

Método alternativo para diafanizar especímenes de pequeños vertebrados con desengrasantes comerciales de uso doméstico

Alternative method to clear small vertebrate specimens with household degreasers

Carlos Ergueta Gutierrez^{1*}

¹Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado, Universidad Autónoma Gabriel René Moreno, Santa Cruz, Bolivia

* ergueta@gmail.com

Palabras clave: anatomía translúcida, ictiología, tejidos blandos, tinción de huesos.

Key words: translucent anatomy, ichthyology, soft tissues, bone staining.

El método de diafanizado o transparentado es una técnica para aclarar los tejidos blandos de pequeños organismos bajo estudio, ya que igualando el índice de refracción de la luz al interior del cuerpo se pueden observar estructuras internas como el tejido óseo o cartilaginoso (Rivera Gómez *et al.* 2016, Jesús & Rodríguez 2019, Megías *et al.* 2024). El proceso de aclarado de tejidos consiste en eliminar lípidos, pigmentos y otras sustancias que dificultan el paso de luz (Megías *et al.* 2024). Si bien no existe un protocolo único para transparentar organismos biológicos (Jesús & Rodríguez 2019), los primeros y más comunes métodos se basan en la utilización de soluciones alcalinas (hidróxidos de potasio, amonio y sodio) para la aclaración del tejido blando, muchas veces combinado con la tinción de tejido óseo con rojo de alizarina y cartilaginoso con azul de alcian, para darles mejor contraste y visibilidad (Dawson 1926, Brown 1967, Rivera Gómez *et al.* 2016, Arambarri 2018, Reed *et al.* 2019).

Otros métodos actuales para aclarar tejidos se basan en la utilización de solventes orgánicos y detergentes hidrofílicos (Megías *et al.* 2024). Así se utilizan solventes como el tetrahidrofurano, el diclorometano y el tetrahidrofurano con éter dibencílico (Ertürk *et al.* 2012). Los métodos basados en detergentes, principalmente saponina o Triton X-100 o disolventes como 3DISCO (imágenes tridimensionales de órganos limpiados con disolventes) reducen el índice de refracción de los tejidos orgánicos al eliminar los lípidos contenidos en el interior de las células (Muntifering *et al.* 2018, Yu *et al.* 2021). Sin embargo, muchos de estos compuestos mencionados están restringidos en varios países y su manipulación tiene riesgos para la salud humana y el medio ambiente. En el caso específico de Bolivia, la mayoría de los reactivos están clasificados como sustancias controladas (según la Ley de Régimen de la Coca y Sustancias Controladas), lo que dificulta enormemente su adquisición, incluso para fines científicos y en pequeñas cantidades. Por otro lado, los colorantes comúnmente usados para la tinción de tejidos, como el rojo de alizarina y el azul de alcian (Sandoval *et al.* 2015, Moreno Guerra *et al.* 2020) no se encuentran o son muy caros, por su parte Moreno Guerra *et al.* (2020) han propuesto opciones como *Bixa orellana* para la tinción en huesos. Frente a estas limitaciones, en este trabajo se propone y prueba un método alternativo para la

diafanización de tejidos blandos con productos de limpieza de uso doméstico y la tinción de otras estructuras con colorantes vegetales. Estos están disponibles en casi cualquier comercio de productos para el hogar, a un bajo costo y sin requerir medidas especiales de seguridad al manipularlos. Algunos estudios taxonómicos ya han aplicado con éxito variantes de este método en peces (Drawert & Ergueta 2024).

La efectividad de los productos se evaluó en una muestra de pequeños vertebrados (14 peces de 8 especies, 1 renacuajo, 1 gecko, y un murciélago; Figura 1) conservados de forma convencional para colecciones científicas húmedas (Tabla 1: Especimen y Longitud cm). Los especímenes fueron inicialmente fijados en formaldehído al 4% durante 1 día, luego remojados en agua durante 1-2 días, y finalmente conservados en alcohol etílico al 70% excepto el gecko y murciélago que quedaron por un día en formol. Antes del proceso de diafanización, los especímenes fueron enjuagados y remojados en agua durante 12 a 24 horas para eliminar la mayor cantidad posible del conservante (Reed *et al* 2019). Para evitar que afecten el proceso de transparentado, se extrajeron las escamas a los peces, los órganos internos a todos los especímenes (excepto al renacuajo), y luego de dejar reposar por un día en el producto desengrasante, la piel y los órganos del murciélago.

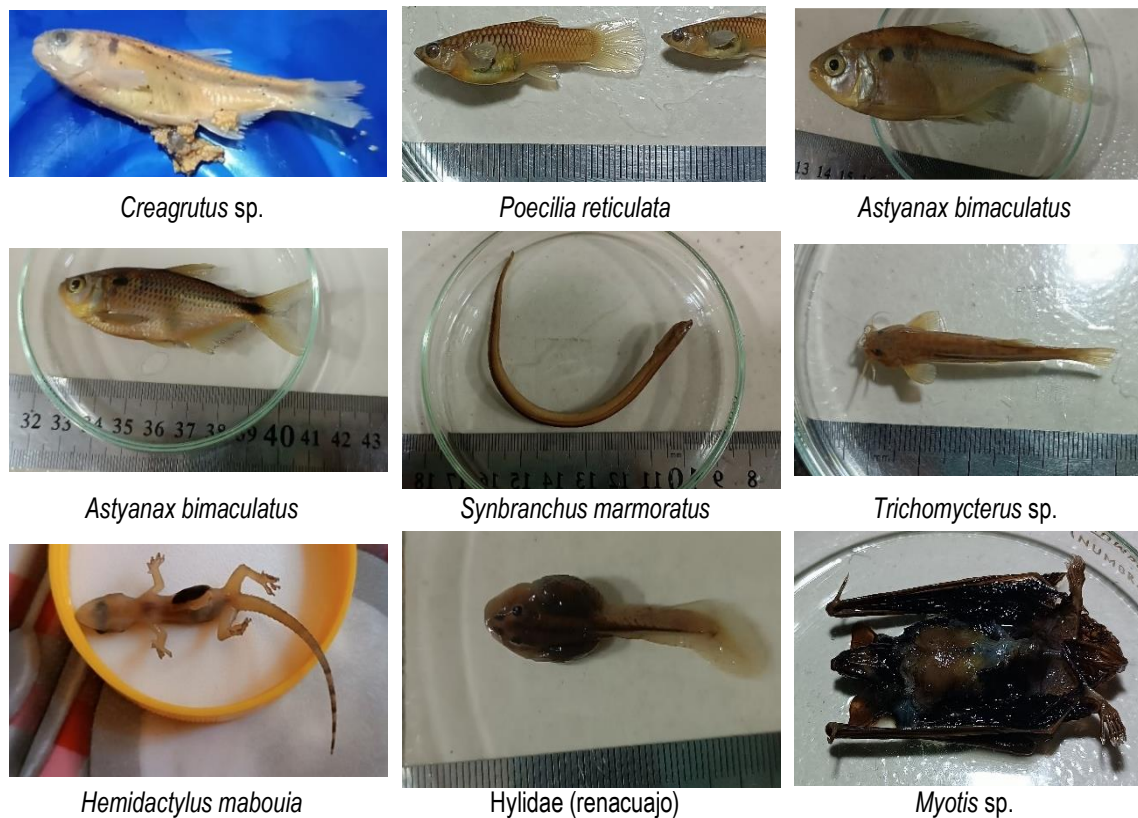


Figura 1. Los nueve tipos de especímenes antes del tratamiento.

Las pruebas se realizaron con siete productos de limpieza doméstica y un protocolo basado en hidróxido de sodio (NaOH al 4%, según Rivera Gómez *et al.* 2016). Estos fueron un limpia vidrios (Ola1), un anti sarro para baños (Ola2), un limpia pisos (Surf1),

cuatro desengrasantes o quita-grasas (Ola3, Surf2, Todo Brillo y Bristar) y soda cáustica destranca tuberías (Tabla 1, Figura 2).



Figura 2. Productos de limpieza utilizados en la diafanización: **Ola1:** Ola Maximus Limpia Vidrios, **Ola2:** Ola Maximus Antisarro, **Surf1:** Surf para piso, **Ola3:** Ola Máximo Anti-Grasas, **Surf2:** Surf para cocina ¡elimina grasa sin esfuerzo, **Todo Brillo:** Todo brillo-quita grasa, **Bristar:** Bristar poder desengrasante, y **NaOH:** Soda Cáustica.

Los especímenes fueron sumergidos en los productos de limpieza sin diluir y en la solución de NaOH al 4%, dentro de frascos transparentes de PVC (policloruro de vinilo) de 500 ml, hasta que el proceso de aclarado de los tejidos blandos hubiera alcanzado su nivel máximo de transparencia (Tabla 1, días expuesto). Algunos productos de limpieza llevan colorantes en su composición original (Yianakopoulos & Pagnoul 2014; Peitersen & Griese 2018), pero además se probaron tinciones alternativas para el tejido óseo como *Bixa orellana*, propuesta por Moreno Guerra *et al.* (2020). En tres casos se usó *B. orellana*, el colorante para comidas urucú (5 g de semillas), y en uno *Curcuma longa*, el condimento llamado palillo (5 g en polvo). Estos fueron mezclados con el producto desengrasante, agitándolos y dejándolos reposar por un día, y luego colando la mezcla antes de introducir el espécimen a tratar. Concluido el proceso de aclarado y/o tinción, las muestras se guardaron en glicerina líquida para su conservación y posterior observación (Sandoval *et al.* 2015, Rivera Gómez *et al.* 2016).

RESULTADOS

Los cuatro productos desengrasantes (Ola3, Surf2, Todo Brillo, Bristar) y la solución de NaOH diafanizaron los tejidos de los especímenes tratados, mientras que los otros tres productos, no (Tabla 1). Ola1 limpia vidrios, Ola2 antisarro y Surf1 para pisos dejaron opacos los especímenes de *Creagrutus* sp. tratados, y además, los tiñeron de color azul (Surf1) o de color fucsia (Ola1). Uno de esos especímenes que luego se colocó y mantuvo en Ola3 quita grasa transparentó en 4 días y se desintegró a los 10 días.

El tiempo de espera para un buen transparentado y tinción dependió del tamaño y espesor del espécimen, y en los más pequeños (de 1 cm), el cambio se empezó a notar a las doce horas. Los especímenes de *Poecilia reticulata*, bajo los cuatro productos desengrasantes y el NaOH (Tabla 1), mostraron tejido epitelial y muscular diafanizados, aunque no perfectos. En todos los casos el músculo mantuvo una coloración amarillo pálido traslúcido que permitía observar claramente el tejido óseo (Figura 3 a, b, c, d, e). En tres casos se usó también un colorante: Todo Brillo + *Bixa*, Ola3 + *Curcuma* y NaOH + *Bixa* (Figura 3 f, g, h), donde los músculos transparentados y los radios blandos se oscurecieron un poco y viraron al rojo, y los huesos aumentaron su contraste y visibilidad.

Tabla 1. Especie y tamaño de los especímenes tratados con ocho productos y dos colorantes (*Bixa* y *Curcuma*), durante 3-5 días de exposición y resultados de diafanización.

ESPECÍMENES	LONG CM	PRODUCTOS	TINCIÓN	DÍAS EXP.	RESULT DIAF.
<i>Creagrutus</i> sp.	5	Ola1 maximus limpia vidrios		4	No
	4,5	Ola2 maximus antisarro		4	No
	6	Surf1 para pisos		4	No
<i>Poecilia reticulata</i>	4	Ola3 maximus quita grasa		3	Si
	3,5	Surf2 grasa cocina		3	Si
	3,6	Todo Brillo quita grasa		3	Si
	3,1	Bristar desengrasante		3	Si
	4,2	Soda cáustica NaOH		3	Si
	3,5	Todo Brillo quita grasa	Bix	3	Si
	2,9	Ola3 maximus quita grasa	Cur	3	Si
	3,4	Soda cáustica NaOH	Bix	3	Si
<i>Astyanax bimaculatus</i>	9	Ola3 maximus quita grasa		4	Si
	15,5	Surf2 grasa cocina		5	Si
<i>Synbranchus marmoratus</i>	11	Ola3 maximus quita grasa		4	Si
<i>Trichomycterus</i> sp.	6	Surf2 grasa cocina		4	Si
Larva Hylidae	5,5	Ola3 maximus quita grasa		4	Si
<i>Hemidactylus mabouia</i>	7	Ola3 maximus quita grasa	Bix	4	Si
<i>Myotis</i> sp.	8	Todo Brillo quita grasa	Cur	5	Si



Figura 3. *Poecilia reticulata* tratada con cuatro productos desengrasantes a) Ola3, b) Surf2, c) Todo Brillo, d) Bristar, e) NaOH, f) Todo Brillo + *Bixa*, g) Ola3 + *Curcuma*, h) NaOH + *Bixa*.

Los dos individuos de *Astyanax bimaculatus* adquirieron una coloración amarillo translúcida con Ola3 y Surf2, donde se pueden observar las vértebras (Figura 4 a y b). La pequeña anguila *Synbranchus marmoratus*, cambió también a un color amarillento translúcido con Ola3, y se aprecia el cuerpo, las estructuras de la columna vertebral y la cabeza (Figura 4 c). El bagrecito *Trichomycterus* sp. tratado con Surf2 adquirió un transparentado amarillento translúcido donde se aprecian poco los huesos, pero bien los radios y la cabeza (Figura 4 d).

El espécimen de gecko *Hemidactylus mabouia* tratado con Ola3 y colorante *Bixa* resultó bien transparentado y con los huesos de su mano y tórax teñidos de color amarillento (Figura 5 a). El renacuajo de la familia Hylidae tratado con Ola3 transparentó sus tejidos blandos como para apreciar sus vértebras y la formación de huesos de las patas (Figura 5 b). Por último, el murciélago *Myotis* sp. tratado con Todo Brillo y *Curcuma* dio como resultado músculos transparentados y los huesos teñidos de rojizo, donde se observa bien el tórax, las patas y cola (Figura 5 c). Los especímenes diafanizados se conservaron inmersos en glicerina, lo que mejoró el transparentado con los días, y permitió la observación de huesos y radios, su identificación con lupa binocular y fotografía con detalles.



Figura 4. *Astyanax bimaculatus* tratada con a) Ola3, b) Surf2; c) *Synbranchus marmoratus* cuerpo, columna y cabeza tratada con Ola3, d) *Trichomycterus* sp. tratado con Surf2 cuerpo poco transparentado.

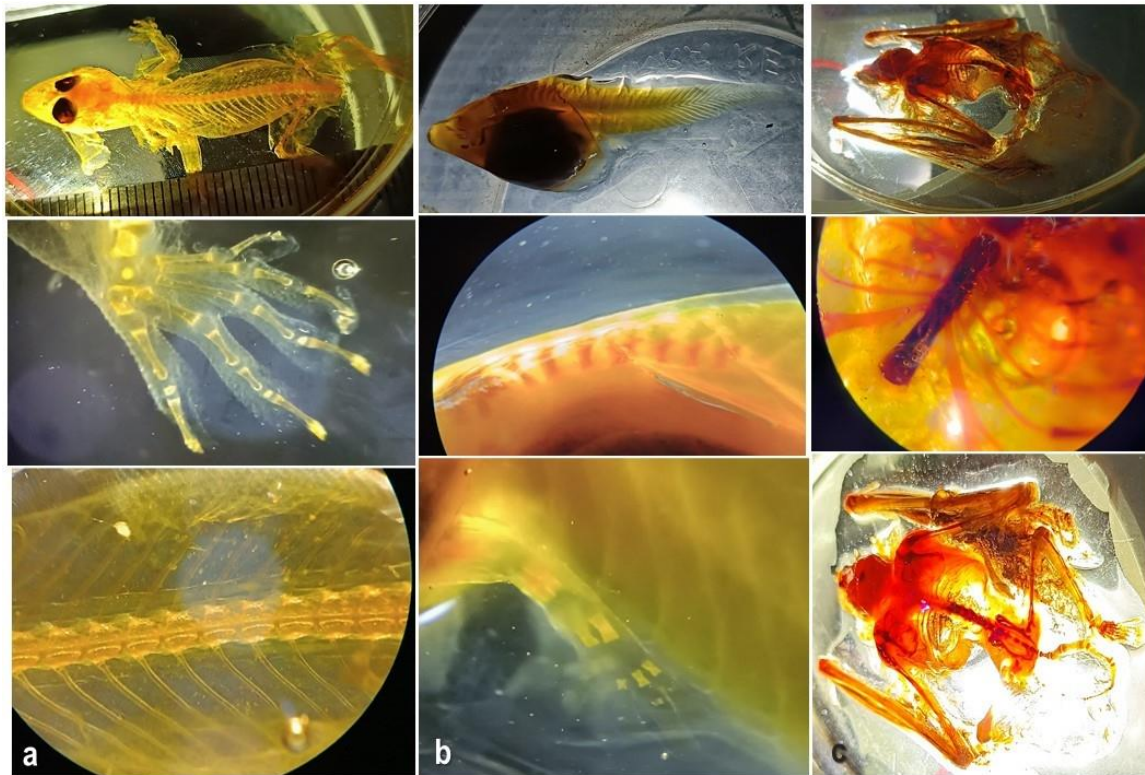


Figura 5. a) *Hemidactylus mabouia* tratada con Ola3 + Bixa, b) Larva de Hylidae tratada con Ola3, c) *Myotis* sp. tratado con Todo Brillo + Curcuma.

DISCUSIÓN Y RECOMENDACIONES

Los compuestos más usados para transparentar tejidos blandos son el hidróxido de potasio (Reed *et al.* 2019, Moreno Guerra *et al.* 2020), el hidróxido de sodio (Rivera Gómez *et al.* 2016), tensoactivos como el dodecilsulfato sódico (SDS), solventes como etanol, alcohol de bencilo, tetrahidrofurano (THF) y el diclorometano (DCM) (Muntifering *et al.* 2018 & Yu *et al.* 2021). Algunos de estos se pueden encontrar en los productos desengrasantes de cocina (Yianakopoulos & Pagnoul 2014; Peitersen & Griese 2018), que, como el hidróxido de sodio, los tensoactivos o solventes son componentes de algunos de los productos aquí usados, pero que no constan de manera detallada o comparable en la etiqueta de las distintas marcas.

Los tres productos no desengrasantes utilizados no transparentaron los tejidos blandos de las muestras *Creagrutus* sp., pero sí tiñeron de color los especímenes, mientras que con Ola3 'maximus quita grasa' se logró transparentarlos a los cuatro días. Sin embargo, este desengrasante desintegró la muestra a los diez días y dejó sólo restos de huesos, demostrando que no sirve como conservante y que es riesgoso sobrepasar el tiempo de exposición. Los cuatro productos desengrasantes (Ola3, Surf2, Todo Brillo, Bristar) y el NaOH transparentaron todos los especímenes en 3 y 4 días, excepto la sardina *Astianax* y el murciélago que necesitaron 5 días. Las muestras diafanizadas se conservaron bien en glicerina líquida, y se notó que con el tiempo su tono amarillento se fue aclarando, más aún, si se les renovaba este conservante. Reed *et al.* (2019) mencionan que la glicerina al 100% mezclada con hidróxido de potasio aumenta el transparentado de las muestras y que con un poco de cristales de timol se evitan los hongos. Para mejorar el aclarado se recomienda dejar las muestras en glicerina expuestas a la luz, siempre observando hasta qué punto de aclarado se requiera llegar, y luego en un lugar cerrado con poca luz.

La tinción de huesos con *Bixa orellana*, que ya se había usado en combinación con hidróxido de potasio (Moreno Guerra *et al.* 2020), igualmente funcionó con hidróxido de sodio y con el desengrasante Todo Brillo. Además de *Bixa*, el otro colorante tradicional *Curcuma longa* también se combinó con dos desengrasantes, que permitieron apreciar con mejor detalle los huesos en *Poecilia reticulata* (Figura 3), *Hemidactylus mabouia* y *Myotis* sp. (Figura 5). La combinación de Todo Brillo con *Bixa* oscureció un poco los músculos, pero brindó un mejor contraste de huesos y radios (Figura 3 f) y fue utilizada para el conteo de vértebras y branquiespinas en la descripción de *Austrolebias accorsi* y *A. ayoreode* (Drawert & Ergueta 2024). El condimento comestible palillo, *Curcuma longa* tiene potencial en la tinción de huesos, pero necesita una mejor examinación.

La soda cáustica (hidróxido de sodio al 99%) es un compuesto que se consigue en tiendas a un mayor precio que una botella de desengrasante, se debe conservar seco y en un ambiente controlado, hay que diluirlo con precisión (4% o 10%) y tener precaución en el manipuleo porque puede producir quemaduras e intoxicación. En cambio, los productos desengrasantes domésticos son más económicos, fáciles de manipular y conservar, pero

deben elegirse sin o con escaso colorante (o diluirlo con glicerina) y vigilarse los tiempos de exposición para no dañar los especímenes. Los cuatro productos desengrasantes disponibles en Bolivia transparentaron tejidos blandos de manera similar a la soda cáustica, pero con menor costo y riesgo en su manipuleo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la sección de ictiología del Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado (UAGRM) con el aval de la directora Luzmila Arroyo y de la responsable del área de Zoología Vertebrados Kathia Rivero. Agradezco a Lucindo Gonzales por sugerir los colorantes naturales, a Edson Cortez por la identificación de herpetos y a Kathrin Barbosa y Luis Acosta por el apoyo con el murciélago. Heinz Drawert brindó asesoramiento durante todo el proceso, y un editor contribuyó a la corrección del manuscrito. Quiero agradecer especialmente a mi madre, Yoly Ergueta Gutierrez, por la idea de utilizar estos productos en un nuevo procedimiento, nombrado en su homenaje como ‘El método de Yoly’.

LITERATURA CITADA

- Arambarri A. M. 2018. La “técnica de clarificación 5-5-5”, un método natural para el tratamiento de material vegetal. Bol. Soc. Argentina. Bot. 53(4) 579-586.
- Brown R. E. 1967. Bacula of some new world molossid bats. Mammalia. Vol. 31. 645-667.
- Dawson, A. B. 1926. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. Stain Tech 1: 123 – 124. DOI: 10.3109/10520292609115636.
- Drawert H.A., & C. Ergueta. 2024 Redescription of *Austrolebias accorsii* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) and description of a new species of the genus from the upper Paraguay River basin. Neotropical Ichthyology 22(2): 1-29. DOI.ORG/10.1590/1982-0224-2024-0001.
- Ertürk A., K. Becker, N. Jährling, C. P. Mauch, C. D. Hojer, J. G. Egen, F. Hellal, F. Bradke, M. Sheng & H. U. Dodt. 2012. Three-Dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3Disco. Nature Protocols. Vol. 7 N. 11. 1983-1995 pp. En <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2012.119>.
- Jesús R. O. O. J., & K. A. G. Rodríguez. 2019. Optimización de la técnica de diafanización y tinción de Piovesana (2014) aplicada para el pez *Gymnocorymbus ternetzi*. Publicación Semestral Pädi No. 13 41–46.
- Megías M., P. Molist & M. A. Pombal. 2024. Atlas de histología vegetal y animal. <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>. Consultado: (2024).
- Moreno Guerra, Y. A., T. M. Mira López, J. A. Rodríguez Pulido, & V. M. Medina Robles. 2020. Método alternativo de tinción ósea en peces juveniles empleando

- extracto de *Bixa orellana*. Revista Facultad de Ciencias Básicas, 15(2), 35-44.
Doi: <https://doi.org/10.18359/rfcb.3971>
- Muntifering M., C. Daniel, A. G. Gregory, M. Evan, M. Kofron & A. M. Watson. 2018. Clearing for Deep Tissue Imaging. *Curr Protoc Cytom*. Vol. 86 (1), 1 – 33.
- Peitersen N. D. & G. G. Griese. 2018. Concentrado desengrasante de hornos no corrosivo. documento Patente. N. 2 663 201. Oficina española de patentes y marcas. España.
- 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. *Anat Histol Embryol*. Vol. 00 1-4 pp. Doi: <https://doi.org/10.1111/ahe.12485>
- Rivera Gómez M del C., R. M. Colín, G. S. Fabila, M. F. Araiza, M. C. León & H. de J. C. Cortes. 2016. Evaluación del efecto de tres hidróxidos en la calidad de diafanización de peces de cola de espada (*Xiphophorus helleri*). *Revista AcuaTIC* 46, 1-9.
- Sandoval D., J. Téllez, A. Gracia, G Rivera, S. Moreno & F. Moreno. 2015. Técnica de diafanizados para describir el desarrollo embrionario del sistema óseo. Revisión de la literatura. *Univ Med* 57 (4) 488-501. Doi: <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.umed57-4.tddd>
- Yianakopoulos G. & P. Pagnoul. 2014. Composiciones y métodos de limpieza desengrasantes universales. documento Patente. N. 2 473 615. Oficina española de patentes y marcas. España.
- Yu T., J. Zhu, D. Li, D. Zhu. 2021. Physical and chemical mechanisms of tissue optical clearing. *CelPress Open access*, 1-21.

Manuscrito recibido en diciembre de 2024.

Aceptado en noviembre de 2025.