones Biológicas.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Área de estudio

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Colecciones Biológicas (LCB) en el interior de la Universidad de la Mar (UMAR), campus Puerto Escondido ubicado sobre el kilómetro 3 de la carretera federal 131 vía Sola de Vega-Puerto Escondido, Oaxaca, México (Fig. 1). El campus cuenta con una superficie de 10 ha y una elevación de 60 msnm, se encuentra ubicado en la salida noreste de la ciudad de Puerto Escondido (Pineda 2014). El clima predominante en la zona es el cálido subhúmedo con lluvias en verano (García-Amaro 2004), con una temperatura media anual mínima de 25.3°C y máxima de 33.1°C, con precipitación media anual de 985.8 mm (Serrano *et al.* 2005).



**Figura 1.** Ubicación del Laboratorio de Colecciones Biológicas (marca en rojo) dentro de las instalaciones de la Universidad del Mar, campus Puerto Escondido (polígono en rojo).

El LCB, se ubica en la zona sureste del campus, dividido internamente en tres espacios: colección zoológica, área de exhibición y el área de enseñanza; esta última zona fue utilizada para el procesamiento de las muestras sometidas a las técnicas de diafanización, contando con un ambiente controlado de 24°C y una humedad relativa de 20%. Dicho laboratorio representó el espacio idóneo para la

ejecución y montaje de la técnica, ya que reúne las condiciones necesarias de infraestructura, estabilidad térmica, bioseguridad, humedad y normatividad relacionada con la manipulación de reactivos y desechos anatómicos (Mora-Ambriz & Fuentes-Moreno 2006, Rivera *et al.* 2015).

## **6.2 Trabajo de laboratorio**

### **6.2.1 Origen de los especímenes**

Para el proceso de diafanización se seleccionaron cinco grupos de vertebrados conformados por: aves (dos tortolitas (*Columbina inca*), dos calandrias (*Icterus sp.*), un Zorzalito (*Catharus ustulatus*), un tardus (*Turdus rufopalliatus*), un periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*), un mosquero verdoso (*Empidonax virescens*) y un saltador grisceseño (*Saltator coerulescens*)); peces (nueve carpines dorados, *Carassius auratus*); mamíferos terrestres (nueve ratones juveniles árabes, *Mus musculus*); anfibios (nueve sapos juveniles, *Rhinella marina*) y reptiles (nueve geckos adultos *Lepidodactylus sp.*). En el caso de las aves, corresponden a individuos que perecieron como producto de colisiones con los ventanales de los edificios de la Universidad, estos se habían mantenido bajo congelación resguardados en el LCB. Los ejemplares de anfibios provinieron de la búsqueda de organismos juveniles muertos en las inmediaciones del campus durante la época de lluvias; respecto a los reptiles, corresponden a organismos adultos muertos como consecuencia de su incursión a ambientes urbanos y fueron donados al LCB; finalmente, los grupos de peces y mamíferos proceden de animales criados en cautiverio, los cuales murieron por causas naturales en tiendas de mascotas y estos fueron depositados en frascos con alcohol etílico al 70° para su conservación. Todos los ejemplares se mantuvieron resguardados bajo congelación a una temperatura de -4 °C en un congelador horizontal (Marca Torrey modelo CH25).

### 6.2.2 Procesamiento previo de los especímenes

Los especímenes fueron descongelados a temperatura ambiente (24°C), con ayuda del equipo de disección se retiró el tejido tegumentario para aves, mamíferos, anfibios y reptiles empleados en las técnicas de Dawson y Taylor; no obstante, para todos los especímenes utilizados en la técnica de Dawson modificada la piel se dejó momentáneamente intacta, retirando solo el pelo o pluma de los animales. Para la extracción de los órganos internos se realizó una incisión longitudinal sobre la línea media en la región abdominal, retirando los órganos de la cavidad torácica-abdominal. En los anfibios, la piel que recubre la cabeza no se retiró completamente debido a que se encuentra fuertemente adherida al cráneo; en el caso de los peces, se mantuvieron las escamas y se omitió el eviscerado para las tres técnicas, debido a que a este procedimiento debilitaba la estructura muscular. Todos los ejemplares fueron lavados con agua del grifo en múltiples ocasiones con el fin de retirar residuos de contenido estomacal, tierra, pelo o plumas y el exceso de sangre antes de iniciar la primera fase del proceso de diafanización.

### 6.2.3 Agrupamiento de los especímenes

Se eligieron aleatoriamente tres especímenes de cada grupo, para cada uno de los tratamientos; nombrando a la técnica de Dawson como TA, la técnica de Taylor como TB y la Técnica de Dawson modificada como TC (Tabla I).

**Tabla I.** Distribución de los especímenes en los tratamientos a evaluar

<b>Clase taxonómica</b>	<b>Código (Grupo)</b>	<b>Tratamiento uno</b> Técnica de Dawson (TA)	<b>Tratamiento dos</b> Técnica de Taylor (TB)	<b>Tratamiento tres</b> Técnica de Dawson M*
<b>Aves</b>	1	3	3	3
<b>Peces</b>	2	3	3	3
<b>Mamíferos</b>	3	3	3	3
<b>Anfibios</b>	4	3	3	3
<b>Reptiles</b>	5	3	3	3
<b>Total</b>		<b>15</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

\* Dawson M: Dawson modificada

Para el experimento se procesaron 45 especímenes de vertebrados, divididos en cinco grupos; por cada tratamiento evaluado se efectuaron tres repeticiones. A cada espécimen, se le colocó un código individual de identificación, el cual consta de un hilo blanco atado con un nudo a uno de los miembros anteriores o cola (peces), dejando las dos puntas del cordón enteras para el primer ejemplar con identificación (ID): A101, cortando la mitad de una de las puntas del cordón para el ejemplar número dos ID: A102 y finalmente cortando ambas puntas, para el último espécimen ID: A103. Las letras en mayúscula indican la técnica a la que pertenecen (TA, TB, TC); el primer número corresponde al grupo (aves: 1, peces: 2, mamíferos: 3, anfibios: 4 y reptiles: 5); el cero funge como separación y el último dígito representa el número de repetición, esto se replicó para los cinco grupos a trabajar (Anexo XI).

Posteriormente, las muestras fueron colocadas de forma individual dentro de una bolsa de plástico y pesadas con ayuda de una balanza de precisión micro-line con escala de 100 g (Marca PESOLA), en la tabla II se muestran los pesos promedio de los especímenes.

**Tabla II.** Pesos promedio de los especímenes por grupos

Técnicas	Grupos				
	Aves	Peces	Mamíferos	Anfibios	Reptiles
Dawson	25.0 g	2.0 g	6.0 g	19.66 g	2.83 g
Taylor	24.0 g	2.33 g	4.6 g	18.33 g	2.83 g
Dawson M	19.0 g	1.16 g	4.6 g	14.16 g	3.16 g

Así mismo, las tapaderas de los frascos fueron rotuladas, con el grupo y tratamiento al que pertenecen, todo ello para llevar un mejor control. Todas las muestras se mantuvieron a lo largo del procedimiento en un cuarto con temperatura controlada a 22°C para evitar la aparición de contaminantes.

## **6.3 Tratamientos evaluados**

### **6.3.1 Técnica de Dawson (TA)**

La primera serie de ejemplares a diafanizar fueron sometidos a la técnica descrita por Dawson (1926, Anexo II); a continuación, se describen las fases realizadas:

*Fijación:* Todos los ejemplares sometidos a esta técnica se fijaron en alcohol etílico de 96° por un tiempo de cuatro días a una temperatura de 22°C.

*Corrosión:* Posteriormente, los especímenes fueron sometidos a una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 1% diluido en agua destilada; siendo retirados hasta que los huesos fueron claramente visibles a través de los tejidos circundantes.

*Tinción:* Se preparó una solución diluida del colorante rojo de alizarina (marca comercial Hycel), a razón de una parte de alizarina por 10,000 partes (0.01 g) de KOH al 1% mezclado en agua destilada. Al finalizar el proceso de tinción los músculos retuvieron parte del colorante, debido a esto las muestras retornaron por 24 a 48 horas al tratamiento de corrosión para retirar el exceso de colorante.

*Transparentación:* Una vez teñidos, los especímenes fueron inmersos en soluciones descendentes de agua y ascendentes de glicerina. Iniciando en una solución con 80% del volumen total de agua destilada más KOH al 1% y 20% del volumen total con glicerina (80:20); cuando se aclararon lo suficiente, continuaron a una concentración con el 50% del volumen total de agua destilada y 50% del volumen total con glicerina (50:50), para finalmente depositarse en una solución con el 30% del volumen total con agua destilada y 70% del volumen total con glicerina (30:70).

*Conservación:* Finalmente los especímenes fueron colocados y exhibidos de manera individual en recipientes de vidrio con cierre hermético; cubiertos completamente con glicerina al 100% más 0.1 g de cristales de timol para evitar el crecimiento fúngico.

### **6.3.2 Técnica de Taylor (TB)**

La segunda técnica se basó en el protocolo de transparentación elaborado por Taylor (1967, Anexo III), el cual se describe a continuación:

*Fijación:* Los especímenes fueron sumergidos en una solución de formaldehído al 4% durante siete días a una temperatura de 22°C, al finalizar se lavaron en agua hasta eliminar el exceso del fijador.

*Corrosión:* Se preparó una solución buffer saturada de borato de sodio, agregando 1 g de borato de sodio (bórax) por 100 ml de agua destilada caliente (40°C), hasta obtener una solución homogénea. Posteriormente se mezclaron tres partes de la solución "buffer saturado de borato de sodio" (preparada con anterioridad) más siete partes de agua destilada (se recomienda que la solución total contenga un volumen de 10 a 40 veces la muestra), adicionando 0.45 g de tripsina (1:100 Marca: *Electron Microscopy Sciences*). La alternancia con KOH al 0.5% y el tratamiento de maceración con tripsina se repitieron hasta que los especímenes se aclararon adecuadamente.

*Tinción:* Se preparó una solución diluyendo 0.01 g de rojo de alizarina (marca comercial Hycel) con KOH al 0.5% mezclado en agua destilada, hasta que alcanzó un tono de color morado. Retirando las muestras de la solución hasta que los huesos se tiñeron completamente; una vez teñidos, los especímenes permanecieron 24 h en agua destilada para retirar el exceso de colorante.

*Transparentación:* Los especímenes fueron colocados en glicerina, comenzando con 60% del volumen total de agua destilada con KOH al 0.5% y 40% del volumen total con glicerina pura (60:40), posteriormente se preparó una solución de 30% del volumen total con agua destilada y 70% del volumen total con glicerina pura (30:70).

*Conservación:* Por último, los especímenes fueron colocados y exhibidos de manera individual en recipientes de vidrio con cierre hermético; cubiertos completamente con glicerina al 100% más 0.1 g de cristales de timol para evitar el crecimiento fúngico.

### 6.3.3 Técnica de Dawson modificada (TC)

La modificación a la técnica de Dawson (TC, Anexo IV), se basó en la técnica descrita por Dawson (1939) y el trabajo elaborado por Coronado (2014), así como en pruebas de diafanización previas a la elaboración del presente trabajo.

*Fijación:* Los especímenes fueron fijados en alcohol etílico de 96° por un tiempo de cuatro días a temperatura ambiente (24 °C). Las muestras muy pigmentadas (aves y anfibios) se colocaron en una solución con tres gotas de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por cada 30 cc de KOH o agua destilada por un máximo de 15 minutos.

*Corrosión:* Posteriormente se preparó una solución que correspondía al 70% de volumen total de agua de grifo con KOH al 5%, más 30% del volumen total con glicerina, llamada para fines del trabajo KOH 5% + glicerina. La modificación realizada se fundamenta en la capacidad del KOH de aumentar la permeabilidad de las membranas celulares, facilitando el reemplazo del agua por glicerina, este líquido con alto índice de refracción ingresa al tejido muscular y comienza anticipadamente a generar el efecto de transparentación a la vez que controla la alta concentración de KOH. La duración de la inmersión dependió del peso del espécimen y el tiempo que transcurrió desde la colocación en la solución hasta la observación de las estructuras óseas a través del músculo. Es importante no exceder el tiempo de inmersión, debido a que la alta concentración de KOH puede desintegrar las muestras. Al término de la primera etapa de corrosión se procedió al retiro de la piel, por acción del KOH es más sencillo separarla de zonas de difícil extracción (zona dorso craneal de los anfibios y la piel que recubre las extremidades), posteriormente se extrajo el tejido graso localizado en la parte supra muscular y en la cavidad abdominal de los especímenes con la ayuda de pinzas de disección rectas; finalmente se colocaron en una solución de KOH al 0.3% para mejorar el aclarado y retirar el exceso de sangre que suele atraparse en los músculos.

*Tinción:* Se prepararon 1000 ml de solución madre para tinción: 0.1 g de colorante rojo de alizarina (marca comercial Hycel), 2.5 ml de acetona, 2.5 ml de alcohol de 96° y KOH al 0.5% diluido en agua de grifo; la mezcla adquirió un color morado

intenso, por lo cual se diluyó al momento de utilizarla para teñir los especímenes, tomando 50% del volumen total de la solución de tinción y el otro 50% del volumen total con agua de grifo. Se optó por una mayor concentración de alizarina para acelerar el proceso, empleando alcohol para mejorar la distribución del pigmento, disminuyendo la concentración del KOH para evitar la aglomeración del colorante y finalmente se incluyó acetona por sus propiedades desengrasantes.

Los especímenes se colocaron en el interior, cerciorándose de que se sumergieran completamente. Las muestras fueron retiradas entre el cuarto y octavo día; algunos especímenes mostraron una tinción excesiva en los músculos por efecto de la solución de tinción, siendo necesario colocarlos en agua de grifo por un mínimo de 24 horas para retirar el exceso de colorante y algunos de ellos se volvieron a colocar en la solución de KOH al 0.3% de 48 a 96 horas para limpiar el tejido.

*Transparentación:* Los especímenes fueron aclarados a través de una serie de fases en glicerina, comenzando con la primera solución de 70% del volumen total con agua de grifo y 30% del volumen total con glicerina (70:30), por un tiempo de tres a siete días. La solución se manchó considerablemente por acción del colorante que no se adhirió al hueso y quedó atrapado en las fibras musculares, realizándose recambios de la solución 70:30 hasta que se observó parcialmente opaca (tomando un color rosa tenue). Posteriormente se preparó una solución de 50% del volumen total con agua de grifo y 50% del volumen total con glicerina (50:50); la solución tendió a mancharse después de 21 días con restos de colorante y descamación epitelial, por lo cual se cambió a una solución nueva. Finalmente se transfirieron a una solución de 25% del volumen total con agua de grifo y 75% del volumen total con glicerina por un periodo de siete días (25:75).

*Preservación:* Los especímenes fueron colocados y exhibidos individualmente en recipientes de vidrio con cierre hermético, cubiertos completamente con glicerina al 100% más 0.1 g de cristales de timol para evitar el crecimiento fúngico.

## 6.4 Trabajo de gabinete

### 6.4.1 Aplicación de la evaluación cualitativa

Una vez concluidas las preparaciones de los especímenes, se realizó la evaluación cualitativa de los 45 especímenes de la colección de vertebrados diafanizados, con el objetivo de evaluar visualmente aspectos relacionados con la transparentación del tejido muscular, fijación e intensidad del colorante en los huesos, apreciación de la técnica y el montaje para su exhibición. Para lo cual se generó un cuestionario (Anexo I), donde se incluyeron siete preguntas que evaluaron individualmente los aspectos anteriormente indicados; así mismo, se incluyeron dos preguntas abiertas con la intención de recapitular la percepción visual y sugerencias. Los encuestados marcaron el grado de intensidad o ligereza de las características observadas utilizando una escala Likert (García-Sánchez 2011, Tabla III)

**Tabla III.** Escala Likert utilizada en la evaluación visual

<b>Nada</b>	<b>Poco</b>	<b>Regular</b>	<b>Bastante</b>	<b>Totalmente</b>
1	2	3	4	5

La UMAR cuenta con una población estudiantil de 491 alumnos inscritos durante en el periodo escolar 2019-2020, esta cantidad de alumnos se reparte en cuatro Licenciaturas: Enfermería, Informática, Biología y Zootecnia, así como en Ingeniería Forestal. Para la aplicación de las encuestas se estimó una muestra representativa, utilizando la fórmula para calcular muestras de una población finita descrita por López-Roldán & Fachelli (2015):

$$n = \frac{Z^2 * p * q * N}{(N - 1) * e^2 + Z^2 * p * q}$$

Donde:

Z<sup>2</sup>: Nivel de confianza adoptado

e<sup>2</sup>: Error de la estimación

N: Tamaño de la población

p: Posibilidad de ocurrencia de un evento

q: Posibilidad de no ocurrencia de un evento (q=1-p)

Sustituyendo:

$Z^2$ : Nivel de confianza al 95% donde  $Z_{\alpha=0.05} = 1.96$

$e^2$ : 0.1

N: 491

p: 0.5

q: 0.5

$$n = \frac{(1.96)^2 * 0.5 * 0.5 * 491}{(491 - 1) * 0.1^2 + (1.96)^2 * 0.5 * 0.5}$$

$$n = 80.46$$

La determinación, del número de alumnos que representaron la muestra fue de  $n = 80$  alumnos, eligiendo por conveniencia la inclusión en un 30% (24 alumnos) de la Lic. en Biología y un 30% (24 alumnos) de la Lic. en Zootecnia, ya que son las carreras que tendrían mayor afinidad, contacto, interés y frecuencia de asistencia al LCB; posteriormente la Lic. en Enfermería con un 20% (16 alumnos) de inclusión ya que representa la mayor población estudiantil dentro de la Universidad y en algún momento podrían visitar la colección para temas relacionados con la asignatura de anatomía; finalmente se incluyó en menor proporción a la población estudiantil de la Lic. en Informática 10% (8 alumnos) e Ing. Forestal con 10% (8 alumnos), al ser las carreras con menor interés en la técnica (considerándolos como la población totalmente ajena a la técnica).

Para la evaluación visual de los especímenes y aplicación de las encuestas, se acondicionaron las mesas del área de exhibición del LCB, divididas con paneles cubiertos con un fondo blanco para mejorar el contraste y reflejar la luz blanca del inmueble. Las muestras individuales fueron etiquetadas con un conjunto de letras y números aleatorios, colocadas en una sección de la mesa identificada con su clave de técnica (TA, TB, y TC). Los encuestados ingresaron en equipos de 6 integrantes con un tiempo entre cada grupo de 15 minutos, esto para permitir la observación individual de las muestras y así evitar el diálogo entre encuestados, situación que pudiera alterar los resultados. Una vez finalizada la encuesta, las evaluaciones fueron agrupadas por carrera y se elaboró una base de datos con la información recolectada utilizando el programa de la paquetería de Office Excel 2013.

#### 6.4.2 Diseño experimental y análisis estadístico

En la presente investigación se utilizó un diseño de bloques completamente aleatorizado, se trabajaron con tres tratamientos que corresponden a las diferentes técnicas de diafanización (TA, TB y TC), cada tratamiento se repitió en cada uno de los bloques (grupos de vertebrados), teniendo como tamaño de unidad experimental tres especímenes por grupo. El esquema del experimento que se utilizó se indica en la tabla IV.

**Tabla IV.** Esquema del experimento

<b>Técnicas</b>	<b>Código</b>	<b>Nº Repetición</b>	<b>U.E.</b>	<b>Observaciones</b>
Dawson	TA	5	3	15
Taylor	TB	5	3	15
Dawson M	TC	5	3	15
<b>Total</b>				<b>45</b>

U.E: Unidad experimental

Se realizó una prueba de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la normalidad de los datos obtenidos; posteriormente, se utilizó el análisis de Kruskal-Wallis para variables no paramétricas, a fin de comparar las medias obtenidas en las encuestas, con el objetivo de comprobar si la información de cada una de las repeticiones (grupos) provenían de la misma población, empleando el software estadístico XLStat ecology (Statsoft, Inc.). Así también, se realizó un análisis de varianza para las variables costo y tiempo por comparación de medias mediante la prueba de Tukey utilizando el software estadístico Minitab 17 (Minitab Inc.).

## 7. RESULTADOS

Los 45 especímenes elaborados presentaron transparentación en el tejido muscular, así como fijación del colorante en el tejido óseo. Para consultar a detalle los reactivos, concentraciones, costo, tiempo y fotografías del proceso de las técnicas elaboradas dirigirse al apartado de anexos. A continuación, se describe por grupos los resultados obtenidos.

### 7.1 Aves (Grupo uno)

En la tabla V se describen las principales características observadas en la transparentación muscular, fijación del colorante e inconvenientes presentados; así también en la figura 2 se muestran los especímenes diafanizados correspondientes al grupo uno.

**Tabla V.** Resultados y características observadas en las aves diafanizadas

<b>Característica</b>	<b>Técnica de Dawson</b>	<b>Técnica de Taylor</b>	<b>Técnica de Dawson M</b>
<b>Tiempo</b>	161 días	177 días	128 días
<b>Transparentación muscular</b>	Completa	Completa	Completa
<b>Percepción visual de la transparentación</b>	Nítido	Opaco	Nítido
<b>Tonalidad del colorante en los huesos</b>	Magenta	Rosa	Morado
	Completa en el esqueleto axial.	Parcial en el esqueleto axial.	Completa en todo el esqueleto
<b>Fijación del colorante</b>	Ausente en la diáfisis de los huesos largos del esqueleto apendicular	Ausente en la diáfisis de los huesos largos del esqueleto apendicular Especimen B101: con nula tinción en costillas, vértebras y el pigóstilo.	

Continúa

<b>Retención muscular del colorante</b>	Escasa	Espécimen B102 retuvo colorante en los músculos pectorales	Escasa
<b>Fracturas o lesiones</b>	Espécimen A103: fractura expuesta en la región distal del tibio tarso	Espécimen B103: desprendimiento de siete costillas esternales	Espécimen C101: dos fracturas ( <i>antemortem</i> ) en escapulas y fémur
<b>Descamación epitelial</b>	Presente en el contorno	Presente en el contorno	Sin presencia
<b>Consistencia muscular</b>	Firme	Flácidos y frágiles	Firme

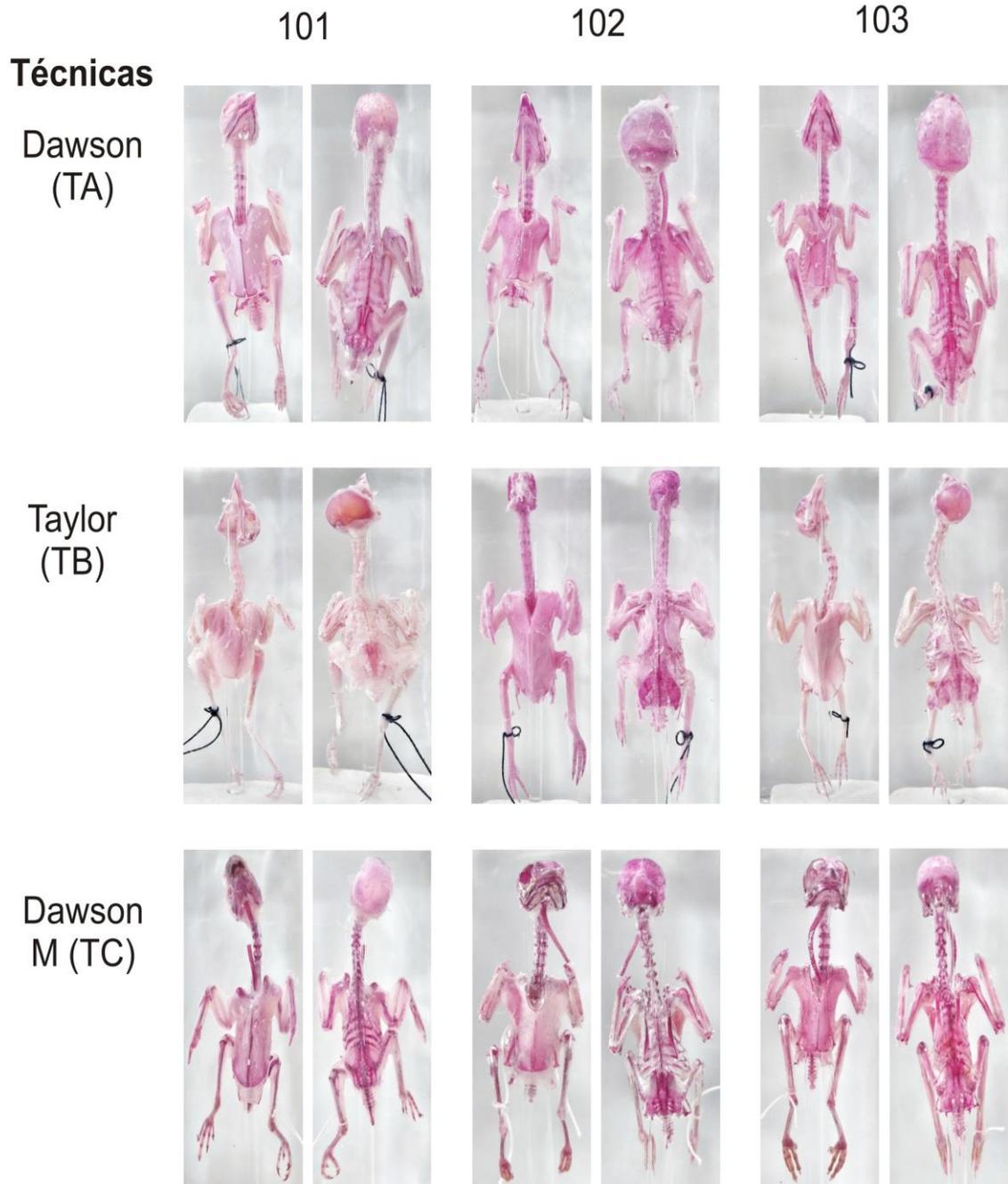
En la tabla VI se presentan los resultados de la comparación de medias por Tukey para las variables costo y tiempo. Para la variable costo, la TC con \$210.16 evidenció diferencias significativas ( $F= 3.93$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ) siendo la técnica más económica, con respecto a la TA y TB, estas dos técnicas demostraron tener un costo de elaboración similar de \$252.00. No obstante, para la variable tiempo, las tres técnicas demostraron tener diferencias significativas ( $F= 3.93$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ), observando que la TC diafanizó las muestras en el menor tiempo con 128 días, seguido de la TA con 161 días y finalmente con el mayor tiempo la TB con 177 días.

**Tabla VI.** Resumen de los resultados de costo (pesos) y tiempo (días) para el grupo de aves

<b>Variabes</b>	<b>N</b>	<b>Técnicas</b>		
		<b>Dawson (TA)</b>	<b>Taylor (TB)</b>	<b>Dawson M (TC)</b>
Costo	3	252.48 <sup>a</sup> ± 3.04	252.60 <sup>a</sup> ± 1.54	210.16 <sup>b</sup> ± 1.30
Tiempo	3	161 <sup>b</sup> ± 2.65	177 <sup>a</sup> ± 1.80	128 <sup>c</sup> ± 5.29

N= Número de repeticiones. <sup>a, b, c</sup> Literales diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ).  
Dawson M= Dawson modificada

## Clave de Identificación



**Figura 2.** Aves diafanizadas, mostrándose en vista ventral (izquierda) y vista dorsal (derecha).

### 7.1.1 Evaluación cualitativa del grupo de aves

Los resultados del análisis estadístico Kruskal-Wallis para el grupo uno, se observa en la tabla VII. La TA presentó diferencias significativas ( $F= 5.991$ ,  $g.l= 2$ ,  $p<0.05$ ) para las preguntas uno y dos (relacionadas con el grado de transparentación), donde ambos especímenes A101 y A102 evidenciaron una variación en el nivel de transparentación del tejido muscular con respecto a la A103; así también, la pregunta cinco referente al contraste observado en la TA presentó diferencias significativas ( $F= 5.991$ ,  $g.l= 2$ ,  $p<0.05$ ) entre las muestras A102 y A103. La TB solo presentó diferencias significativas ( $F= 5.991$ ,  $g.l= 2$ ,  $p<0.05$ ) en la pregunta uno, la cual señala distintos grados de transparentación entre los especímenes B102 y B103. Finalmente, la TC, no presentó diferencias significativas ( $F= 5.991$ ,  $g.l.= 2$ ,  $p>0.05$ ) entre las muestras, indicando que la técnica generó especímenes con la misma calidad en sus repeticiones.

**Tabla VII.** Resultados de la evaluación cualitativa para el grupo de aves

Pregunta	Técnica de Dawson			Técnica de Taylor			Técnica de Dawson M		
	A101	A102	A103	B101	B102	B103	C101	C102	C103
1	4.113 <sup>a</sup> ± 0.746	4.063 <sup>a</sup> ± 0.785	4.413 <sup>b</sup> ± 0.688	2.938 <sup>ab</sup> ± 0.801	2.763 <sup>a</sup> ± 0.846	3.163 <sup>b</sup> ± 1.049	4.538 <sup>a</sup> ± 0.655	4.688 <sup>a</sup> ± 0.493	4.738 <sup>a</sup> ± 0.522
2	3.913 <sup>a</sup> ± 0.814	3.863 <sup>a</sup> ± 0.853	4.288 <sup>b</sup> ± 0.678	2.775 <sup>a</sup> ± 1.031	2.488 <sup>a</sup> ± 0.928	2.850 <sup>a</sup> ± 1.104	4.475 <sup>a</sup> ± 0.636	4.475 <sup>a</sup> ± 0.656	4.538 <sup>a</sup> ± 0.711
3	4.038 <sup>a</sup> ± 0.920	3.963 <sup>a</sup> ± 0.987	4.125 <sup>a</sup> ± 0.973	2.575 <sup>a</sup> ± 1.053	2.467 <sup>a</sup> ± 1.107	2.637 <sup>a</sup> ± 0.873	4.675 <sup>a</sup> ± 0.546	4.475 <sup>a</sup> ± 0.711	4.625 <sup>a</sup> ± 0.644
4	3.825 <sup>a</sup> ± 0.978	3.988 <sup>a</sup> ± 0.819	4.138 <sup>a</sup> ± 0.775	2.538 <sup>a</sup> ± 1.201	2.563 <sup>a</sup> ± 1.123	2.575 <sup>a</sup> ± 1.178	4.438 <sup>a</sup> ± 0.777	4.125 <sup>a</sup> ± 0.960	4.313 <sup>a</sup> ± 0.848
5	4.125 <sup>ab</sup> ± 0.848	3.925 <sup>a</sup> ± 0.965	4.313 <sup>b</sup> ± 0.836	2.763 <sup>a</sup> ± 0.997	2.463 <sup>a</sup> ± 1.006	2.825 <sup>a</sup> ± 1.145	4.763 <sup>a</sup> ± 0.674	4.443 <sup>a</sup> ± 0.425	4.550 <sup>a</sup> ± 0.743
6	4.488 <sup>a</sup> ± 0.656	4.225 <sup>a</sup> ± 0.886	4.375 <sup>a</sup> ± 0.832	3.688 <sup>a</sup> ± 1.074	3.575 <sup>a</sup> ± 1.167	3.388 <sup>a</sup> ± 1.355	4.538 <sup>a</sup> ± 0.572	4.525 <sup>a</sup> ± 0.693	4.475 <sup>a</sup> ± 0.842
7	4.413 <sup>a</sup> ± 0.807	4.288 <sup>a</sup> ± 0.970	4.475 <sup>a</sup> ± 0.711	3.038 <sup>a</sup> ± 1.107	3.038 <sup>a</sup> ± 1.267	3.100 <sup>a</sup> ± 1.186	4.525 <sup>a</sup> ± 0.763	4.513 <sup>a</sup> ± 0.729	4.538 <sup>a</sup> ± 0.635

<sup>a, b, c</sup> Literales diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

**Preguntas:** 1.- ¿Es posible observar e identificar los huesos a través del cuerpo del animal?; 2.- ¿Es fácil observar las uniones entre los huesos (articulaciones)?; 3.- ¿Observas completamente pintados (teñidos) los huesos del animal?; 4.- ¿Te agrada la intensidad del color presente en los huesos del esqueleto animal?; 5.- ¿Se aprecia un contraste o diferencia entre los huesos teñidos y el cuerpo transparente?; 6.- ¿Se ha preservado la forma del cuerpo del animal que observas?; 7.- ¿Es agradable visualmente la presentación o exhibición de la muestra?.

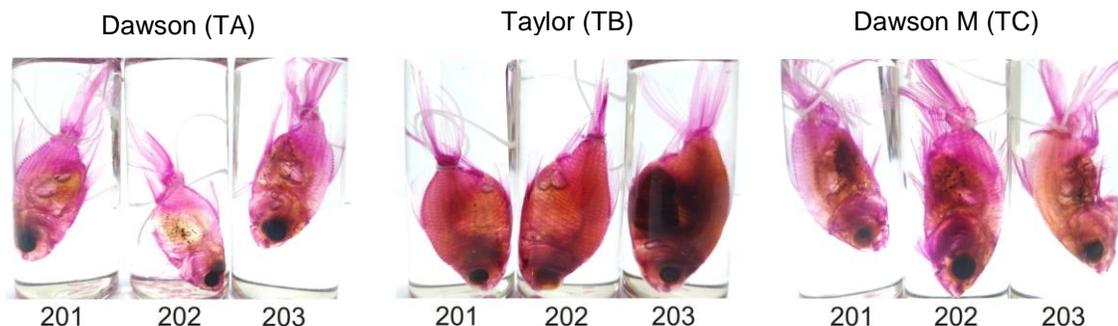
## 7.2 Peces (Grupo dos)

En la tabla VIII se observan los resultados obtenidos para la transparentación muscular, tinción del esqueleto y complicaciones presentadas. Se observó una notable variación en la transparentación muscular, así como en el grado de fijación del colorante en los huesos. En la figura 3 se muestran los especímenes sometidos al proceso de diafanización.

**Tabla VIII.** Resultados y características observadas en los peces diafanizados

<b>Característica</b>	<b>Técnica de Dawson</b>	<b>Técnica de Taylor</b>	<b>Técnica de Dawson M</b>
<b>Tiempo</b>	43 días	60 días	35 días
<b>Transparentación muscular</b>	Completa	Parcial	Completa
<b>Percepción visual de la transparentación</b>	Nítido	Opaco	Nítido
<b>Tonalidad del colorante en los huesos</b>	Magenta	Rosa	Morado
<b>Fijación del colorante</b>	Completa en el esqueleto y aletas	Completa en el esqueleto y aletas	Completa en el esqueleto y aletas
<b>Retención muscular del colorante</b>	Inexistente	Inexistente	Inexistente
<b>Fracturas o lesiones</b>	Especímen A202: pérdida parcial de la aleta pélvica y pectoral. Daño por corrosión en zona abdominal	Ninguna	Especímen C203: Daño zona abdominal, con pérdida de algunas costillas y el par de aletas pectorales
<b>Descamación</b>	Inexistente	Inexistente	Inexistente
<b>Consistencia muscular</b>	Firme	Firme	Firme

## Técnicas



**Figura 3.** Peces diafanizados, mostrándose en vista lateral

Los resultados obtenidos de la comparación de medias por el estadístico Tukey para las variables costo y tiempo se observan en la tabla IX. El costo de elaboración de las técnicas evidenció diferencias significativas ( $F= 3.93$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ), siendo la TA la de menor costo de elaboración con \$23.00, seguida de la TC con un costo de \$34.53 y finalmente la TB con un costo total de \$49.74. Para la variable tiempo, las tres técnicas demostraron tener diferencias significativas ( $F= 3.93$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ), teniendo la TC el menor tiempo de trabajo de diafanización con 34 días, seguido de la TA con 43 días y finalmente con el mayor tiempo la TB con 60 días

**Tabla IX.** Resumen de los resultados de costo (pesos) y tiempo (días) para el grupo de peces

Variables	N	Técnicas		
		Dawson (TA)	Taylor (TB)	Dawson M (TC)
Costo	3	23.00 <sup>c</sup> ± 1.00	49.74 <sup>a</sup> ± 1.85	34.53 <sup>b</sup> ± 2.19
Tiempo	3	43 <sup>b</sup> ± 1.97	60 <sup>a</sup> ± 1.26	35 <sup>c</sup> ± 3.61

N= Número de repeticiones. <sup>a, b, c</sup> Literales diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ).  
Dawson M= Dawson modificada

### 7.2.1 Evaluación cualitativa del grupo de peces

Los resultados del análisis estadístico Kruskal-Wallis para el grupo dos se aprecian en la tabla X. La TA no presentó diferencias significativas ( $F= 5.991$ ,  $g.l= 2$ ,  $p>0.05$ ), demostrando ser la técnica más equilibrada, generando especímenes con la misma calidad en sus repeticiones. La TB presentó diferencias significativas ( $F= 5.991$ ,  $g.l= 2$ ,  $p<0.05$ ), en las preguntas uno, cuatro y cinco las cuales indican una variación en el grado de transparentación y tinción de las muestras B201 y B202 con respecto a la B203; de acuerdo a las preguntas dos, tres y siete el espécimen B201 demostró diferencias en el grado de transparentación, tinción y montaje con respecto al espécimen B203. La TC presentó diferencias significativas ( $F= 5.991$ ,  $g.l= 2$ ,  $p<0.05$ ), para las preguntas cuatro y siete, manifestando una variación en el grado de tinción y aceptación del montaje entre los especímenes C201 y C203; de igual forma, la pregunta seis expresó diferencias entre el espécimen C203 con respecto a las dos muestras en la conservación de la forma corporal.

**Tabla X** Resultados de la evaluación cualitativa para el grupo de peces.

Pregunta	Técnica de Dawson			Técnica de Taylor			Técnica de Dawson M		
	A201	A202	A203	B201	B202	B203	C201	C202	C203
1	3.638 <sup>a</sup> ± 0.799	3.775 <sup>a</sup> ± 0.993	3.725 <sup>a</sup> ± 0.981	2.925 <sup>b</sup> ± 1.053	2.863 <sup>b</sup> ± 1.003	2.250 <sup>a</sup> ± 0.879	3.888 <sup>a</sup> ± 0.842	3.575 <sup>a</sup> ± 0.978	3.563 <sup>a</sup> ± 1.054
2	3.350 <sup>a</sup> ± 1.032	3.338 <sup>a</sup> ± 1.102	3.250 <sup>a</sup> ± 1.185	2.613 <sup>b</sup> ± 1.061	2.475 <sup>ab</sup> ± 1.067	2.100 <sup>a</sup> ± 0.866	3.488 <sup>a</sup> ± 1.067	3.263 <sup>a</sup> ± 1.133	3.350 <sup>a</sup> ± 1.148
3	3.738 <sup>a</sup> ± 0.964	3.688 <sup>a</sup> ± 0.936	3.788 <sup>a</sup> ± 0.910	2.763 <sup>b</sup> ± 1.082	2.913 <sup>ab</sup> ± 0.996	2.413 <sup>a</sup> ± 0.964	3.725 <sup>a</sup> ± 0.954	3.538 <sup>a</sup> ± 1.124	3.325 <sup>a</sup> ± 1.053
4	3.650 <sup>a</sup> ± 1.126	3.450 <sup>a</sup> ± 1.190	3.713 <sup>a</sup> ± 1.046	2.828 <sup>b</sup> ± 1.185	2.838 <sup>b</sup> ± 1.206	2.288 <sup>a</sup> ± 1.093	3.975 <sup>b</sup> ± 0.993	3.688 <sup>ab</sup> ± 1.249	3.350 <sup>a</sup> ± 1.351
5	3.713 <sup>a</sup> ± 0.970	3.763 <sup>a</sup> ± 0.984	3.750 <sup>a</sup> ± 1.049	2.788 <sup>b</sup> ± 1.219	2.788 <sup>b</sup> ± 1.052	2.250 <sup>a</sup> ± 0.987	3.725 <sup>a</sup> ± 1.006	3.538 <sup>a</sup> ± 1.090	3.575 <sup>a</sup> ± 1.111
6	4.46 <sup>a</sup> ± 0.655	4.200 <sup>a</sup> ± 0.818	4.375 <sup>a</sup> ± 0.700	4.000 <sup>a</sup> ± 0.994	4.050 <sup>a</sup> ± 0.980	3.788 <sup>a</sup> ± 1.166	4.175 <sup>b</sup> ± 0.759	3.863 <sup>b</sup> ± 0.910	3.250 <sup>a</sup> ± 1.196
7	4.288 <sup>a</sup> ± 0.814	4.138 <sup>a</sup> ± 0.924	4.225 <sup>a</sup> ± 0.856	3.613 <sup>b</sup> ± 1.253	3.500 <sup>ab</sup> ± 1.136	3.113 <sup>a</sup> ± 1.253	4.238 <sup>b</sup> ± 0.889	3.888 <sup>ab</sup> ± 1.043	3.775 <sup>a</sup> ± 1.102

<sup>a, b, c</sup> Literales diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ).

**Preguntas:** 1.- ¿Es posible observar e identificar los huesos a través del cuerpo del animal?; 2.- ¿Es fácil observar las uniones entre los huesos (articulaciones)?; 3.- ¿Observas completamente pintados (teñidos) los huesos del animal?; 4.- ¿Te agrada la intensidad del color presente en los huesos del esqueleto animal?; 5.- ¿Se aprecia un contraste o diferencia entre los huesos teñidos y el cuerpo transparente?; 6.- ¿Se ha preservado la forma del cuerpo del animal que observas?; 7.- ¿Es agradable visualmente la presentación o exhibición de la muestra?.

### 7.3 Mamíferos (Grupo tres)

En la tabla XI se presentan los resultados obtenidos para la transparentación muscular, tinción del esqueleto y dificultades presentadas. Este grupo mostró la más completa transparentación sobre la musculatura y la mejor fijación del colorante en las estructuras óseas (Fig. 4).

**Tabla XI.** Resultados y características observadas en los mamíferos diafanizados

<b>Característica</b>	<b>Técnica de Dawson</b>	<b>Técnica de Taylor</b>	<b>Técnica de Dawson M</b>
<b>Tiempo</b>	82 días	119 días	66 días
<b>Transparentación muscular</b>	Completa	Completa	Completa
<b>Percepción visual de la transparentación</b>	Nítido	Opaco	Nítido
<b>Tonalidad del colorante en los huesos</b>	Magenta	Magenta	Morado
<b>Fijación del colorante</b>	Completa en todo el esqueleto; excepto, en el espécimen A302 con una menor fijación en la diáfisis de los huesos largos	Completa en el esqueleto axial. Ausente en la diáfisis de los huesos largos del esqueleto apendicular. Especímenes B301 y B302 tinción incompleta de las vértebras coccígeas	Completa en el esqueleto axial y apendicular
<b>Retención muscular del colorante</b>	Inexistente	Inexistente	Inexistente
<b>Fracturas o lesiones</b>	Especímen A301: desprendimiento de hueso nasal. Especímen A302: pérdida de vértebras coccígeas distales al hueso pélvico. (vértebras de la cola)	Ninguna	Ninguna
<b>Descamación epitelial</b>	Inexistente	Inexistente	Inexistente
<b>Consistencia muscular</b>	Firme	Firme	Frágil

## Clave de Identificación

301

302

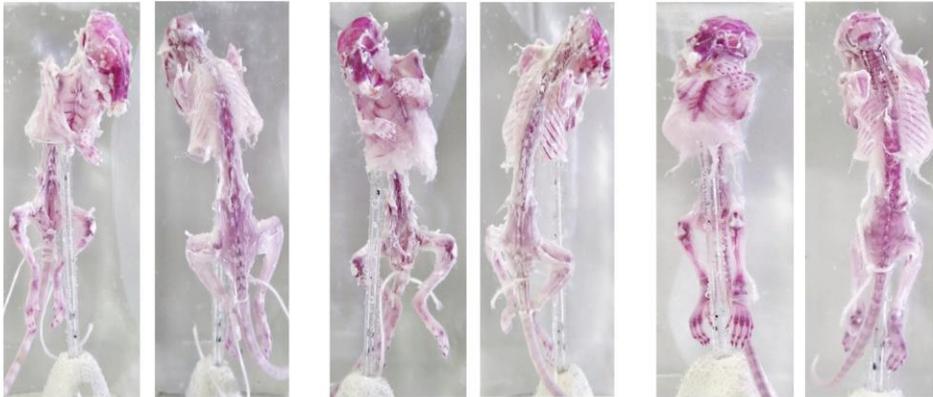
303

### Técnicas

Dawson  
(TA)



Taylor  
(TB)



Dawson  
M (TC)



**Figura 4.** Mamíferos diafanizados, mostrándose en vista ventral (izquierda) y vista dorsal (derecha).

Los resultados de la comparación de medias por Tukey para las variables costo y tiempo se observan en la tabla XII. El costo de elaboración de las técnicas evidenció diferencias significativas ( $F= 3.93$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ) entre las técnicas, la TC demostró un menor costo con \$85.64, seguida de la TA con un costo de \$91.37 y finalmente la TB con un costo total de \$130.79. Para la variable tiempo, las tres técnicas demostraron tener diferencias significativas ( $F= 3.93$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ), siendo nuevamente la TC la de menor tiempo de diafanización con 66 días, seguido de la TA con 82 días y finalmente el mayor tiempo fue para la TB con 119 días.

**Tabla XII.** Resumen de los resultados de costo (pesos) y tiempo (días) para el grupo de mamíferos

Variables	N	Técnicas		
		Dawson (TA)	Taylor (TB)	Dawson M (TC)
Costo	3	91.37 <sup>b</sup> ± 0.57	130.79 <sup>a</sup> ± 2.15	85.64 <sup>c</sup> ± 1.70
Tiempo	3	82 <sup>b</sup> ± 0.81	119 <sup>a</sup> ± 1.73	66 <sup>c</sup> ± 0.76

N= Número de repeticiones. <sup>a, b, c</sup> Literales diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ).  
Dawson M= Dawson modificada

### 7.3.1 Evaluación cualitativa del grupo de mamíferos

Los resultados del análisis estadístico Kruskal-Wallis realizado al grupo tres se muestran en la tabla XIII. Indicando que no existe variación ( $F= 5.991$ , g.l.= 2,  $p>0.05$ ) dentro de los procedimientos evaluados, revelando que los efectos de las técnicas fueron consistentes en sus repeticiones; no obstante, la TA y TC en el grupo contaron con los valores de ponderación más altos dentro de la escala de evaluación Likert, siendo superiores a lo presentado por la TB.

**Tabla XIII** Resultados de la evaluación cualitativa para el grupo de mamíferos

Pregunta	Técnica de Dawson			Técnica de Taylor			Técnica de Dawson M		
	A301	A302	A303	B301	B302	B303	C301	C302	C303
<b>1</b>	4.513 <sup>a</sup> ± 0.551	4.400 <sup>a</sup> ± 0.686	4.500 <sup>a</sup> ± 0.551	3.588 <sup>a</sup> ± 0.807	3.413 <sup>a</sup> ± 0.882	3.413 <sup>a</sup> ± 0.882	4.625 <sup>a</sup> ± 0.560	4.725 <sup>a</sup> ± 0.527	4.738 <sup>a</sup> ± 0.545
<b>2</b>	4.413 <sup>a</sup> ± 0.630	4.263 <sup>a</sup> ± 0.707	4.350 <sup>a</sup> ± 0.748	3.275 <sup>a</sup> ± 0.856	3.113 <sup>a</sup> ± 1.043	3.150 <sup>a</sup> ± 1.008	4.438 <sup>a</sup> ± 0.726	4.513 <sup>a</sup> ± 0.729	4.525 <sup>a</sup> ± 0.675
<b>3</b>	4.475 <sup>a</sup> ± 0.746	4.238 <sup>a</sup> ± 0.917	4.463 <sup>a</sup> ± 0.927	3.188 <sup>a</sup> ± 0.915	3.163 <sup>a</sup> ± 1.037	3.225 <sup>a</sup> ± 1.006	4.663 <sup>a</sup> ± 0.615	4.750 <sup>a</sup> ± 0.464	4.675 <sup>a</sup> ± 0.759
<b>4</b>	4.413 <sup>a</sup> ± 0.937	4.113 <sup>a</sup> ± 1.114	4.275 <sup>a</sup> ± 0.941	3.000 <sup>a</sup> ± 1.006	2.925 <sup>a</sup> ± 1.088	3.063 <sup>a</sup> ± 1.035	4.388 <sup>a</sup> ± 0.755	4.413 <sup>a</sup> ± 0.791	4.425 <sup>a</sup> ± 0.759
<b>5</b>	4.500 <sup>a</sup> ± 0.675	4.275 <sup>a</sup> ± 0.779	4.375 <sup>a</sup> ± 0.718	3.275 <sup>a</sup> ± 1.055	3.100 <sup>a</sup> ± 1.086	3.213 <sup>a</sup> ± 1.015	4.150 <sup>a</sup> ± 0.969	4.138 <sup>a</sup> ± 0.964	4.113 <sup>a</sup> ± 1.006
<b>6</b>	4.450 <sup>a</sup> ± 0.634	4.325 <sup>a</sup> ± 0.725	4.388 <sup>a</sup> ± 0.720	3.875 <sup>a</sup> ± 1.036	3.850 <sup>a</sup> ± 1.057	3.863 <sup>a</sup> ± 1.076	4.118 <sup>a</sup> ± 0.969	4.188 <sup>a</sup> ± 0.915	4.238 <sup>a</sup> ± 0.875
<b>7</b>	4.550 <sup>a</sup> ± 0.840	4.413 <sup>a</sup> ± 0.822	4.513 <sup>a</sup> ± 0.795	3.538 <sup>a</sup> ± 1.043	3.463 <sup>a</sup> ± 1.043	3.538 <sup>a</sup> ± 0.993	4.413 <sup>a</sup> ± 0.852	4.463 <sup>a</sup> ± 0.826	4.488 <sup>a</sup> ± 0.795

<sup>a, b, c</sup> Literales diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**Preguntas:** 1.- ¿Es posible observar e identificar los huesos a través del cuerpo del animal?; 2.- ¿Es fácil observar las uniones entre los huesos (articulaciones)?; 3.- ¿Observas completamente pintados (teñidos) los huesos del animal?; 4.- ¿Te agrada la intensidad del color presente en los huesos del esqueleto animal?; 5.- ¿Se aprecia un contraste o diferencia entre los huesos teñidos y el cuerpo transparente?; 6.- ¿Se ha preservado la forma del cuerpo del animal que observas?; 7.- ¿Es agradable visualmente la presentación o exhibición de la muestra?.

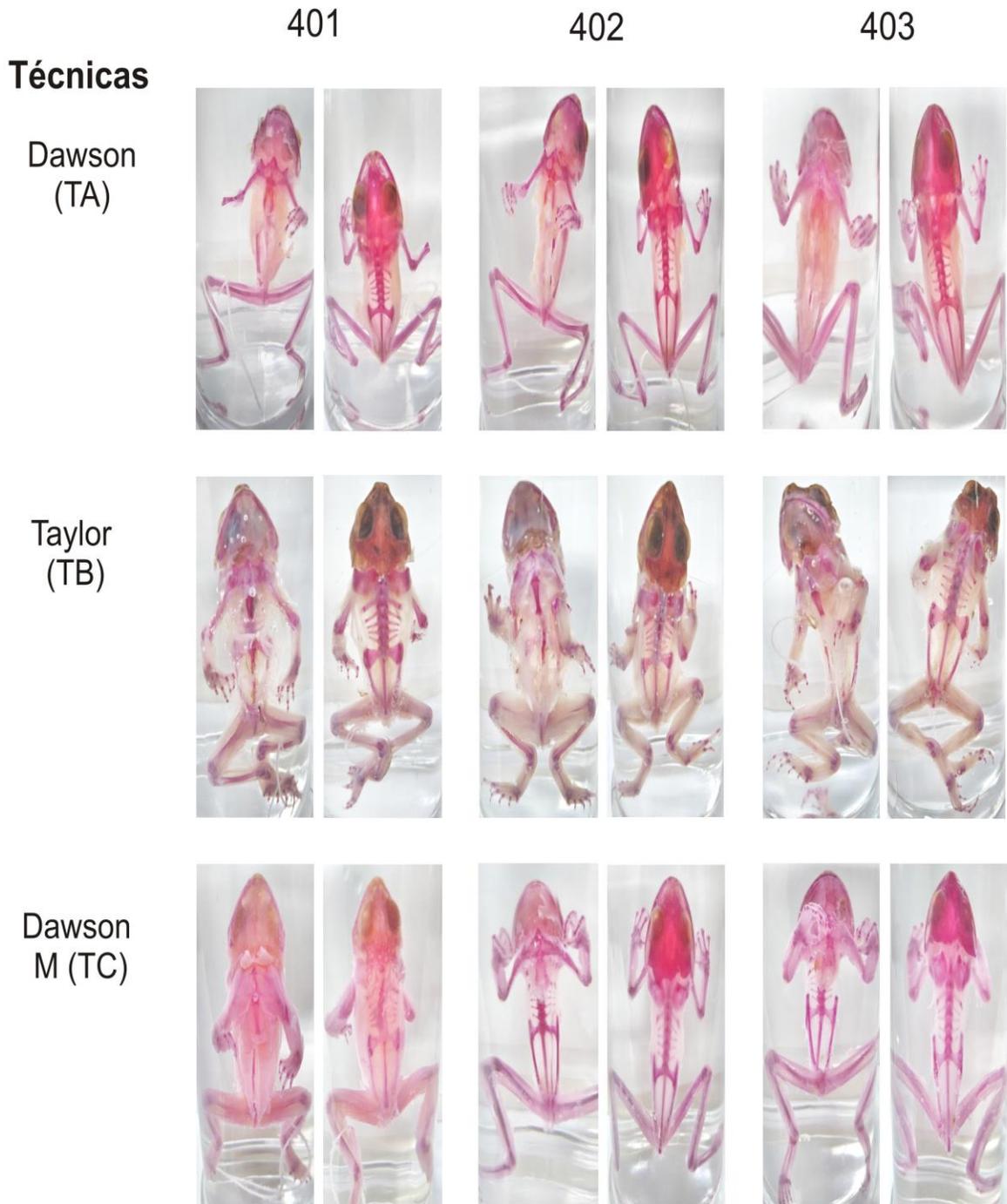
#### 7.4 Anfibios (Grupo cuatro)

Los resultados conseguidos para la transparentación muscular, tinción del esqueleto y dificultades presentadas se comentan en la tabla XIV. El grupo presentó transparentación muscular y fijación del colorante en el esqueleto (Fig. 5); sin embargo, se observó una variada transparentación en la piel que recubre el cráneo, esto debido a que no fue retirada completamente.

**Tabla XIV.** Resultados y características observadas en los anfibios diafanizados

<b>Característica</b>	<b>Técnica de Dawson</b>	<b>Técnica de Taylor</b>	<b>Técnica de Dawson M</b>
<b>Tiempo</b>	123 días	124 días	103 días
<b>Transparentación muscular</b>	Completa	Completa en el cuerpo; nula en la zona craneal	Completa
<b>Percepción visual de la transparentación</b>	Nítido	Nítido	Nítido Opaco solo para espécimen C401
<b>Tonalidad del colorante en los huesos</b>	Magenta	Magenta	Magenta
<b>Fijación del colorante</b>	Completa en todo el esqueleto.	Escasa en el esqueleto axial. Ausente en la diáfisis de los huesos largos y falanges del esqueleto apendicular.	Completa en el esqueleto axial y apendicular. Ausente en el cráneo y diáfisis de los huesos largos del espécimen C401
<b>Retención muscular del colorante</b>	Ligera	Inexistente	Ligera Considerada en espécimen C401
<b>Fracturas o lesiones</b>	Espécimen A401: desprendimiento de la mano izquierda	Ninguna	Ninguna
<b>Descamación epitelial</b>	Ligera	Ligera	Ligera
<b>Consistencia muscular</b>	Firme	Flácidos	Frágil

## Clave de Identificación



**Figura 5.** Anfibios diafanizados, mostrándose en vista ventral (izquierda) y vista dorsal (derecha).

La comparación de medias por Tukey para las variables costo y tiempo se observa en la tabla XV. El costo de elaboración de las técnicas evidenció diferencias significativas ( $F= 3.93$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ), siendo la TA la de menor costo con \$126.13, posteriormente la TC con un costo de \$130.91 y finalmente la TB con un costo total de \$186.39. Para la variable tiempo, existieron diferencias significativas ( $F= 3.93$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ) siendo la TC la de menor tiempo de elaboración con 102 días, la TA y la TB demostraron estadísticamente tiempos similares con 123 y 124 días respectivamente.

**Tabla XV.** Resumen de los resultados de costo (pesos) y tiempo (días) para los anfibios

Variables	N	Técnicas		
		Dawson (TA)	Taylor (TB)	Dawson M (TC)
Costo	3	126.13 <sup>c</sup> ± 1.95	186.39 <sup>a</sup> ± 1.21	130.91 <sup>b</sup> ± 1.70
Tiempo	3	123 <sup>a</sup> ± 2.65	124 <sup>a</sup> ± 1.73	102 <sup>b</sup> ± 2.08

N= Número de repeticiones. <sup>a, b, c</sup> Literales diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ).  
Dawson M= Dawson modificada

#### 7.4.1 Evaluación cualitativa del grupo de anfibios

Los resultados del análisis estadístico Kruskal-Wallis correspondiente al grupo cuatro (Tabla XVI), demuestran que la TA y la TB no mostraron diferencias significativas ( $F= 5.991$ , g.l.= 2,  $p>0.05$ ) entre las muestras. Por último, la TC presentó diferencias significativas ( $F= 5.991$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ) para las preguntas uno, dos, tres, cuatro y cinco, las cuales abordan características de transparentación, tinción y contraste de la técnica, indicando diferencias en el espécimen C401 con respecto a las otras dos muestras generadas; así también, la pregunta siete indicó diferencias entre lo agradable del montaje observado en el espécimen C401 con respecto al C403. Los valores de ponderación más altos dentro de la escala de evaluación Likert fueron generados por la TA.

**Tabla XVI** Resultados de la evaluación cualitativa para el grupo de anfibios

Pregunta	Técnica de Dawson			Técnica de Taylor			Técnica de Dawson M		
	A401	A402	A403	B401	B402	B403	C401	C402	C403
<b>1</b>	4.313 <sup>a</sup> ± 0.587	4.213 <sup>a</sup> ± 0.706	4.200 <sup>a</sup> ± 0.848	3.150 <sup>a</sup> ± 0.843	3.363 <sup>a</sup> ± 0.799	3.275 <sup>a</sup> ± 1.031	3.025 <sup>a</sup> ± 1.055	4.050 <sup>b</sup> ± 0.745	3.988 <sup>b</sup> ± 0.819
<b>2</b>	4.138 <sup>a</sup> ± 0.670	4.025 <sup>a</sup> ± 0.842	4.075 <sup>a</sup> ± 0.759	2.875 <sup>a</sup> ± 0.998	3.088 <sup>a</sup> ± 0.996	3.100 <sup>a</sup> ± 1.001	2.975 <sup>a</sup> ± 1.125	3.775 <sup>b</sup> ± 0.811	3.775 <sup>b</sup> ± 0.871
<b>3</b>	4.175 <sup>a</sup> ± 0.839	4.038 <sup>a</sup> ± 0.878	4.075 <sup>a</sup> ± 0.883	3.188 <sup>a</sup> ± 0.915	3.225 <sup>a</sup> ± 0.981	3.050 <sup>a</sup> ± 1.078	3.125 <sup>a</sup> ± 1.048	3.888 <sup>b</sup> ± 0.857	4.025 <sup>b</sup> ± 0.871
<b>4</b>	4.288 <sup>a</sup> ± 0.874	4.113 <sup>a</sup> ± 0.886	4.125 <sup>a</sup> ± 1.011	2.825 <sup>a</sup> ± 1.065	2.975 <sup>a</sup> ± 1.147	2.975 <sup>a</sup> ± 1.018	2.938 <sup>a</sup> ± 1.184	3.800 <sup>b</sup> ± 0.892	3.825 <sup>b</sup> ± 0.965
<b>5</b>	4.088 <sup>a</sup> ± 0.830	4.013 <sup>a</sup> ± 0.849	4.063 <sup>a</sup> ± 0.891	2.813 <sup>a</sup> ± 0.982	3.088 <sup>a</sup> ± 1.034	3.325 <sup>a</sup> ± 2.443	2.988 <sup>a</sup> ± 1.206	3.713 <sup>b</sup> ± 0.970	3.788 <sup>b</sup> ± 0.977
<b>6</b>	3.950 <sup>a</sup> ± 0.926	4.050 <sup>a</sup> ± 0.855	4.288 <sup>a</sup> ± 0.766	3.513 <sup>a</sup> ± 1.006	3.600 <sup>a</sup> ± 0.908	3.600 <sup>a</sup> ± 0.949	3.938 <sup>a</sup> ± 0.998	3.713 <sup>a</sup> ± 1.193	3.825 <sup>a</sup> ± 1.134
<b>7</b>	4.138 <sup>a</sup> ± 0.882	4.038 <sup>a</sup> ± 0.987	4.050 <sup>a</sup> ± 0.992	3.063 <sup>a</sup> ± 1.129	3.213 <sup>a</sup> ± 1.027	3.150 <sup>a</sup> ± 1.069	3.400 <sup>a</sup> ± 1.218	3.838 <sup>ab</sup> ± 0.906	3.875 <sup>b</sup> ± 0.986

a, b, c Literales diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**Preguntas:** 1.- ¿Es posible observar e identificar los huesos a través del cuerpo del animal?; 2.- ¿Es fácil observar las uniones entre los huesos (articulaciones)?; 3.- ¿Observas completamente pintados (teñidos) los huesos del animal?; 4.- ¿Te agrada la intensidad del color presente en los huesos del esqueleto animal?; 5.- ¿Se aprecia un contraste o diferencia entre los huesos teñidos y el cuerpo transparente?; 6.- ¿Se ha preservado la forma del cuerpo del animal que observas?; 7.- ¿Es agradable visualmente la presentación o exhibición de la muestra?.

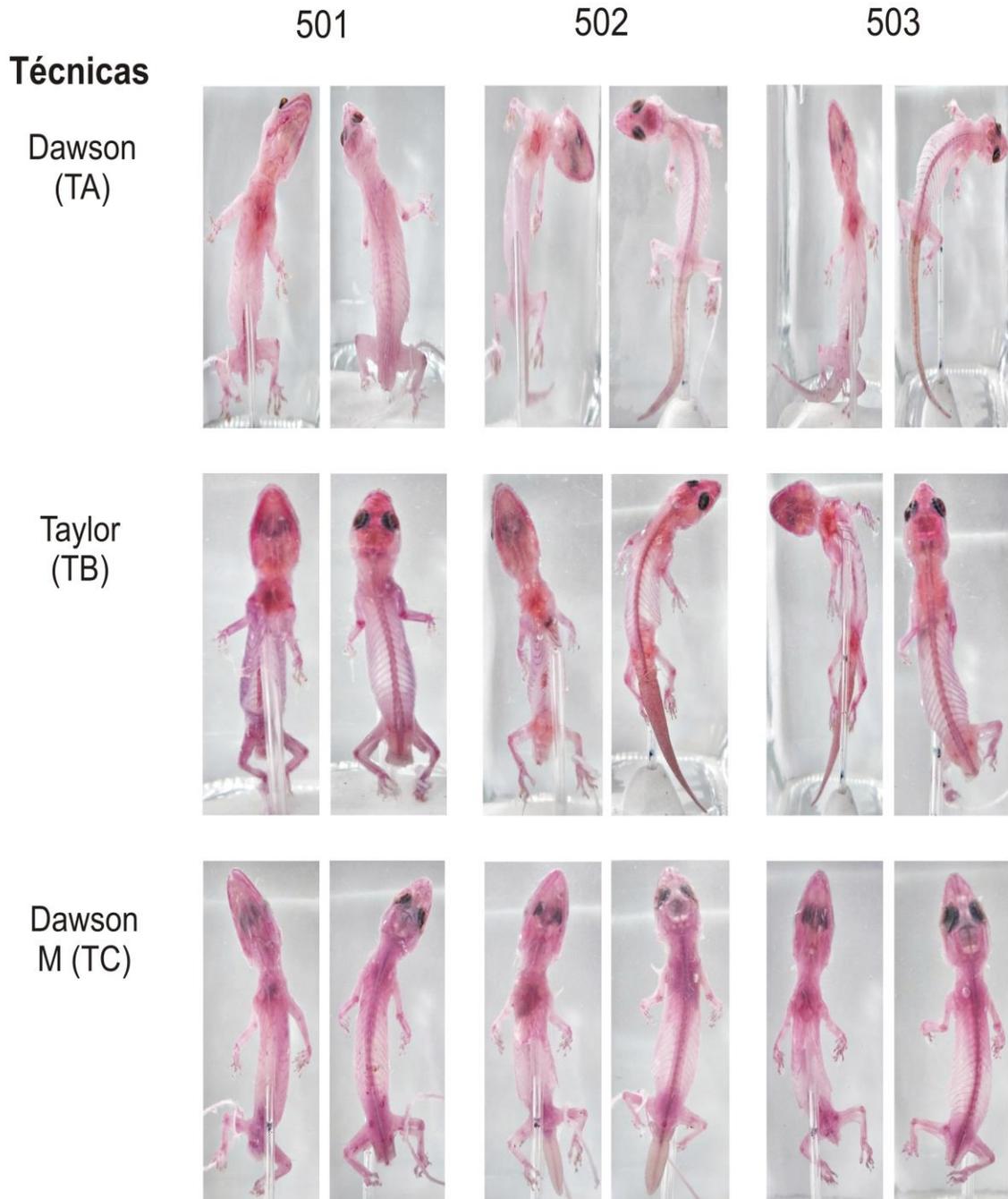
## 7.5 Reptiles (Grupo cinco)

Finalmente, los resultados obtenidos en el último grupo para el grado de transparentación muscular, tinción del esqueleto e inconvenientes presentados se describen en la tabla XVII. Los especímenes se observan en la figura 6, los cuales comparados con los otros cuatro grupos presentaron de manera general una coloración ligeramente menos intensa; no obstante, es posible la observación completa de las estructuras óseas a través del tejido muscular transparentado.

**Tabla XVII.** Resultados y características observadas en los reptiles diafanizados

<b>Característica</b>	<b>Técnica de Dawson</b>	<b>Técnica de Taylor</b>	<b>Técnica de Dawson M</b>
<b>Tiempo</b>	97 días	112 días	95 días
<b>Transparentación muscular</b>	Completa	Completa	Completa
<b>Percepción visual de la transparentación</b>	Translucido	Nítido	Translucido
<b>Tonalidad del colorante en los huesos</b>	Rosa	Magenta	Magenta
<b>Fijación del colorante</b>	Completa en esqueleto axial. Parcial en el esqueleto apendicular	Completa en esqueleto axial y apendicular	Completa en esqueleto axial. Parcial en el esqueleto apendicular
<b>Retención muscular del colorante</b>	Ligera en zona pectoral	Inexistente	Considerada en zona pectoral y pélvica
<b>Fracturas o lesiones</b>	Desprendimiento de cola en el espécimen A501	Desprendimiento de cola en los especímenes B501 y B503	Desprendimiento de cola en los especímenes C501 y C503
<b>Descamación epitelial</b>	Inexistente	Inexistente	Inexistente
<b>Consistencia muscular</b>	Firme	Flácidos	Firme

## Clave de Identificación



**Figura 6.** Reptiles diafanizados, mostrándose en vista ventral (izquierda) y vista dorsal (derecha).

La tabla XVIII, presenta los resultados de la comparación de medias para las variables costo y tiempo de las tres técnicas. En cuanto al costo, la TA con \$60.21 y la TC con \$65.17 fueron similares, presentando diferencias significativas ( $F= 3.93$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ) con la TB cuyo costo total fue de \$110.59. De la misma forma para la variable tiempo, la TC con un tiempo de 95 días y la TA con 97 días fueron similares, demostrando diferencias significativas ( $F= 3.93$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ) con la TB con un tiempo total de \$112 días.

**Tabla XVIII** Resumen de los resultados de costo (pesos) y tiempo (días) para los reptiles

Variables	N	Técnicas		
		Dawson (TA)	Taylor (TB)	Dawson M (TC)
Costo	3	60.21 <sup>b</sup> ± 2.98	110.59 <sup>a</sup> ± 2.25	65.17 <sup>b</sup> ± 1.04
Tiempo	3	97 <sup>b</sup> ± 2.76	112 <sup>a</sup> ± 1.80	95 <sup>b</sup> ± 1.02

N= Número de repeticiones. <sup>a, b, c</sup> Literales diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas ( $p<0.05$ ).  
Dawson M= Dawson modificada

### 7.5.1 Evaluación cualitativa del grupo de reptiles

Los resultados del análisis estadístico Kruskal-Wallis para el grupo cinco se observan en la tabla XIX. La TA presentó diferencias significativas ( $F= 5.991$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ), en la pregunta uno referente a la transparentación y seis que indica la conservación del cuerpo entre los especímenes A501 y A502. Para la TB existen diferencias significativas ( $F= 5.991$ , g.l.= 2,  $p<0.05$ ) en las preguntas seis y siete relacionadas con conservación del cuerpo y lo atractivo del montaje final, indicando variaciones en estos aspectos en las muestras B502 y B503. Finalmente, la TC no presentó diferencias significativas ( $F= 5.991$ , g.l.= 2,  $p>0.05$ ) expresando que los efectos de la técnica fueron apreciables de la misma forma en todas las repeticiones.

**Tabla XIX.** Resultados de la evaluación cualitativa para el grupo de reptiles

Pregunta	Técnica de Dawson			Técnica de Taylor			Técnica de Dawson M		
	A501	A502	A503	B501	B502	B503	C501	C502	C503
<b>1</b>	3.588 <sup>a</sup> ± 0.977	4.063 <sup>b</sup> ± 0.785	3.825 <sup>ab</sup> ± 0.823	3.713 <sup>a</sup> ± 0.830	3.588 <sup>a</sup> ± 0.867	3.688 <sup>a</sup> ± 0.908	3.775 <sup>a</sup> ± 0.656	3.813 <sup>a</sup> ± 0.695	3.900 <sup>a</sup> ± 0.739
<b>2</b>	3.488 <sup>a</sup> ± 1.006	3.763 <sup>a</sup> ± 0.860	3.663 <sup>a</sup> ± 0.885	3.438 <sup>a</sup> ± 0.809	3.238 <sup>a</sup> ± 0.875	3.475 <sup>a</sup> ± 0.811	3.550 <sup>a</sup> ± 0.913	3.513 <sup>a</sup> ± 0.857	3.650 <sup>a</sup> ± 0.828
<b>3</b>	3.288 <sup>a</sup> ± 0.961	3.613 <sup>a</sup> ± 0.893	3.550 <sup>a</sup> ± 0.840	3.625 <sup>a</sup> ± 0.973	3.300 <sup>a</sup> ± 0.986	3.388 <sup>a</sup> ± 1.013	3.538 <sup>a</sup> ± 0.841	3.388 <sup>a</sup> ± 0.893	3.650 <sup>a</sup> ± 0.843
<b>4</b>	3.313 <sup>a</sup> ± 1.176	3.525 <sup>a</sup> ± 1.055	3.388 <sup>a</sup> ± 1.013	3.513 <sup>a</sup> ± 0.994	3.150 <sup>a</sup> ± 1.104	3.250 <sup>a</sup> ± 1.153	3.488 <sup>a</sup> ± 0.900	3.388 <sup>a</sup> ± 0.948	3.638 <sup>a</sup> ± 0.767
<b>5</b>	3.600 <sup>a</sup> ± 0.976	3.875 <sup>a</sup> ± 0.802	3.750 <sup>a</sup> ± 0.755	3.513 <sup>a</sup> ± 0.900	3.413 <sup>a</sup> ± 0.951	3.663 <sup>a</sup> ± 0.980	3.675 <sup>a</sup> ± 0.808	3.675 <sup>a</sup> ± 0.823	3.775 <sup>a</sup> ± 0.746
<b>6</b>	3.875 <sup>a</sup> ± 1.011	4.325 <sup>b</sup> ± 0.742	4.328 <sup>ab</sup> ± 0.767	3.700 <sup>ab</sup> ± 1.095	3.500 <sup>b</sup> ± 1.191	4.038 <sup>a</sup> ± 0.961	3.850 <sup>a</sup> ± 0.901	3.963 <sup>a</sup> ± 0.803	3.850 <sup>a</sup> ± 0.943
<b>7</b>	3.713 <sup>a</sup> ± 1.015	4.088 <sup>a</sup> ± 0.944	3.900 <sup>a</sup> ± 1.063	3.668 <sup>ab</sup> ± 1.098	3.513 <sup>b</sup> ± 1.158	3.988 <sup>a</sup> ± 1.000	3.838 <sup>a</sup> ± 0.961	3.850 <sup>a</sup> ± 0.969	3.888 <sup>a</sup> ± 0.827

**a, b, c** Literales diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

**1.-** ¿Es posible observar e identificar los huesos a través del cuerpo del animal?; **2.-** ¿Es fácil observar las uniones entre los huesos (articulaciones)?; **3.-** ¿Observas completamente pintados (teñidos) los huesos del animal?; **4.-** ¿Te agrada la intensidad del color presente en los huesos del esqueleto animal?; **5.-** ¿Se aprecia un contraste o diferencia entre los huesos teñidos y el cuerpo transparente?; **6.-** ¿Se ha preservado la forma del cuerpo del animal que observas?; **7.-** ¿Es agradable visualmente la presentación o exhibición de la muestra?.

## 8. DISCUSIÓN

La identificación y valoración de las técnicas de diafanización aplicadas en el Laboratorio de Colecciones Biológicas requirió del conocimiento previo de las estructuras anatómicas para observar cada una de las variantes morfológicas de los especímenes e identificar los músculos y huesos, con esta información se catalogó el grado de transparentación del tejido muscular y tinción sobre el esqueleto. Estos datos se compararon con los obtenidos en la valoración cualitativa para homogenizar los resultados del grado de transparentación y tinción, permitiendo tener una certeza de la calidad de las piezas elaboradas.

Los resultados demostraron al KOH como el agente corrosivo más eficiente para macerar el tejido muscular, utilizado en la técnica de Dawson (TA) y la modificación realizada a la misma (TC), estos resultados difieren con lo obtenido por Taylor (1967) y Dingerkus & Uhler (1977) donde sus muestras maceradas en tripsina (TB) presentaron una mejor calidad que las procesadas con KOH. Por otra parte, en términos de tinción del tejido óseo, se obtuvo una mayor fijación del colorante y una coloración uniforme con la modificación realizada a la técnica de Dawson (TC), demostrando que la utilización de alcohol, acetona y una pequeña concentración de KOH, favorecieron a una mejor distribución y fijación del colorante, contrastando a lo observado por las otras dos técnicas, donde solo se diluyó el pigmento en KOH al 1%. Considerando las variables costo y tiempo, el resultado que sobresale es el obtenido con la técnica de Dawson modificada (TC), demostrando que las modificaciones realizadas en las etapas de corrosión y tinción optimizaron eficientemente estas fases logrando disminuir ambas variables; en segundo lugar, sobresalen los resultados obtenidos por la técnica original de Dawson (TA) y por último la técnica de Taylor (TB).

Hasta el momento, no hay registro de estudios que apliquen alguna de las técnicas descritas a más de un grupo de vertebrados, así como una comparación visual, económica y con tiempos de preparación. De la bibliografía consultada sobresale el trabajo realizado por Hernández-Gil (2017) donde se valoró la calidad de las técnicas de diafanización de Taylor, Dawson y una modificación efectuada a

la técnica original de Taylor en crías de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), utilizando de igual manera una evaluación visual para valorar los resultados obtenidos. Sus resultados indican que la mejor técnica de diafanización fue la técnica de Dawson, seguida de la técnica de Taylor y en último lugar la modificación realizada a la técnica de Taylor. Coincidiendo con lo obtenido por Hernández-Gil (2017), de un mejor comportamiento de aclaración del KOH de la técnica de Dawson sobre la tripsina; sin embargo, para lograr su aclarado en las tres técnicas evaluadas aplicó alternadamente inmersiones en KOH al 1% y durante su transparentación utilizó soluciones de glicerina con KOH al 5%. Así también esta autora, presentó amplias variaciones en la coloración y fijación del colorante entre las técnicas, atribuyendo esta falta de pigmento a la caducidad del reactivo y a las propiedades digestoras de la enzima sobre el colorante.

De la misma forma, Romero & Gonzáles (2019) realizaron modificaciones a la técnica de Dawson con el objetivo de optimizar el costo y tiempo del procedimiento para peces monja (*Gymnocorymbus ternetzi*), generando piezas transparentadas en poco más de una semana con un costo total de \$27.25; su periodo de diafanización (ocho días) evidenció una amplia diferencia con la técnica más rápida del trabajo, que fue la TC con 35 días; no obstante, en cuestión de costo se logró un resultado más económico con la TA de \$23.00, esto con respecto al valor presentado por el autor anteriormente mencionado. Este resultado evidencia que, mejorando el proceso, se pueden generar piezas en un tiempo más corto y a un menor costo.

Cabe resaltar que en la bibliografía revisada, la parte valorativa del grado de transparentación y tinción, es dictaminada por la percepción y criterio del ejecutor, pasando por alto una evaluación por parte de individuos o medios externos, por cual es complicado realizar una comparación directa de los grados de transparentación y tinción obtenidos; así mismo, en los trabajos de referencia, se omite en la descripción del protocolo los tiempos de inmersión en la solución y el costo del proceso, por lo cual la descripción detallada de los protocolos incluidos en este

trabajo y la explicación del procedimiento de diafanización, permitirá comprender la técnica de mejor forma.

La colección elaborada de animales diafanizados, formara parte del material de docencia así como de exhibición dentro de las instalaciones del Laboratorio de Colecciones Biológicas, esta implementación y aprobación de la técnica de diafanización con fines didácticos es reportada por Estrada *et al.* (2009), Pramod *et al.* (2011), Tamayo *et al.* (2012), Coronado (2014) y Tsandev *et al.* (2017).

Cabe señalar que existieron complicaciones durante los procesos de diafanización. El mayor problema se presentó en la estandarización del tiempo de permanencia en la etapa de corrosión, durante este lapso los peces en las tres técnicas se desintegraron completamente; así como, el desprendimiento de extremidades durante manipulación de los especímenes de mamíferos y anfibios de la TA; ambos problemas ocasionaron la repetición del procedimiento de diafanización en su totalidad. Así también, se presentó un fallo en el equipo de climatización del área que mantenía resguardada las muestras, provocando un incremento en la temperatura ambiente del área, esto produjo la aparición de hongos en la parte superior de la solución de transparentación de un espécimen de aves de la TC y en las soluciones de transparentación de todas las muestras de los reptiles, por lo que fue necesario la aplicación de un tratamiento preventivo con timol al 5% diluido en alcohol etílico de 96° para la eliminación y prevención de la aparición nuevamente de hongos. A continuación, se discuten de manera general elementos a mejorar en específicas etapas de las técnicas elaboradas.

### **8.1 Técnica de Dawson (A)**

La técnica descrita por Dawson (1926) demostró diafanizar eficientemente vertebrados; sin embargo, se debe mejorar la fase de corrosión y tinción. Si bien la corrosión con KOH al 1% generó buenos resultados, su efectividad dependió del tamaño (peso), pigmentación y musculatura de la muestra, siendo los músculos pectorales de las aves y los músculos de las piernas de los anfibios las zonas que requieren de mayor tiempo de aclarado y por tanto, mayor cantidad de reactivos; por lo cual, incrementar la concentración a 2% en animales con mayor musculatura

(aves, mamíferos y anfibios) podría acelerar el proceso. Los especímenes solo permanecerán el tiempo suficiente para hacer permeable la musculatura y permitir el ingreso de la glicerina en fases posteriores, debido a que el uso prolongado de soluciones con concentraciones superiores al 2% de KOH suelen ser destructivas para el tejido (Drugbank 2015). Si la musculatura se observa opaca se pueden realizar inmersiones por breves periodos de tiempo en KOH al 0.5% o adicionarlo en la glicerina durante la fase de transparentación.

La fase de tinción resultó efectiva para pigmentar el esqueleto axial de todos los grupos; sin embargo, en el esqueleto apendicular la zona de la diáfisis de los huesos largos de las aves, mamíferos y reptiles demostraron escasa fijación del colorante; así mismo, se observó que después de 24 horas el colorante tendía a precipitarse y aglomerarse en el fondo del recipiente (Springer & Johnson 2000); motivo por el cual, se sugiere para trabajos futuros diluir la alizarina en una menor concentración de KOH o en alcohol etílico de 70°.

Durante la fase de transparentación, los cambios graduales de glicerina mejoraron notablemente el aclarado logrado en la etapa de corrosión, requiriendo de numerosos cambios hasta que la solución dejara de presentar restos de colorante (Taylor 1967, Pramod *et al.* 2011). A lo largo de los diversos cambios de soluciones los especímenes se deben manipular con cuidado ya que por exposición al KOH suelen encontrarse frágiles, lo que puede ocasionar fracturas e incluso desprendimiento con facilidad de vértebras coccígeas (cola), patas y manos.

## **8.2 Técnica de Taylor (B)**

La técnica de Taylor realizada en el presente trabajo demostró ser efectiva para diafanizar pequeños vertebrados; ya que en los especímenes más grandes se observó una transparentación opaca sobre el músculo, excesiva flacidez muscular, escasa fijación del colorante y diferentes coloraciones en los huesos; ocasionando que el contraste de la técnica no se apreciara completamente, teniendo que optimizar para trabajos futuros las fases de fijación, corrosión y tinción para garantizar una mejor calidad de la diafanización y lograr mejores resultados.

El uso de formaldehído sin tamponar provocó diversos problemas, inicialmente el pH descendió a menos de 6.4 ocasionando una descalcificación en el esqueleto, disminuyendo la zona de fijación de la alizarina (Sadeghi 2014, Salaromoli *et al.* 2015, Schnell *et al.* 2016, Mohamed 2018); también se observó que las muestras se volvieron densas y se decoloraron, observándose en un color amarillo pálido (Salaromoli *et al.* 2015, Rivera *et al.* 2016, Schnell *et al.* 2016); además de generar irritación en mucosas nasales y ojos durante el manejo de estas, por lo cual, reemplazar este fijador por alcohol etílico de 96° es la mejor opción, ya que este demostró ser eficiente para conservar el tejido y facilitar el proceso de transparentación (Pramod *et al.* 2011).

La fase de corrosión generó buenos resultados para peces y reptiles; no obstante, para las aves, mamíferos y anfibios, produjo una menor transparentación y flacidez en los músculos. Lo cual puede atribuirse a la mayor presencia muscular de estos grupos (uno, tres y cuatro), extendiendo la permanencia de las muestras en la solución digestora; en consecuencia, la tripsina fue desnaturalizando las proteínas del músculo, dañando los ligamentos que mantienen unidos los huesos, volviéndose flácidos a medida que avanzaba la digestión (Taylor 1967, Weck & Miljak 1998, Collete & Smith 2005). Otro factor que pudo influenciar la aparición de la flacidez muscular del grupo uno, fue el periodo de más de un año de congelación que registraron las aves dentro del LCB; debido a que aun estando bajo congelación la degradación celular continuó lentamente, ocasionando una ruptura de la membrana celular por los cristales de hielo (Taylor 1967). Los especímenes congelados por un largo periodo de tiempo, se vuelven extremadamente frágiles e incluso algunos se pueden desintegrar durante su permanencia en tripsina (Philip & Green 2000, Schnell *et al.* 2016), por este motivo es fundamental utilizar animales frescos o recién preservados (Taylor 1967, Weck & Miljak. 1998, Costa *et al.* 2018).

Para mejorar la fijación del pigmento, principalmente sobre la diáfisis de los huesos largos, costillas, vertebras y falanges, se debe utilizar formaldehído tamponado o reemplazar por alcohol etílico durante la etapa de fijación (Philip & Green 2000), así como evitar una sobre maceración de las muestras para no

contener residuos de tripsina, debido a que la enzima puede alterar la fijación del colorante (Cortés-Delgado *et al.* 2009 Hernández-Gil 2017). Por último, se observó el mismo efecto de aglomeración de la alizarina visualizado en la TA, teniendo que disminuir la concentración del KOH en la solución o reemplazarlo por alcohol etílico de 70°.

Dichos cambios contribuyen a obtener especímenes completamente aclarados, más firmes y con una completa fijación del colorante en el esqueleto para todos los grupos. Cabe resaltar que estos cambios se deben adaptar al presupuesto del proyecto, debido a que la adquisición de enzimas (tripsina) resulta ser costoso y requiere de condiciones óptimas de temperatura y pH para un mejor desempeño (Pramod *et al.* 2011, Sakata-Haga *et al.* 2018). Con los resultados obtenidos, la TB demostró ser eficiente para pequeños vertebrados (Taylor 1967), sobresaliendo el resultado obtenido en reptiles; no obstante, resultó ser la técnica más costosa debido al elevado precio de la tripsina y con los tiempos más largos causados por su tardado efecto de maceración sobre el tejido muscular. Vale la pena mencionar que la técnica no es adecuada para trabajos de rutina, debido a la irritación que suele causar el formaldehído y lo costoso del agente corrosivo, por lo cual la implementación de la técnica se deja a consideración del ejecutor.

### **8.3 Técnica de Dawson modificada (C)**

La TC generó una buena transparentación muscular, así como una completa fijación del colorante sobre el esqueleto con las modificaciones realizadas, observando en los huesos una coloración intensa en tono “morado”, resaltando esta característica en el contraste de la técnica, siendo del agrado visual este rasgo para los entrevistados.

Las modificaciones se realizaron principalmente en las fases de corrosión y tinción de la técnica original de Dawson (TA). Para optimizar la fase de corrosión se utilizó una alta concentración de KOH disuelto en glicerina, con esto se disminuyó considerablemente el riesgo de destrucción de la musculatura y se aceleró el proceso. Logrando buenos resultados en la transparentación muscular para todos los grupos, piezas similares obtenidas por combinación de ambos reactivos se

observan en los trabajos de: Blom & Lilja (2004), Coronado (2014), Chandramouli & Kumar (2015), Sepúlveda *et al.* (2017), Sakata-Haga *et al.* (2018) y Reed *et al.* (2019). La modificación realizada se adaptó positivamente a las características del LCB y a las variaciones morfológicas de las muestras utilizadas (Cortés-Delgado *et al.* 2009, Chandramouli & Kumar 2015, Mohamed 2018); sin embargo, solo los peces por su delgada piel y menor tamaño, fueron el grupo más susceptibles al efecto corrosivo del KOH 5% + glicerina (Springer & Johnson 2000, Piovesana *et al.* 2014, Rivera *et al.* 2016, Costa *et al.* 2018, Sakata-Haga *et al.* 2018); condicionando a seguir detalladamente el proceso de aclarado hasta lograr estandarizar el tiempo de permanencia en la solución.

El paso crítico de la etapa fue juzgar cuándo la maceración había progresado adecuadamente, para retirar las muestras se determinó que se debían observar translucidos gran parte de los músculos y mantener una consistencia rígida (Piovesana *et al.* 2014); la detección de especímenes poco macerados, se basó en la observación de tonos rojo-marrón en el músculo, indicando presencia de hemopigmentos aún en el tejido, por lo cual debían sumergirse nuevamente en KOH 5% + glicerina y finalizar el aclarado en KOH al 0.3%, requiriendo cambios constantes entre ambas soluciones hasta alcanzar el grado de limpieza adecuado para animales grandes o muy pigmentados (Grupos uno, tres y cuatro; Reed *et al.* 2019).

La modificación en la solución de tinción se elaboró de acuerdo con lo observado en los trabajos de Tamayo *et al.* (2012), Coronado (2014), Rivera *et al.* (2015), Sepúlveda *et al.* (2017) y Romero & Gonzáles (2019), quienes utilizaron 0.1 g de rojo de alizarina, mezclado con acetona como desengrasante y alcohol etílico para conservar sus propiedades aún después de semanas (Dwight 1986, Springer & Johnson 2000, Sadeghi 2014, Mohamed 2018); por último, mencionar que la dureza y alcalinidad del agua de grifo utilizada para la dilución de la alizarina, aparentemente no alteró el comportamiento del colorante, esto contrasta con lo mencionado por Taylor (1967) Dwight (1986) Schnell *et al.* (2016) quienes exponen que estas características del agua de grifo podrían alterar los resultados.

En la TC se obtuvieron tinciones homogéneas en las aves, peces, mamíferos y anfibios, logrando una completa fijación de la alizarina en las diáfisis de los huesos largos y falanges para los tetrápodos, problema principal presentado por la TA y TB (Blom & Lilja 2004, Tamayo *et al.* 2012, Chandramouli & Kumar 2015, Rivera *et al.* 2015); sin embargo, los reptiles presentaron el mismo patrón de fijación observado en las otras dos técnicas. A pesar de producir una mejor fijación del colorante, no se logró disminuir considerablemente el tiempo de permanencia en la solución de tinción, presentando tiempos similares a los generados por las TA y TB.

Estos extensos tiempos ocasionaron un problema adicional en las muestras, debido a que presentaron una gran retención del colorante en las fibras musculares y demás tejidos blandos (Green 1952, Mohamed 2018, Romero & Gonzáles 2019). Para lograr desvanecer las manchas, los grupos debieron colocarse 48 horas en repetidos cambios de agua de grifo, siguiendo de una corta inmersión en KOH al 0.3% para facilitar la salida de los residuos del colorante. La sobre tinción resultó en un mayor uso de reactivos (costo) y tiempo para lograr limpiar el músculo (Green 1952, Dwight 1986, Datovo & Bockmann 2010). Para reducir el tiempo de tinción y evitar la retención del colorante en las fibras musculares se debe evaluar la pigmentación de los huesos durante las primeras 24 a 72 horas, variando el tiempo con el tamaño del espécimen (Philip & Green 2000, Sakata-Haga *et al.* 2018, Reed *et al.* 2019).

Las modificaciones realizadas a la técnica de Dawson generaron especímenes de alta calidad, cumpliendo con los objetivos de realizar piezas diafanizadas con un menor costo y tiempo; no obstante, aún se debe observar detalladamente el proceso de corrosión y transparentación para tratar de disminuir aún más los tiempos. Los cambios se deben enfocar principalmente en la etapa de tinción, para obtener especímenes con el esqueleto completamente teñido y con el tono deseado en el menor tiempo posible

## **9. CONCLUSIÓN**

Las técnicas de diafanización evaluadas en el Laboratorio de Colecciones Biológicas, demostraron ser efectivas para la transparentación y tinción de todos los grupos de vertebrados considerados en este trabajo; siendo una técnica accesible, que genera material visualmente atractivo y una alternativa para la conservación de animales dentro de la Institución, con la característica de presentar transparentación en el tejido muscular, lo cual facilita el estudio macroscópico de estructuras óseas en las materias de anatomía, fisiología, anatomía comparada y embriología.

De acuerdo con los resultados obtenidos y considerando los pesos de los especímenes presentados, se recomienda la implementación de las técnicas de Dawson (TA) y su modificación (TC) para la obtención de piezas visualmente atractivas, validadas por medio de la evaluación visual. En cuestión de costo y tiempo, la técnica más eficiente fue la técnica de Dawson modificada (TC), seguida de la técnica de Dawson (TA) y finalmente la técnica de Taylor (TB). Por otro lado, de acuerdo con la morfología de las muestras, para la técnica de Dawson (TA) se obtuvieron buenos resultados en aves, peces, mamíferos y anfibios; en la técnica de Taylor (TB) sobresale el resultado obtenido en el grupo de los reptiles; finalmente la técnica de Dawson modificada (TC), generó buenos resultados en aves, peces (controlando el tiempo de inmersión), mamíferos y anfibios.

La colección de animales diafanizados fue del agrado de los alumnos, recibiendo resultados positivos en la evaluación visual; esto otorga la posibilidad de realizar nuevos especímenes, así como mejorar la técnica para generar piezas de una mayor calidad; asimismo, la técnica de diafanización puede ser una alternativa de comercialización para estudiantes e interesados en el tema, debido a lo colorida, accesible y de sencilla elaboración.

## 10. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar muestras frescas, evitando utilizar animales sometidos a una congelación prolongada, si es inevitable, tratarlas en recipientes separados a los animales frescos para tener un mejor control del proceso.
- Los especímenes fijados por un largo tiempo en alcohol o formaldehído pueden diafanizarse; sin embargo, no se obtendrá una transparentación nítida.
- Para acelerar y facilitar el proceso, es necesario desollar y eviscerar totalmente los especímenes.
- Se recomienda ampliamente utilizar alcohol etílico como principal medio de fijación y si es posible reemplazar de la TB el formaldehído.
- Para especímenes pequeños y grandes es factible utilizar protocolos basados en KOH; para especímenes pequeños se recomienda la utilización de tripsina.
- El KOH demostró un mayor potencial para transparentar el tejido muscular, por lo que es recomendable utilizar en la fase de corrosión el KOH al 1% o la combinación de KOH al 5% + glicerina
- El incremento de la concentración del KOH estará en función de la cantidad de tejido muscular, disponibilidad del reactivo y experiencia del ejecutor, esto implicará un seguimiento detallado del progreso de la transparentación, para evitar un posible colapso de la muestra.
- La solución de tinción empleada estará en función de la afinidad del color buscado, a mayor concentración e inmersión se obtendrá un color más intenso.
- Las manchas del músculo por efecto del colorante suelen desvanecerse en cambios numerosos de agua, por lo que si persisten se recomienda utilizar KOH al 0.5% más glicerina.
- La transparentación final se obtendrá en los cambios graduales de glicerina, siendo necesario realizar cambios rutinarios hasta alcanzar la transparentación total.

## 11. LITERATURA CITADA

- Arias, K., Y. Corona, Y. Guillen & E. Landaeta. 2013. Optimización de la técnica de plastinación para la preservación adecuada de piezas anatómicas. Tesis de Licenciatura, Universidad de Carabobo, Valencia, España.
- Arias, L.L.A. 2012. Exploración de la técnica de plastinación en la preparación de modelos anatómicos como material docente para la enseñanza de la Morfología Humana en la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Arruda, S.R.K., C.M. do Ó, V.C. Brito, B.D.R. de Oliveira, E.M.A. Costa & G.J.B. de Moura. 2011. Vantagens e desvantagens das técnicas de preparação de materias didáticos para as aulas práticas de morfología. Revista Didáctica Sistêmica 13(2): 24-41.
- Ashdown, R.R. & S.H. Done. 2012. Atlas en color de anatomía veterinaria: El caballo. 2a ed., Elsevier, Barcelona, 368 pp.
- Aspinall, V. & M. Cappello. 2015. Introduction to Veterinary Anatomy and Physiology Textbook. 3er ed., Elsevier, Oxford, 288 pp.
- Audisio, S.A., P. Torres, P. Vaquero & E. Verna. 2013. Plastinación: una contribución a la enseñanza de la cirugía ortopédica en pequeños animales. Revista Ciencias Veterinarias 15(1): 137-144.
- Baeza, A. M. E. 2008. Implementación y evaluación de la Transparentación del Charal (*Chirostoma humboldtianum*) con soluciones alcohólicas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd de México.
- Benkhadra, M., A. Faust, S. Ladoire, O. Trost, P. Trouilloud, C. Girard, F. Anderhuber. G. Feigl. 2009. Comparison of fresh and thiel's embalmed cadavers according to the suitability for ultrasound-guided regional anesthesia of the cervical region. Surgical and Radiologic Anatomy 0(31): 531-535.

- Blom, J. & C. Lilja. 2004. A comparative study of growth, skeletal development and eggshell composition in some species of birds. *Journal of Zoology* 2004(262): 361-369.
- Bohn, da S.L.K., B.L. Endl, G. Garcez, A. Farias, F.R. Passos & P.B. Goettems. 2017. A técnica de diafanização e a aprendizagem da anatomia e fisiologia do desenvolvimento fetal humano. Pp: 2318-2385, *In: XXV Seminário de Iniciação Científica, Jornada de Pesquisa*. Santa Rosa, Brasil.
- Burdi, A.R. 1965. Toluidine blue-alizarin red S staining of cartilage and bone in whole-mount skeletons in vitro. *Stain Technology* 1(40): 45-48.
- Cañete, B.G., J.M. Sánchez & L. Noda. 2014. Ensamblaje artesanal de un esqueleto canino mediante variantes de la Osteotecnia. *Revista Electrónica de Veterinaria* 15(8):1-15.
- Carril, J. 2015. Crecimiento y desarrollo del complejo cráneo-mandibular y post-cráneo en *Myiopsitta monachus* (Aves, Psittaciformes). Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Carvalho, Y.K., K.C. Zavarize, L. dos S. Medeiros & P.P. Bombonato. 2013. Avaliação do uso da glicerina proveniente da produção de biodiesel na conservação de peças anatómicas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(1): 115-118.
- Chandramouli, S.R. & S. Kumar. 2015. Comparative Osteology of Anuran Genera in the Western Ghats, Peninsular India. *Alytes* 32(32): 67-81.
- Collete, B.B. & D.G. Smith. 2005. William Ralph Taylor 1919-2004. *Copeia* 2005(3): 709-711.
- Coronado, C.J.C. 2014. Elaboración de material docente mediante la técnica de diafanización para la enseñanza de la morfogénesis ósea. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

- Cortés-Delgado, N., J. Pérez-Torres & J.M. Hoyos. 2009. Staining procedure of cartilage and skeleton in adult Bats and Rodents. *International Journal of Morphology* 27(4): 1163-1167.
- Costa, J.M., M.M.P. Sartori, N.F. do Nascimento, S.M. Kadri, P.E.M. Ribolla, D. Pinhal & L.E. Pezzato. 2018. Inadequate Dietary Phosphorus Levels Cause Skeletal Anomalies and Alter Osteocalcin Gene Expression in Zebrafish. *International Journal of Molecular Sciences* 19(364): 1-13.
- Cunningham, J.G. & G.K. Bradley. 2009. *Fisiología veterinaria*. 4a ed., Elsevier, Barcelona, 671 pp.
- Cury, F.S., J. Barrionuevo & C.E. Ambrósio. 2013. Técnicas anatômicas no ensino da prática de anatomia animal. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(5): 688-696.
- Darias, M., O.L.C. Wing, C. Cahu, J. Zambonini-Infante & D. Mazurais. 2010. Double staining protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Applied Ichthyology* 26(1): 280-285.
- Datovo, A. & F.A. Bockmann. 2010. Dorsolateral head muscles of the catfish families Nematogenyidae and Trichomycteridae (Siluriformes: Loricarioidei): comparative anatomy and phylogenetic analysis. *Neotropical Ichthyology*, 8(2): 193-246.
- 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.
- Dawson, A.B. 1939. Visualization of the vertebrate skeleton in the entire specimen by clearing and selective staining. *The American Biology Teacher* 5(1): 91-93.
- Dingerkus, G. & L.D. Uhler. 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technology* 52(4): 229-232.
- Drugbank. 2015. Potassium hydroxide. Canadian Institutes of Health Research, Alberta Innovates-Health Solutions & The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). Consultado el 24 de junio del 2020: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB11153>.

- Dwight, D. 1986. Clearing and Staining Skeletons of Small Vertebrates. Technique Series, Museum of Natural History. Chicago, 28 pp.
- Estrada, C.I., J.A. Hernández, D. Lozada, M.T. Sandoval & E.L. Torres. 2009. Transparentación de vertebrados como material didáctico para el sistema óseo. Pp: 32, *In*: XVII Concurso Universitario: Feria de las Ciencias, la tecnología y la innovación. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. de México. Consultado el 03 de septiembre del 2018: <https://www.feriadelasciencias.unam.mx/anteriores/feria17/27.pdf>
- Fernández, J.M., M. Guerrero & R. Fernández. 2007. Estrategia para sistematizar los contenidos morfológicos veterinarios: sus regularidades, sistema de habilidades y facilitadores didácticos utilizados. *Revista Salud Animal* 29(3): 146-152.
- Frandsen, R.D., W. L. Wilke & A.D. Fails. 2009. *Anatomy and physiology of Farm animals*. 7a ed., Wiley-Blackwells, Iowa, 489 pp.
- García-Amaro de M.E. 2004. Modificaciones al Sistema de clasificación climática de Köppen. 5a ed. Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Geografía. Cd. de México. 98 pp.
- García-Sánchez, J.R. Aguilera T. & A. Castillo R. 2011. Guía técnica para la construcción de escalas de actitud. *Revista Electrónica de Pedagogía* 8(6): 1-13.
- Green, M.C. 1952. A rapid method for clearing and staining specimens for the demonstration of bone. *Ohio Journal of Science* 52(1): 31-33.
- Hernández-Gil, Y. 2017. Clarificación de crías de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*) de la familia Cheloniidae. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. México.
- Hungar, L.D. 1969. Clearing and staining juvenile pacific salmon for skeletal studies. *Fisheries research board of Canada* 123(0): 1-4.
- Jiménez, M.R. & Isaza C.O. 2005. Plastinación, una técnica moderna al servicio de la anatomía. *IATREIA* 18(1): 99-106.

- Kirwan, A. A. M. 2004. Implementación de una técnica combinada plastinación-transparentación para el estudio del esqueleto de mamíferos. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Cd de México.
- Krahmer, R. & L. Schröder. 1982. Anatomía de los animales domésticos. 3a ed., Acribia, Zaragoza, España. 339 pp.
- Llorente, C.E. 2000. Imágenes en la enseñanza. Revista de Psicodidáctica. (9): 119-135.
- Lone, M.J. McKenna, J.Y. Balta, S.M. O'Mahony, J.F. Cryan, E.J. Downer & A. Toulouse. 2017. Assessment of Thiel-Embalmed Cadavers as a Teaching Tool for Oral Anatomy and Local Anesthesia. Journal of Dental Education 8(4): 420-426.
- López-Roldán, P. & S. Fachelli. 2015. Metodología de la Investigación Social Cuantitativa. Universidad Autónoma de Barcelona, España. 58 pp.
- Lundvall, H. 1905. Weiteres über demonstration embryonaler skelette. Anatomischer Anzeiger 0(27): 520-523.
- Martínez, A. F. 2019. Descripción y comparación anatómica del esqueleto de dos especies de anuros "Rana de uñas" *Xenopus laevis* (Daudin, 1802) y "Rana verde" *Hyla eximia* (Baird, 1854) a través de la técnica de diafanización. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd de México.
- Mendoza, V.O.U. 2009. Descripción del desarrollo embrionario del tiburón azul, *Prionace glauca* (Linnaeus 1758), en la costa occidental de Baja California sur, México. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Cd de México.
- Mohamed, R. 2018. Alizarin Red-S Protocol for Skeletal Staining during Fetal Period in Rabbit. Academia Anatómica International 4(1): 41-44.
- Mora-Ambriz, L. & H. Fuentes-Moreno. 2006. El laboratorio de Colecciones Biológicas de la Universidad del Mar: perspectivas de una colección regional. Ciencia y Mar 10(28): 34-37.

- Muñetón, G.C.A. & J.A. Ortiz. 2011. Conservación y elaboración de piezas anatómicas con sustancias diferentes al formol en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de La Salle. *Revista Médica Veterinaria* 0(22): 51-55.
- Muñetón, G.C.A. & J.A. Ortiz. 2012. Plastinación: un instrumento complementario para el desarrollo del proceso enseñanza-aprendizaje de la anatomía. *Revista Médica Veterinaria* 23(enero-junio): 111-117.
- Muñetón, G.C.A. & J.A. Ortiz. 2013. Preparación en glicerina para la conservación prolongada de cuerpos en anatomía veterinaria. *Revista Médica Veterinaria*. (26): 115-122.
- Navarrete, M., M. Ghezzi, A. Chávez, A. Soto, F. Santos, H. Castañeda & L. Buitrón. 2015. Descripción macroscópica de las arterias y venas del páncreas de la alpaca (*Vicugna pacos*). Pp: 1-4, *In: VII congreso mundial en camélidos sudamericanos*, Puno, Perú.
- Olivares, R., P. Labra, L. Adaro. 2005. Técnicas anatómicas y métodos de conservación en anatomía veterinaria. *TecnoVet* 11(3): 27-31.
- Ottone, N.E., C.A. Vargas, R. Fuentes & M. del Sol. 2016. Walter Thiel's embalming method. Review of solutions and applications in different fields of biomedical research. *International of Journal Morphology* 34(4): 1442-1454.
- Peralta, P.E. 2017. Aplicación de la técnica de plastinación en órganos humanos utilizando látex en la generación de modelos anatómicos para la enseñanza de la morfología humana. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Peresan, L. & A. Adúriz-Bravo. 2010. El arte de la histología. Pp: 4, *In: II Congreso Internacional de Didactiques*. Girona, España.
- Philip, N.S. & D.M Green. 2000. Recovery and Enhancement of Faded Cleared and Double Stained Specimens. *Biotechnic & Histochemistry* 75(4): 193-196.

- Pineda, R. B. 2014. Diversidad herpetofaunística en dos sitios de la Universidad del Mar, campus Puerto Escondido, Oaxaca, México. Tesis de Licenciatura. Universidad del Mar, Puerto Escondido, Oaxaca.
- Piovesana, M., J.R. Gerbasi & F.A. Vigliano. 2014. Diafanización: Una técnica que permite la visualización diferencial de cartílago y hueso para el estudio del desarrollo y malformaciones en peces. *Revista de la Sociedad Argentina de Histotecnología* 25(1): 10-14.
- Potthoff, T. 1984. Clearing and staining techniques. Pp: 35–37, *In: Ontogeny and Systematics of Fishes. Special Publication American Society of Ichthyologists and Herpetologists. Kansas, USA.*
- Pramod, K.L., V.R. Vaswani & S. Bindhu. 2011. Museum preservation of skeleton of fetus & small Vertebrates. *Recent Research in Science and Technology* 3(2): 54-58.
- Real Academia Española (RAE). 2017. Diáfano. Diccionario online de la Real Academia Española. Consultado el 21 de octubre del 2018: <http://dle.rae.es/srv/search?m=30&w=di%C3%A1fano>
- Reed, R.B., C.R. Kendall, N. Tsangarides & H.E. Evans. 2019. Clearing and Staining Small Vertebrates for Demonstrating Ossification of the Skeletal System Using the KOH and Glycerine Clearing Method. *Anatomia Histologia Embryologia* 48(6): 605-608.
- Riquelme, L., R. Abarzúa & J. Leichtle. 2018. Adaptación de Osteotecnia para el montaje de un ejemplar de Delfín de Risso *Grampus griseus* (Cuvier, 1812). *Revista de Medicina Veterinaria e Investigación* 1(1):102-108.
- Rivera, M.C., F. Bonino, C. Fioretti, M. Galán, S. Gigena, R. Moine, H. Mouguelar, J. Natali & R. Quinteros. 2009. Análisis Multivariado aplicado a la etapa de deshidratación en la técnica de plastinación del riñón de caballo. *International Journal of Morphology* 27(3): 855-859.

- Rivera, D.M.L., C.J. Suárez, A.Y. Valbuena, C.E. Cruz, G.S. Barahona, A.X. Cortés, L.A. Arias. 2014. Comparación de técnicas de conservación morfológica y su posible aplicación para la enseñanza de la anatomía. *Morfología* 6(3): 1-14.
- Rivera, C.G.A., A. García & F.A. Moreno. 2015. Técnica de diafanización con alizarina para el estudio del desarrollo óseo. *Revista Colombiana Salud Libre* 10(2): 109-115.
- Rivera, G.M.C., R. Moreno, G. Sánchez, M. Fernández, M. Cárdenas, H.J. Castro. 2016. Evaluación del efecto de tres hidróxidos en la calidad de diafanización de peces de cola de espada (*Xiphophorus helleri*). *AquaTIC* 1(46): 1-9.
- Rodríguez, P.D. & J. Ramírez. 2009. Técnica de conservación de huesos en peróxido de hidrógeno. *Medicina Legal de Costa Rica* 26(2): 117-123.
- Romero, O.O.J. & K.A. Gonzáles. 2019. Optimización de la técnica de diafanización y tinción de Piovesana (2014), aplicada para el pez *Gymnocorymbus ternetzi*. *Publicación Semestral Pädi* 2019(13): 41-46.
- Rubio, R.U. 2011. Osteología comparada de los peces linterna del género *Triphoturus fraser-brunner*, 1949 (teleostei: *myctophidae*). Tesis de Maestría. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, La Paz, México.
- Rueda-Esteban, R.J., J. Palacio, J.S. López-McCormick & J.D. Hernández. 2017. Diaphanization: A Standardized Protocol for Non-Fetal Tissue Preservation. *International Journal of Morphology* 35(2): 547-551.
- Ruiz, C. A. J. 1993. Contribución al estudio osteológico de elasmobranquios hipotremados del Golfo de México a través de la Técnica de transparentación. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sadeghi, F. 2014. Two Separated Protocols with the Most Important Comments for Skeletal Staining in Embryonic and Adulthood Period in Laboratory Animals. *Anatomical Sciences* 11(2): 87-92.

- Sakata-Haga, H., M. Uchishiba, H. Shimada, T. Tsukada, M. Mitani, T. Arikawa, H. Shoji & T. Hatta. 2018. A rapid and nondestructive protocol for whole-mount bone staining of small fish and *Xenopus*. *Scientific Reports* 8(7453): 1-7.
- Sandoval, D.N.A., M.E. Loeza, A. Loeza & S. Jiménez. 2015. El uso del Blog como recurso de apoyo en los procesos de enseñanza-aprendizaje de la materia de anatomía veterinaria del centro universitario de ciencias biológico-agropecuarias. Tesis de Licenciatura. Universidad de Guadalajara, México
- Sandoval, D., J. Téllez, A. García, G. Rivera, S. Moreno & F. Moreno. 2016. Técnica de diafanización para describir el desarrollo embrionario del sistema óseo. Revisión de la literatura. *Universitas Médica* 57(4): 488-501.
- Schnell, N.K., P. Konstantinidis & G.D. Johnson. 2016. High-proof Ethanol Fixation of Larval and Juvenile Fishes for Clearing and Double Staining. *Copeia* 104(3): 617-622.
- Schultze, O. 1897. Ueber herstellung und conservirung durchsichtiger embryonen zum stadium der skeletbildung. *Anatomischer Anzeiger* (13): 3-5.
- Sepúlveda, C.G. Rivera-Cardona, M.J. Barona, I. Berbesí, E.D. Acosta & A. García. 2017. Protocolo de diafanización con alizarina roja para el estudio del desarrollo óseo. *Salutem Scientia Spiritus* 1(1):154-155.
- Serrano, A., M.M. Silva-Serna, M.A. Cano-García, G. Medina-García & A. Ruiz-Corral. 2005. Estadísticas climatológicas básicas del Estado de Oaxaca (Periodo 1961-2003). Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Oaxaca. 272 pp.
- Simons, E. & J. Van Horn. 1971. A new procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilaginous skeleton of the chicken embryos, adapted to the clearing procedure in potassium hydroxide. *Acta Morphologica Nederland Scandinavia* 8(4): 281-292.

- Sisson, S., J.D. Grossman, R. Getty. 1982. Anatomía de los animales domésticos, Tomo I. 5a Edición. Salvat. Barcelona. 1416 pp.
- Song, J. & L.R. Parenti. 1995. Clearing and Staining Whole Fish Specimens for Simultaneous Demonstration of Bone, Cartilage, and Nerves. *Copeia* (1): 114-118.
- Spalteholz, W. 1914. Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang Über Knochenfärbung. 2a ed., Erweiterte Aufl. Leipzig, Alemania. 93 pp.
- Springer, V.G. & G.D. Johnson. 2000. Use and Advantages of Ethanol Solution of Alizarin Red S Dye for Staining Bone in Fishes. *Copeia* (1): 300-301
- Tamayo, L.J., P.A. Suárez, A.I. Cano, B.A Cuartas, S.A. Yepes, C.A. Mejía & Y.Y. Lenis. 2012. Didactic model of the chicken embryo development using modified Dawson's diaphanization and staining technique. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 1(25): 620-624.
- Taylor, W.R. 1967. An enzyme method of clearing and staining small vertebrates. *Proceedings of the United States National Museum* 3596(122): 1-17.
- Tsandev, N., A. Atanasoff, G. Kostadinov, E. Petrova-Pavlova & I. Stefanov, 2017. Elaboration of transparent biological specimens for visualization of developing cartilage and bone structures. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 20(1): 27–32.
- Vélez-García. J.F. 2016. Retos en la enseñanza y aprendizaje de la anatomía veterinaria en el actual currículo del programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 9(1): 9-11
- Vélez-García, J.F. & R. Ruiz-Lozano. 2017. Reflexión sobre los procesos de enseñanza aprendizaje de la anatomía veterinaria. *International Journal of Morphology* 35(3): 888-892.

- Wassersug, J. 1976. A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates. *Stain Technology* 51(2): 131-134.
- Webb, G.N. & R.A. Byrd. 1994. Simultaneous differential staining of cartilage and bone in rodent fetuses: an Alcian blue and alizarin red S procedure without glacial acetic acid. *Biotechnic & Histochemistry* 69(4): 181-185.
- Weck B. & P. Miljak. 1998. Give New Life to Old Specimens through Clearing & Staining. *The American Biology Teacher* 60(9): 699-702.
- Whitaker, J. & K.M. Dix. 1979. Double staining technique for rat fetus skeletons in teratological studies. *Laboratory Animals* 1(13): 309-310.

## 12. ANEXOS

### Anexo I. Diseño de encuestas

#### Datos generales

Licenciatura: \_\_\_\_\_ Sexo: F M Edad: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

**Instrucciones:** Frente a ti encontrarás muestras presentadas de tres en tres, por favor evalúa individualmente los aspectos indicados. Marca con una **X** el grado de intensidad o ligereza que consideres representa mejor la característica que se te solicita calificar.

Los números representan 1: Nada, 2: Poco, 3: Regular, 4: Bastante y 5: Totalmente.

#### Grupo X

"Técnica X"														
ID: XXXX					ID: XXXX					ID: XXXX				
<b>1.- Es posible observar e identificar los huesos a través del cuerpo del animal.</b>														
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<b>2.- Es fácil observar las uniones entre los huesos (articulaciones).</b>														
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<b>3.- Observas completamente pintados (teñidos) los huesos del animal.</b>														
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<b>4.- Te agrada la intensidad del color presente en los huesos del esqueleto animal.</b>														
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<b>5.- Se aprecia un contraste o diferencia entre los huesos teñidos y el cuerpo transparente.</b>														
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<b>6.- Se ha preservado la forma del cuerpo del animal que observas.</b>														
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<b>7.- Es agradable visualmente la presentación o exhibición de la muestra.</b>														
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5

¿Qué es lo que más te ha llamado la atención y por qué?

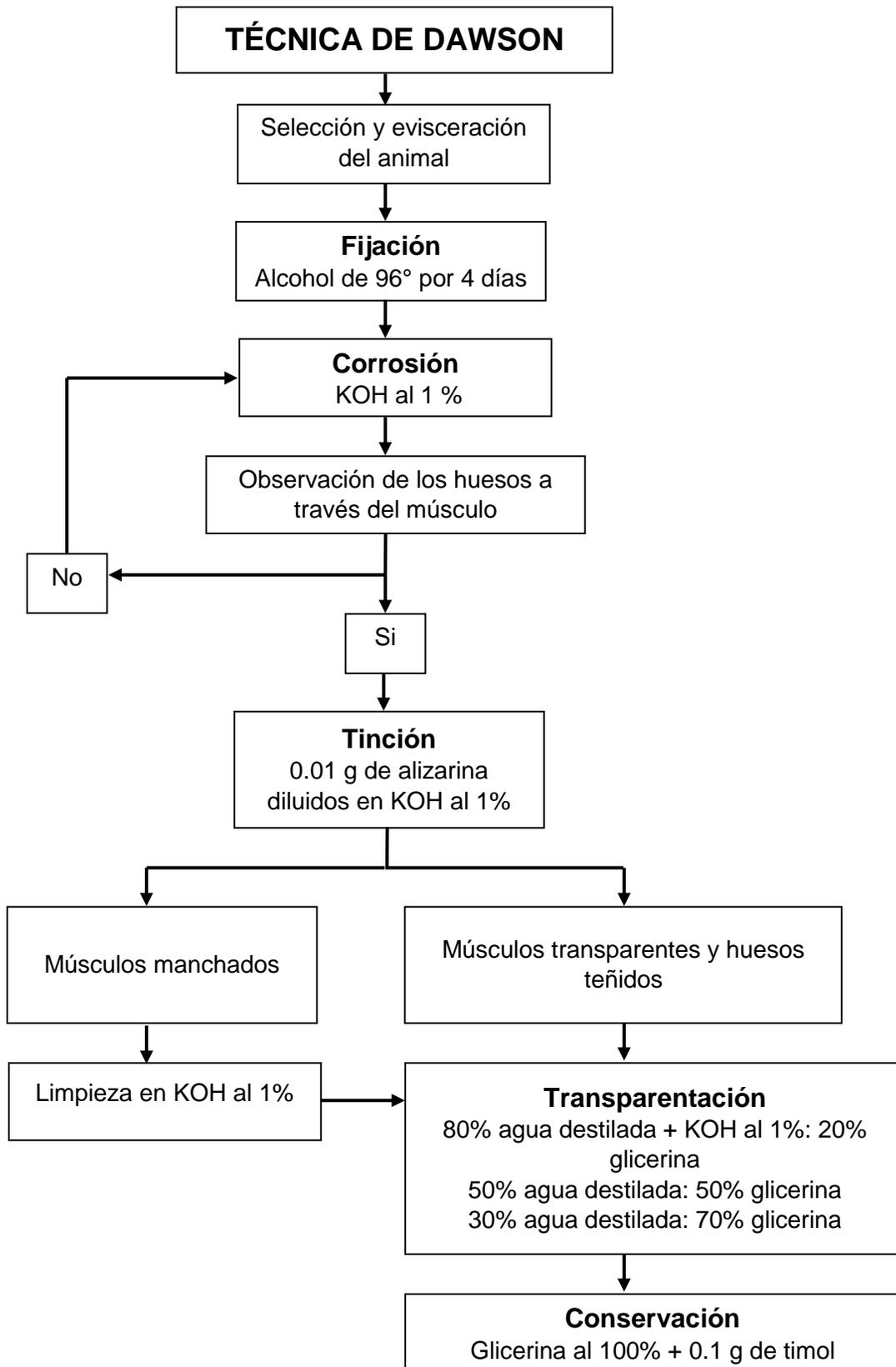
\_\_\_\_\_

Sugerencias:

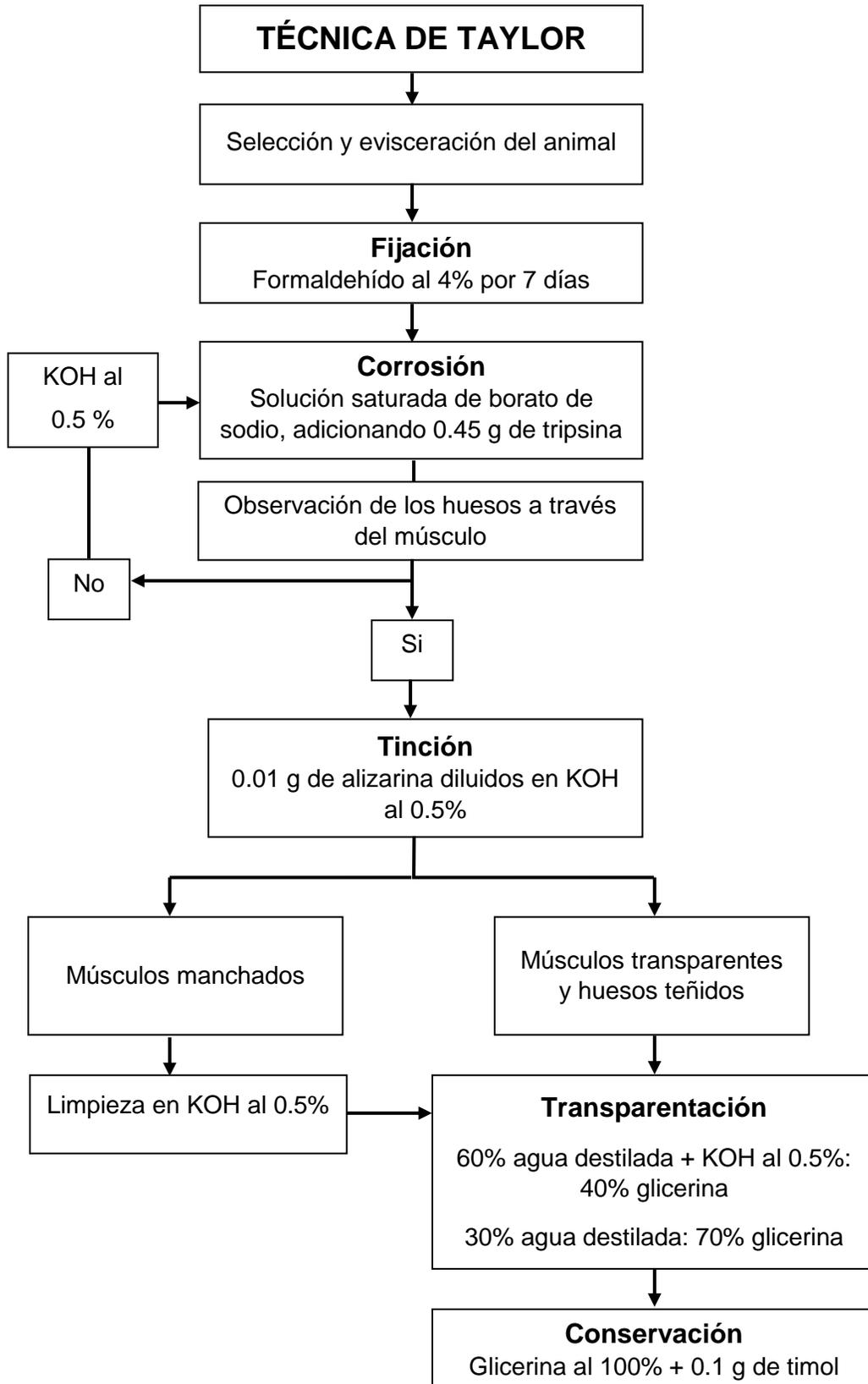
\_\_\_\_\_

Gracias, por tu colaboración

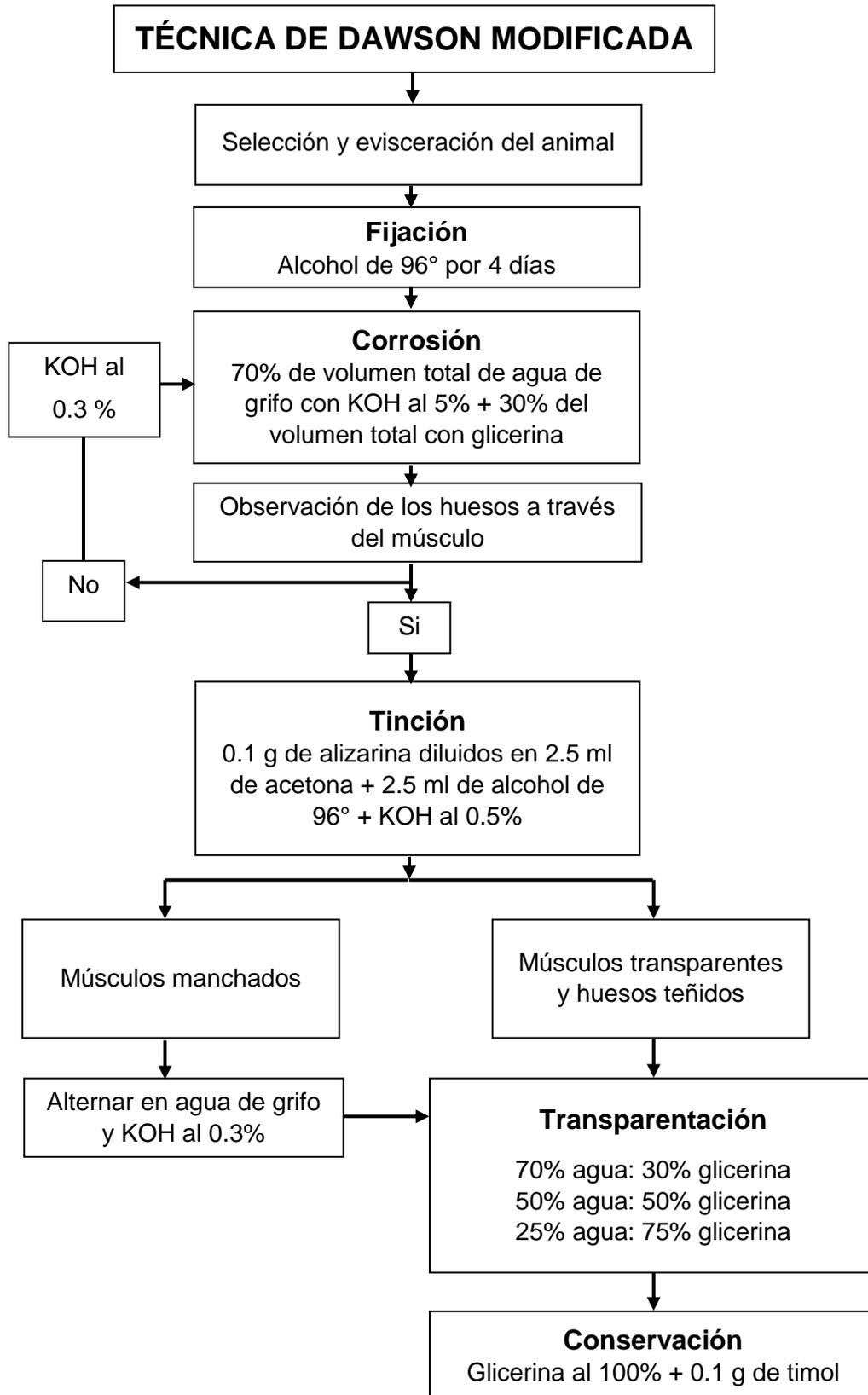
**Anexo II.** Diagrama del proceso de la técnica de Dawson



**Anexo III.** Diagrama del proceso de la técnica de Taylor



**Anexo IV.** Diagrama del proceso de la técnica de Dawson modificada



## Anexo V. Presupuesto de reactivos químicos

Reactivo	Cantidad	Precio
<b>Fijación</b>		
Alcohol etílico de 96°	Garrafa de 20,000 ml	\$720.00
Formaldehído	Galón de 4,000 ml	\$16.16
Peróxido de hidrogeno (solo TC)	Botella de 460 ml	\$15.00
<b>Corrosión</b>		
Hidróxido de potasio en lentejas	Frasco de 500 g	\$571.74
Tripsina (marca: Electron Microscopy Sciences)	Frasco de 25 g	\$1,840.00
Borato de sodio o bórax	Frasco 500 g	\$47.25
<b>Tinción</b>		
Colorante rojo de alizarina (marca: Hycel)	Frasco de 10 g	\$315.00
Acetona (solo TC)	Frasco de 1000 ml	\$75.00
<b>Transparentación y preservación</b>		
Glicerina (marca corona)	Botella de 500 ml	\$20.80
Timol	Frasco de 500 g	\$459.88

\*Nota: El agua destilada no fue incluida en el presupuesto, debido a que esta proviene del destilador de la propia Universidad.

\*Precios establecidos durante los años 2019-2020

**Anexo VI.** Descripción del procedimiento de diafanización para el grupo uno

Fase	Técnicas de diafanización en Aves		
	Dawson (A)*	Taylor (B)*	Dawson M (C)
<b>Fijación</b>	300 ml de alcohol 96°	300 ml de formaldehído al 4%	500 ml de Alcohol 96°
<b>Corrosión</b>	300 ml de KOH al 1% por 23 días.	Alternar: 400 ml de sol. digestora (enzima) con 300 ml de KOH al 0.5%	Alternar: 400 ml KOH 5% + glicerina con 400 ml de KOH al 0.3%:
<b>Tinción</b>	Preparar 400 ml de solución y sumergir completamente las muestras	Preparar 400 ml de solución y sumergir completamente las muestras	Preparar 400 ml de solución y sumergir completamente las muestras. Al finalizar lavar con agua
<b>Transparentación</b>	Preparar 300 ml en concentraciones ascendentes de agua destilada y glicerina -80:20 -50:50 -30:70	Preparar 300 ml en concentraciones ascendentes de agua destilada y glicerina -60:40 -30:70	Preparar 300 ml en concentraciones ascendentes de agua y glicerina -70:30 -50:50 -25:75
<b>Conservación</b>	300 ml de Glicerina pura + 1 g de timol	300 ml de Glicerina pura + 1 g de timol	300 ml de Glicerina pura + 1 g de timol

Relación tiempo-costo promedio para las técnicas de diafanización aplicadas al grupo uno (aves). Tiempo= en días

Fases	Técnicas					
	Dawson (A)		Taylor (B)		Dawson M (C)	
	Tiempo	Costo (\$)	Tiempo	Costo (\$)	Tiempo	Costo (\$)
<b>Fijación</b>	4	32.40	7	0.39	4	18.00
<b>Corrosión</b>	23	42.50	40	116.44	24	94.77
<b>Tinción</b>	6	2.46	8	2.60	6	4.40
<b>Transparentación</b>	128	134.92	122	92.97	94	52.79
<b>Preservación</b>		40.20		40.20		40.20
<b>Total</b>	<b>161</b>	<b>252.48</b>	<b>177</b>	<b>252.60</b>	<b>128</b>	<b>210.16</b>

**Anexo VII.** Descripción del procedimiento de diafanización para el grupo dos

Fase	Técnicas de diafanización en Peces		
	Dawson (A)	Taylor (B)	Dawson M (C)
<b>Fijación</b>	150 ml de Alcohol 96°	150 ml de formaldehído al 4%	150 ml de alcohol 96°
<b>Corrosión</b>	150 ml de KOH al 1%.	Alternar: 150 ml de solución, con 150 ml de KOH al 0.5%	150 ml de solución KOH 5% + glicerina
<b>Tinción</b>	Preparar 150 ml de solución y sumergir completamente	Preparar 150 ml de solución y sumergir completamente	Preparar 150 ml de solución y sumergir completamente
<b>Transparentación</b>	Preparar en concentraciones ascendentes de agua destilada y glicerina -80:20 -50:50 -30:70	Preparar en concentraciones ascendentes de agua destilada y glicerina -60:40 -30:70	Preparar en concentraciones ascendentes de agua y glicerina -70:30 -50:50 -25:75
<b>Conservación</b>	25 ml de Glicerina pura más 0.1 g de timol	25 ml de Glicerina pura más 0.1 g de timol	25 ml de Glicerina pura más 0.1 g de timol

Relación tiempo-costo promedio para las técnicas de diafanización aplicadas al grupo dos (peces). Tiempo = en horas (\*: en días)

Fases	Técnicas					
	Dawson (A)		Taylor (B)		Dawson M (C)	
	Tiempo	Costo (\$)	Tiempo	Costo (\$)	Tiempo	Costo (\$)
<b>Fijación</b>	96	5.40	169	0.07	96	5.40
<b>Corrosión</b>	4	1.72	152.88	34.02	2	10.45
<b>Tinción</b>	6	2.03	6	1.17	8	4.05
<b>Transparentación</b>	936	10.45	1104	11.08	744	11.23
<b>Preservación</b>		3.40		3.40		3.40
<b>Total</b>	<b>1042</b>	<b>23.00</b>	<b>1430.88</b>	<b>49.74</b>	<b>850</b>	<b>34.53</b>
Tiempo en días*	43.41		59.62		35.41	

**Anexo VIII.** Descripción del procedimiento de diafanización para el grupo tres

Fase	Técnicas de diafanización en Mamíferos		
	Dawson (A)	Taylor (B)	Dawson M (C)
<b>Fijación</b>	250 ml de alcohol 96°	250 ml de formaldehído al 4%	250 ml de alcohol 96°
<b>Corrosión</b>	200 ml de KOH al 1%	Alternar 200 ml de sol. digestora (enzima) con 200 ml de KOH al 0.5%	Alternar tratamiento 200 ml KOH 5% + glicerina y 200 ml KOH al 0.3%
<b>Tinción</b>	Preparar 200 ml de solución y sumergir completamente -Al finalizar lavar con agua	Preparar 200 ml de solución y sumergir completamente -Al finalizar lavar con agua	Preparar 200 ml de solución y sumergir completamente -Al finalizar lavar con agua
<b>Transparentación</b>	Preparar en concentraciones ascendentes de agua destilada y glicerina -80:20 -50:50 -30:70	Preparar en concentraciones ascendentes de agua destilada y glicerina -60:40 -30:70	Preparar en concentraciones ascendentes de agua y glicerina -70:30 -50:50 -25:75
<b>Conservación</b>	300 ml de Glicerina pura + 1 g de timol	300 ml de Glicerina pura + 1 g de timol	300 ml de Glicerina pura + 1 g de timol

Relación tiempo-costo promedio para las técnicas de diafanización aplicadas al grupo tres (mamíferos). T = en días

Fases	Técnicas					
	Dawson (A)		Taylor (B)		Dawson M (C)	
	Tiempo	Costo (\$)	Tiempo	Costo (\$)	Tiempo	Costo (\$)
<b>Fijación</b>	4	18.00	7	0.11	4	9.00
<b>Corrosión</b>	8	4.57	35	69.78	9	14.62
<b>Tinción</b>	5	2.60	5	1.46	5	4.35
<b>Transparentación</b>	65.4	26.00	72	19.24	48	17.47
<b>Preservación</b>		40.20		40.20		40.20
<b>Total</b>	<b>82.4</b>	<b>91.37</b>	<b>119</b>	<b>130.79</b>	<b>66</b>	<b>85.64</b>

**Anexo IX.** Descripción del procedimiento de diafanización para el grupo cuatro

Fase	Técnicas de diafanización en Anfibios		
	Dawson (A)	Taylor (B)	Dawson M (C)
<b>Fijación</b>	350 ml de alcohol 96°	350 ml de formaldehído al 4%	350 ml de alcohol 96°
<b>Corrosión</b>	350 ml de KOH al 1% por 9 días.	Alternar 350 ml de sol. digestora (enzima) con 300 ml de KOH al 0.5%	Alternar tratamiento 350 ml KOH 5% + glicerina y 350 ml KOH al 0.3%:
<b>Tinción</b>	Preparar 350 ml de solución y sumergir completamente -Al finalizar lavar con agua	Preparar 350 ml de solución y sumergir completamente -Al finalizar lavar con agua	Preparar 350 ml de solución y sumergir completamente -Al finalizar lavar con agua
<b>Transparentación</b>	Preparar en concentraciones ascendentes de agua destilada y glicerina -80:20 -50:50 -30:70	Preparar en concentraciones ascendentes de agua destilada y glicerina -60:40 -30:70	Preparar en concentraciones ascendentes de agua y glicerina -70:30 -50:50 -25:75
<b>Conservación</b>	300 ml de Glicerina pura + 1 g de timol	300 ml de Glicerina pura + 1 g de timol	300 ml de Glicerina pura + 1 g de timol

Relación tiempo-costo promedio para las técnicas de diafanización aplicadas al grupo cuatro (anfibios). T = tiempo en días

Fases	Técnicas					
	Dawson (A)		Taylor (B)		Dawson M (C)	
	Tiempo	Costo (\$)	Tiempo	Costo (\$)	Tiempo	Costo (\$)
<b>Fijación</b>	4	25.20	7	0.15	4.0	12.60
<b>Corrosión</b>	9	4.00	31	103.09	9.2	29.18
<b>Tinción</b>	6	4.32	8	1.46	8.7	5.25
<b>Transparentación</b>	104	52.41	78	41.49	81.0	43.68
<b>Preservación</b>		40.20		40.20		40.20
<b>Total</b>	<b>123</b>	<b>126.13</b>	<b>124</b>	<b>186.39</b>	<b>102.9</b>	<b>130.91</b>

**Anexo X.** Descripción del procedimiento de diafanización para el grupo cinco

Fase	Técnicas de diafanización en Reptiles		
	Dawson (A)	Taylor (B)	Dawson M (C)
<b>Fijación</b>	150 ml de alcohol 96°	150 ml de formaldehído al 4%	150 ml de alcohol 96°
<b>Corrosión</b>	150 ml de KOH al 1% por 8 días	Alternar 150 ml de sol. digestora (enzima) con 150 ml de KOH al 0.5%	Alternar tratamiento 150 ml KOH 5% + glicerina y 150 ml KOH al 0.3%
<b>Tinción</b>	Preparar 150 ml de solución y sumergir completamente -Al finalizar lavar con agua	Preparar 150 ml de solución y sumergir completamente -Al finalizar lavar con agua	Preparar 150 ml de solución y sumergir completamente -Al finalizar lavar con agua
<b>Transparentación</b>	Preparar en concentraciones ascendentes de agua destilada y glicerina -80:20 -50:50 -30:70	Preparar en concentraciones ascendentes de agua destilada y glicerina -60:40 -30:70	Preparar en concentraciones ascendentes de agua y glicerina -70:30 -50:50 -25:75
<b>Conservación</b>	150 ml de Glicerina pura + 1 g de timol	150 ml de Glicerina pura + 1 g de timol	150 ml de Glicerina pura + 1 g de timol

Relación tiempo-costo promedio para las técnicas de diafanización aplicadas al grupo cinco (reptiles). T = en días

Fases	Técnicas					
	Dawson (A)		Taylor (B)		Dawson M (C)	
	Tiempo	Costo (\$)	Tiempo	Costo (\$)	Tiempo	Costo (\$)
<b>Fijación</b>	7.0	10.80	11.00	5.47	7.16	10.80
<b>Corrosión</b>	8.1	3.43	12.33	68.04	4.19	11.99
<b>Tinción</b>	6.5	2.03	4.10	1.17	7.50	4.05
<b>Transparentación</b>	75.0	22.46	85.00	14.43	76	16.85
<b>Preservación</b>		21.48		21.48		21.48
<b>Total</b>	<b>96.6</b>	<b>60.20</b>	<b>112.41</b>	<b>110.59</b>	<b>94.85</b>	<b>65.17</b>

**Anexo XI.** Fotografías que ilustran el proceso de diafanización en los diferentes especímenes de vertebrados



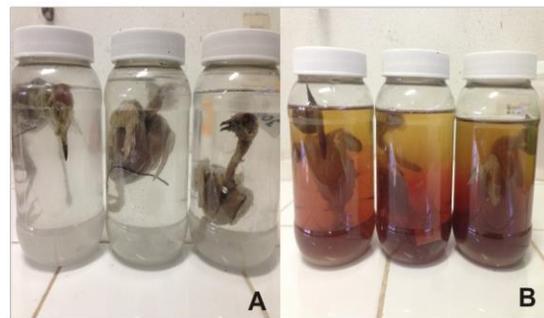
**Paso 1:** Selección, descongelamiento y eviscerado



**Paso 2:** Pesado y fijación



**Paso 3:** Valoración de la fijación del tejido



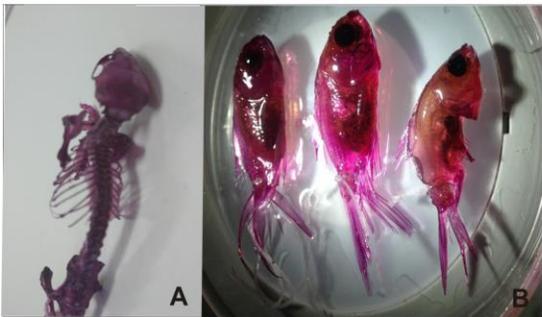
**Paso 4:** Corrosión de los especímenes



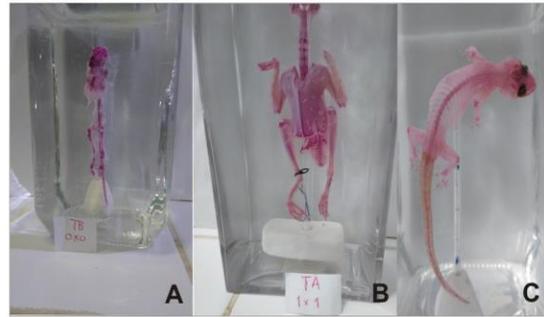
**Paso 5:** Valoración de la corrosión del tejido



**Paso 6:** Tinción de los especímenes



**Paso 7:** Valoración de la tinción del esqueleto



**Paso 8:** Transparentación y montaje