



Primer Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas.

Primera Jornada Científica de la Cátedra Santiago Ramón y Cajal.

Diafanización: Técnica Modificada por Solución Rojo Carmín.

Rodríguez, Federico .R; Algarilla, Daniel. G.

Laboratorio de Investigación y Taller de Anatomía, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Católica de Cuyo.

Servicio de Anatomía Patológica Hosp. Marcial V. Quiroga

San Juan Argentina

RESUMEN

La osificación en el ser humano se inicia a partir de centros primarios, que aparecen en forma secuenciada, los cuales van evolucionando hasta llegar a completar el desarrollo óseo en la edad adulta. La técnica de Dawson permite la visualización del esqueleto de embriones y fetos, transparentándolos con KOH, coloreando el tejido óseo con alizarina y su conservación final con una solución de glicerina alcohólica. El objetivo de este trabajo es modificar la técnica de Dawson, reduciendo el tiempo de transparencia y remplazando la alizarina por el colorante rojo carmín. Se emplearon fetos humanos donados por el Hosp. M. V. Quiroga, Morgue Judicial, y laboratorio CIAP de San Juan. Comenzamos con un proceso de fijación en formol al 10% se continua con deshidratación por medio de una serie de alcoholes en forma decreciente, durante 8 días y 2 días en Xilol para su aclaramiento .Utilizamos KOH al 20% para disminuir el tiempo de transparentación, experimentándose previamente con soluciones al 10%, 15% y 40%. Para obtener una tinción adecuada se probaron diferentes concentraciones de solución rojo carmín al 10%, 20%, y 30%; siendo la óptima la de 20% en 48hs. La conservación se realiza en una solución de alcohol al 95%, que aumenta la concentración de glicerina, gradualmente de 20%, 40%, 60% y 80 %, agregando en esta última unos granitos de Fenol. Se logro remplazar la alizarina por carmín, el cual es más accesible y económico, obteniendo el mismo resultado. Concluimos con una presentación óptima para la visualización del desarrollo óseo en forma secuenciada, como también para diferenciar la osificación membranosa de la endocondral.

INTRODUCCION

La osificación en el ser humano se inicia a partir de centros primarios, que aparecen en forma secuenciada, los cuales van evolucionando hasta llegar a completar el desarrollo óseo en la edad adulta. Con el interés en el estudio de la osificación, tanto membranosa como endocondral en nuestro laboratorio de Anatomía de la Universidad Católica de Cuyo de San Juan, incursionamos en la técnica de Diafanización, técnica que permite transparentar tejidos basándose en la igualación de los índice de refracción de la luz, dentro y fuera del tejido. Para este trabajo Se emplearon fetos humanos donados por el Hosp. Marcial. V. Quiroga y Morgue Judicial de la provincia. Tomamos como base la técnica de Dawson que permite la visualización del esqueleto de embriones y fetos transparentándolos con

KOH, coloreando el tejido óseo con alizarina y su conservación final con una solución de glicerina alcohólica. El objetivo de este trabajo es modificar la técnica de Dawson, reduciendo el tiempo de transparencia y remplazando la solución de alizarina, por el colorante rojo carmín. Este trabajo permite además exhibir preparados diafanizados como muestra de museo, investigar las patologías relacionadas en etapas del crecimiento y profundizar el aprendizaje de nuestros alumnos en la rama de biología y embriología.

Cabe destacar que la técnica de Diafanización es aplicable a cualquier espécimen animal. Los materiales y químicos son de uso común, que permiten conservar un espécimen en muy buenas condiciones y por largo tiempo sin que sufra alteración o descomposición.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se emplearon fetos humanos, algunas estructuras anatómicas como fragmentos de hígado y riñones que quisimos transparentar a modo de ensayos. Comenzamos con un proceso de fijación en formol al 10% si el espécimen es grande se recomienda quitar la piel, se continúa con la deshidratación del tejido por medio de una serie de alcoholes en forma decreciente al 70% -80%-96% y 100%, durante 8 días y 2 días en Xilol como aclarante. El espécimen debe ser sumergido cuatro veces por encima de su tamaño y conviene aplicar una leve agitación para lograr una buena impregnación de los alcoholes. Luego de que el tejido está deshidratado. La técnica de Dawson emplea KOH al 1%, esta concentración se aumenta al 20% para lograr disminuir el tiempo de transparencia a Mayor concentración de la solución menor tiempo de transparencia. Experimentando previamente con soluciones al 10%, 15% y 40%. observamos que la óptima era al 20% ya que por encima de este valor el espécimen se desintegraba. Una vez que la muestra toma un color café se pasa a la solución de carmín alcohólico. Para obtener una tinción adecuada, se probaron diferentes concentraciones de solución rojo carmín al 10%, 20%, y 30%; siendo la óptima la de 20% en 48hs. La conservación se realiza en una solución de alcohol al 96%, que aumenta la concentración de glicerina gradualmente. Solución de 50% de (KOH 2%) + 50% de glicerina, Solución de 25% de (KOH 2%) + 75% de glicerina técnica, Solución de 100% de glicerina técnica. Si en esta etapa la muestra no se torna transparente se puede volver a los pasos anteriores. Por lo general se requiere cambiar varias veces la solución en glicerina pura. Hasta obtener una transparencia adecuada.

En Resumen:

Formol al 10%	48hs (dependiendo el tamaño de la muestra)
Alcoholes 70%	1 o 2 pases en dos días
Alcoholes 80%	1 o 2 pases en una día
Alcoholes 96%	1 o 2 pases en dos días
Alcoholes 100%	1 o 2 pases en dos días
Xileno	1 pase en un día
Xileno	1 pase en un día.
KOH al 20%	1 o 2 pases en horas (hasta que tome color café)
la muestra) solución rojo carmín	1 pase (observar y evaluar la muestra)
Lavar con agua destilada cuidadosamente.	
Conservación:	

Solución de 50% de (KOH 2%) + 50% de glicerina	1 pase en 6hs
Solución de 25% de (KOH 2%) + 75% de glicerina,	1 pase en 6 he
Solución de 100% de glicerina	2 pases en horas.

Solución de 100% de glicerina + granos de Fenol

conservación final.

RESULTADOS.

Se logro remplazar la alizarina por carmín, el cual es más accesible y económico, obteniendo el mismo resultado. Concluimos con una presentación óptima para la visualización del desarrollo óseo en forma secuenciada, como también para diferenciar la osificación membranosa de la endocondral. Es aplicable sin ningún tipo de problemas para observar y estudiar alteraciones patológicas en la edad gestacional, sobre el desarrollo óseo, observamos que nuestra muestra presentaba una patología llamada Síndrome de Turner, alteración de origen genética que se manifiesta con el cuello en forma de esfinge Egipcia. Las muestras obtenidas de riñón e hígado fueron coloreadas sin ningún problema marcando calcificaciones en arterias principales.

CONCLUSIONES

Concluimos con una presentación óptima para la visualización del desarrollo óseo en forma secuenciada, como también para diferenciar la osificación membranosa de la endocondral.

BIBLIOGRAFIA

1. Robbins y Cotran, Adaptaciones Celulares, lesión Celular y Muerte Celular, Patología Estructural y Funcional, 7° edición, editorial Grafos S.A., Madrid España,2009, pp. 03-460.
2. Lever W.F.,Schaumburg lever G., Métodos de Laboratorio, Histopatología de la Piel, 5°edicion, editorial Interamericana SAICI, Buenos Aires, Argentina.,1978, pp 36-43.
3. Angritt P., Johnson F.P., Harrington R., Mills J., Métodos Histotecnologicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP),5°edicion, editada por las Fuerzas Armada de los EE UU. Washington DC. EE. UU.1995 pp 01-290.
4. Embriologia Medica con orientación clínica 8° edición, Langman; T.W.Sadler Editorial Panamericana. Año 1997
5. Anatomía y Embriología Veterinarias Facultad de Veterinaria, Campus de Espinardo30100 Murcia, España www.um.es/anatvet.

ANEXOS



Fig.1. Elementos Utilizados para la Diafanización con Rojo Carmín



Fig.2. Serie de deshidratación y aclaramiento



Fig.3. Feto en Hidróxido de Potasio para Diafanización



Fig.4. Fragmento de hígado diafanizado con carmín.



Fig.5. Feto terminado con Rojo Carmín que muestra osificación membranosa.