

# Diafanización:

## Una técnica que permite la visualización diferencial de cartílago y hueso para el estudio del desarrollo y malformaciones en peces.

María Florencia Piovesana<sup>1</sup>, Jéssica Romina Gerbas<sup>2</sup>, Fabricio Andrés Vigiato<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Becaria de investigación del Programa de Becas de Promoción y Actividades Científicas y Tecnológicas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

<sup>2</sup> Instituto de Histopatología, Montevideo 1788, Rosario. En el año 2013 se desempeñó como técnica en el Laboratorio de Histología e Inmunohistoquímica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario.

<sup>3</sup> Cátedra de Histología I y Embriología Básica / Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. Bv. Ovidio Lagos y Ruta 33 (2170) Casilda, Santa Fe.

<sup>4</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).  
Correspondencia a: M. F. Piovesana piove\_13@hotmail.com



**RESUMEN:** En este artículo técnico describimos los resultados de nuestra experiencia en el desarrollo y optimización de la técnica de diafanización seguida de coloración diferencial de cartílago y hueso en ejemplares de peces autóctonos. Debido a que no se requieren equipamientos complejos, la técnica puede ser desarrollada en cualquier laboratorio de Histología o Embriología. Es de gran aplicación para el estudio del desarrollo esquelético en embriones o neonatos de cualquier especie animal, representando además una técnica que complementa la formación de los histotecnólogos ampliando su campo laboral.

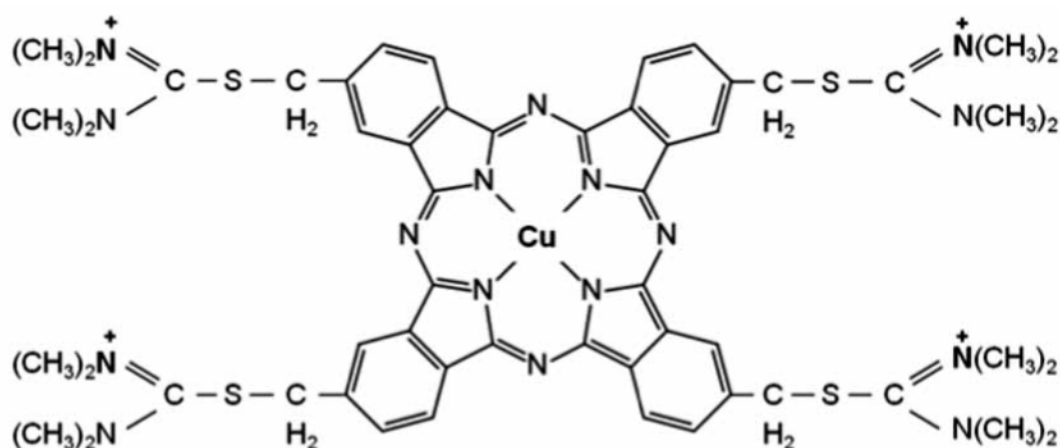
**INTRODUCCIÓN:** La técnica de diafanización de organismos vivos fijados consiste en la transparentización de los mismos para permitir observar estructuras internas. Fue descrita hace más de un siglo por Mall en embriones humanos como una técnica alternativa para el estudio de los centros de osificación (Mall, 1902). Posteriormente, en investigaciones sobre el desarrollo de miembros torácicos y pelvianos de ratas albinas, Dawson introduce el empleo del rojo alizarín para colorear selectivamente el tejido óseo (Dawson, 1926). En 1985, Taylor y Van Dyke describen en peces un protocolo optimizado para la doble tinción simultánea del tejido cartilaginoso con azul Alcian y del tejido óseo con rojo alizarín (Taylor y Van Dyke, 1985). Los resultados obtenidos mediante esta técnica pueden observarse en la foto de portada de esta revista, así como en las figuras 3b a 3d.

La diafanización, junto con la tinción de azul Alcian y rojo alizarín, son muy útiles para la observación del esqueleto cartilaginoso y óseo en los peces teleosteos en las semanas posteriores a la eclosión que están desarrollando su estructura ósea, ya que a esta edad no pueden emplearse otras técnicas como la radiografía debido al pequeño tamaño de los ejemplares y la nula o escasa mineralización del tejido óseo (Boglione y col, 2013).

En el Centro de Investigaciones en Piscicultura Experimental estamos validando tecnologías para el cultivo de especies de peces autóctonos, entre ellas la triploidización de ejemplares de bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*). En estudios recientes, determinamos que las larvas triploides obtenidas por choques térmicos de agua fría presentaron alta incidencia de malformaciones (Alaniz y col, 2013). Por ello, actualmente estamos empleando la técnica de diafanización para determinar que eventos generan estas alteraciones en la estructura oseocartilaginosa. Además, la utilizamos en nuestro laboratorio para evaluar la incidencia de malformaciones óseas en la columna vertebral y complejo caudal de pejerreyes sometidos a condiciones de larvicultura intensiva.

Brevemente, la técnica consiste en teñir los ejemplares de larvas o alevines con una solución ácida de azul Alcian, siendo seguidamente neutralizados en etanol absoluto. Posteriormente se transparentizan macerándolos en soluciones de hidróxido de potasio (K(OH)) a distintas concentraciones. Una vez transparentes los peces son teñidos con una solución alcalina de rojo alizarín y sumergidos en solución de Mall para finalizar la diafanización. Previo a su almacenamiento en glicerina pura, se los transfiere por soluciones de concentración creciente de glicerina en K(OH).

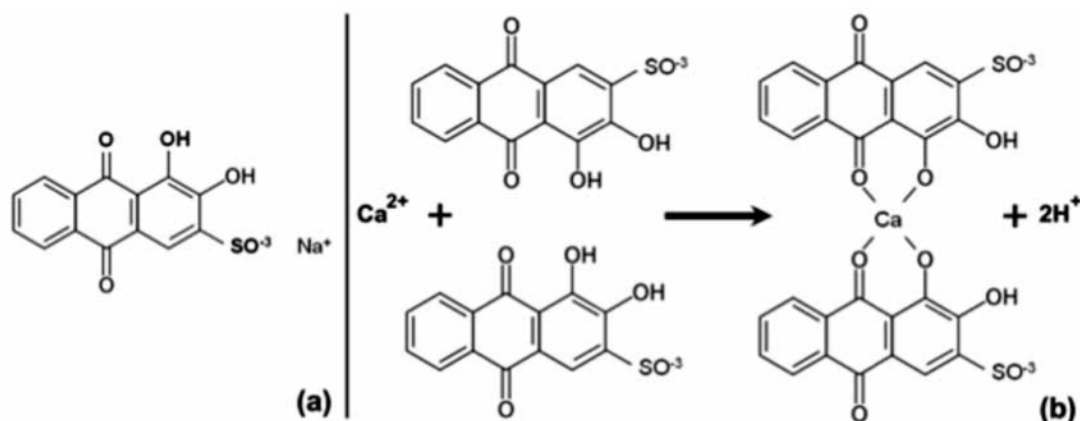
**PRINCIPIOS HISTOQUÍMICOS DE LA COLORACIÓN:** El azul Alcian es un colorante catiónico sintético derivado de la ftalocianina caracterizado por poseer hasta cuatro grupos tetrametilisotiouronio, cada uno ubicado en cada anillo benzoico de la molécula de ftalocianina de cobre (Figura 1). Estos grupos tetrametilisotiouronio son los responsables de las cargas positivas del colorante que determinan una elevada afinidad por moléculas polianiónicas como los glucosaminoglucanos sulfatados y carboxilados presentes en la matriz del tejido cartilaginoso (Scott y col., 1964).



**ARRIBA: Figura 1.** Fórmula estructural del azul Alcian. En negrita se indican las cargas positivas de los átomos de N en los grupos tetrametilsotiouronio, responsables de la interacción electrostática de este colorante con los polianiones.

El rojo alizarin es un colorante sintético, soluble en agua, derivado de la antroquinona y comercializado en forma de sales de alizarin sulfonato de sodio (Figura 2a). Una de las posibles hipótesis sobre la unión entre el calcio de los huesos y el colorante postula que la fijación específica del rojo alizarin al calcio se produce por quelación de una molécula de calcio mediante dos moléculas de rojo alizarin (Kiernan, 1990). Esto ocurriría porque las moléculas de oxígeno presentes en los grupos quinona y fenol del colorante (Figura 2a) se comportan como dadores de electrones y establecen con el calcio dos anillos estables (Figura 2b). Este mecanismo de quelación podría ocurrir con otros cationes divalentes como el magnesio o el hierro pero debido a la baja concentración de los mismos en comparación con los iones de calcio en hueso no interferirían en la especificidad de la reacción.

**ABAJO: Figura 2.** a. Fórmula estructural del rojo alizarin. En negrita se indican los átomos de oxígeno de los grupos quinona (anillo central) y fenol (anillo derecho) que participan en la reacción de quelación del calcio representada en la reacción de la figura 2b. También se muestra en negrita el grupo sulfonato. b. Reacción de quelación propuesta por Kiernan (1990) en la que dos moléculas de rojo alizarin se unen a un átomo de calcio liberando dos protones.



Lievremont y col. (1982) plantean una hipótesis alternativa de la unión entre el calcio y el colorante ya que determinaron *in vitro* que el mayor nivel de complejos ion-colorante precipitados se obtenía con una relación entre estos de 1:1, es decir que a cada molécula de calcio se le une una molécula de rojo alizarin.

Por ello, estos autores sugieren que la unión con el calcio se produce a través del residuo hidroxilo del grupo fenol y el grupo sulfonato

de la molécula de colorante (Figura 2a) (Lievremont y col., 1982). La reacción óptima de unión del rojo alizarin con el calcio se produce en un rango de pH de 4 a 8 (Lievremont y col., 1982). Por ello, teniendo en cuenta que el calcio de los huesos se solubiliza a pH ácido (que puede producir una pérdida de este ión en los huesos), resulta conveniente preparar la solución de rojo alizarin a un pH alcalino para evitar la descalcificación en las estructuras óseas.

#### EQUIPAMIENTO, INSUMOS Y REACTIVOS NECESARIOS PARA EL DESARROLLO DE LA TÉCNICA.

Para la realización de la presente técnica se requiere un microscopio estereoscópico, cassettes de biopsias y microbiopsias, viales de plástico, pipetas Pasteur, frascos de boca ancha con tapa, hojas de bisturí, material de laboratorio para preparación de distintas soluciones y guantes de látex. Entre los reactivos y colorantes son necesarios: etanol absoluto, hidróxido de potasio, glicerina, ácido acético, azul Alcian, rojo alizarin y peróxido de hidrógeno.

#### SOLUCIONES UTILIZADAS

##### A. Solución ácida de azul Alcian

Etanol 96° .....	80 ml
Ácido acético .....	20 ml
Azul Alcian .....	15 mg

Se conserva a 4° C hasta por 3 meses.

##### B. Hidróxido de potasio

Se deben preparar soluciones a diferentes concentraciones (5%, 3%, 1% y 0,5%).

Por ser el K(OH) un sólido higroscópico recordar que se debe tapar bien.

##### C. Solución de rojo alizarin

Inicialmente se debe preparar una solución de stock (SSRA), de acuerdo a lo siguiente:

Rojo alizarin .....	1 g
K(OH) 0,5% .....	100 ml

Se filtra antes de conservar.

Luego debemos preparar la solución de trabajo de rojo alizarin, la cual se obtiene con:

SSRA .....	2 ml
K(OH) 1% .....	100 ml

##### D. Solución de Mall

Agua destilada .....	79 ml
Glicerina .....	20 ml
K(OH) .....	1 g
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50 µl

Esta solución de Mall se encuentra al 1%. También puede prepararse al 3% agregando 2 g más de K(OH) a la solución, es decir en total 3 g.

##### E. Glicerina / K(OH)

Se deben preparar tres soluciones de concentración creciente de glicerina en K(OH) 0,5%. Las proporciones son las siguientes:

- 1:3 (25 ml de glicerina + 75 ml de K(OH) 0,5%)
- 1:1 (50 ml de glicerina + 50 ml de K(OH) 0,5%)
- 3:1 (75 ml de glicerina + 25 ml de K(OH) 0,5%)

#### DESARROLLO DE LA TÉCNICA DE DIAFANIZACIÓN

A continuación se describe la técnica para la transparentización de larvas de peces y la coloración del cartilago mediante la uti-

lización de azul Alcian y del hueso por rojo alizarin, siguiendo la técnica de Taylor y Van Dyke (1985), introduciendo algunas mejoras publicadas por Gavaia y col. (1999) e indicando algunas sugerencias de acuerdo a nuestra experiencia. Las larvas y alevines de pejerrey y bagre sudamericano que rutinariamente se procesan para esta técnica en nuestro laboratorio miden entre 6 y 20 mm de longitud estándar, aunque hemos realizado la diafanización de ejemplares juveniles de hasta 50 mm.

Todas las incubaciones se realizan sumergiendo los ejemplares en cada solución. Si procesamos muestras individuales los peces pueden colocarse en viales plásticos de 1,5 ml tipo Eppendorf. Si por el contrario se deben procesar lotes de peces, podemos colocarlos en cassettes de biopsias o microbiopsias, dependiendo de su tamaño, a los fines de facilitar el procesado (Figura 3a). En este caso los cassettes se sumergen en las soluciones colocadas en frascos de boca ancha.

#### 1º) FIJACIÓN.

Previo a la fijación en formol tamponado al 10%, se deben eutanasiar los ejemplares por sobredosis anestésica de acuerdo a las normativas y protocolos internacionales de bienestar animal. Las muestras pueden fijarse de 24 a 72 hs dependiendo del tamaño del animal y luego se transfieren a etanol 70% hasta colorear (pueden almacenarse años).

#### 2º) TINCIÓN DEL CARTÍLAGO.

Colocar los ejemplares en solución ácida de azul Alcian durante 30 minutos. Terminada la coloración se lavan los ejemplares con agua destilada para barrer el exceso de colorante. Si bien distintos autores sugieren variar el tiempo de coloración de acuerdo al tamaño del ejemplar hasta que el cartilago se vea bien teñido, en nuestra experiencia esto es de difícil realización, ya que una vez sumergidas en esta solución la piel de los peces se colorea fuertemente debido a los mucopolisacáridos ácidos de las células mucosas, lo que imposibilita ver las estructuras internas cartilaginosas.

#### 3º) NEUTRALIZACIÓN.

Inmediatamente después de la coloración del cartilago, los peces se transfieren a etanol absoluto por un lapso de tiempo de 3 días, renovando el alcohol todos los días.

#### 4º) MACERACIÓN.

Este es un paso central de la técnica ya que será el que nos permitirá iniciar la diafanización de los ejemplares. Requiriendo de paciencia por parte del técnico y una observación regular de los ejemplares para determinar en qué momento decidiremos pasar al paso siguiente de la técnica.

Para la maceración, transferir los ejemplares a la solución de K(OH) utilizando concentraciones del 1%, 3% o 5% dependiendo del tamaño del animal, esto es, a mayor tamaño empleamos una concentración de K(OH) más elevada. En esta solución las muestras deberán mantenerse hasta que el esqueleto se distinga claramente a través de las partes blandas, lo que puede variar entre 3 y 12 días dependiendo de la concentración de K(OH) utilizada. A mayor tamaño del ejemplar y menor concen-

tracción de K(OH) más tiempo de macerado. Es conveniente que los ejemplares de menor tamaño se coloquen a concentraciones bajas para evitar que el tejido se rompa y no se pierda la muestra. Las mismas deben ser observadas con regularidad, las de mayor tamaño cada 2 días y finalizando la transparentización cada día. En los ejemplares más pequeños (menos de 10 mm) se debe chequear todos los días. Si en una misma muestra hay variación de tamaño de los ejemplares, lo aconsejable es separarlas para la maceración y emplear distintas concentraciones. Es importante resaltar que durante la maceración, aprovecharemos para eliminar las escamas del tegumento de aquellas especies que las posean (como el pejerrey) y en los ejemplares de gran talla también eliminaremos el tejido muscular macerado para facilitar la posterior coloración del hueso. Para esto emplearemos el borde no cortante de una hoja de bisturí para raspar suavemente la superficie, eliminando así los tejidos reblandecidos por el K(OH).

#### 5º) TINCIÓN DEL HUESO.

Colocar los peces en solución de trabajo de rojo alizarin durante 30 minutos. Luego de la coloración lavar las muestras con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.

#### 6º) TRANSPARENTIZACIÓN.

Transferir los ejemplares a la solución transparentadora de Mall al 1 ó 3% hasta que los tejidos no esqueléticos sean completamente transparentes, lo que ocurrirá en un lapso de 1 a 3 días, dependiendo del tamaño del animal.

#### 7º) PRESERVACIÓN.

Una vez concluida la transparentización, se deben acondicionar

los ejemplares para su almacenamiento en glicerina. Para ello, sumergiremos los peces en las soluciones de glicerina de concentración creciente en K(OH) 0,5% (recordar las proporciones 1:3, 1:1 y 3:1), pasándolos finalmente a glicerina pura. Si las muestras están bien diafanizadas, se pueden hacer los pasajes por estas soluciones cada 2 horas. En el caso que consideremos que no están del todo transparentes, podemos mantenerlas 1 día en cada solución dándole tiempo al K(OH) para seguir actuando.

Estando en glicerina, los ejemplares pueden perder un poco de rojo alizarin tiñendo de rosado el medio por lo que se aconseja hacer algunos cambios de glicerina pura si esto ocurre.

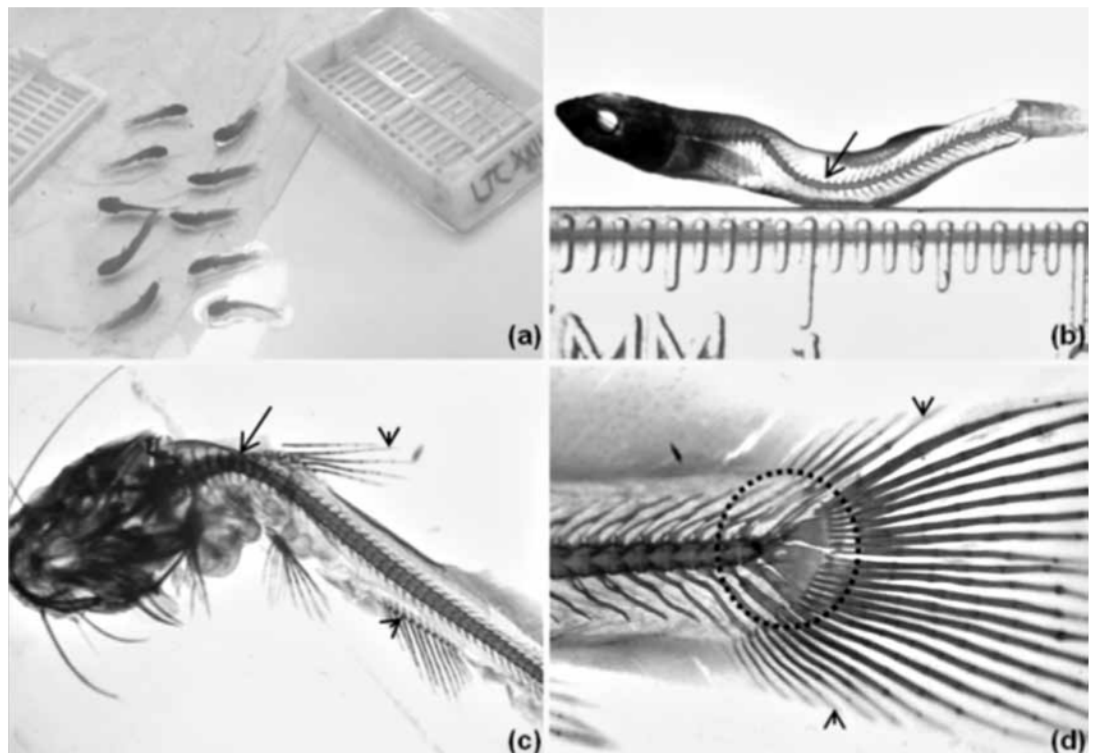
#### RESULTADOS OBTENIDOS CON LA TÉCNICA

Concluida la técnica se podrán observar los ejemplares transparentes, permitiendo la visualización de las estructuras internas teñidas con azul Alcian (cartilago) y rojo alizarin (hueso) (Figuras 3b, 3c, 3d).

Es importante remarcar que la solución ácida de azul Alcian tiñe mucopolisacáridos ácidos lo que puede dar a errores en la observación del cartilago, ya que estos glucosaminoglicanos también se encuentran en otros tejidos como el epitelio del tegumento o del tubo digestivo. Además, el azul Alcian al ser preparado en una solución ácida puede producir desmineralización en el tejido óseo en etapas tempranas de desarrollo de los ejemplares y así el tejido óseo puede perder afinidad por el colorante rojo alizarin (Boglione y col, 2013).

Por otra parte, es importante mencionar que debido a que el rojo alizarin es un colorante aniónico puede teñir de manera inespecífica los tejidos blandos dando una tinción rosada de fondo en las muestras.

Figura 3. a. Imagen que muestra 10 ejemplares de bagre sudamericano ya teñidos con azul Alcian y listos para ser colocados nuevamente en el cassette de biopsia para la neutralización. b. Pejerrey diafanizado en el que puede observarse una lordosis (flecha larga) a nivel de las vértebras caudales. c. Bagre sudamericano diafanizado presentando una escoliosis (flecha larga) en las primeras vértebras precaudales. d. Imagen ampliada del complojo caudal normal (área punteada) de un bagre sudamericano. En las figuras 3c y 3d se observa una tinción diferencial que distingue el azul Alcian en los mucopolisacáridos de la piel y del cartilago en la inserción y porción distal de los radios (flecha corta) de las aletas aún no completamente osificados y el rojo alizarin en el hueso.







## CONCLUSIONES:

La técnica de diafanización seguida de coloración diferencial de cartilago y hueso mediante el empleo de azul Alcian y rojo alizarin es una técnica sencilla que puede ser realizada con el equipamiento disponible en cualquier laboratorio de Histología o Embriología. Requiere de tiempo y del buen criterio del técnico que la ejecuta para obtener resultados satisfactorios ya que el mismo deberá decidir, en base a la observación de los ejemplares, en qué momento iniciar cada paso de la técnica. La misma presenta gran utilidad para el estudio del desarrollo del esqueleto óseo-cartilaginoso en peces permitiendo evaluar el impacto de las malformaciones bajo determinadas condiciones de cultivo.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Alaniz, M., Morón Albain, E., López, P.A., Hernández, D.R., Tobin, M., Ugalde, J.A., Vigliano, F.A. (2013). Efectos de la triploidía inducida por choques térmicos sobre el desarrollo embrionario y larval del bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*). En: *Memorias de la IV Conferencia Latinoamericana sobre Cultivo de Peces Nativos*, Villavicencio (Colombia). 8 al 11 setiembre de 2013.
2. Boglione, C., Gisbert, E., Gavaia, P., E Witten, P., Moren, M., Fontagné, S., & Kourmoundouros, G. (2013). Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Reviews in Aquaculture*, 5(s1), S121-S167.
3. Dawson A. A. 1926. Note on the staining of the skeleton of cleared specimens with Alizarin Red S. *Biotechnology & Histochemistry*; 1, 123-124.
4. Gavaia, P., Sarasquete, C. & Cancela, M. (1999). Detection of mineralized structures in early stages of development of marine Teleostei using a modified alcian blue - alizarin red double staining technique for bone and cartilage. *Biotechnic & Histochemistry*, 75:79-84.
5. Kiernan, J.A. (1990). *Histological and histochemical methods. Theory and practice*. Kiernan, J.A. (ed). Second edition. Pergamon Press: Oxford. 433 pp.
6. Lievreumont, M., Potus, J., Guillou, B. (1982). Use of alizarin red S for histochemical staining of Ca<sup>2+</sup> in the mouse; some parameters of the chemical reaction in vitro. *Acta Anatomica*. 114, 268-280.
7. Mall, F. P. 1902. On ossification centers in human embryos less than one hundred days old. *American Journal of Anatomy*, 5, 435-458.
8. Scott J.E., Quintarelli, G., Dellovo, M.C. (1964). The chemical and histochemical properties of Alcian blue. I. The mechanism of Alcian blue staining. *Histochemie*, 4, 73-85.
9. Taylor, W.R., Van Dyke, G.C. (1985). Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium* 9, 107-119