



AquaTIC

ISSN: 1578-4541

igjaugar@upv.es

Universidad de Zaragoza

España

Rivera Gómez, María del Consuelo; Moreno Colín, Roberto; Sánchez Fabila, Gabriela;
Fernández Araiza, Mario; Cárdenas León, Mario; Castro Cortes, Hugo de Jesús
Evaluación del efecto de tres hidróxidos en la calidad de diafanización de peces de cola
de espada (*Xiphophorus helleri*)
AquaTIC, núm. 46, 2016, pp. 1-9
Universidad de Zaragoza
Zaragoza, España

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49453354001>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

 redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Evaluación del efecto de tres hidróxidos en la calidad de diafanización de peces de cola de espada (*Xiphophorus helleri*)

María del Consuelo Rivera Gómez¹, Roberto Moreno Colín¹, Gabriela Sánchez Fabila¹, Mario Fernández Araiza², Mario Cárdenas León³ y Hugo de Jesús Castro Cortes³

¹Laboratorio de Anatomía de Vertebrados y Educación Científica; Morfofisiología Animal Comparada; FES Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

²Laboratorio de Producción Acuícola; FES Iztacala, UNAM.

³Laboratorio de Morfofisiología Animal Comparada; FES Iztacala, UNAM.

Resumen

La anatomía, como otras ramas del conocimiento biológico, está constantemente en búsqueda de técnicas que le permitan mejorar la descripción de su estudio. La diafanización es una técnica que permite igualar el índice de refracción de la luz del interior de un órgano con el medio que lo contiene, con el fin de poner de manifiesto otras estructuras anatómicas internas. Esta técnica supone una herramienta de gran utilidad en el estudio de las estructuras óseas de los peces. En este estudio se realizó un análisis de la metodología de dicha técnica utilizando tres tipos de hidróxidos, KOH, NH₄OH, y NaOH, todos al 4%, además de NaOH al 2% para realizar la técnica de diafanización en ejemplares del pez cola de espada *Xiphophorus helleri*, con el objetivo de encontrar los resultados más relevantes que favorezcan un estudio anatómico más detallado de estos peces. La conclusión a la que se llegó es que con el KOH se obtuvieron los mejores resultados en el proceso de diafanización de estos organismos. El NaOH a la concentración indicada resultó ser muy agresivo con los tejidos, propiciando la pérdida de la integridad corporal de los peces.

Palabras clave: diafanización, pez cola de espada, sistema óseo, KOH, NaOH, NH₄OH.

Summary

Evaluation of three hydroxides on the quality of swordtail fishes diaphanization *Xiphophorus helleri*

Anatomy, like any other branches of biological knowledge, is constantly in search of techniques that allow it to improve the description of its research. Diaphanization is a technique that allows the index of refraction of the light of the interior of an organ to be equated with the medium containing it, in order to reveal other internal anatomical structures. This technique is a useful tool in the study of the skeletal structures of fish. In this work, the KOH, NH₄OH and 4% NaOH and 2% NaOH were used to perform the diaphanization technique on *Xiphophorus helleri* swordfish, in order to find the most relevant results that favor a more detailed anatomical study of these fish. The conclusion reached was that best results were obtained with KOH during the process of diaphanization of these organisms. The NaOH to the indicated concentration was found to be very aggressive with the tissues causing the loss of the corporal integrity of the fish.

Key words: diaphanization, swordtail fish, osseous system, KOH, NaOH, NH₄OH.

Introducción

La producción de peces ornamentales ha sido uno de los más rentables tipos de acuacultura (Tamaru y cols., 2001). Es innegable que la producción de peces de ornato ha tenido un impacto positivo en la economía global, en particular en países en desarrollo donde esta actividad es un importante generador de empleos e ingresos (Ramírez y cols., 2010). Por ello el conocimiento que se obtenga, en diversos aspectos de los peces de ornato dará opciones para la mejora de su manejo; los peces ornamentales, como el pez cola de espada, han sido estudiados desde diversos enfoques; entre ellos su anatomía.

En México, el pez cola de espada debido a su marcado dimorfismo sexual (que en machos se caracteriza por la extensión ventral de la aleta caudal, llamada cola de espada) y su coloración tiene demanda en este mercado (Lazcano-Barrero, 1992).

Es un pez fusiforme, de entre 7 y 10 cm, presenta cráneo alargado y columna vertebral dividida en 15 torácicas y 14 caudales; de las cuales salen 31 espinas neurales, 31 hémiales y 15 costillas. Además, la facilidad de su manejo, mantenimiento, reproducción y tamaño hace que estos peces sean ampliamente utilizados como sujetos de experimentación (Marañón, 1999). Uno de ellos, es el sistema óseo, característica principal de los vertebrados, por ello nos hemos centrado en estudiar y aplicar diferentes técnicas que muestren el esqueleto sin dañar los huesos ni cambiar el arreglo estructural con la finalidad de observarlos y estudiarlos. Por ello, en este trabajo se utiliza la técnica de diafanización o transparentación propuesta por Dawson (1926) y modificada por Gersenowies y Sánchez en 2010.

La técnica de diafanización de Dawson (1926), que ha sido empleada desde los años 70 (Cortés-Delgado y cols., 2009) permite evidenciar el hueso para su estudio (Rodríguez, 2012). Usa el aclaramiento del músculo a través de la digestión alcalina con hidróxidos y rojo de alizarina con el fin de teñir los huesos, el cual es un colorante que se fija a los fosfatos de calcio que se encuentran en el hueso (Cortés-Delgado y cols., 2009).

La técnica original de Dawson (1926) utiliza hidróxido de potasio (KOH) para conseguir el efecto mencionado; sin embargo, existen técnicas modificadas como es el caso de Pérez y Sánchez en 1983, donde cambiaron la técnica original por hidróxido de sodio (NaOH) al 3% y 10% de formol, dando mejores resultados en organismos pequeños. Otra variación es la que se hizo en la "Técnica modificada de Dawson"; donde se sumerge al espécimen en KOH con aclaramiento en hidróxido de amonio (NH_4OH) junto con glicerina (Coronado, 2014). Aunque se han realizado distintas modificaciones a la técnica de diafanización de Dawson, pocos artículos mencionan las propiedades que tienen los hidróxidos y colorantes que se utilizan en la técnica por lo que los mencionaremos brevemente a continuación.

El KOH es una sustancia fuertemente alcalina que al disolverse en agua genera calor por lo que puede ocurrir una vigorosa reacción que lo vuelve corrosivo, lo cual resulta útil en este tipo de trabajos (Coronado, 2014).

Una solución de NaOH permite la observación por diafanización, y sirve para ablandar el tejido, además no solo mantiene la forma y tamaño, sino que también hace desaparecer las inclusiones celulares que no permiten observar con claridad los haces musculares (Dawson, 1926).

Tomando en cuenta que la presión de vapor del NH_4OH es alta este tiende a evaporarse, y por tanto la solución disminuye la concentración del hidróxido y el efecto puede no ser el esperado.

El rojo de alizarina (1,2-dihidroxiantraquinona) es un colorante que se obtiene de la raíz de la rubia y es utilizado en ensayos bioquímicos para determinar cuantitativamente por colorimetría, la presencia de deposición calcificada por las células de un linaje osteogénico, los depósitos de calcio en el sistema vascular, crecimiento y edad del hueso (Coronado, 2014). Esta técnica se fundamenta en la formación de complejos poco solubles y coloreados entre algunos colorantes y metales en estado iónico como calcio (González, 2011).

El objetivo de este trabajo fue utilizar diferentes soluciones aclarantes a base de KOH, NH_4OH y NaOH, para observar y comparar sus efectos sobre la diafanización del pez óseo cola de espada *Xiphophorus helleri*.

Materiales y métodos

Se trabajaron 250 ejemplares de pez cola de espada *Xiphophorus helleri*, divididos en 4 grupos para el manejo de los diferentes hidróxidos. Fueron sacrificados sumergiéndolos en agua fría con éter para posteriormente realizar el siguiente procedimiento:

- Se colocaron en formol al 4% neutralizado con borato de sodio durante 24 h, para el proceso de fijación. Se lavaron y dejaron en agua por otras 24 h. Se tomaron medidas morfométricas (cm) (Fig. 1 y Tabla 1). Se evisceraron y descamaron.

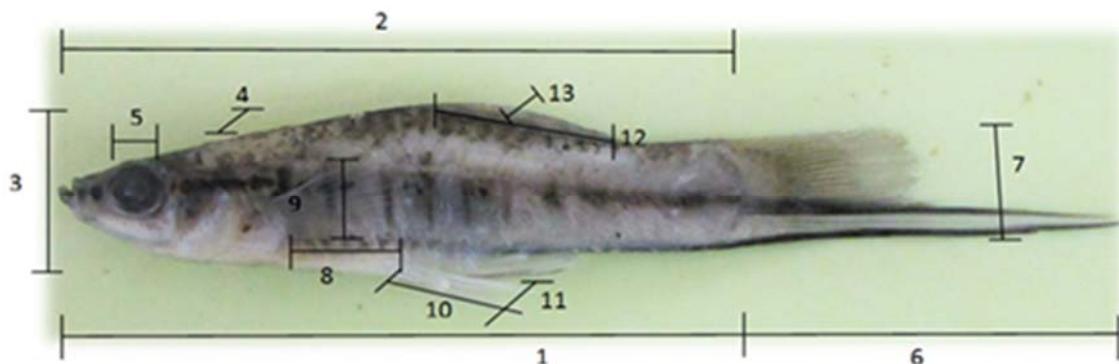


Figura 1. Pez cola de espada completo en el cual se indican las medidas morfométricas.

Tabla 1. Medidas morfométricas tomadas.

No.	Medida	Abreviatura
1	Longitud total	LT
2	Longitud patrón	LP
3	Alto	A
4	Ancho	AN
5	Diámetro ocular	DO
6	Longitud caudal	LC
7	Ancho caudal	AC
8	Longitud de la aleta pectoral	LAPec
9	Ancho de la aleta pectoral	AAPec
10	Longitud de la aleta pélvica	LAPel
11	Ancho de la aleta pélvica	AAPel
12	Longitud de la aleta dorsal	LAD
13	Ancho de la aleta dorsal	AAD

- Se realizó una deshidratación del organismo mediante un tratamiento con etanol en concentración ascendente (20%, 40%, 60%, 80%, 90% y 96%, durante 24 h cada uno).
- Proceso de Diafanización: se dividieron en 4 grupos. El primer grupo se colocó en KOH al 4% durante 72 h, el segundo grupo fue en NH₄OH al 4% durante 3 semanas, el tercero en NaOH al 4% por 12 h y el cuarto en NaOH al 2% también por 12 h. A todas las soluciones se les agregó 0,01 g de Rojo de Alizarina para la tinción del tejido óseo.

Una vez terminado el proceso de diafanización se colocaron en un tren ascendente de glicerina (20%, 40%, 60%, 80%, 90% y 100% 24 horas en cada uno) para terminar el aclarado del tejido muscular.

Resultados

A continuación, se presentan los valores promedio de las medidas morfométricas (cm) de los 250 peces cola de espada sometidos al proceso de diafanización (Tabla 2):

Tabla 2. Valor promedio de las medidas morfométricas (cm) del pez cola de espada sometido a diferentes tratamientos de diafanización.

Medida (cm)	Tratamiento			
	KOH 4%	NH ₄ OH 4%	NaOH 4%	NaOH 2%
LT	8,42	9,28	8,21	7,82
LP	5,13	5,62	4,97	4,86
A	1,5	1,76	1,49	1,36
AN	0,66	0,71	0,76	0,64
DO	0,54	0,49	0,43	0,36
LC	3,7	4,1	3,54	3,04
AC	1,42	1,5	1,33	1,25
LAPec	1,48	1,66	1,33	1,07
AAPec	0,66	0,64	0,57	0,4
LAPel	1,49	1,54	1,34	0,99
AAPel	0,62	0,6	0,5	0,4
LAD	1,51	1,63	1,41	1,19
AAD	0,97	0,83	0,97	0,75

En el proceso de evaluación de los resultados del proceso de diafanización con los cuatro diferentes tratamientos observamos lo siguiente:

Tratamiento con KOH

Tras el tratamiento de KOH 4%, se observó que el tono muscular del pez es más firme que en el caso de los otros dos hidróxidos.

La transparentación con KOH permitió apreciar el esqueleto completamente teñido y bien definido, lo que facilitó observar cada uno de los huesos (Figs. 2 y 3).



Figura 2. Regióncefálica del pez cola de espada con el tratamiento de KOH.



Figura 3. Pez cola de espada transparentado con el tratamiento de KOH.

Tratamiento con NH_4OH

Uno de los aspectos importantes a considerar es que durante el tratamiento con NH_4OH en los peces se observó un incremento en el volumen corporal; por múltiples causas, como puede ser el cambio en la presión osmótica. Asimismo, hubo cambio de coloración: color lila opaco sin diafanización, aspecto único observado con el empleo de este hidróxido (Fig. 4).



Figura 4. Pez cola de espada durante el tratamiento con NH_4OH . Se observa el cambio de coloración y el aumento de volumen en la musculatura.

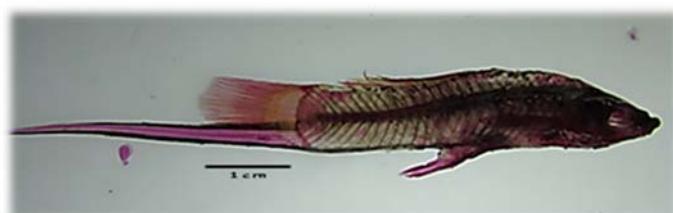


Figura 5. Pez cola de espada transparentado con el tratamiento de NH_4OH .



Figura 6. Regióncefálica del pez cola de espada con el tratamiento de NH_4OH .

Para continuar con el procedimiento se pasaron a la glicerina y se transparentaron en un periodo de dos semanas más. Esto difiere del proceso con KOH.

Después de terminado el procedimiento, se observó el esqueleto de manera definida y con la coloración homogénea en todas partes del organismo. La musculatura perdió firmeza, lo cual los volvió frágiles (Figs. 5 y 6).

Tratamiento con NaOH 4%

Después de transcurrir las 12 horas se completó la tinción. El tratamiento con NaOH 4% fue el más eficaz; sin embargo, el tejido muscular perdió rigidez volviendo frágiles a los organismos y fragmentándolos en algunos casos. Su esqueleto tomó una coloración rojiza homogénea (Figs. 7 y 8).

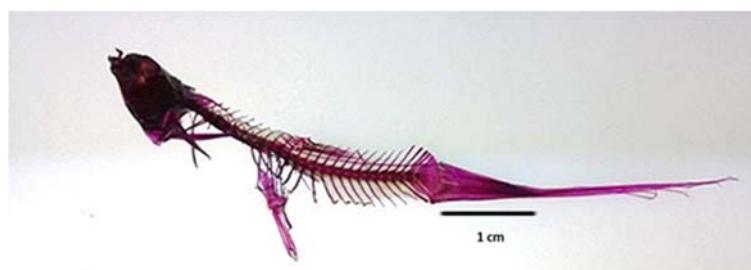


Figura 7. Pez cola de espada transparentado y fragmentado con el tratamiento de NaOH 4%.

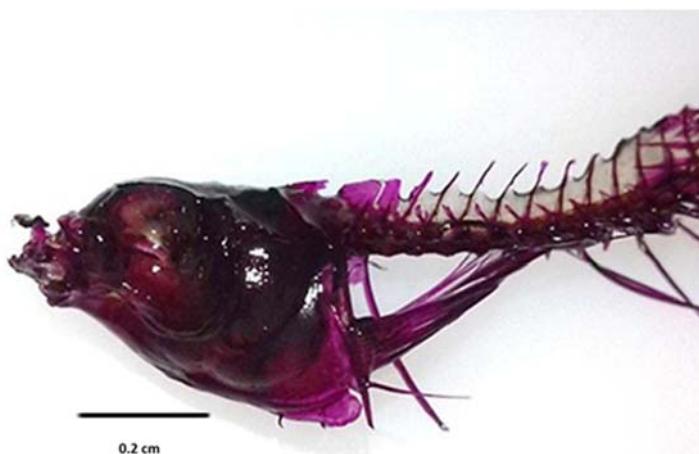


Figura 8. Regióncefálica del pez cola de espada con el tratamiento de NaOH 4%.

Tratamiento con NaOH 2%

Con el fin de contrarrestar el efecto dañino de NaOH 4% se optó por reducir la concentración a 2%. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados: se obtuvo poca tinción de los huesos, no se consiguió la diafanización y el tejido muscular nuevamente perdió firmeza. De modo que no hubo éxito aparente en el uso de este hidróxido (Figs. 9 y 10).

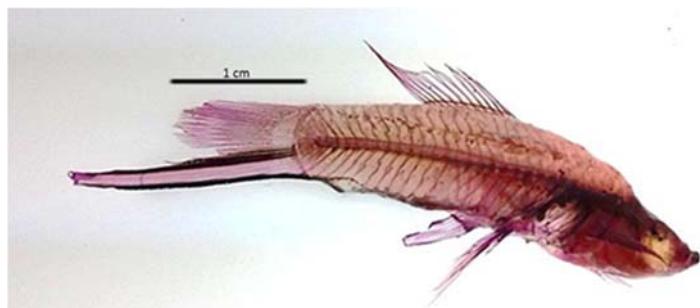


Figura 9. Pez cola de espada transparentado con el tratamiento de NaOH 2%.



Figura 10. Regióncefálica del pez cola de espada con el tratamiento de NaOH 2%.

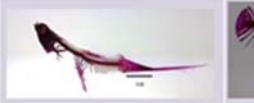
Comparación

Con base en la Tabla 2 los resultados nos permiten afirmar la diferencia en la calidad de diafanización aplicando los distintos tipos de hidróxido. Los óptimos fueron con el tratamiento de hidróxido de potasio, siendo el más eficiente: mejor calidad, y rapidez en el proceso; a diferencia del hidróxido de amonio, el cual tomó cerca de un mes y, aun así, los resultados no fueron los esperados, hubo coloración en los huesos pero el tejido muscular se dañó. Los resultados menos satisfactorios se obtuvieron con el tratamiento de hidróxido de sodio 4%, ya que en un lapso de 12 horas los peces tomaron coloración morada, pero el tejido muscular comenzó a deshacerse y desprenderse lejos de diafanizarse, lo cual generó peces en un estado poco útil para su posterior estudio. Para mejorar la calidad en la diafanización con NaOH, se trabajó como alternativa experimental el cuarto grupo al 2% durante 6 horas; a pesar de ello no se consiguió la transparentación, pues también quedaron destruidos y los huesos no alcanzaron el color esperado, por lo que no fueron organismos útiles para estudios anatómicos (Tabla 3).

Al observar la tabla podemos ver las tres etapas del proceso de diafanización en cada uno de los aclarantes probados en este trabajo, de manera comparativa. Como se puede ver, en el caso del KOH no hay cambios significativos, desde el inicio hasta el final del proceso se conserva la forma del pez, mientras que en el caso del NH₄OH desde el inicio presenta un cambio evidente en su estructura y coloración. En el intermedio aumenta su volumen y al finalizar el proceso el volumen se ve disminuido y con poca coloración en los huesos. En el tratamiento con NaOH 4% el daño al tejido muscular es notable

desde el inicio, pero al intermedio del tratamiento el efecto ha dañado el tejido muscular casi en su totalidad, y al final, la pérdida del músculo ocasiona que se pierdan elementos óseos, como en este caso, las aletas y costillas. A pesar de que se redujo la concentración del NaOH desde el inicio también se ve el daño al tejido muscular; en el intermedio aun es evidente el daño, al final no es tan agresivo como en NaOH 4%, por lo que no se pierden elementos óseos pero pierde la forma.

Tabla 3. Comparación de los tratamientos durante la diafanización.

Tratamiento	Inicio	Intermedio	Final
KOH 4%			
NH ₄ OH 4%			
NaOH 4%			
NaOH 2%			

Discusión

Los tres hidróxidos que se usaron con la misma concentración tiñeron los huesos, pero no en todos los casos hubo diafanización del músculo.

De acuerdo con Dawson, el NaOH es recomendado para la diafanización en plantas y vertebrados de mayor tamaño que el pez cola de espada, produciendo resultados satisfactorios. Sin embargo, en el presente trabajo duró menos de un día; fue muy agresivo para el músculo y lo digirió completamente llegando a desarticular los huesos. Tomando en cuenta que el hidróxido de sodio en ambas concentraciones, dañó el tejido y ocasionó que se deshiciera, este tratamiento resultó poco útil para organismos de la talla y contenido de grasa, equivalentes a los del pez empleado en este estudio.

Al contrario de los resultados obtenidos por Rivera y cols. en 2014 (NH₄OH con glicerina), en este trabajo (NH₄OH 4%) el proceso llevó más tiempo y los resultados no fueron satisfactorios. Al igual que Coronado en 2014, por lo tanto, no recomendamos el empleo del NH₄OH al 4%, para fines equivalentes a los del presente estudio. O en su defecto, se sugiere incrementar la concentración del hidróxido, o bien emplearlo en otro tipo de vertebrados.

Consideramos que dados los resultados el mejor tratamiento es el de hidróxido de potasio al 4%, porque no solo tiñó al esqueleto del pez sino también se diafanizó el músculo sin que perdiera su tono muscular ni su estructura en general, generando un organismo completo para el estudio anatómico. Cabe mencionar que se tuvo ventaja en cuanto al tiempo de diafanización (que fue de 3 días); a comparación de otros trabajos, como en el artículo elaborado por Tamayo y cols. en 2012, quién también obtuvo una diafanización exitosa pero su proceso de transparentación con KOH al 2% fue de 8 ocho días.

Conclusiones

Los tres tratamientos son efectivos para lograr la tinción de los huesos. Por el contrario, el proceso de diafanización del músculo fue diferente.

El tratamiento de NH₄OH no es recomendable para estos peces. Se consiguió la transparencia muscular pero el organismo perdió rigidez debido al exceso de tiempo en el hidróxido.

El grupo en el que se usó NaOH fue rápido más no efectivo. El hidróxido es muy agresivo, y a pesar de que se redujo la concentración no hubo mejoría en los resultados finales. Podría ser recomendable en organismos de mayor talla.

Finalmente, con el tratamiento de KOH se obtuvieron los resultados más favorecedores: transparencia, tinción ósea y tratamiento de menor duración.

Bibliografía

1. Coronado, C. J. (2014). *Elaboración de material docente mediante la técnica de diafanización para la enseñanza de la morfogénesis ósea*. Trabajo de grado para optar al Título de Magíster en Morfología Humana. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
2. Cortés-Delgado, N., Pérez-Torres, J., Mario H. (2009). Staining Procedure of Cartilage and Skeleton in Adult Bats and Rodents. *International Journal of Morphology*; 27(4): 1163-1167. Temuco, Chile.
3. Dawson, A. B. (1926). A note on the staining of the skeleton of cleared specimens in alizarin red S. *Stain Technique*; 1: 123-124.
4. Gersenowies, R.J.R., Sánchez F.G. (2010). Descripción anatómica del Esqueleto de los Tractos Respiratorios Superiores del Periquito Australiano. *International Journal of Morphology*; 28(1):85-92. Temuco, Chile.
5. Lazcano-Barrero, M.A., Vogt, R.C. (1992). *Peces de la Selva Lacandona, un recurso potencial*. ResearchGate. Berlin, Alemania.
6. Marañón, H. S., Maya E. P., Salgado H. Z. (1999). Masculinización de *Xiphophorus helleri* (Pisces: Poeciliidae) inducida por los esteroides norgestrel y androstenediona. *Revista Hidrológica*; 9(1): 31-38. México D.F.
7. Pérez, H. M. A., Sánchez, F. M. (1983). *Técnicas de estudio del endoesqueleto de peces*. Laboratorio de vertebrados. Área de zoología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México D.F.
8. Ramírez, C. M., Mendoza, R. A., Aguilera C. G. (2010). *Estado actual y perspectivas de la producción y comercialización de peces de ornato de agua dulce en México*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México.
9. Rivera, D. M. L., Suárez, C. J. R., Yate, A. B., Cruz, C. E. M., Barahona, G. S. B., Cortes, A. X. N., Arias, L. A. L. (2014). Comparación de técnicas de conservación morfológica y su posible aplicación para la enseñanza de la anatomía. *Morfología*; 6(3). Colombia.
10. Rodríguez, C. F. (2012). *Diafanización: Técnica modificada por rojo carmín*. Laboratorio de Investigación y Taller de Anatomía, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica de Cuyo. Rivadavia, Argentina.
11. Tamaru, C. S., Cole, B., Bailey, R., Brown, C., Ako, H. (2001). *A Manual for Commercial Production of the Swordtail, Xiphophorus helleri*. University of Hawaii Sea Grant Extension Service. School of Ocean Earth Science and Technology. Honolulu, Hawaii.
12. Tamayo, A. L. J., Suárez, P. A. A., Cano, A. I. V., Cuartas B. A. M., Yepes, S. A. C., Mejía, C. A. G., Lenis, Y. Y. S. (2012). Didactic model of the chicken embryo development using modified Dawson's diaphanization and staining technique. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*; (25): 620-624. Colombia.