

**ELABORACIÓN DE MATERIAL DOCENTE MEDIANTE LA TÉCNICA DE
DIAFANIZACIÓN PARA LA ENSEÑANZA DE LA MORFOGÉNESIS ÓSEA.**

JONATHAN CORONADO CASALLAS

**Trabajo de grado para optar al
Título de magister en Morfología Humana**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA DE MORFOLOGIA HUMANA
BOGOTÁ – CUNDINAMARCA**

2014

**ELABORACIÓN DE MATERIAL DOCENTE MEDIANTE LA TÉCNICA DE
DIAFANIZACIÓN PARA LA ENSEÑANZA DE LA MORFOGÉNESIS ÓSEA**

JONATHAN CORONADO CASALLAS

Trabajo de grado

Director

DR. JAIME BELTRÁN GUERRA

Codirectora

DR. ZOILA EMILIA CASTAÑEDA MURCIA

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE MEDICINA

MAESTRIA DE MORFOLOGIA HUMANA

BOGOTA – CUNDINAMARCA

2014

DEDICATORIA

A Dios, por su sabiduría y discernimiento durante cada instante; a mí hijo Esteban por sus grandes bendiciones desde el momento que llego a nuestras vidas; a mi esposa Jessica y a mi familia por su apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Zoila Emilia Castañeda Murcia, Profesora pensionada e invitada de la Maestría de Morfología Humana de la Unidad de Biología Celular por su continuo respaldo, paciencia, motivación, interés constante, acompañamiento y sus consejos científicos para la elaboración de este trabajo.

Al Dr Jaime Alfonso Beltrán Guerra, Profesor asociado de la Unidad de Anatomía y Embriología del Departamento de Morfología Humana y director de la Maestría en Morfología Humana de la Universidad Nacional de Colombia, por sus valiosos aportes y su acompañamiento en el desarrollo de la investigación.

RESUMEN.

El proyecto de investigación busca exponer la obtención de piezas anatómicas diafanizadas con tinción de centros de osificación en ratones, la elaboración de los modelos y lograr estandarizar la técnica de preservación anatómica de diafanización. Según la propuesta, el proyecto de investigación requirió de siete fases, las cuales se desarrollaron en la Universidad Nacional de Colombia. En la primera fase se realizó una prueba preliminar en un cerdo. En la segunda y tercera fase, se implementó el protocolo de una universidad local y latinoamericana. La cuarta fase se basó en las experiencias de las primeras tres fases, y se realizó una fusión de técnicas que resultó en una adecuada diafanización. La quinta fase se hizo en fetos ratones de 17 días después de la copulación. La sexta y séptima fase, basadas en las anteriores realizó un protocolo de diafanización estandarizado que se implementó en 4 ratones con resultados satisfactorios en diafanización.

Palabras clave: Diafanización, centros de osificación, fases, ratón y estandarización.

ABSTRACT

This paper present in a clear the way how getting pieces anatomical diaphanizations with staining centers of ossification in mice. The development of pieces and help standardize the technique of anatomical preservation of diafanization according to the proposal made by the author of the research project required seven phases which were developed at Universidad Nacional de Colombia. The first step was done in a pig, the second and the third phase was use not only the protocol from a local university but also from a Latin American college. The fourth step of the project was perform a fusion of the thecniques than provide a successful result in the diafanization. The fifth step was done the process in mice fetuses of 17 days since the coupling. The sixth and seventh stage of the project was perform a standardized protocol of diaphanization that was implemented in four mice with satisfactory results.

Keywords: Diaphanization, ossification centers, stages, mouse and standardization.

Índice.

INTRODUCCIÓN.	12
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 OBJETIVO GENERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	14
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. MARCO DE REFERENCIA	16
4.1. ANTECEDENTES MUNDIALES	16
4.2 ANTECEDENTES LATINOAMERICANOS	17
4.3. ANTECEDENTES NACIONALES	18
4.4. ANTECEDENTES DE INVESTIGACION ASOCIADOS AL ESTUDIO EN LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	20
5. MARCO CONCEPTUAL.....	21
5.1. DIAFANIZAICIÓN.....	21
5.1.1. PROCEDIMIENTOS DE DIAFANIZACIÓN	21
5.1.1.1. TECNICA DE MACERACION DE DAWSON // SCHULTZ.	22
5.1.1.2. METODO DE DIAFANIZACION EN PECES.....	23
5.2. REACTIVOS A IMPLEMENTAR EN LA INVESTIGACION.....	23
5.2.1 HIDROXIDO DE POTASIO.	24
5.2.2 GLICERINA	24
5.2.3 ACETONA.....	24
6. BIOQUIMICA DE COLORANTES EN TEJIDO OSEO Y CARTILAGO A IMPLEMENTAR EN TECNICA DE DIAFANIZACIÓN.	27
6.1 ROJO DE ALIZARINA.....	27
6.2 AZUL DE ALCIAN.....	27
6.3 Embriología del tejido oseo.....	28
6.3.1. Desarrollo del mesodermo lateral.	28
6.3.2. Órganos derivados del mesodermo paraxial (sistema esquelético).....	29
6.3.3. Histogenia del cartílago.....	30
6.3.4 Histogenia de hueso.	30
6.3.5 Osificación Intramembranosa.	31
6.3.6 Osificación intracartilaginosa o endocondral.	31
6.3.7 Desarrollo del esqueleto axial.	34
6.3.8 Desarrollo del cráneo	35
6.3.8.1 Neurocráneo cartilaginoso.....	35
6.3.8.2 Neurocráneo membranoso.....	35
6.3.8.3 Desarrollo de la cabeza ósea a partir de arcos faringeos.....	36

6.3.8.4 Desarrollo de la cara.....	36
6.3.8.5 Cráneo del recién nacido.	37
6.3.8.6 Crecimiento postnatal del cráneo.	37
6.3.9 Desarrollo de la columna vertebral.	38
6.3.9.1 Etapa cartilaginosa del desarrollo vertebral.	38
6.3.9.2 Etapa ósea del desarrollo vertebral.....	39
6.3.10 Desarrollo de las costillas.....	39
6.3.11 Desarrollo del esternón.....	40
6.3.12 Desarrollo del esqueleto apendicular.	40
7. CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	42
8. DISEÑO METODOLOGICO PARA LA ELABORACION DE PIEZAS ANATOMICAS DIAFANIZADAS.	43
8.1. TIPO DE ESTUDIO.....	43
8.2. Especímenes utilizados.	43
8.3. Variables.....	43
8.3.1. Variable cualitativa nominal.	43
9. INSTRUMENTOS.	44
9.1 Equipos.....	44
9.2 Materiales.	45
10. FASES PARA LA ELABORACION DEL MATERIAL ANATÓMICO.	46
11. RESULTADOS OPTENIDOS DE LAS TECNICAS DE DIAFANIZACIÓN DURANTE CADA FASE.....	48
11.1. FASE UNO: “PRUEBA PRELIMINAR”.....	48
11.1.1 FIJACION DE CENTROS DE OSIFICACION: PRIMERA FASE.	57
11.1.2 CONCLUSIONES FASE UNO: PRUEBA PRELIMINAR.....	62
11.2. FASE DOS: “PROTOCOLO UNIVERSIDAD DE LOS ANDES”	63
11.2.1 FIJACION DE CENTROS DE OSIFICACION: SEGUNDA FASE.....	72
11.2.2 CONCLUSIONES DE LA FASE DOS: PROTOCOLO UNIVERSIDAD DE LOS ANDES	74
11.3. FASE TRES: “PROTOCOLO UNIVERSIDAD DE CHILE”	74
11.3.1 CONCLUSION FASE TRES: PROTOCOLO UNIVERSIDAD SANTO TOMAS DE CHILE.....	76
11. 4. FASE CUATRO: “EXPERIENCIAS POSITIVAS FASE UNO Y DOS”.....	77
11.4.1 FIJACION DE CENTROS DE OSIFICACION: CUARTA FASE.....	83
11.4.2 CONCLUSION FASE CUATRO: “EXPERIENCIAS POSITIVAS FASE UNO Y DOS.	85
11.5. FASE CINCO: “FETOS RATONES”.	86
11.5.1 CONCLUSION FASE CINCO: FETOS RATONES.	92

11.6 FASE SEIS: “PROCOLO DE DIAFANIZACIÓN SEGÚN EXPERIENCIAS POSITIVAS DE FASES 1, 3, 4, 5 EN CUATRO RATONES DE 17 DIAS”	92
11.6.1 FIJACION DE CENTROS DE OSIFICACION: SEXTA FASE.	96
11.6.2 CONCLUSION FASE SEIS: PROCOLO DE DIAFANIZACIÓN SEGÚN EXPERIENCIAS POSITIVAS DE FASES 1,2, 4, 5 EN CUATRO RATONES DE 17 DIAS.	98
11.7. PROCOLO DE DIAFANIZACIÓN SEGÚN EXPERIENCIA PRELIMINAR UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA	99
11.8 ANÁLISIS GENERAL DE RESULTADOS DE CADA FASE, DURANTE LA ELABORACIÓN DE LAS PIEZAS ANATÓMICAS DIAFANIZADAS	100
12. CONFIABILIDAD Y VALIDEZ.	101
13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.	102
14. CRONOGRAMA.	104
15.PRESUPUESTO.	106
ANEXOS.	110
16. Bibliografía.	114

Índice de tablas.

Tabla 1. Datos de seguridad de reactivos.	25
Tabla 2. Principales centros de osificación y edad en la que se fusionan.	33
Tabla 3. Registro de reactivos fase uno.	48
Tabla 4. Registro de reactivos fase dos	63
Tabla 5. Registro de reactivos fase tres.	75
Tabla 6. Registro de reactivos fase cuatro.	77
Tabla 7. Registro de reactivos fase cinco	86
Tabla 8. Registro de reactivos fase seis	92
Tabla 9. Resumen de reactivos y resultados fases 1,2 y 3 durante las técnicas de diafanización.	100
Tabla 10. Resumen de reactivos y resultado fases 4,5,6 y 7 durante las técnicas de diafanización.	100
Tabla 11: CRONOGRAMA SEGUNDO SEMESTRE 2013	104
Tabla 12: CRONOGRAMA PRIMER SEMESTRE 2014	104
Tabla 13: CRONOGRAMA SEGUNDO SEMESTRE 2014	105
Tabla 14: Presupuesto.	106
Tabla 15: presupuesto detallado.	107
Tabla 16: Presupuesto reactivos químicos.	109

Índice de fotografías.

Fotografía 1 y Fotografía 2.....	42
Fotografía 3. Inmersión en KOH y fijación con alcohol 70%	50
Fotografía 4. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,2%	51
Fotografía 5. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,25%	51
Fotografía 6. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,35% y 0,45%	52
Fotografía 7. Inmersión en Glicerina pura	53
Fotografía 8. Inmersión por 15 días y recambio cada 7 días de Glicerina pura.....	54
Fotografía 9. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,2%.....	55
Fotografía 10. Inmersión en Glicerina pura	56
Fotografía 11. Marcación de centros de osificación con rojo de alizarina primer, tercer, quinto y séptimo día.....	59
Fotografía 12. Aspecto final de marcación de centros de osificación.....	59
Fotografía 13. Desmanchado con alcohol al 70% e inmersión en solución de hidróxido de potasio.....	59
Fotografía 14. Inmersiones en glicerina pura, alcohol y hidróxido de potasio.....	60
Fotografía 15. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,2%.....	61
Fotografía 16. Inmersión y recambio de glicerina pura.....	62
Fotografía 17. Fijación en formol al 10% e inmersión en solución de hidróxido de potasio 10%.....	65
Fotografía 18. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 10%.....	66
Fotografía 19. Pérdida y retiro de pelo.....	66
Fotografía 20. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 2%.....	67
Fotografía 21. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 2%.....	67
Fotografía 22. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 2%.....	68
Fotografía 23. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 2%.....	68
Fotografía 24. Primera inmersión en glicerina pura.....	69
Fotografía 25. Inmersión de solución de hidróxido de potasio 0,2%	70
Fotografía 26. Segunda inmersión en glicerina pura.....	70
Fotografía 27. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,4%.....	71
Fotografía 28. Tercera inmersión en glicerina pura.....	71
Fotografía 29. Pos-marcación de centros de osificación.....	72
Fotografía 30. Inmersión y desmanchado en solución de hidróxido de potasio 0,45% y 0,5%.....	73
Fotografía 31. Inmersión en glicerina pura 10%.....	73
Fotografía 32. Fijación en formol al 10%.....	75
Fotografía 33. Cinco días de inmersión en solución de hidróxido de potasio 2% sin glicerina.....	76

Fotografía 34. Fijación en formol al 10% e inmersión en solución de hidróxido de potasio 10%.....	79
Fotografía 35. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 10%.....	80
Fotografía 36. Pérdida y retiro de pelo.....	81
Fotografía 37. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 2% con glicerina.....	81
Fotografía 38. Inmersión de solución de hidróxido de potasio 0,3%.....	82
Fotografía 39. Inmersión de solución de hidróxido de potasio 0,35%.....	82
Fotografía 40. Inmersión de solución de hidróxido de potasio 0,4%.....	83
Fotografía 41. Pos-marcación de centros de osificación.....	84
Fotografía 42. Inmersión y desmanchado en solución de hidróxido de potasio 0,45%.....	84
Fotografía 43. Inmersión en glicerina pura.....	84
Fotografía 44. Fijación en formol al 10% e inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,05%.....	87
Fotografía 45. Aumento de concentración de 0,05% a 0,1% de solución de hidróxido de potasio.....	88
Fotografía 46. Inmersión de solución de hidróxido de potasio a 0,15% y fijación con alcohol al 70%.....	88
Fotografía 47. Solución de hidróxido de potasio 0,2%.....	89
Fotografía 48. Solución de hidróxido de potasio superior a la permitida para obtener una diafanización adecuada.....	89
Fotografía 49. Solución de hidróxido de potasio a 0,1%.....	90
Fotografía 50. Solución de hidróxido de potasio a 0,1%.....	90
Fotografía 51. Inmersión en glicerina pura.....	91
Fotografía 52. Séptimo día de inmersión y recambio de la glicerina.....	91
Fotografía 53. Fijación en formol al 10% e inmersión en solución de hidróxido de potasio 10%.....	94
Fotografía 54. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 10%.....	95
Fotografía 55. Inmersión de solución de hidróxido de potasio 0,2% y 0,3%.....	95
Fotografía 56. Inmersión de solución de hidróxido de potasio 0,3% y 0,35%.....	96
Fotografía 57. Pos-marcación de centros de osificación.....	97
Fotografía 58. Inmersión en glicerina pura.....	98

INTRODUCCIÓN.

Las técnicas de preservación anatómicas son actualmente elementos pedagógicos y científicos de evidencia real, científica y verificable que permiten a la educación de las ciencias de la salud incorporar de manera temprana al estudiante al laboratorio y hacia enfoques de investigación que contribuyan a transformar al estudiante pasivo-receptor en activo-constructor que permita mejorar la calidad del proceso de enseñanza del docente trasmisor, en un mediador del proceso con el fin de lograr un aprendizaje significativo en ciencias morfológicas de seres humanos y otras especies.

La técnica de diafanización la que permite corroborar la secuencia anatómica del proceso de osificación de mamíferos (humanos, ratones) mediante el uso de sustancias corrosivas (hidróxido de potasio) las cuales transparentan los tejidos a excepción del tejido óseo brindan información importante para determinar la edad ósea de un feto normal, malformado o la relación y comparación ósea evolutiva entre especies, desde una mirada docente no existe en la Universidad Nacional una relación directa de estudio verificable en piezas anatómicas de la teoría de la morfogénesis ósea por parte del estudiante. El proceso de conservación anatómica mediante diafanización otorga posibilidades investigativas en el desarrollo de protocolos aplicables, sostenibles y reproducibles en el tiempo no solo en sistema óseo también en cardiovascular, digestivo y nervioso por las diferentes alternativas para el procesamiento de especímenes mediante la técnica de diafanización, el reto es explorar el procedimiento de diafanización desde sus principios técnicos, científicos y conocer las sustancias químicas empleadas y lograr un óptimo resultado de manera costo-efectiva. De una u otra manera, lograr especímenes diafanizados de excelente calidad con poco deterioro en tiempo, ofrece la alternativa de la técnica de diafanización como línea de profundización e investigación de correlación teórico-práctica de morfogénesis ósea, anatomía comparada y embriología que permita el fortalecimiento y posicionamiento de la Maestría de Morfología Humana a nivel nacional e internacional.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Actualmente, hay disponibles técnicas de preservación anatómica protocolizadas (plastinación, inyección corrosión), con importancia y enfoque anatómico estructural. Entre ellas, la técnica de la diafanización, que consiste en transparentar tejido, con la intención de visualizar el sistema óseo sin alterar su estructura macroscópica. Debido a la falta de modelos de preservación anatómica diferentes a inyección corrosión y plastinación, no se encuentran actualmente material de profundización y correlación teórico-práctica del aprendizaje embriológico de la morfogénesis ósea, que ayude a la formación de los estudiantes del departamento de morfología de la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. La ausencia de investigaciones publicadas en diafanización en la universidad (ver repositorio institucional de la biblioteca), y en la única maestría de morfología humana de nuestro país, constituye uno de los principales aportes de esta investigación. No obstante, en las múltiples técnicas de diafanización (ver marco teórico) no se relacionan detalles de concentraciones, tiempos, purezas y calidad de los reactivos, por lo tanto, el presente proyecto parte de la siguiente pregunta:

¿Cuál es la técnica de diafanización que puede ser implementada por docentes para la enseñanza de la morfología y en la elaboración de piezas anatómicas de morfogénesis ósea de mamíferos por parte del estudiante como estudio de correlación teórico-práctico en el departamento de morfología de la Universidad Nacional de Colombia?

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Establecer protocolo y piezas anatómicas de conservación con la técnica de diafanización como material de enseñanza a los estudiantes de pregrado y posgrado del departamento de morfología de la Universidad Nacional de Colombia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Desarrollar un protocolo de diafanización que pueda ser implementado por docentes y estudiantes en el departamento de morfología de la Universidad Nacional de Colombia.
- Realizar la revisión teórica de la técnica de diafanización que permita su implementación.
- Validar la técnica, según revisión teórica, con el fin de obtener resultados de diafanización en la elaboración de piezas anatómicas.

3. JUSTIFICACIÓN.

La preservación de cadáveres y especímenes anatómicos es un proceso descrito desde la antigüedad; los egipcios aportaron al conocimiento médico y de la industria funeraria usando sustancias químicas y técnicas de embalsamar. Actualmente, hay muchas técnicas de preservación anatómica, protocolizadas y con enfoque anatómico estructural. Particularmente, entre ellas encontramos la técnica de la diafanización, descrita en la literatura de manera sencilla y puntual que busca explicar cómo transparentar tejidos con base en la igualación de los índices de refracción de la luz dentro y fuera del tejido, con la intención de permitir la visualización del tejido óseo. Por tal razón, el presente proyecto tiene como objetivo la generación de *piezas anatómicas preservadas con la técnica de diafanización*, que sirvan como modelo pedagógico claro y costo-efectivo en la morfogénesis ósea de mamíferos. En el momento, no existen piezas diafanizadas para sus estudios en el departamento de morfología de la Facultad de Medicina y la maestría de morfología, que permitan la comprensión de la formación ósea en mamíferos, que ayuden a la determinación de centros de osificación membranosa y cartilaginosa, permitiendo el análisis de la anatomía comparada entre vertebrados y sus implicaciones evolutivas. (Concha, 2006)

Al finalizar el desarrollo del proyecto de investigación, se construirán piezas anatómicas diafanizadas, con base en una técnica implementada, que dará respuesta a la pregunta del proyecto de investigación.

4. MARCO DE REFERENCIA

4.1. Antecedentes mundiales

Tilotta Françoise, Lazaroo Bernard, Laujac M y Gaudy J, del Instituto de anatomía de la Universidad de Saints-Pères, y la Universidad Descartes de París-Francia, realizaron la investigación titulada: *“Estudio de la vascularización de la aurícula mediante disección y diafanización”*, en la que parten de afirmar que el proceso de vascularización de la oreja está mal documentado, a pesar de los avances en la auriculoterapia y cirugía reconstructiva; el objetivo fue describir la distribución arterial, usando dos técnicas: diafanización y la disección anatómica. El estudio fue llevado a cabo después de la inyección intravascular de ocho pabellones auriculares diafanizados y diez que fueron disecados y diseccionados. La conclusión mostró que la oreja es irrigada por una rama auricular anterior, que surge en la arteria temporal superficial y una rama posterior que nace de la arteria auricular posterior en ocho de cada diez casos, y los restantes dos casos, en la arteria occipital. En relación a la diafanización, se reveló que la distribución arterial tridimensional en los especímenes conservados, a través de la técnica mencionada, tiene un uso didáctico para complementar la disección anatómica (Tilotta F, 2009).

Rodríguez Baeza en colaboración con M. Rodríguez Palos de la Universidad Autónoma de Barcelona realizaron un estudio de revisión titulado *“Determinación mediante técnicas de corrosión, diafanización y microscopía electrónica de barrido de los territorios vasculares arteriales, con especial referencia a la irrigación de la medula espinal”* el objetivo fue mediante técnicas anatómicas estudiar la variación de vascularización en órganos del cuerpo humano para concluir con la medula espinal, una de estas técnicas anatómicas fue la diafanización, denominada de Spalteholz donde se transparenta utilizando xilol o derivados y mantenimiento en solución de benzoato de benzilo y salicilato de metilo (Rodríguez Baeza, 2004).

Pedro Henrique Duarte França De Castro, J. V realizaron el estudio titulado *“Evaluación de la filtración marginal de diferentes materiales restauradores temporales en Endodoncia”*

El objetivo es evaluar la filtración marginal coronal de tres materiales restauradores temporales utilizados para el sellado del conducto radicular después del tratamiento endodóntico. La metodología del estudio consiste en un total de 88 dientes unirradiculares fueron sometidos a preparación biomecánica y se llenó por la técnica de condensación lateral. Después de proceso de obturación, los dientes fueron separados al azar en cuatro grupos, siendo dos dientes de cada grupo utilizado como control positivo y negativo. A continuación, las muestras se sumergieron en tinta china durante 30 y 60- días, siendo 10 muestras para cada intervalo de tiempo y luego sometidos al *proceso de diafanización* en el cual las raíces se sumergieron en un receptáculo que contiene 5% de ácido clorhídrico. Después de descalcificación, las raíces se lavaron con agua corriente y se colocan en escala ascendente de alcohol (70%, 80%, 92% y 100%) durante 1 h en cada escala, seguido por inmersión en salicilato de metilo para el proceso de clarificación. Después de diafanización, las muestras se colocaron en un portaobjetos de vidrio y se llevaron al microscopio óptico para evaluar la profundidad de fuga coronal. La conclusión principal del estudio fue que ninguno de los materiales fue capaz de prevenir la filtración marginal en el plazo de 30 y 60 días. (Pedro Henrique Duarte França De Castro, 2013)

4.2 Antecedentes latinoamericanos

Vanesa del Carmen Reyes Rios, Agustín Alfredo Valiente Schipani, entre otros, desarrollaron la investigación “*Diafanización de embriones de Codorniz como experiencia didáctica*”, con el objetivo de mostrar los resultados obtenidos mediante la diafanización aplicada en embriones de codorniz, realizada por estudiantes del segundo año de la carrera de medicina de la Facultad de Ciencias Médicas de Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Como experiencia didáctica, la metodología consistió en que grupos de tres alumnos trabajaron con ejemplares de embriones de codorniz, que fueron fijados en formol por 30 días. La transparencia de las piezas anatómicas se realizó con una solución de hidróxido de potasio. Luego se utilizó el colorante Rojo de alizarina para el tejido óseo; dicha actividad permitió la observación del tejido en cuestión. Los alumnos realizaron diversas experiencias, introduciendo modificaciones de la técnica de diafanización, según el tamaño de la pieza, permeabilidad tisular y tiempo de exposición de las soluciones

utilizadas. En conclusión, la técnica de diafanización posibilita corroborar la secuencia anatómica del proceso de osificación en diferentes localizaciones y permite también determinar la edad ósea de un gestante normal. (Reyes Rios & Vanesa del Carmen, 2012)

Bulfon, M; Carabajal, M; Porcari, C. en la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, realizaron el trabajo titulado “Diafanización y tinción diferencial de hueso y cartílago en embriones y pequeños vertebrados” que tiene como objetivo la capacitación para la ejecución de las técnicas de tinción diferencial en vertebrados, fueron utilizados un total de cinco ejemplares representantes de distintos vertebrados (un pez, una rana, un reptil, una ave y una comadreja). El material empleado fue fijado previamente en formol 4% y conservado en alcohol 70%. La preparación de las piezas se realizó de acuerdo al siguiente protocolo: 1) Identificación del espécimen, 2) Morfometría, 3) Extracción del tegumento, evisceración y remoción de ojos. 4) Lavado con agua corriente, 5) Blanqueamiento en Peróxido de Hidrógeno al 10%, 6) tinción de cartílago, los especímenes se sumergieron en una solución de Azul de Alcian y luego se post-fijaron en alcohol 100%, 7) Para teñir hueso se embebieron en una solución de KOH al 3% por 24 hs. Luego se agregaron 8 gotas de solución acuosa de alizarina roja por cada 100 ml, la solución fue controlada hasta lograr la transparencia y el color deseado. 8) Posteriormente se transfirieron a soluciones de glicerina al 50 y 75% por 24 hs y se conservaron en glicerina anhidra pura. (Bulfon, Carabajal, & Porcari, 2012)

4.3. Antecedentes nacionales.

Lynda Tamayo Arango, Paula Suarez Avendaño, entre otros, realizaron el estudio titulado: *Modelo didáctico del desarrollo del embrión de pollo con diafanización modificada de Dawson y técnica de tinción*, publicado en la revista Colombiana de Ciencias Pecuarias en el 2012. El objetivo del trabajo fue la creación de un modelo didáctico, que mostrara el desarrollo del embrión de pollo, usando la técnica modificada de diafanización de Dawson y la técnica de tinción, que permite a los centros de osificación ser vistos. La metodología, consistió en utilizar embriones de pollo desde el día 5 al día 21, que fueron diafanizados con KOH; después se tiñeron con rojo de alizarina, y luego fueron almacenados en glicerol.

Los resultados de crecimiento de los centros de osificación primarios durante el desarrollo embrionario, fueron fáciles de visualizar, y se pudo concluir que este es el primer informe que muestra un modelo anatómico de todas las etapas embrionarias del desarrollo del pollo. (Tamayo LJ, 2012)

Ana Claudia Villegas, María De Los Ángeles Quiroga y Daniela Cleves de la Universidad de los Andes, realizaron el proyecto titulado; *Diafanización: visualización del desarrollo óseo en fetos*. En él, se muestra cómo la visualización del sistema óseo, se llevó a cabo por medio de exploración de dos técnicas o procedimientos de diafanización; la primera fue técnica Modificada de Dawson, la cual no tuvo resultados satisfactorios en la obtención de transparentación y resultó más costosa y menos efectiva en la transparentación del espécimen y visualización del sistema óseo. La segunda técnica de diafanización fue por maceración de Dawson/Schultz, y evidenció resultados en los que se observó cierto grado del progreso de transparentación, pero quedó inconclusa en lo referente a los centros de osificación del sistema óseo del embrión. En conclusión, el proyecto muestra que la diafanización es una técnica morfológica que se usa en conjunto con la tinción para poder exponer, visualizar y analizar los centros de osificación en un feto, antes de llevar a cabo el proceso y se debe hacer un estudio previo exhaustivo de la técnica, el procedimiento, materiales y las condiciones ambientales, para asegurar que el experimento sea exitoso. (Villegas, Quiroga, & Cleves, 2012)

Carlo Mejía realizó diafanización e informe titulado “ Secuencia de aparición de centros de osificación en embriones y fetos bovinos mediante la técnica de diafanización y tinción ósea con alizarina” el objetivo general es determinar la secuencia de aparición de centros de osificación en embriones y fetos bovinos mediante la técnica modificada de Dawson que se realizó en etapas: fijación con formol al 5%, deshidratación con hidróxido de potasio y etano al 70%, tinción con rojo de alizarina y diafanización con hidróxido de potasio diluido en glicerina, los resultados fueron registrados en tablas que determinan estructuras ósea, edad, longitud y tipo de osificación (ejemplo: clavícula, 37 días, longitud 2,2 cm y osificación membranosa) (Mejía, 2013)

4.4. Antecedentes de investigación asociados al estudio en la Universidad Nacional de Colombia.

Actualmente, no hay investigaciones en diafanización publicadas en el repositorio de la biblioteca de la Universidad Nacional de Colombia que se encuentren aprobadas y establecidas para optar por un título de posgrado.

5. MARCO CONCEPTUAL.

5.1. Diafanización.

La visualización del desarrollo óseo en animales o fetos humanos por diafanización es una técnica conservación anatómica de los tejidos de un espécimen que se someten a una despigmentación, con el fin de estudiar su anatomía del sistema óseo. Independientemente del tipo de método, todos tienen el mismo fundamento, y siguen los siguientes pasos: primero, se realiza una fijación del espécimen, con el fin de mantener las células con las propiedades intactas. Esto se logra al estimular la formación de enlaces cruzados entre las proteínas e inactivar enzimas celulares, para impedir que se presente una autólisis y por tanto, una degradación post mortem de los fetos o del espécimen. En segunda instancia, para poder visualizar y analizar el sistema óseo, se transparenta todo el tejido a excepción del sistema óseo en desarrollo; a este proceso, por el cual una muestra se hace diáfana o transparente, mediante técnicas que igualan los índices de refracción de la luz del interior del órgano con el medio que lo contiene (Concha, 2006), se le conoce como diafanización, sumergiéndolo en una solución de hidróxido de potasio (KOH), el cual es miscible, tanto en alcohol como con el medio de inclusión, y a la vez es bastante corrosivo, ya que realiza una reacción de óxido-reducción, deshidratando todos los tejidos. Por último, con el objetivo de exponer los huesos en desarrollo, la edad del embrión y posibles anomalías óseas, los centros de osificación se tiñen con un colorante específico, comúnmente rojo de alizarina.

5.1.1. Procedimientos de diafanización.

Actualmente, existen dos procedimientos diferentes de diafanización, la primera es la “Técnica modificada de Dawson” que consiste en someter al espécimen a deshidratación con alcohol al 70%, inmersión en hidróxido de potasio puro con aclaramiento en hidróxido de amonio (NH₄OH) junto con glicerina pero, según literatura y antecedentes de investigación, no es muy satisfactoria la obtención de resultados por medio de la técnica modificada de Dawson. Por tal razón, en este proyecto se utilizará la técnica de diafanización por maceración, llamada Técnica de Dawson // Schultz

5.1.1.1. Técnica de maceración de Dawson // Schultz.

La técnica de Dawson/Schultz (Villegas, Quiroga, & Cleves, 2012) es mucho más sencilla que la técnica de Dawson modificada; sin embargo, tarda más tiempo en generar resultados. Es fácil obviar lo anterior debido a que no incluye los pasos de fijación, ni de dilución de las grasas; pero la concentración del hidróxido de potasio es menor, por lo que la diafanización toma más tiempo.

El espécimen se encuentra sumergido en glicerina, y en una solución de KOH, en concentraciones menores al 15%. En el transcurso de cuatro semanas aproximadamente, se evidencian cambios notorios en la composición física y la transparentación del tejido. El proceso, según el protocolo de la Universidad de los Andes es el siguiente:

1. Fijación de la muestra en formol 10%
2. Técnica de tinción de centros de osificación.
3. Diafanización siguiendo el esquema:
 - a) Solución de Hidróxido de potasio + H₂O al 75 % (KOH 10%,) + 25% de glicerina técnica. (5 días).
 - b) Solución de 65% de (KOH 10%)+ 35% de glicerina técnica
 - c) Solución de 50% de (KOH 2%)+ 50% de glicerina técnica
 - d) Solución de 100% de glicerina técnica. Si en esta etapa la muestra no se torna transparente, se puede volver a los dos pasos anteriores. (Por lo general se requiere cambiar varias veces la solución en glicerina pura hasta obtener una transparencia adecuada).

En la universidad Santo Tomas de Chile (Concha, 2006) se desarrolla así:

1. Fijación de la muestra en formol 10%
2. Técnica de tinción de centros de osificación.
3. Diafanización siguiendo del esquema:
 - a. Solución de hidróxido de potasio de (KOH 2% o 3%). Esta solución se puede renovar varias veces según el espesor de la muestra.

- b. Solución de 75% de (KOH 2%)+25% glicerina de técnica.
- c. Solución de 50% de (KOH 2%)+50% glicerina de técnica.
- d. Solución de 25% de (KOH 2%)+75% glicerina de técnica.
- e. Solución de glicerina técnica. Si en esta etapa la muestra no se torna transparente, se pueden volver a los pasos C o D. Por lo general, se requiere cambiar varias veces la solución en glicerina pura hasta obtener una transparencia adecuada

5.1.1.2. Método de diafanización en peces (Mikolji, 2010)

1. Fijación con formol.
2. Deshidratación con alcohol etílico al 90% por 24h aproximadamente.
3. Coloración de cartílago con azul de alcian; se recomienda de horas hasta uno (1) o dos (2) días.
4. Transparentación preparando una mezcla de KOH, (no especifica la concentración) y peróxido de hidrogeno. El tiempo varia de una (1h) a varias horas según resultados.
5. Digestión de la musculatura con tripsina en una base de tretraborato.
6. Coloración de tejido óseo con rojo de alizarina recomienda aproximadamente por 24h.

5.2. Reactivos a implementar en la investigación.

La información suministrada en esta investigación, en relación a reactivos químicos que se utilizaron, fue tomada del *Chemical Abstracts Service (CAS)*, una división de American Chemical Society (ACS), que proporciona la mayor base de datos de evidencia revelada, ordenada (numero CAS) públicamente sobre reactivos químicos, con el objeto de que garantice la seguridad de la salud humana y el medio ambiente. Así, se genera por elaboración propia un cuadro de seguridad de cada uno de los reactivos utilizados y se hace una definición breve, concisa de los reactivos utilizados:

5.2.1 Hidróxido de potasio.

El hidróxido de potasio (KOH) es un sólido a temperatura ambiente y se fabrica a partir de cloruro de potasio por procesos electroquímicos. El hidróxido de potasio puro es una sustancia fuertemente alcalina (pH alto) que se disocia completamente en el agua en el ion potasio (K^+) e iones de hidróxido (OH^-). La disolución en agua genera calor, por lo que puede ocurrir una vigorosa reacción cuando al hidróxido de potasio se añade al agua y por lo tanto, es sumamente corrosivo, por lo dicho anteriormente este reactivo se empleara para tal fin en los tejidos durante la elaboración de las piezas anatómicas del presente proyecto de investigación. (Euro Chlor, 2014).

5.2.2 Glicerina.

El glicerol o glicerina, también conocido como glicerina o 1, 2,3 propanotriol, es un compuesto alcohólico con tres grupos $-OH$ (hidroxilos). La palabra glicerol, procede del griego Glykos, que significa dulce. Posee un aspecto de líquido viscoso, no tiene color, pero sí un característico olor, además de un sabor dulce. Además el glicerol es un compuesto higroscópico, lo que quiere decir que tiene la capacidad de ceder o absorber la humedad presente en el medio ambiente que lo rodea. Además es fácilmente soluble en agua, y se descompone en ebullición, en la cual entra a una temperatura de $290^\circ C$. Es un compuesto líquido si se encuentra a temperatura ambiente (La Guía, 2010). Dentro de la industria farmacéutica, la glicerina USP tiene un papel importante en la producción de los siguientes medicamentos: anestésicos, pastillas, grageas, cápsulas, supositorios, productos para combatir la infección de oído, jarabes (como excipiente), disolvente (para iodo, timol, bromo, cloruro de mercurio, alcaloides, entre otros), antisépticos, inhibidores de cambios enzimáticos en procesos de fermentación de cremas, ungüentos y pastas (QuimiNet, 2011).

5.2.3 Acetona

La acetona o propanona es un compuesto químico de fórmula química $CH_3(CO)CH_3$ del grupo de las cetonas que se encuentra naturalmente en el medio ambiente a temperatura ambiente, se presenta como un líquido incoloro de olor característico. Se evapora

fácilmente, es altamente inflamable y es soluble en agua. Es utilizada como disolvente general más empleada en técnicas industriales debido a sus excelentes propiedades disolventes de grasas, aceites, ceras, hules, plásticos, lacas y barnices. Se usa en la manufactura de algunos explosivos, rayón, películas fotográficas, elaboración de removedores de pinturas y barnices, purificación de parafinas, en la deshidratación y endurecimiento de tejidos, en la extracción de algunos productos vegetales y animales y como materia prima en una gran variedad de síntesis en química orgánica (IPCS INCHEM, 1999).

Tabla 1. Datos de seguridad de reactivos.

Reactivo(CAS N°)	Peligro	Recomendaciones de manipulación	Clasificación de riesgo	Almacenamiento
Hidróxido de potasio (CAS N°: 1310-58-3)	Corrosivo e irritante	Guantes de protección, mascarilla, protección ocular y concentraciones superiores a 2% es corrosivo.	Sustancia peligrosa	Recipiente cerrado no expuesto al ambiente y temperatura ambiente.
Rojo de alizarina (CAS N°:58005)	Irritante cutáneo, ocular y respiratorio.	No ingerir o inhalar el polvo, uso guantes de protección, mascarilla y protector ocular.	Sustancia no peligrosa	Recipiente cerrado no expuesto al ambiente y temperatura ambiente.
Azul de alcian (CAS N°: 33864-99-2)	Sustancia no peligrosa	No se precisan medidas especiales, en caso de inhalación suministrar aire fresco y en caso de contacto con la piel aclarar con abundante	Sustancia no peligrosa	

		agua.		
Glicerol (CAS N°:56-81-5)	Se descompone al arder e irritante cutáneo, ocular y respiratorio.	No ingerir o inhalar.	Sustancia no peligrosa	En recipiente cerrado a temperatura menor a 60°C.

Fuente: Elaboración propia, Septiembre de 2014

6. BIOQUIMICA DE COLORANTES EN TEJIDO OSEO Y CARTILAGO A IMPLEMENTAR EN TÉCNICA DE DIAFANIZACIÓN.

6.1 Rojo de alizarina.

La Alizarina o 1,2-dihidroxiantraquinona, es uno de los diez isómeros dihidroxiantraquinona. Su estructura molecular puede ser vista como derivado de antraquinona por sustitución de dos átomos de hidrógeno por grupos hidroxilos vecinos, cuya fórmula es $C_{14}H_8O_4$ generado de la planta de rubia. Es soluble en hexano y cloroformo, y se puede obtener a partir de este último en forma de cristales de color rojo púrpura. La alizarina cambia de color en función del pH de la solución que se encuentra, por lo que es un indicador de pH.

El rojo de alizarina 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. En la práctica clínica, se utiliza para teñir líquido sinovial, y evaluar la presencia de cristales de fosfato de calcio. En otras disciplinas como la geología, se utiliza como marcador para indicar los minerales de carbonato de calcio, calcita y aragonita. En este proyecto de investigación se utilizara como un marcador de fase inicial hacia la mineralización de la matriz ósea calcificada en proceso de formación de centros de osificación y tinción de matriz ósea mineralizada en el hueso ya formado o maduro. (E-centro, 2013)

6.2 Azul de alcian.

Los Azules alcian, son una familia de colorantes básicos polivalentes, de los cuales, el azul de alcian 8G ha sido históricamente el más común y el miembro más fiable. Es un colorante básico tetravalente con un núcleo de ftalocianina de cobre, con tres o cuatro cadenas laterales de isotiouronio independientes, que imparten su volumen y cargas positivas. Se utilizara en este proyecto de investigación para teñir polisacáridos ácidos, tales como glucosaminoglicanos en los cartílagos y otras estructuras del cuerpo, algunos tipos de mucopolisacáridos, glicocáliz sialilado de células etc. Las partes de tejido que se tiñen

específicamente por este medio de contraste se vuelven azules o azul-verde después de la tinción y se llaman "Alcianophilic" (E-centro, 2013)

6.3. Embriología del tejido óseo.

Inicialmente para hablar de sistema esquelético se debe partir de que este se desarrolla de células mesenquimáticas que son de origen del mesodermo y de la cresta neural que son de origen del ectodermo (Moore, Persaud, & Torchía, 2013). Hacia el decimoséptimo día las células cercanas a la línea media proliferan y forman una placa gruesa de tejido conocida como mesodermo paraxial. Más hacia los lados, la capa mesodérmica continúa siendo delgada y se conoce como placa lateral. Con la aparición y la coalescencia de cavidades intercelulares en la placa lateral, este tejido se divide en dos capas: una (1) capa que se continúa con el mesodermo que recubre el amnios, llamada capa mesodérmica somática o parietal. Y una segunda capa que se continúa con el mesodermo que recubre el saco vitelino, llamada capa mesodérmica esplácnica o visceral. Juntas, estas capas delimitan una nueva cavidad acabada de formar, la cavidad intraembrionaria, que se continúa con la cavidad extraembrionaria de cada lado del embrión. El mesodermo intermedio conecta el mesodermo de la placa paraxial con el mesodermo de la placa lateral (Sadler & Langman, 2011).

6.3.1. Desarrollo del mesodermo lateral.

El mesodermo lateral es separado longitudinalmente en dos sectores por el desarrollo de un espacio embrionario llamado celoma intraembrionario. Así, el sector dorsal es llamado ahora hoja parietal o somática del mesodermo lateral y se ubica bajo el ectodermo, formando la pared corporal del embrión; en cambio el sector ventral es llamado hoja visceral o esplácnica del mesodermo lateral y se ubica sobre el endodermo. La hoja parietal dará origen a las serosas: pleura, pericardio y peritoneo; y la hoja visceral formará la pared muscular del tubo digestivo y de la vía respiratoria baja. (Sadler & Langman, 2011)

6.3.2. Órganos derivados del mesodermo paraxial (sistema esquelético)

En este párrafo se describe el desarrollo del sistema esquelético que se origina de las células mesenquimatosas del mesodermo paraxial (esqueleto axial) principalmente aclarando que el esqueleto apendicular se origina del mesodermo de la placa lateral. A medida que se forman la notocorda y el tubo neural, el mesodermo intraembrionario lateral a estas estructuras sufre un engrosamiento y forma dos columnas longitudinales de mesodermo paraxial. Hacia finales de la tercera semana, estas columnas muestran segmentación en bloques de mesodermo denominadas los somitas. La formación de los somitas a partir del mesodermo paraxial implica la expresión de genes de la vía Notch (vía de señalización Notch), genes Hox y otros factores señalizadores. Estos somitas, que corresponden a engrosamientos del mesodermo paraxial, presentan una secuencia de aparición precisa, de manera que es posible determinar la edad del embrión conociendo el número de somitas (Moore, Persaud, & Torchía, 2013). Los primeros pares de somitas aparecen el día 20 en la región cervical del embrión y continúan apareciendo de a tres a cuatro pares por día hasta alcanzar un número de 42 a 44 pares. Los pares de somitas se denominan según su ubicación: 4 occipitales (de los cuales el primer par involucrena), 8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y 8 a 10 coxígeos (de los cuales involucrenan los más caudales). Cada somita hacia el comienzo de la cuarta semana se diferencia en dos porciones:

La parte dorso-lateral es el dermatotoma; las células de la región del miotomo forman mioblastos (células musculares primitivas dorsales) y las de la región del dermatomo constituyen la dermis.

La parte ventro-medial, es el esclerotoma, cuyas células toman un polimorfismo y forma un tejido laxo llamado mesenquima que es un tejido embrionario que migra y se puede convertir en fibroblastos, condroblastos u osteoblastos que originan las vértebras, costillas y tejido conectivo (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

Todo el tejido esquelético se origina en células de morfología mesenquimatosas como moldes cartilagosos de los huesos que después se forman, pero el origen del mesénquima varía en las diferentes regiones del cuerpo. En el tronco el mesénquima a partir del cual se desarrolla el esqueleto axial segmentario (es decir, la columna vertebral, las costillas y el esternón), se origina de la porción esclerotómica (ventromedial) de los somitas

mesodérmicos, en tanto, que el esqueleto apendicular (los huesos de las extremidades con sus respectivas cinturas) se deriva de la mesénquima del mesodermo de la placa lateral (somatopleura).

6.3.3. Histogenia del cartílago.

El cartílago se desarrolla a partir del mesénquima en áreas destinadas a condricificación y aparece por primera vez en el embrión a lo largo de la quinta semana. Las células mesenquimatosas proliferan y se redondean. Las células formadoras de cartílago o condroblastos secretan fibrillas de colágeno y la sustancia fundamental de la matriz. Después se depositan fibras de colágeno o elásticas en la sustancia intercelular o matriz. Se pueden distinguir tres tipos de cartílago en función del tipo de matriz formada (Moore, Persaud, & Torchía, 2013):

- Cartílago hialino: el tipo de distribución más amplia en articulaciones (cartílagos costales).
- Fibrocartílago: como en los discos intervertebrales.
- Cartílago elástico: (por ejemplo en el pabellón auditivo)

6.3.4 Histogenia del hueso.

Los huesos aparecen como condensaciones de células mesenquimales que constituyen modelos óseos. La condensación delimita el inicio de la actividad génica selectiva que precede a la diferenciación celular. Los miembros de la familia del factor de crecimiento transformante BETA (TGF-B) están implicados en varias etapas de la formación del hueso. La mayoría de los huesos planos se desarrollan en el mesénquima en el interior de vainas membranosas pre-existentes; este tipo de osteogenia se denomina formación ósea intramembranosa. Los modelos mesenquimales de la mayor parte de los huesos de las extremidades se transforman en modelos óseos de cartílago, que posteriormente sufren osificación de tipo endocondral. Las proteínas morfogenéticas de hueso (BMP5 y BMP7), el factor de crecimiento Gdf5, miembros de la superfamilia de TGF-B y otras moléculas de transmisión de señales participan como reguladores endógenos del desarrollo esquelético (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

6.3.5 Osificación intramembranosa.

Este tipo de formación ósea se produce en el mesénquima que ha originado una vaina membranosa, de donde procede el término osificación membranosa. El mesénquima se condensa y aumenta su vascularización; algunas células se diferencian en osteoblastos (células formadoras de hueso) y comienzan a depositar matriz o sustancias intercelulares, el tejido osteoide o pre-hueso. Los osteoblastos están casi totalmente separados entre sí y se mantienen en contacto por medio de unas pequeñas prolongaciones. A continuación, se deposita fosfato cálcico en el tejido osteoide conforme éste se organiza en hueso. Los osteoblastos del hueso quedan atrapados en la matriz y se convierten en osteocitos. En un principio, el hueso nuevo carece de un patrón de organización, pero pronto se organizan las espículas de hueso en láminas o capas. Alrededor de los vasos sanguíneos aparecen láminas concéntricas que constituyen sistemas haversianos. Algunos osteoblastos permanecen en la periferia del hueso en desarrollo y continúan depositando capas para dar lugar a placas de hueso compacto. Este ambiente esponjoso se acentúa, en cierta medida, por la acción de unas células de distinto origen, los osteoclastos, que reabsorben hueso. En los espacios intersticiales del hueso esponjoso el mesénquima se diferencia en la médula ósea. Durante la vida fetal y posnatal tiene lugar una remodelación continua de hueso debido a la actividad simultánea de osteoclastos y osteoblastos. Los estudios sobre los sucesos celulares y moleculares que acontecen a lo largo de la formación ósea embrionaria sugieren que la osteogenia y la condrogenia se programan en las fases iniciales del desarrollo y representan procesos independientes influidos por factores vasculares (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

6.3.6 Osificación intracartilaginosa o endocondral.

Este tipo de formación ósea ocurre sobre modelos cartilagosos pre-existentes. Por ejemplo, en un hueso largo, el centro primario de osificación aparece en la diáfisis, que forma el cuerpo del hueso, donde las células del cartílago aumentan de tamaño (hipertrofia), la matriz se calcifica y las células mueren. Al mismo tiempo se deposita una delgada capa de hueso bajo el pericondrio que rodea a la diáfisis; de este modo, el pericondrio se transforma en el periostio. La invasión de tejido conjuntivo vascular del

periostio degrada el cartílago. Algunas células invasoras se diferencian en las células hematopoyéticas responsables de la formación de células sanguíneas de la médula ósea. Otras células invasoras se convierten en osteoblastos que depositan matriz ósea en las espículas del cartílago calcificado. El proceso continúa hacia las epífisis o extremos del hueso. Las espículas óseas se remodelan por acción de los osteoclastos y los osteoblastos.

El alargamiento de los huesos largos se produce en la unión diafiso-epifisaria. El alargamiento óseo depende de las placas epifisarias de cartílago (placas de crecimiento), cuyos condrocitos proliferan y participan en la formación de hueso endocondral. Las células cartilaginosas de la región diafisoepifisaria proliferan mediante mitosis. Hacia la diáfisis, las células cartilaginosas se hipertrofian y la matriz se calcifica y se rompe en espículas por un tejido vascular originado en la médula o cavidad medular. En esas espículas se deposita hueso, cuya reabsorción mantiene relativamente constante la longitud de las masas óseas esponjosas y hace crecer la cavidad medular.

La osificación de los huesos de las extremidades se inicia hacia el final del período embrionario y posteriormente supone una importante demanda de calcio y fósforo para la madre. Por ello, se recomienda a las embarazadas que mantengan una ingesta adecuada de estos elementos con el fin de mantener sanos sus huesos y dientes. La región de formación ósea en el centro del cuerpo de un hueso largo es el centro de osificación primario.

Al nacer, los cuerpos o diáfisis se encuentran osificados en gran medida, pero la mayoría de los extremos o epífisis son aún cartilaginosos. Casi todos los centros de osificación secundarios aparecen en las epífisis a lo largo de los primeros años posteriores al nacimiento. Las células cartilaginosas de la epífisis se hipertrofian y posteriormente quedan invadidas por un tejido conjuntivo vascular. La osificación se extiende en todas las direcciones y solamente el cartílago articular y una placa transversal de cartílago, la placa epifisaria de cartílago, mantienen su naturaleza cartilaginosa. Tras finalizar el crecimiento, esta placa es sustituida por hueso esponjoso; las epífisis y la diáfisis se fusionan y no se produce ninguna elongación posterior del hueso.

En la mayoría de los huesos, las epífisis se han fusionado con la diáfisis alrededor de los 20 años de edad, esta fusión de centros de osificación ya identificados ha permitido generar este indicador que presenta una variación un poco mayor entre las edades biológica y cronológica que la erupción dental pero es una medida bastante certera de la edad.

Conociendo la edad precisa en que se fusiona cada epífisis con su diáfisis y observando el grado en que lo haya hecho, podemos determinar la edad del individuo como se puede observar en la tabla 2. El crecimiento del diámetro de un hueso es consecuencia del depósito de hueso en el periostio, así como de la reabsorción en la superficie medular. La velocidad de depósito y reabsorción están equilibradas con el fin de regular el grosor del hueso compacto y el tamaño de la cavidad medular. La reorganización interna del hueso continúa toda la vida. El desarrollo de los huesos irregulares es semejante al de las epífisis de los huesos largos. La osificación comienza de forma central y se extiende en todas las direcciones. Además de la osificación membranosa y endocondral, el tejido condroide también se diferencia a partir del mesénquima y actualmente se acepta que constituye un factor importante de crecimiento esquelético (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

Tabla 2. Principales centros de osificación y edad en la que se fusionan.

EDAD	MUJERES	HOMBRES
Al nacer	Extremo inferior del fémur	
Entre 1 y 2 años	Falanges proximales de los cuatro últimos dedos de la mano	
2 años	Cuatro últimos metacarpianos, primer metatarsiano, falanges proximales de los dedos del pie, falange distal del primer dedo del pie.	
3	Rotula, peroné, segundo y tercer metatarsianos; falange medial del segundo, tercer y cuarto dedos del pie.	Falange proximal del pulgar. Falanges medias del tercero y cuarto dedos de la mano, hueso navicular del tarso, segundo cuneiforme y cuarto metatarsiano.
4	Cabeza del radio y fusión de la tuberosidad mayor de la cabeza del humero	Semilunar, navicular y trocánter mayor.
5 años	Epífisis distal del cubito, semilunar.	Cabeza del radio, proximal del peroné y fusión del tubérculo mayor de la cabeza del humero.
6 años	Epicóndilo medial y distal del cubito	
7 años	Falange distal de meñique, fusión del isquion y el pubis.	
8 años	Olecranon	Apófisis del calcáneo
9 años	Tróclea y piciforme	Fusión de las ramas del isquion y pubis
10 años		Tróclea y olecranon

11 años	Epicóndilo lateral	Piciforme
12 años		Epicóndilo lateral
13 años	Fusión del ileon, isquion y pubis	Fusión de la tróclea con el epicóndilo lateral.
14 años	Acromion. Cresta iliaca y trocánter menor, fusión del olecranon, epífisis superior del radio, cabeza del fémur, cabeza del fémur, distal de la tibia y peroné	
16 años		Fusión de la epífisis inferior del humero, epicóndilo medial, olecranon y cabeza del radio.
17 años	Fusión de la cabeza del fémur, trocánter mayor de la tibia y distal del peroné.	Fusión del acromion, epífisis superior del humero, distal del cubito, proximal del peroné y distal del fémur.
18 años	Fusión de la epífisis distal del radio	Fusión de la epífisis proximal de la tibia.
19 años		Fusión de la epífisis proximal del humero, distal del radio y el fémur, proximal del peroné.
20 años	Fusión de la cresta iliaca	
21 años	Clavícula, fusión de la tuberosidad isquiática	Fusión de la tuberosidad isquiática

Fuente: (Eternod Rodriguez, Osteologia infantil, 2010)

6.3.7 Desarrollo del esqueleto axial.

El esqueleto axial se compone de: cráneo, columna vertebral, costillas, esternón. En el proceso de formación de esta parte del esqueleto, las células de los esclerotomos de los somitas modifican su posición. A lo largo de la cuarta semana, rodean al tubo neural y a la notocorda, la estructura alrededor de la cual se desarrollan los rudimentos de las vértebras. Este cambio de posición de dichas células se lleva a cabo por un crecimiento diferencial de las estructuras circundantes y no por migración activa de dichas células. El gen Pax-1, que se expresa en todas las futuras células esclerotomales de los somitas epiteliales en embriones de pollo y de ratón, parece desempeñar una función esencial en el desarrollo de la columna vertebral (Moore, Persaud, & Torchía, 2013, pág. 348).

6.3.8 Desarrollo del cráneo

El cráneo se forma a partir del mesénquima situado alrededor del cerebro en desarrollo y está constituido el cráneo por: el neurocráneo, los huesos del cráneo que rodean el encéfalo (la cavidad craneana) y el viscerocráneo los huesos del esqueleto facial que proceden de los arcos faríngeos, por lo tanto se describirá el desarrollo del neurocráneo y el viscerocráneo a continuación de manera independiente.

6.3.8.1 Neurocráneo cartilaginoso.

En un principio, el neurocráneo cartilaginoso o condrocráneo está compuesto por la base cartilaginosa del cráneo en desarrollo, que se forma por fusión de varios cartílagos. Posteriormente, la osificación endocondral del condrocráneo origina los huesos de la base del cráneo, El patrón de osificación de esos huesos sigue una secuencia definida: comienza en el hueso occipital, cuerpo del esfenoides y hueso etmoides. El cartílago paracordal, o placa basal, se forma alrededor del extremo craneal de la notocorda y se fusiona con los cartílagos derivados de las regiones del esclerotomo de los somitas occipitales. Esta masa cartilaginosa participa en la formación de la base del hueso occipital; después crecen extensiones alrededor del extremo craneal de la columna vertebral y constituyen los límites del agujero occipital. El cartílago hipofisiario se forma alrededor de la hipófisis en desarrollo y se fusiona para dar lugar al cuerpo del hueso esfenoides. Las trabéculas craneales (*trabeculae cranii*) se unen y originan el cuerpo del hueso etmoides mientras que el ala orbitaria (*ala orbitalis*), forma el ala menor del esfenoides. Las cápsulas óticas se desarrollan alrededor del ala menor de las vesículas óticas, primordios de los oídos internos, y se convierten en las porciones petrosa y mastoidea del hueso temporal. Las cápsulas nasales se desarrollan alrededor de los sacos nasales y participan en la formación del hueso etmoides (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

6.3.8.2 Neurocráneo membranoso.

La osificación intramembranosa ocurre en el mesénquima de la cabeza en las zonas laterales y parte superior del encefalo, formando la bóveda craneal. Durante la vida fetal, los huesos planos de la bóveda se encuentran separados por membranas de tejido

conjuntivo denso que forman unas articulaciones fibrosas, las suturas. Existen seis grandes áreas fibrosas en las zonas donde se unen varias suturas. La blandura de los huesos y sus conexiones laxas en las suturas permiten a la bóveda craneal sufrir cambios de forma durante el nacimiento, denominados amoldamiento. En el amoldamiento del cráneo fetal (adaptación de la cabeza fetal a la cavidad pélvica durante el nacimiento), los huesos frontales se aplanan, el occipital protruye y un parietal se superpone por encima del otro. Unos pocos días después de nacer, la forma de la bóveda craneal se normaliza (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

6.3.8.3 Desarrollo de la cabeza ósea a partir de arcos faríngeos.

El cráneo fetal como por ejemplo la porción escamosa del hueso temporal, el cigomático y maxilar, hueso cigomático o malar derivan de la prolongación maxilar del primer arco faríngeo asociado el mesenquima de la prominencia mandibular del primer arco se condensa alrededor de su cartílago y experimenta osificación intramembranosa y forma la mandíbula. El extremo dorsal del cartílago del primer arco forma dos huesos del oído medio: el martillo y el yunque. El extremo dorsal del cartílago del segundo arco da lugar al estribo del oído medio y a la apófisis estiloides del hueso temporal. Su extremo ventral se osifica para formar el asta menor y la parte superior del cuerpo del hueso hioides.

Los cartílagos del tercero, cuarto y sexto arcos se forman únicamente en las porciones ventrales de los arcos. Los cartílagos del tercer arco originan las astas mayores y parte inferior del cuerpo del hueso hioides. Los cartílagos de los arcos cuarto y sexto se fusionan para constituir los cartílagos laríngeos, con excepción de la epiglotis (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

6.3.8.4 Desarrollo de la cara.

La cara se forma con la participación de la prominencia frontonasal, las prominencias nasal medial y nasal lateral, las prominencias maxilar y mandibular derivados del primer arco faríngeo. Estos elementos se desarrollan dando origen a las siguientes regiones de la cara: región frontal, que se forma a partir de la porción cefálica de la prominencia frontonasal. La región nasal, que se forma por la unión de las prominencias nasal medial y nasal lateral; de modo que el dorso de la nariz, el tabique y el pilar medial de la nariz provienen de la

prominencia nasal medial mientras que las partes laterales de la nariz surgen de la prominencias nasal lateral y la región geniana o de la mejilla, que se forma por la unión en las prominencias maxilar y mandibular; en la línea de contacto entre las prominencias maxilar y nasal lateral se forma el surco lacrimonasal y constituye el conducto nasolacrimal. (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

6.3.8.5 Cráneo del recién nacido.

Cuando se ha recuperado del proceso de amoldamiento que es una forma anormal de la cabeza del bebé que resulta de la presión ejercida sobre ésta durante el parto (MedlinePlus, 2014), el cráneo del recién nacido es redondeado y sus huesos son delgados. Al igual que el cráneo fetal, su tamaño es grande en proporción con el resto del esqueleto y la cara es relativamente pequeña en comparación con la bóveda craneal. El pequeño tamaño facial se debe a: el reducido tamaño de las mandíbulas, la ausencia prácticamente total de senos paranasales (aire) y el infradesarrollo de los huesos faciales al nacer (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

6.3.8.6 Crecimiento postnatal del cráneo.

Las suturas fibrosas de la bóveda craneal del recién nacido permiten el aumento de tamaño del encéfalo durante la lactancia y la niñez. Este aumento del tamaño de la bóveda craneal es mayor durante los dos primeros años de vida, el período de crecimiento posnatal más rápido del encéfalo. La bóveda craneal suele incrementar su capacidad hasta alrededor de los 16 años de edad. Después sólo suele aumentar ligeramente de tamaño durante tres o cuatro años por el engrosamiento de sus huesos. Asimismo, se produce un rápido crecimiento de la cara y los maxilares que coinciden con el brote de los dientes primarios (deciduos). Estos cambios faciales son más notables después de la aparición de la dentición secundaria (permanente).

Existe un crecimiento simultáneo de las regiones frontales y faciales asociadas al aumento de tamaño de los senos paranasales. La mayoría de estos senos son rudimentarios o no están presentes al nacer. Su crecimiento es importante, ya que altera la forma de la cara y añade resonancia a la voz (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

6.3.9 Desarrollo de la columna vertebral.

Durante la fase pre-cartilaginosa o mesenquimal, las células mesenquimales de los esclerotomos se localizan en tres regiones principales: alrededor de la notocorda, rodeando al tubo neural y en la pared corporal. En un corte frontal de un embrión de cuatro semanas, los esclerotomos aparecen como pares de condensaciones de células mesenquimales alrededor de la notocorda. Cada esclerotomo está formado por células que se disponen laxamente en la región craneal y densamente empaquetadas en la región caudal. Algunas de estas últimas se mueven en sentido craneal opuesto al centro del miotomo, donde forman el disco intervertebral (IV). El resto de ellas se fusionan con las células de disposición laxa del esclerotomo inmediatamente caudal y dan lugar al centro (centrum) mesenquimal, el primordio de cuerpo de la vértebra. Por tanto, cada centrum se forma a partir de dos esclerotomos adyacentes y se convierte en una estructura intersegmentaria. En este momento, la relación entre los nervios y los discos IV es estrecha, y las arterias intersegmentarias se hallan a cada lado de los cuerpos vertebrales. En el tórax, las arterias intersegmentarias dorsales se convierten en las arterias intercostales.

La notocorda degenera y desaparece donde está rodeada por los cuerpos vertebrales en desarrollo. Entre las vértebras, la notocorda se expande y forma el centro gelatinoso del disco intervertebral o el núcleo pulposo. Posteriormente, este núcleo se rodea de fibras en disposición circular que originan el anillo fibroso. En conjunto, el núcleo pulposo y el anillo fibroso forman el disco IV. Las células mesenquimales que rodean al tubo neural dan lugar al arco vertebral (neural), mientras que las de la pared corporal constituyen los procesos costales que forman las costillas de la región torácica (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

6.3.9.1 Etapa cartilaginosa del desarrollo vertebral.

A lo largo de la sexta semana aparecen centros de condricación en cada vértebra mesenquimal. A finales del período embrionario, los dos centros de cada centrum se fusionan y forman un centrum cartilaginoso. Al mismo tiempo, los centros de los arcos vertebrales se unen entre sí y con el centrum. Se desarrollan las apófisis espinosas y transversales a partir de extensiones de los centros de condricación en el arco vertebral.

La condricificación se extiende hasta que se forma una columna vertebral cartilaginosa (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

6.3.9.2 Etapa ósea del desarrollo vertebral.

La osificación de una vértebra típica se inicia durante el período embrionario y suele finalizar a los 25 años de edad. Existen dos centros de osificación primarios, ventral y dorsal para el centrum. Estos centros de osificación primarios se fusionan en poco tiempo y forman un centro. A finales del período embrionario existen tres centros primarios: uno (1) en el centrum, uno en cada mitad del arco vertebral. La osificación se hace evidente en los arcos vertebrales durante la octava semana. Al nacer, cada vértebra está formada por tres porciones óseas conectadas por cartílago. Por lo general, las mitades óseas del arco vertebral se suelen fusionar durante los primeros tres a cinco años. En primer lugar, los arcos se unen en la región lumbar y el proceso de fusión avanza en sentido craneal. El arco vertebral se articula con el centrum en las articulaciones neurocentrales cartilaginosas. Estas articulaciones permiten el crecimiento de los arcos vertebrales a medida que se alarga la médula espinal y desaparecen cuando el arco vertebral se fusiona al centrum durante el tercer a sexto años de vida. Tras la pubertad aparecen seis centros de osificación secundarios en las vértebras: uno (1) en la punta de la apófisis espinosa, uno (1) en la punta de cada apófisis transversa y dos (2) epífisis anulares, una en el reborde superior y otra en el inferior del cuerpo vertebral.

El cuerpo vertebral está compuesto por las epífisis anulares y una masa ósea situada entre ellas. El cuerpo vertebral incluye el centrum, partes del arco vertebral y las carillas articulares para las cabezas de las costillas. Todos los centros secundarios se unen al resto de la vértebra alrededor de los 25 años de edad. El atlas (C1), axis (C2), vértebra lumbar C7, sacro y coxis constituyen excepciones al modelo de osificación típica de las vértebras (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

6.3.10 Desarrollo de las costillas.

Las costillas se desarrollan a partir de los procesos costales de las vértebras torácicas. Se tornan cartilaginosas durante el período embrionario y se osifican a lo largo del fetal. El

lugar original de unión de los procesos costales con las vértebras es sustituido por articulaciones costovertebrales, articulaciones planas de tipo sinovial (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

.3.11 Desarrollo del esternón

Un par de bandas mesenquimales verticales, las barras esternales, aparecen en posición ventrolateral en la pared corporal. A medida que se desplazan en sentido medial, se produce la condricificación de las mismas. Se fusionan en sentido craneocaudal en el plano medio para formar modelos cartilagosos del manubrio, esternovértebras (segmentos del cuerpo esternal) y apófisis xifoides. A veces, la fusión en el extremo inferior del esternón es incompleta; como consecuencia de ello, la apófisis xifoides de estos niños es bífida o perforada. Antes del nacimiento aparecen centros de osificación craneocaudalmente en el esternón, excepto en la apófisis xifoides, donde aparecen durante la infancia (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

6.3.12 Desarrollo del esqueleto apendicular.

El esqueleto apendicular está compuesto por las cinturas pectoral y pélvica y los huesos de las extremidades. Los huesos mesenquimales se forman a lo largo de la quinta semana como condensaciones de mesénquima que aparecen en las yemas de las extremidades. A lo largo de la sexta semana del desarrollo, los moldes óseos mesenquimales de las extremidades se condricifican y forman modelos óseos de cartílago hialino. La clavícula se desarrolla inicialmente por osificación intramembranosa y posteriormente da lugar a cartílagos de crecimiento en ambos extremos. Los modelos de la cintura pectoral y de los huesos de las extremidades superiores aparecen ligeramente antes de los de la cintura pélvica y las extremidades inferiores; los modelos óseos se desarrollan siguiendo una secuencia próximo-distal. El patrón de las extremidades en desarrollo está regulado por genes homeocaja (Hox).

La osificación comienza en los huesos largos durante la octava semana del desarrollo embrionario y, en un principio, ocurre en las diáfisis de los huesos de los centros de osificación primarios. Hacia la semana 12 han aparecido centros de osificación primarios

en casi todos los huesos de las extremidades. Las clavículas inician su osificación antes que el resto de los huesos del organismo. Los fémures son los siguientes huesos en mostrar indicios de osificación. La primera indicación de este proceso en el modelo cartilaginoso de un hueso largo se puede observar en la proximidad de la futura diáfisis, que constituye el centro de osificación primario. Los centros primarios aparecen en momentos distintos en diferentes huesos, pero la mayoría de ellos lo hace entre la semana séptima y duodécima del desarrollo. Casi todos los centros de osificación primarios están presentes al nacimiento. La parte de hueso que se osifica a partir de un centro primario es su diáfisis.

Los centros de osificación secundarios de los huesos de la rodilla se forman en primer lugar. Los centros del extremo distal del fémur y proximal de la tibia suelen aparecer durante el último mes de vida intrauterina (34 a 38 semanas después de la fecundación). Por consiguiente, suelen estar presentes al nacer; sin embargo, la mayor parte de los centros de osificación secundarios aparecen después del nacimiento. La parte del hueso osificada a partir de un centro secundario se denomina epífisis. El hueso formado a partir del centro primario de las diáfisis no se fusiona con el originado por los centros secundarios de las epífisis hasta que el hueso ha alcanzado su longitud adulta. Este retraso permite que continúe el alargamiento del hueso hasta adquirir su tamaño final. Durante el crecimiento óseo, una placa de cartílago conocida como placa (de cartílago) epifisaria se sitúa entre la diáfisis y la epífisis.

Esta placa epifisaria (placa de crecimiento) es sustituida finalmente por el desarrollo de hueso en cada uno de sus lados, diafisarios y epifisarios. Cuando esto ocurre, se interrumpe el crecimiento del hueso (Moore, Persaud, & Torchía, 2013).

7. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El presente proyecto investigativo, tendrá en cuenta las implicaciones éticas, con base en la premisa del respeto por el animal, la vida, el dolor y el sufrimiento, teniendo claro qué se quiere del animal. También, ser riguroso y respetuoso con la reglamentación que establece normas científicas, técnicas y administrativas para investigaciones en salud y experimentación con animales, (Ministerio de Salud de la República de Colombia., 2010) con el fin de respetar las disposiciones de la resolución número 8430 de 1993 en el título 5 “*Investigación biomédicas con animales*”, y las disposiciones determinadas en la ley 84 de 1989 “por la cual se adopta el Estatuto Nacional de Protección de los Animales, se crean contravenciones y se regula lo referente a su procedimiento y competencia”. De lo anterior, y en cumplimiento de las disposiciones, resoluciones y leyes establecidas en nuestro país, se obtendrán las ratas para la elaboración del material docente por el laboratorio de producción animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, el cual aplica la eutanasia al roedor(rata) utilizando cámara de CO2 (ver fotografía # 1 y 2), que es un gas seguro, no explosivo, inocuo para las vías respiratorias, fácil de generar, que no provoca dolor ni estrés y que produce un efecto anestésico con rápida pérdida de conciencia seguido de un efecto eutanásico en el animal (Persia, Vera, Mariani, & Penissi, 2010). Por tanto se utilizará en el presente proyecto de investigación un (1) cerdo, siete (7) roedores (ratas) y una (1) rata copulada que será sacrificada para obtener de 2 a 3 neonatos aproximadamente. Todo lo anterior y el presente proyecto de investigación fue evaluado y aprobado por el comité de ética de la facultad de medicina el día 26 de junio de 2014 mediante acta de evaluación No. 076 de 2014 (ver Anexo C)

Fotografía 1.



Fotografía 2.



Fuente: *Elaboración propia.*

Fuente: *Elaboración propia.*

8. DISEÑO METODOLÓGICO PARA LA ELABORACIÓN DE PIEZAS ANATOMICAS DIAFANIZADAS.

8.1. Tipo de estudio.

Estudio de tipo cuasi-experimental donde a partir de la revisión teórica de la técnica anatómica de preservación denominada diafanización, se aplicará esta para consolidar la teoría existente. Se emplearán reactivos a distintas concentraciones, volúmenes, tiempos de duración para obtener éxito en el resultado de la diafanización como técnica anatómica. Por tanto, es un tipo de investigación que comparte gran parte de las características de un experimento, pero las comparaciones en la respuesta de los distintos reactivos se realiza entre grupos ‘no equivalentes’, es decir, grupos que se pueden diferenciar en muchos otros aspectos además de la ‘exposición a reactivos’ tales como especie (ratón, cerdo), edad, incubación entre otras.

8.2. Especímenes utilizados.

Los especímenes del proyecto de investigación son ratones (*Mus Musculus*) de la colonia ICR 21, proporcionados por el laboratorio de producción animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia y un (1) cerdo (*Sus scrofa domestica*) sin cabeza como pieza anatómica de prueba preliminar.

8.3. Variables.

Se eligieron como variables características anatómicas susceptibles de ser observadas, analizadas y controladas, que se clasificaron de la siguiente manera:

8.3.1. Variable cualitativa nominal.

- **Color:** Cualidad del modelo anatómico, manifestada en cada fase del proceso de diafanización. Observable mediante control fotográfico de la muestra.
- **Diafanización de tejido:** transparentación de todo el tejido a excepción del sistema óseo maduro y en desarrollo, el cual se expone y se tiñe con rojo de alizarina.

- **Friabilidad de tejido:** cualidad manifestada en el tejido y expresada en no aplastarse, fraccionarse o romperse con facilidad.
- Centros de osificación: exponer centros de osificación en desarrollo teñido con rojo de alizarina.
- **Visualización ósea:** cualidad observable de tejido conectivo óseo marcado con rojo de alizarina.
- **Visualización de cartílago:** cualidad observable de tejido conectivo (cartílago hialino) marcado con azul de alcian.

9. INSTRUMENTOS.

Para la ejecución del trabajo de grado se requirió el laboratorio de histo-tecnología del departamento de morfología de la facultada de medicina y la utilización de equipos, materiales e insumos relacionados a continuación:

9.1 Equipos

- Cámara fotográfica marca Nikon coolpix L320 16 megapixeles zoom full Hd: Instrumento utilizado para evidenciar el color de la pieza anatómica durante el proceso de diafanización.
- Balanza-Gramare marca ESCALTEC: instrumento utilizado para la medida de peso exacto de reactivos y colorantes manejados.
- Formato de registro fotográfico: durante el proceso de las técnicas de diafanización se toma invidencia fotográfica de resultados positivos y negativos de las técnicas de manera cronológica (ver anexo B).
- Formato para registro del procedimiento de cada una de las fases: en cada fase de la técnica se diligenció un formato que identificó la técnica utilizada, el reactivo empleado, la cantidad de compuesto utilizado, el porcentaje de cada reactivo, la duración de cada fase, fecha de inicio y finalización del proceso. Durante el mismo se lleva informe cronológico escrito tipo diario durante cada semana hasta finalizar la técnica por parte del investigador (ver anexo A).

9.2 Materiales.

- Cuatro (4) frascos de vidrio mayores a 1 litro.
- Una (1) caja de guantes de látex.
- Batas desechables.
- Protectores de vía aérea.
- Gafas de seguridad industrial.
- Vaso precipitado x 1000cc.
- Probeta graduada x 1000cc.
- Papel higiénico
- Pipeta.

10. FASES PARA LA ELABORACIÓN DEL MATERIAL ANATÓMICO.

La implementación de las técnicas de diafanización se realizó con base en información obtenida de antecedentes de investigación nacional, latinoamericano, teoría existente en bases de datos, web y proyectos de exploración en Universidades locales que trabajaron en diafanización. Por consiguiente, se realizara la diafanización por maceración, técnicas de Dawson // Schultz, en relación a la revisión bibliográfica y recomendaciones. Para la elaboración de las piezas anatómicas y del protocolo se implementaron en total siete (7) fases.

En la primera (1) fase, encaminada a la implementación de la técnica de diafanización en el espécimen, se realizó una prueba preliminar para lograr diafanizar tejido, exposición y tinción de sistema óseo maduro con un cerdo eviscerado y sin cabeza, desconociendo la edad del cerdo y fijado en formol al 10% con concentración de KOH iniciales de 0,1% (recomendación de experto en diafanización Dra Zoila Emilia Castañeda Murcia).

La segunda (2) fase, implementación de una técnica en un ratón de 60 días de nacido, con concentraciones iniciales de KOH al 10% diluido en glicerina técnica (protocolo de Universidad de los Andes).

Como tercera (3) fase, se inicia diafanización en un ratón de 21 días de nacido con concentraciones iniciales de 2% según protocolo chileno.

La cuarta (4) fase, se inicia diafanización de un ratón de 13 días de nacido, con base en experiencias de fases anteriores y resultados positivos en diafanización.

La quinta (5) fase, se inicia diafanización en fetos ratones, con concentración inicial de solución de hidróxido de potasio a 0.05%.

La sexta (6) fase, implementación de la técnica de diafanización con 4 ratones de 13 días de nacidos, según hallazgos encontrados en las fases uno, dos, tres, cuatro y cinco.

La séptima (7) fase, con base en la implementación de técnicas de diafanización, se elabora y se construye protocolo de diafanización basado en la experiencia preliminar, resultados obtenidos y recomendaciones para la implementación de técnicas de diafanización.

11. RESULTADOS OBTENIDOS DE LAS TÉCNICAS DE DIAFANIZACIÓN DURANTE CADA FASE.

11.1. FASE UNO: “PRUEBA PRELIMINAR”

En la primera (1) fase, encaminada a la implementación de la técnica de diafanización en el espécimen, se realizó una prueba preliminar con un cerdo eviscerado y sin cabeza fijado en formol al 10% con concentración de hidróxido de potasio (KOH) iniciales de 0,1% (recomendación de experto en diafanización Dra Zoila Emilia Castañeda Murcia). Durante la primera fase preliminar no se utilizó KOH diluido y mezclado con glicerina en ningún momento, tan solo se realizaron cambios de solución de hidróxido de potasio y se inició con concentraciones muy bajas 0,1% y al finalizar se realizó coloración de centros de osificación con rojo de alizarina por 7 días. Durante el proceso de la diafanización de la primera fase se realizó y se especificó la concentración, pureza y tiempos de los reactivos, evidenciado en la tabla No 3 que se encuentra a continuación:

Tabla 3: Registro de reactivos fase uno.

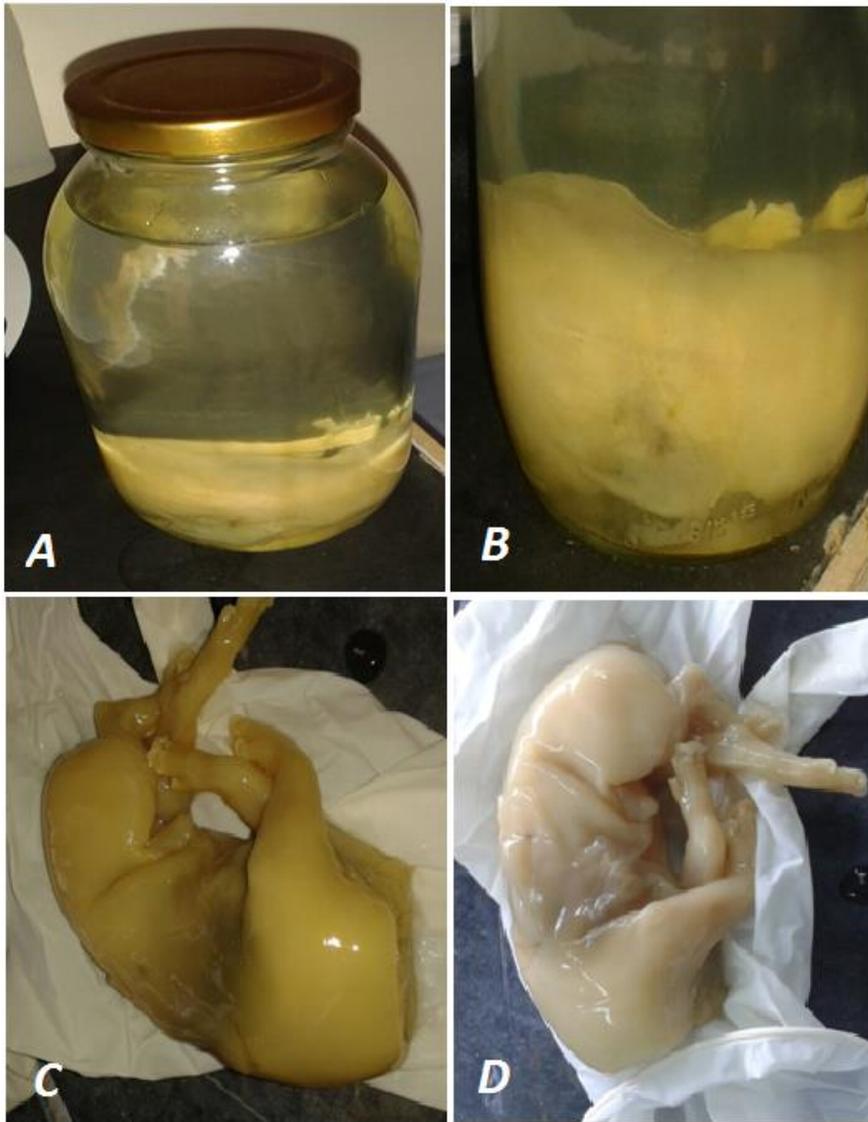
MUESTRA	SEMANA	REACTIVO EMPLEADO	CANTIDAD REACTIVO	% DEL REACTIVO	FECHA INICIO Y HORA	FECHA FINAL HORA
1	1	KOH	1gr	0,1%	06-05-14	13-05-14
					12h	14h
	2	KOH	1.5gr	0,15%	13-05-14	21-05-14
					14h	14h
	3	KOH	2,0GR	0,20%	21-05-14	29-05-14
					10h	10h
	4	KOH	2,0GR	0,20%	29-05-14	05-06-14
	5	KOH	2,5GR	0,25%	05-06-14	13-06-14
	6	KOH	2,5GR	0,25%	13-06-14	20-06-14
	7	KOH	3,5GR	0,35%	20-06-14	27-06-14
	8	KOH	3,5GR	0,35	27-06-14	04-07-14

	9	KOH	4 GR	0,40	04-07-14	10-07-14
	10	KOH	4 GR	0,40	10-07-14	22-07-14
	11	Glicerina	500cc	100%	22-07-14	30-07-14
	12	Glicerina	500cc	100%	30-07-14	04-08-14
	13	Glicerina	500cc	100	04-08-14	11-08-14
	14	KOH	2gr	0.2%	11-04-14	22-08-14
	15	Glicerina	500cc	100%	22-08-14	25-08-14
	16	Rojo de alizarina..	Rojo de alizarina0.6 gr+1000cc agua estéril.	100%	25-08-14	02-09-14
	17	Glicerina pura	700cc	100%	02-09-14	05-09-14
	18	Alcohol	1000cc	70%	05-09-14	08-09-14
	18	KOH	2gr	0.2%	08-09-14	22-09-14
	19	KOH	2gr	0.2%	08-09-14	22-09-14
	20	Glicerina pura	500cc	100%	22-09-14	01-09-14
	21	KOH	2gr	0.2%	01-09-14	15-09-14
	22	KOH	2gr	0.2%	15-09-14	24-09-14
	23	Glicerina	250	100%	24-09-14	26-09-14

Fuente: elaboración propia.

Del anterior cuadro y para dar una evidencia real del resultado obtenido se generó un control de registro semanal minucioso de acontecimientos relevantes captados fotográficamente en relación con variables definidas durante el diseño metodológico (color, diafanización de tejido, friabilidad de tejido, centros de osificación, visualización ósea y cartilaginosa) como se evidencia desde las fotografías 3 al 10:

Fotografía 3. Inmersión en KOH y fijación con alcohol 70%



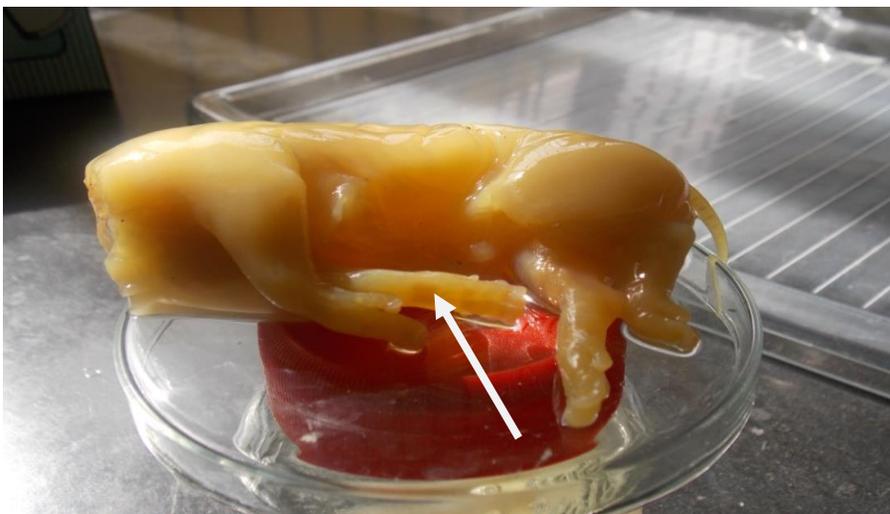
Fuente: *Elaboración propia*. Semana 1,2 y 3. A) solución de hidróxido de potasio 0,1%. B) Pérdida de integridad cutánea en dorso. C) Cambio de solución de hidróxido de potasio. D. Pos inmersión de 5 minutos de alcohol al 70% para mejorar fijación.

Fotografía 4. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,2%



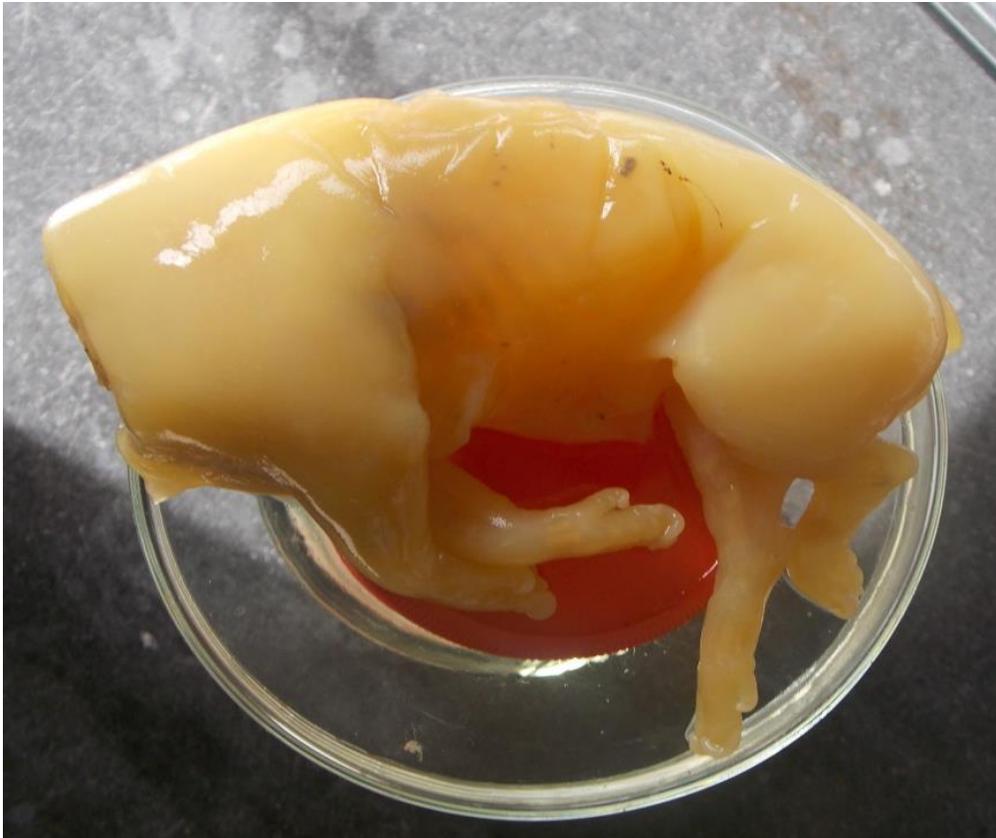
Fuente: *Elaboración propia*. Semana 4. Se visualiza diafanización de tejido en las patas del espécimen.

Fotografía 5. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,25%



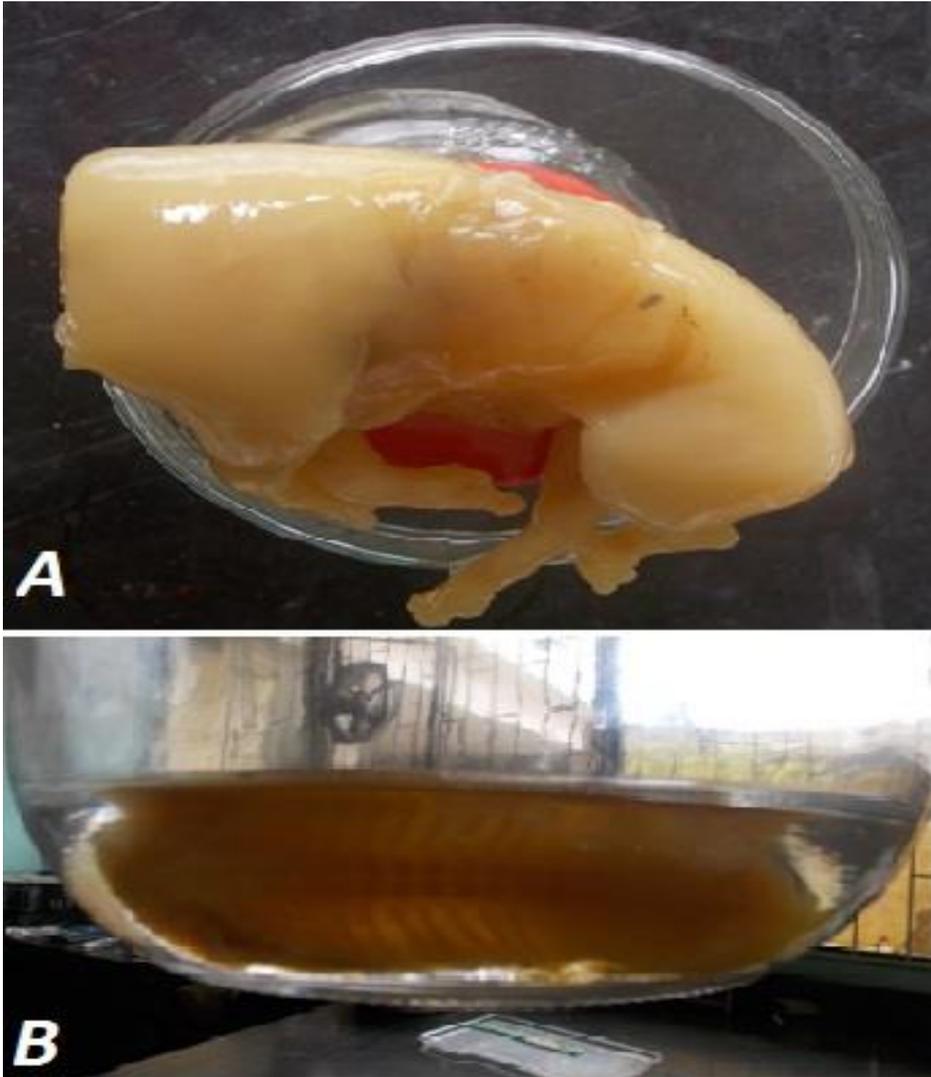
Fuente: *Elaboración propia*. Semana 6 y 7. Se mejora visualización de diafanización de tejido en las patas del espécimen y se insinúa tórax.

Fotografía 6. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,35% y 0,45%



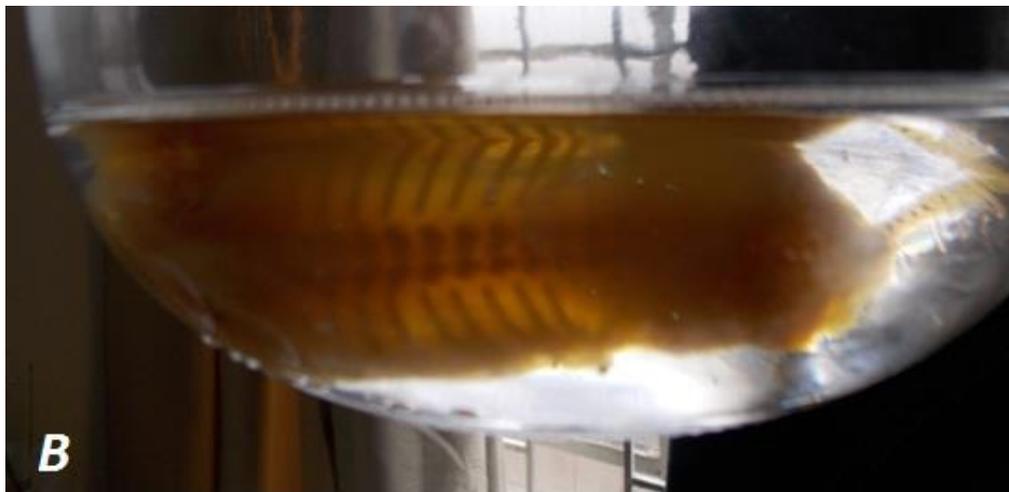
Fuente: *Elaboración propia*. Semana 8 y 9. Se visualiza tórax del espécimen.

Fotografía 7. Inmersión en Glicerina pura



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 10. Se observa mayor pérdida de integridad cutánea, por tanto se deja inmerso en glicerina pura por una (1) semana para mejorar fijación e integridad cutánea. B. Luego una (1) semana de inmersión en glicerina se evidencia diafanización de tejido.

Fotografía 8. Inmersión por 15 días y recambio cada 7 días de Glicerina pura.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 12 y 13. A. Se mejora la diafanización de tejido y visualización de sistema óseo a los 14 días pos-inmersión en glicerina pura. B. Diafanización de tejido del dorso y se observa la columna vertebral del espécimen y mejora la diafanización con el recambio de glicerina en comparación con la semana 11.

Fotografía 9. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,2%



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 14. Se coloca inmerso nuevamente en solución de hidróxido de potasio 0,2%, para mejorar diafanización de tejido en región pélvica y tórax, con posterior opacidad de tejido al retiro de la glicerina e inmersión en KOH.

Fotografía 10. Inmersión en Glicerina pura

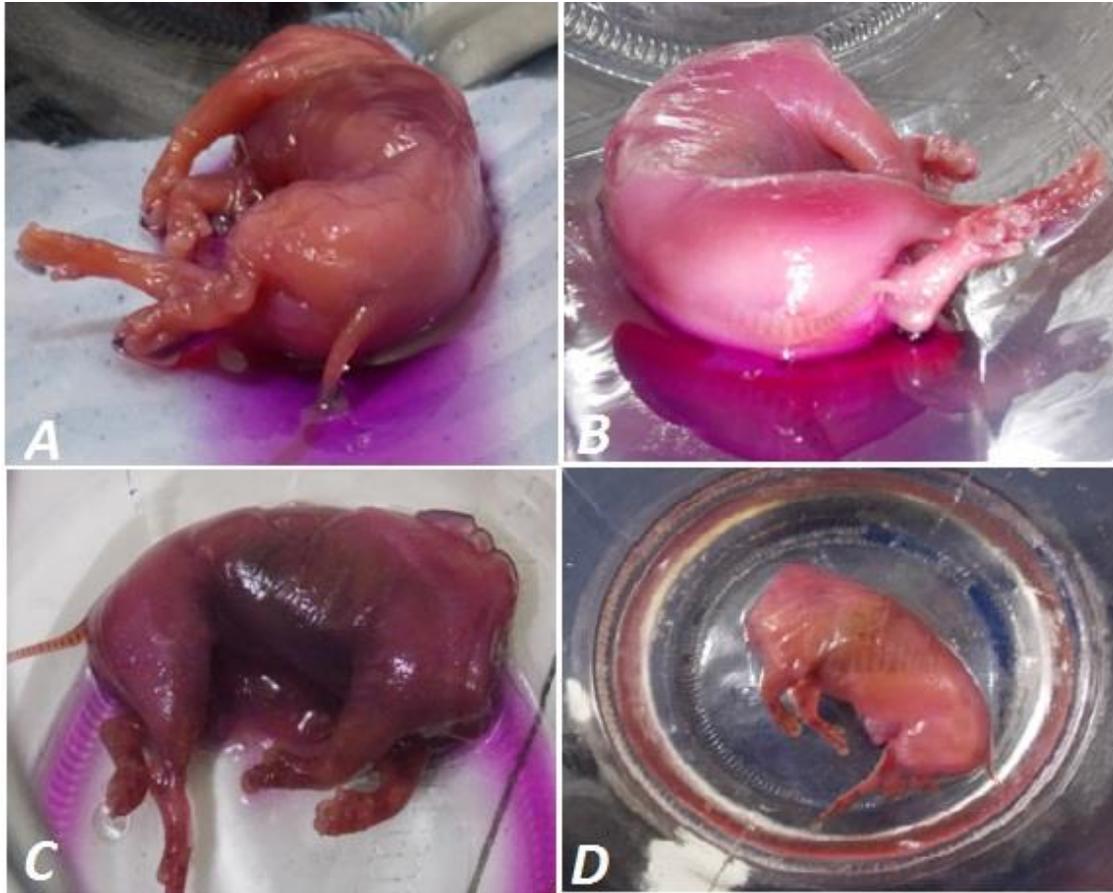


Fuente: *Elaboración propia*. Semana 15. A. durante las primeras 24h en glicerina pura se diafaniza tejido con visualización de tejido óseo. B. Tres (3) días de inmersión en glicerina y recambio mejora visualización de pelvis y tórax.

11.1.1 FIJACIÓN DE CENTROS DE OSIFICACIÓN: PRIMERA FASE.

La fijación de los centros de osificación en la primera fase se realizó a partir de recomendaciones de la experiencia de la profesora y Dra. Zoila Emilia Castañeda y la revisión bibliográfica, por tanto la técnica de tinción de centros de osificación en la fase uno (1) se realizó de la siguiente manera: en un recipiente mayor a un litro se preparó una solución de 1000cc de agua estéril, se adicionó 1gr de rojo de alizarina. Cuando la solución estaba disuelta y homogénea se aplicaron: 2cc de acetona al 99%, 2cc de alcohol al 99% y 0,3gr de hidróxido de potasio; se mezcló totalmente hasta encontrar un estado homogéneo. Se introdujo al espécimen por siete 7 días, aclarando que se generó un control secuencial fotográfico evidenciado desde la fotografía No 11 hasta la No 16 que se encuentran a continuación:

Fotografía 11. Marcación de centros de osificación con rojo de alizarina primer, tercer, quinto y séptimo día.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 16. A. 24 horas de tinción con rojo de alizarina. B. 72 horas de tinción de rojo de alizarina. C. Cinco (5) días de tinción con de rojo de alizarina. D. séptimo y último día de tinción y primer día de inmersión en glicerina pura

Fotografía 12. Aspecto final de marcación de centros de osificación.



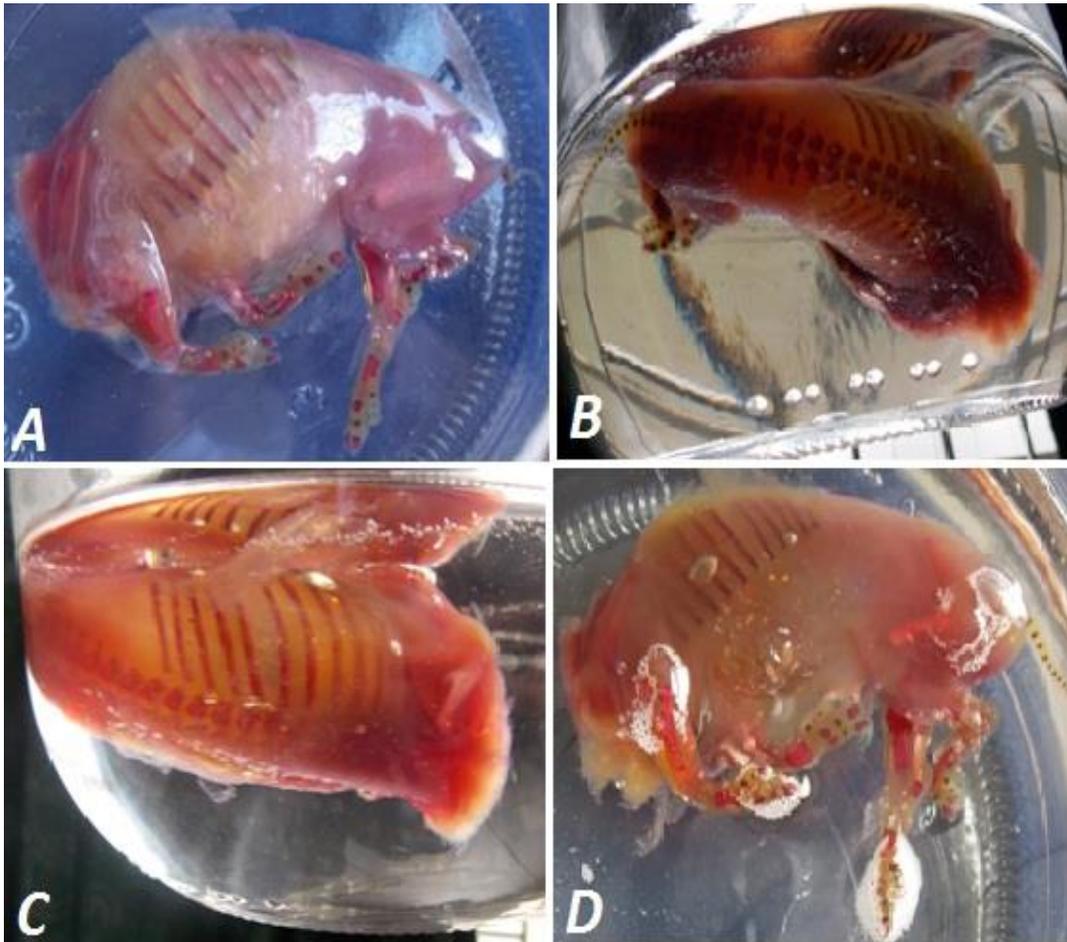
Fuente: *Elaboración propia*. Semana 17. Se finaliza marcación de centros de osificación e inmersión en glicerina pura, evidenciando teñido de piel y aspecto muy rojizo del espécimen.

Fotografía 13. Desmanchado con alcohol al 70% e inmersión en solución de hidróxido de potasio.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 18. Se realiza inmersión en alcohol al 70%, por 48h, para fijación y retiro de rojo de alizarina en piel y tejido blando. Posterior al segundo día de inmersión de alcohol, se pone inmerso en KOH al 0,2% por dos semanas

Fotografía 14. Inmersiones en glicerina pura, alcohol e hidróxido de potasio.



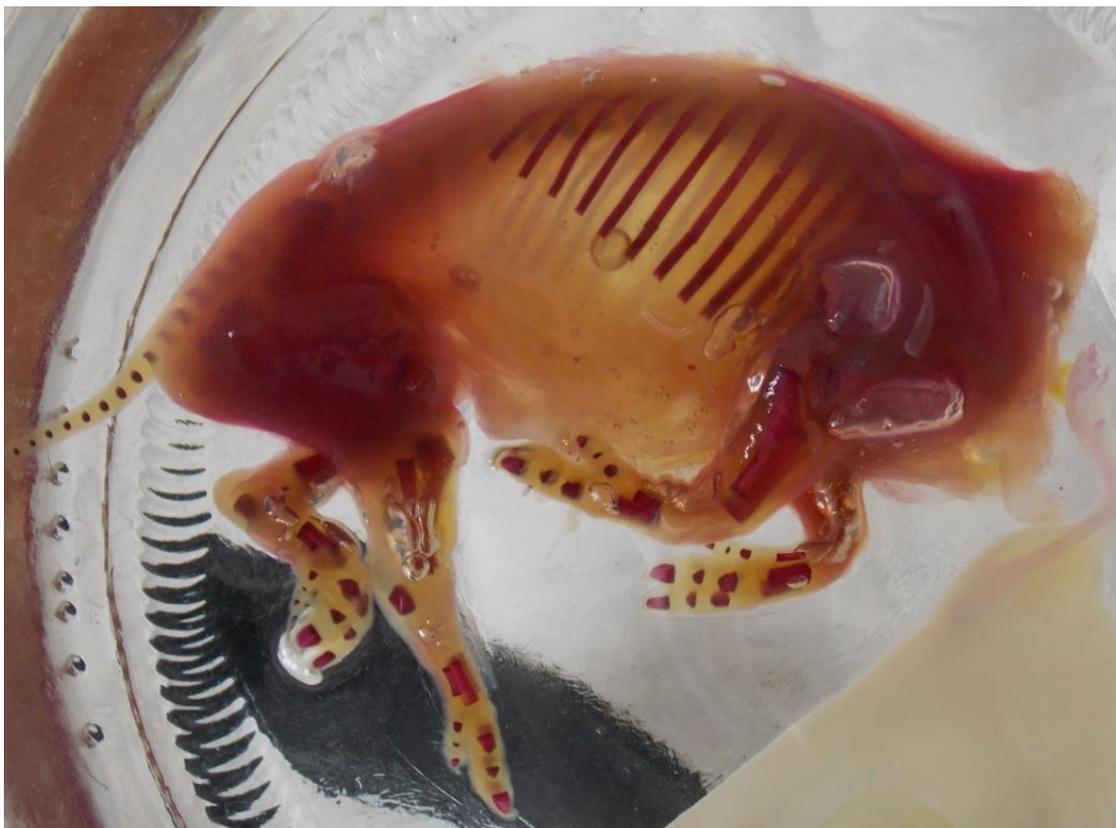
Fuente: *Elaboración propia*. Semana 19. A y B Se mejora diafanización pero se evidencia que piel se tiñó por aspecto rojizo marcado del espécimen que se trató de aclarar (ver fotografía C, D) con alcohol al 70% por 24 horas e inmersión nuevamente en KOH al 0,2%.

Fotografía 15. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,2%



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 20 y 21 Espécimen inmerso en KOH al 0,2%, para mejorar diafanización y desmanchado de piel del espécimen.

Fotografía 16. Inmersión y recambio de glicerina pura.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 22 y 23. Especimen inmerso en glicerina pura, se cambia glicerina pura varias veces para finalizar el proceso de diafanización del espécimen.

11.1.2 CONCLUSIONES DE LA FASE UNO: PRUEBA PRELIMINAR.

- Se logra diafanizar tejido del espécimen, visualización y tinción del sistema óseo.
- Se concluye que no se debe superar las concentraciones de KOH mayores a 0,5% para evitar el daño en la piel del espécimen.
- Se concluye que el manejo del espécimen debe ser en un frasco amplio.
- Se concluye que el uso de inmersión del espécimen en rojo de alizarina debe ser menor a siete días.

11.2. FASE DOS: “PROTOCOLO UNIVERSIDAD DE LOS ANDES”

En la fase (2), encaminada a la implementación y estandarización de la técnica de diafanización se utilizó un ratón de 60 días de nacido, el proceso se realizó con base en la revisión bibliográfica local donde se revisó un protocolo basado en glicerina (protocolo Universidad de los Andes) disuelta con solución de hidróxido de potasio con concentraciones máximas hasta del 10%, pero la actual revisión bibliográfica del protocolo no da cuenta de tiempos específicos de manejo del espécimen en las soluciones. Con base en la primera fase y las características de las soluciones se realizó una aproximación en tiempos en conjunto con los resultados arrojados en el ratón, que se registraron como evidencia en la tabla 4 desde el inicio hasta el final del proceso de diafanización.

Tabla 4. Registro de reactivos fase dos.

MUESTRA	SEMANA	REACTIVO EMPLEADO	CANTIDAD REACTIVO	% DEL REACTIVO	FECHA INICIO Y HORA	FECHA FINAL Y HORA
1	1	KOH al 99%	50 gr+500cc Agua estéril se toma un volumen de 375cc.	10%	07-06-14	12-06-14
					12h	14h
		Glicerina técnica	125ml	100%	07-06-14	12-06-14
					12h	14h
	2	KOH al 99%	50 gr+500cc Agua estéril se toma un volumen de 325cc.	10%	12-06-14	19-06-14
					10h	
		GLICERINA TECNICA	175cc	100%	12-06-14	19-06-14
	3	KOH al 99%	50 gr+500cc Agua estéril se toma un volumen de 325cc	10%	19-06-14	23-06-14
					10h	
		GLICERINA TECNICA	175cc	100%	19-06-14	23-06-14
	4	KOH al 99%	10 gr de KOH+500cc Agua estéril se toma un volumen de 250cc	2%	23-06-14	27-06-14

		Glicerina técnica	250cc	100%	23-06-14	27-06-14
5 y 6		KOH al 99%	10 gr de KOH+500cc Agua estéril se toma un volumen de 250cc	2%	27-06-14	11-07-14
		Glicerina técnica	250cc	100%	27-06-14	11-07-14
7 y 8		KOH al 99%	10 gr de KOH+500cc Agua estéril se toma un volumen de 250cc	2%	11-07-14	29-07-14
		Glicerina técnica	250cc	100%	08-07-14	29-07-14
9		KOH al 99%	10 gr de KOH+500cc Agua estéril se toma un volumen de 250cc	2%	29-07-14	05-08-14
		Glicerina técnica	250cc	100%	29-07-14	05-08-14
10		Glicerina técnica	500 cc	100	05-08-14	12-08-14
11		KOH 99%	2gr	0.2%	12-08-14	19-08-14
12		KOH 99%	2gr	0.2%	19-08-14	28-08-14
13		Glicerina 100%	500cc	100%	28-08-14	04-09-14
14		KOH	4 gr	0,4%	04-09-14	16-09-14
15		KOH	4gr	0,4%	16-09-14	23-09-14
16		Glicerina	250cc	100%	23-09-14	01-10-14
17		Marcación ROJO DE ALIZARINA	800cc+0,8mg rojo de alizarina.		01-10-14 Hora: 16:30h	01-10-14 Hora: 23:30h
17		Alcohol al 70%	300cc recambio a las 6 horas		02-10-14	02-10-14
17		Agua estéril	300cc recambio c/2h x 8h.		02-10-14	02-10-14

	17	KOH	4,5gr	0,4	02-10-14	9-10-14
	18	KOH	4,5gr	0,4	09-10-14	16-10-14
	19	KOH	4,5gr	0,4	09-10-14	24-10-14
	20	KOH	5gr	0,5%	24-10-14	31-10-14
	21	Glicerina	250cc	100%	31-10-14	04-10-14

En el cuadro precedente se realizó un control secuencial de registro semanal minucioso de acontecimientos acompañado con el registro fotográfico para registrar las variables definidas durante el diseño metodológico (color, diafanización de tejido, friabilidad de tejido, centros de osificación, visualización ósea y cartilaginosa) como se evidencia desde la fotografía No 17 hasta la No 27.

Fotografía 17. Fijación en formol al 10% e inmersión en solución de hidróxido de potasio 10%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 1. Ratón fijado en formol al 10% por 48 horas y al tercer (3) día se coloca inmerso en una solución de hidróxido de potasio al 75 % volumen (KOH 10%,) + 25% de volumen de glicerina técnica.

Fotografía 18. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 10%.



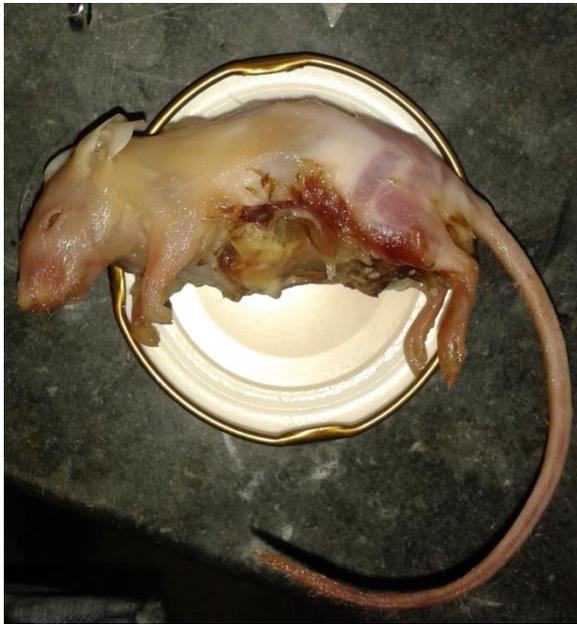
Fuente: *Elaboración propia*. Semana 2. Ratón se coloca inmerso en una solución de hidróxido de potasio al 65 % de volumen (KOH 10%,) + 35% de volumen de glicerina técnica, el líquido es amarillo claro, aún no hay cambios en el espécimen.

Fotografía 19. Pérdida y retiro de pelo.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 3. A. Ratón inmerso en solución de la semana 2, presenta pérdida de pelo y líquido amarillo claro. B. Se retira pelo con bisturí. No presenta significativa diafanización.

Fotografía 20. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 2%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 4. Ratón inmerso en solución de hidróxido de potasio 50% de volumen (KOH 2%,) + 50% de volumen de glicerina técnica.

Fotografía 21. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 2%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 5 y 6. Durante el cambio de la solución se visualizan los miembros inferiores del ratón y se insinúa la pelvis.

Fotografía 22. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 2%.



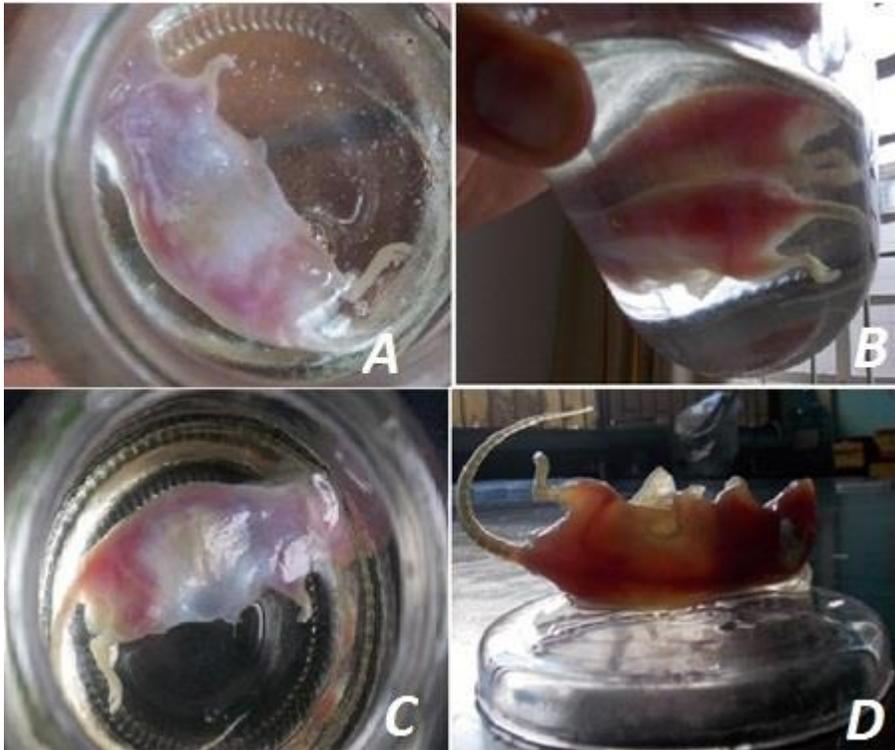
Fuente: *Elaboración propia*. Semana 7 y 8. Sin cambios significativos de diafanización en miembros inferiores y pelvis. Se insinúa la columna del ratón. Por falta de diafanización, se cambió solución de KOH cada semana y no cada dos (2) semanas.

Fotografía 23. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 2%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 9. Tejido blandos del ratón empiezan a diafanizar y algunos huesos se observan.

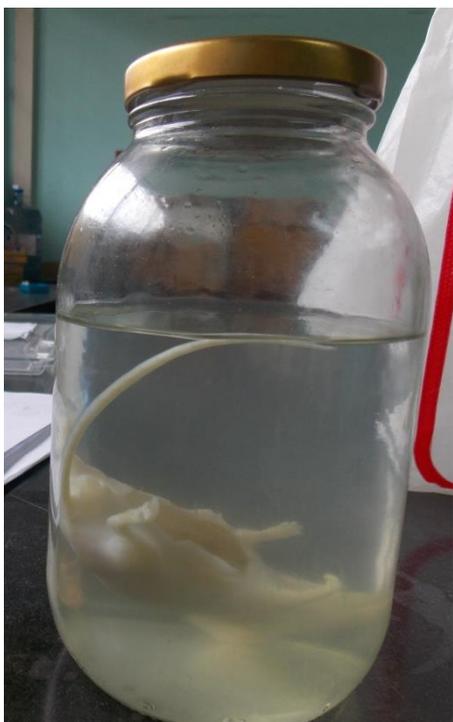
Fotografía 24. Primera inmersión en glicerina pura.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 10. A. primeras 24 horas de inmersión. B. tercer día de inmersión. C y D. quinto día pos-inmersión.

Hasta la fotografía 24, se realizaron todos los pasos del protocolo universidad de los Andes, aunque los resultados no fueron totalmente satisfactorios en diafanización pero se observó que la glicerina junto al hidróxido de potasio a concentración del 10% aceleran el proceso corrosión y/o diafanización y preservan la piel del espécimen. Las anteriores observaciones del protocolo de la Universidad de los Andes permitieron concluir que algunos pasos del proceso de diafanización del protocolo se pueden fusionar con los de la fase 1, para obtener resultados de igual calidad más rápidamente. Para comprobar lo anterior se continuó la diafanización de la fase dos con base a los resultados positivos que se evidenciaron en la fase uno, al diafanizar con KOH a concentraciones no superiores de 0,5% sin glicerina mezclada, como se observa en las fotografías No 25,26,27 y 28 de la fase 2 de diafanización.

Fotografía 25. Inmersión de solución de hidróxido de potasio 0,2%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 11 y 12. Se torna blanco el espécimen durante la inmersión en hidróxido de potasio 0,2% sin glicerina mezclada.

Fotografía 26. Segunda inmersión en glicerina pura.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 13. Mejora la diafanización de tejido y la visualización de sistema óseo.

Fotografía 27. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,4%



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 14 y 15. El espécimen se torna de aspecto traslucido o diáfano.

Fotografía 28. Tercera inmersión en glicerina pura.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 16. Se mejora diafanización de pelvis, columna y tórax del espécimen al quinto día de inmersión en glicerina pura.

11.2.1. FIJACIÓN DE CENTROS DE OSIFICACIÓN: SEGUNDA FASE.

La fijación de centros de osificación en la segunda fase se realizó a partir de la experiencia de la primera fase. Para la técnica de tinción de centros de osificación se realizó de la siguiente manera: en un recipiente mayor a uno (1) litro se preparó una solución de 800cc de agua estéril con 0,8gr de rojo de alizarina. Cuando la solución estuvo disuelta y homogénea se adicionaron: 2cc de acetona al 99%, 2cc de alcohol al 99% y 0,5gr hidróxido de potasio, se mezcló hasta lograr un estado homogéneo. Se introdujo el espécimen por seis horas, se llevó control secuencial fotográfico como se observa en las fotografías No 29 hasta la No 31:

Fotografía 29. Pos-marcación de centros de osificación.



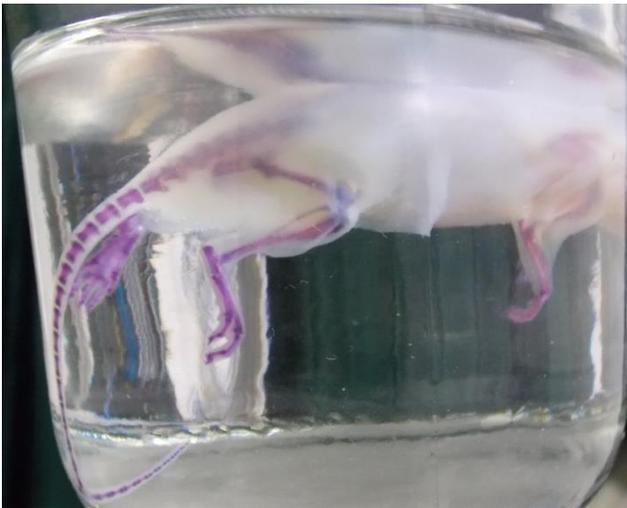
Fuente: *Elaboración propia*. Semana 17. Se realiza coloración de centros de osificación por 6 horas por medio de inmersión, se lava y se recambia con alcohol al 70% por 6 horas, al encontrar manchado de piel del espécimen, se transfiere a solución de hidróxido de potasio a 0,45%.

Fotografía 30. Inmersión y desmanchado en solución de hidróxido de potasio 0,45% y 0,5%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 18, 19,20. Se recambia solución de hidróxido de potasio 0,45% y se logra el desmanchado de piel durante la semana 18, las semanas siguientes 19 y 20 se aumenta la solución de hidróxido de potasio a 0,5%.

Fotografía 31. Inmersión en glicerina pura.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 21. Inmersión y recambio cada 3 días de glicerina pura con resultados satisfactorios en marcación de sistema óseo y diafanización.

11.2.2 CONCLUSIONES DE LA FASE DOS: PROTOCOLO UNIVERSIDAD DE LOS ANDES.

- Se observó que los pasos iniciales de la diafanización en el protocolo de la Universidad de los Andes pueden ser fusionados con la fase uno (1) y así acelerar el proceso en los especímenes grandes mayor de 4 cm mejorando la calidad en diafanización y desmanchado de la piel.
- Se demostró que el tiempo de marcación de centros de osificación no debe superar las 6 a 8 horas de inmersión del espécimen en la solución de alizarina además se observó la necesidad de adicionar hidróxido de potasio para mejorar la penetración del rojo de alizarina en el sistema óseo.

11.3. FASE TRES: “PROTOCOLO UNIVERSIDAD DE CHILE”

En la fase, encaminada a la implementación y estandarización de la técnica de diafanización se utilizó un (1) ratón de 30 días de edad, el proceso se realizó con base a la revisión bibliográfica del protocolo de la Universidad Santo Tomás de Chile (ver marco teórico). No había tiempos específicos de inmersión del espécimen en las soluciones. Con base en la experiencia en las fases uno y dos considerando las características de las soluciones se realizó una aproximación en tiempos de las soluciones de acuerdo con los resultados encontrados en el ratón, se obtuvieron resultados poco satisfactorios en diafanización. En la siguiente tabla 5 se registraron las concentraciones de los reactivos hasta el final del proceso.

Tabla 5. Registro de reactivos fase tres.

MUESTRA	SEMANA	REACTIVO EMPLEADO	CANTIDAD REACTIVO	% DEL REACTIVO	FECHA INICIO Y HORA	FECHA FINAL Y HORA
1	1	Formol al 44%	100cc	Formol al 10%	16-06-14	18-06-14
		KOH al 99%	20 gr (KOH)+1000cde agua estéril	2%	18-06-14	23-06-14
		Glicerina al 99%.	100cc	100%	24-06-14	Hasta el día de hoy.

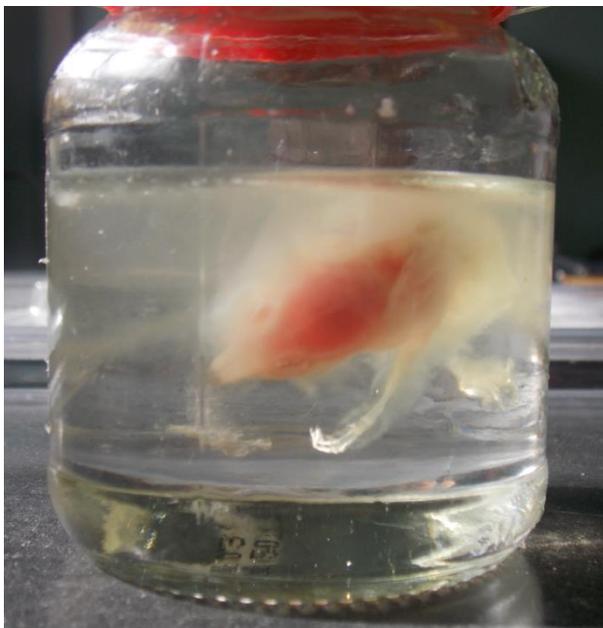
Se realizó un control fotográfico semanal de los acontecimientos relevantes en relación a las variables definidas durante el diseño metodológico (color, diafanización de tejido, friabilidad de tejido, centros de osificación, visualización ósea y cartilaginosa) en las fotografías No 31 y No 32:

Fotografía 32. Fijación con formol al 10%.



Fuente: *Elaboración propia.* Semana 1. Fijación con formol al 10% por 48horas e inmersión en solución de hidróxido de potasio 2% sin glicerina.

Fotografía 33. Cinco días de inmersión en solución de hidróxido de potasio 2% sin glicerina.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 2. Cinco (5) días de inmersión en KOH al 2% sin glicerina genera corrosión masiva, pérdida total de integridad cutánea, muscular y tendinosa, por tanto se suspendió inmersión de KOH al 2% y se puso inmerso en glicerina técnica.

11.3.1 CONCLUSIÓN FASE TRES: PROTOCOLO UNIVERSIDAD SANTO TOMAS DE CHILE.

Las concentraciones de hidróxido de potasio por encima de 2% puro sin adicionar glicerina son sumamente corrosivas en el espécimen. Por tanto, se descarta este tipo protocolo y se suspende.

11. 4. FASE CUATRO: “EXPERIENCIAS POSITIVAS FASE UNO Y DOS”

Durante la fase cuatro se realizó el proceso de diafanización con base en experiencias positivas de la fase uno y dos del presente proyectos-de investigación. En consecuencia se realizó la diafanización como se muestra en la tabla 6 a continuación:

Tabla 6. Registro de reactivos fase cuatro.

MUES TRA	SEMAN A	REACTIVO EMPLEADO	CANTIDAD REACTIVO	% DEL REACTI VO	FECHA INICIO Y HORA	FECHA FINAL HORA
1		Formol al 44%	100cc	Formal al 10%	1-07-14	3-07-14
	1 (solo cinco(5) días)	KOH al 99%	50 gr+500cc Agua estéril se toma un volumen de 375cc.	10%	03-07-14	08-07-14
		Glicerina técnica	125ml	100%	03-07-14	08-07-14
	2	KOH al 99%	50 gr+500cc Agua estéril se toma un volumen de 325cc.	10%	08-07-14	23-07-14
		GLICERINA TÉCNICA	175cc	100%	08-07-14	23-07-14
	3	KOH al 99%	50 gr+500cc Agua estéril se toma un volumen de 325cc	10%	08-07-14	23-07-14
		GLICERINA TÉCNICA	175cc	100%	08-07-14	23-07-14

	4	KOH al 99%	10 gr de KOH+500cc Agua estéril se toma un volumen de 250cc	2%	23-07-14	31-07-14
		Glicerina técnica	250cc	100%	23-07-14	31-07-14
	5	KOH al 99%	10 gr de KOH+500cc Agua estéril se toma un volumen de 250cc	2%	31-07-14	07-08-14
		Glicerina técnica	250cc	100%	31-07-14	07-08-14
	6	KOH	3 gr	0,3%	07-08-14	14-08-14
	7	KOH	3 gr	0,3%	14-08-14	21-08-14
	8	KOH	3 gr	0,3%	21-08-14	28-08-14
	9	KOH	3,5 gr	0,35%	28-08-14	05-09-14
	10	KOH	4 gr	0,4%	05-09-14	12-09-14
	11	KOH	4 gr	0,4%	12-09-14	19-09-14
	12	KOH	4,5gr	0,45%	19-09-14	29-09-14
	13	Marcación ROJO DE ALIZARINA	800cc+0,8mg rojo de alizarina.		01-10-14 Hora: 16:30h	01-10-14 Hora: 23:30h
	13	Agua estéril	300cc recambio c/2h x 8h.		02-10-14	02-10-14
	14	KOH	4,5gr	0,45%	02-10-14	09-10-14

	15	KOH	4,5gr	0,45%	09-10-14	16-10-14
	16	GLICERINA	250cc	100%	16-10-14	18-10-14

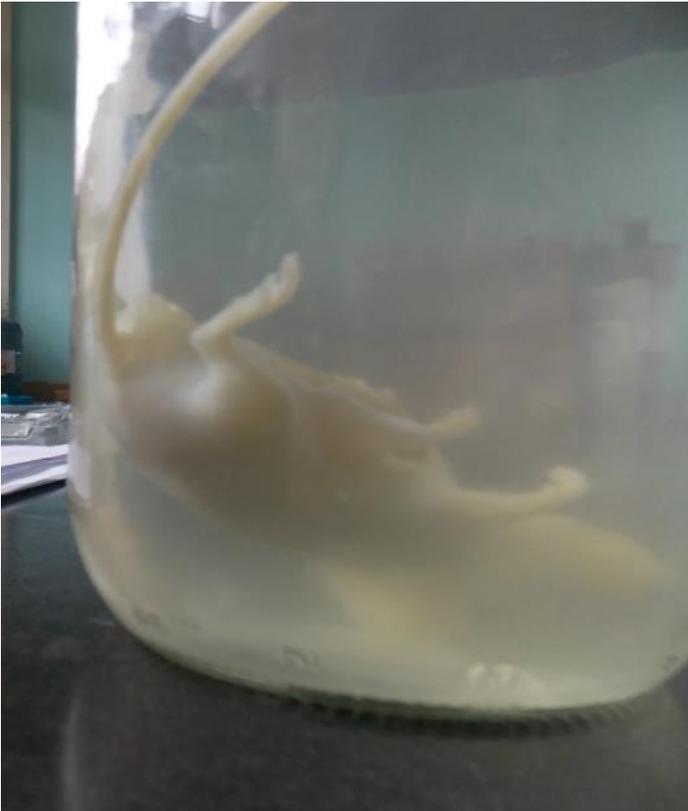
Se generó un control fotográfico secuencial semanal de los acontecimientos relevantes en relación a variables definidas durante el diseño metodológico (color, diafanización de tejido, friabilidad de tejido, centros de osificación, visualización ósea y cartilaginosa) como se evidencia desde la fotografía No 34 hasta la 40.

Fotografía 34. Fijación en formol al 10% e inmersión en solución de hidróxido de potasio 10%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 1. Ratón fijado en formol al 10% por 48 horas y al tercer (3) día se coloca inmerso en una solución de hidróxido de potasio al 75 % de volumen (KOH 10%,) + 25% de volumen de glicerina técnica.

Fotografía 35. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 10%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 2. El ratón se coloca en inmersión de solución de hidróxido de potasio al 65 % de volumen (KOH 10%,) + 35% de volumen de glicerina técnica, el se torna liquido amarillo claro, no hay cambios de diafanización en el espécimen.

Fotografía 36. Pérdida y retiro de pelo.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 3. Ratón inmerso en solución de la semana 2, se observa pérdida de pelaje y líquido de la solución amarilla turbia, se cambia a la solución de hidróxido de potasio al 65 % de volumen (KOH 10%,) + 35% de volumen de glicerina técnica

Fotografía 37. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 2% con glicerina.



Fuente: *Elaboración propia*. Semanas 4 y 5. Ratón inmerso en solución de hidróxido de potasio 50% de volumen (KOH 2%,) + 50% de volumen de glicerina técnica.

Fotografía 38. Inmersión de solución de hidróxido de potasio 0,3%



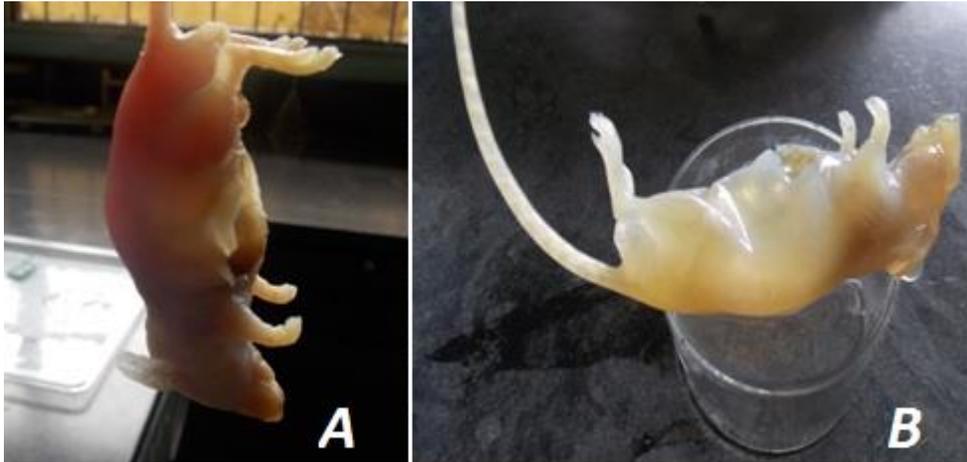
Fuente: *Elaboración propia*. Semanas 6,7 y 8. La solución de hidróxido de potasio 0.3% sin glicerina, se cambia cada semana, al final de la octava (8) semana se evidencia diafanización y se aprecia la columna, los dedos, las garras y levemente otros huesos de las extremidades.

Fotografía 39. Inmersión de solución de hidróxido de potasio 0,35%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 9. Diafanización de extremidades, columna, dedos, garras y se insinúa pelvis del espécimen.

Fotografía 40. Inmersión de solución de hidróxido de potasio 0,4%



Fuente: *Elaboración propia*. Semanas 10, 11 y 12. A. Durante las semana 10 y 11, se visualiza tejido muscular, mejora la visualización de tejido óseo. B. al final de la semana 12, el espécimen se visualiza blando, desaparece visualización de tejido muscular, y mejora diafanización de tejido óseo en especial pelvis y tórax

11.4.1 FIJACIÓN DE CENTROS DE OSIFICACIÓN: CUARTA FASE.

La fijación de centros de osificación en la cuarta fase se realizó a partir de la experiencia de la primera y segunda fase asociado a la revisión bibliográfica; por tanto la técnica de tinción de centros de osificación en la fase cuatro (4) se realizó de la siguiente manera: en un recipiente de un (1) litro se preparó una solución de 800cc de agua estéril con 0,8gr de rojo de alizarina. Cuando la solución estuvo disuelta y homogénea se agregaron 2cc de acetona al 99%, 2cc de alcohol al 99% y 0,5gr hidróxido de potasio, se mezcló hasta encontrar un estado homogéneo. Se introdujo al espécimen por seis horas y se llevó un control fotográfico como se observa en las fotografías No 41 hasta la 43:

Fotografía 41. Post-marcaación de centros de osificación.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 13. Coloración de centros de osificación con rojo de alizarina por 6 horas. Luego se sumerge en agua estéril, se lava y se recambia cada 2 horas por 8 horas. Se observó desmanchado y retiro de la alizarina en la casi totalidad de la piel del espécimen luego se deja inmerso en solución de hidróxido de potasio a 0,45% por dos semanas.

Fotografía 42. Inmersión y desmanchado en solución de hidróxido de potasio 0,45%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 14 y 15. Solución de hidróxido de potasio 0,45% y se evidencia desmanchado en la piel durante la semana, él espécimen estaba más friable y se observa la escapula en tórax.

Fotografía 43. Inmersión en glicerina pura.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 16. Inmersión con recambio cada 3 días de glicerina pura con resultados satisfactorios en marcación de sistema óseo y diafanización.

11.4.2 CONCLUSIÓN FASE CUATRO: EXPERIENCIAS POSITIVAS FASE UNO Y DOS.

Se obtiene un resultado satisfactorio durante el proceso de la diafanización gracias a las experiencias adquiridas durante la fase uno (1) y dos (2); sumado a esto se logra estandarizar la tinción de centros de osificación en especímenes mayores a 4cm, concluyendo que la tinción se debe realizar luego de la solución de hidróxido de potasio y el desmanchado se debe realizar con solo agua estéril en recambios cada 2 horas por aproximadamente 8 horas, se sugiere no utilizar para el retiro de la alizarina de la piel y tejidos la glicerina, ni mucho menos alcohol al 70% por ser sustancias conservadoras, fijadoras y que generan deshidratación. Posterior al retiro de la alizarina del tejido se colocó rata inmersa en solución de hidróxido de potasio para mejorar aspecto de piel y tejidos.

11.5. FASE CINCO: “FETOS RATONES”.

Durante la fase cinco se realizó el proceso de diafanización con base en la solución de hidróxido de potasio a concentraciones no mayores de 0,2% por el tamaño de los fetos de ratón. Entonces se realizó la diafanización de la manera como se ve en la tabla 7 que se encuentra a continuación:

Tabla 7. Registro de reactivos fase cinco.

MUESTRA	SEMANA	REACTIVO EMPLEADO	CANTIDAD REACTIVO	% DEL REACTIVO	FECHA INICIO Y HORA	FECHA FINAL HORA
	1	Formol al 44%	200cc	10%	4-08-14	6-08-14
	1	KOH	0,5gr	0,05%	6-08-14	13-08-14
	2	KOH	0,5gr	0,05%	13-08-14	20-08-14
	3	KOH	1gr	0,1%	20-08-14	27-08-14
	4	KOH	1gr	0,1%	27-08-14	03-09-14
	5	KOH	1,5gr	0,15%	03-09-14	10-08-14
	6	KOH	1,5gr	0,15%	10-09-14	17-08-14
	7	KOH	2gr	0,2%	17-09-14	23-09-14
	8	KOH	1gr	0,1%	23-09-14	30-09-14
	9	KOH	1gr	0,1%	30-09-14	07-10-14
	10	KOH	1gr	0,1%	07-10-14	14-10-14

	11	KOH	1gr	0,1%	14-10-14	21-10-14
	12	KOH	1gr	0,1%	28-10-14	28-10-14
	13	Glicerina	50cc	100%	05-10-14	FINAL DE LA TECNICA

De la anterior tabla se llevó control fotográfico secuencial semanal de los acontecimientos relevantes en relación a variables definidas durante el diseño metodológico (color, diafanización de tejido, friabilidad de tejido, centros de osificación, visualización ósea y cartilaginosa) como se muestra en las fotografías No 44 hasta el No 52:

Fotografía 44. Fijación en formol al 10% e inmersión en solución de hidróxido de potasio 0,05%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 1. Se sacrificó rata copulada de aproximadamente 17 días, en cámara hiperbárica, se realizó incisión en el abdomen, se retiraron las vísceras, se fijaron en formol al 10%, en grupos de dos (2) especímenes por 48 horas y se inició inmersión en KOH al 0,05%.

Fotografía 45. Aumento de concentración de 0,05% a 0,1% de solución de hidróxido de potasio.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 2, 3 y 4. Se cambia KOH cada semana, al terminar la segunda semana, se aumenta concentración de KOH a 0,1%, con posterior visualización de tejido óseo en patas al finalizar la cuarta semana.

Fotografía 46. Inmersión de solución de hidróxido de potasio a 0,15% y fijación con alcohol al 70%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 5. Líquido amarillo, turbio, con partículas en su interior por tanto se cambia KOH y se aumentó concentración a 0,15%, durante el cambio de solución se evidencia pérdida de la integridad y friabilidad cutánea, por tanto se fija espécimen con alcohol al 70% por un (1) día.

Fotografía 47. Solución de hidróxido de potasio 0,2%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 6. Se visualizó tejido óseo en los miembros del ratón y se insinúa en el tórax, se presentó aumento de la pérdida de integridad cutánea, sin más cambios significativos. Se cambia solución de hidróxido de potasio y se aumenta concentración a 0,2%.

Fotografía 48. Solución de hidróxido de potasio superior a la permitida para obtener una diafanización adecuada.



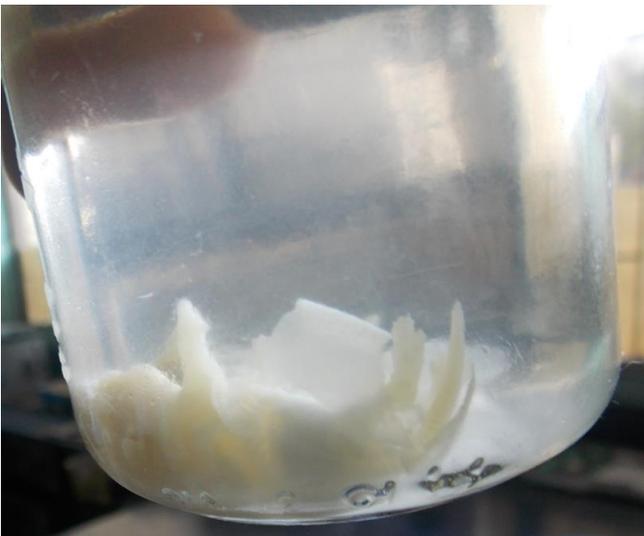
Fuente: *Elaboración propia*. Semana 7. Se mejoró la diafanización de tejido en patas de ratón y tórax de los fetos. Desafortunadamente asociado con mayor pérdida de integridad cutánea y la solución se tornó de aspecto rojo, por tanto se reduce la concentración de solución de hidróxido de potasio a 0,1%.

Fotografía 49. Solución de hidróxido de potasio a 0,1%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 8 y 9. Se hizo el recambio de solución de hidróxido de potasio cada semana y luego se llevó a cabo la fijación por 24 horas con alcohol al 70% para disminuir la pérdida de integridad cutánea y reducir la friabilidad.

Fotografía 50. Solución de hidróxido de potasio a 0,1%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 10 y 11. Durante estas dos semanas, se mantuvo la concentración de hidróxido de potasio al 0,1% con pérdida total en fetos de integridad cutánea.

Fotografía 51. Inmersión en glicerina pura.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 12. Se dejan inmersos los especímenes en glicerina pura que se recambia cada 3 días.

Fotografía 52. Séptimo día de inmersión y recambio de la glicerina.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 13. Se evidenciaron centros de osificación y cartílago.

11.5.1 CONCLUSIÓN FASE CINCO: FETOS RATONES.

Se logra diafanizar fetos menores a 4 cm de longitud, concluyendo que se debe implementar solución de KOH sin glicerina en concentraciones que no superen 0,1% para conservar la calidad de la diafanización y la integridad cutánea de los fetos ratones.

11.6 FASE SEIS: “PROTOCOLO DE DIAFANIZACIÓN SEGÚN EXPERIENCIAS POSITIVAS DE FASES 1, 3, 4, 5 EN CUATRO RATONES DE 17 DIAS”

Durante la fase seis el proceso de diafanización se realiza con base a las experiencias positivas de las fases uno, dos, cuatro y cinco del presente proyectos de investigación. De lo anterior se realiza la diafanización como se encuentra en la tabla 8 que está a continuación:

Tabla 8. Registro de reactivos fase seis

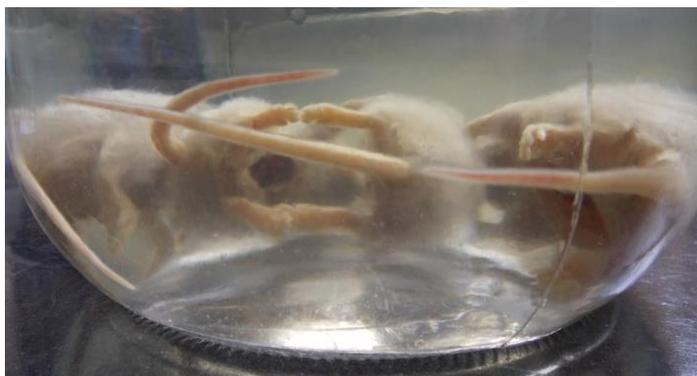
MUESTRA	SEMANA	REACTIVO EMPLEADO	CANTIDAD REACTIVO	% DEL REACTIVO	FECHA INICIO Y HORA	FECHA FINAL HORA
	1	Formol al 44%	500cc	10%	29-07-14	01-08-14
	1	KOH al 99%	50 gr+500cc Agua estéril se toma un volumen de 375cc.	10%	01-08-14	03-08-14
		Glicerina técnica	125ml	100%	01-08-14	03-08-14
	1 recambio por turbidez.	KOH al 99%	50 gr+500cc Agua estéril se toma un volumen de 375cc.	10%	03-08-14	06-08-14

		Glicerina técnica	125ml	100%	03-08-14	06-08-14
	2	KOH al 99%	50 gr+500cc Agua estéril se toma un volumen de 325cc.	10%	06-08-14	11-08-14
		GLICERINA TECNICA	175cc	100%	06-08-14	11-08-14
		KOH al 99%	50 gr+500cc Agua estéril se toma un volumen de 325cc	10%	11-08-14	14-08-14
		GLICERINA TECNICA	175cc	100%	11-08-14	14-08-14
	3	KOH al 99%	50 gr+500cc Agua estéril se toma un volumen de 325cc	10%	14-08-14	21-08-14
		GLICERINA TECNICA	175cc	100%	14-08-14	21-08-14
	4	KOH	2 gr	0,3%	21-08-14	28-08-14
	5	KOH	2 gr	0,3%	28-08-14	04-09-14
	6	KOH	3 gr	0,3%	04-09-14	11-09-14
	7	KOH	3 gr	0,3%	11-09-14	18-09-14
	8	KOH	3,5 gr	0,3%	18-09-14	25-09-14
	9	KOH	3,5 gr	0,3%	18-09-14	25-09-14
	10	Marcación ROJO DE	800cc+0,8mg rojo de		25-09-14 Hora:	25-09-14 Hora:

		ALIZARINA	alizarina.		16:30h	23:30h
	10	Agua estéril	300cc recambio c/2h x 8h.		26-09-14	26-09-14
	10	KOH	4 gr	0,4%	26-09-14	03-10-14
	11	Glicerina	250cc	100%	03-10-14	10-10-14
	12	Glicerina	250cc	100%	10-10-14	Hasta el día de hoy.

De la tabla anterior se realizó un registro fotográfico semanal de acontecimientos relevantes en relación a variables definidas durante el diseño metodológico (color, diafanización de tejido, friabilidad de tejido, centros de osificación, visualización ósea y cartilaginosa) como se evidencia desde las fotografías No 53 hasta la No 56:

Fotografía 53. Fijación en formol al 10% e inmersión en solución de hidróxido de potasio 10%.



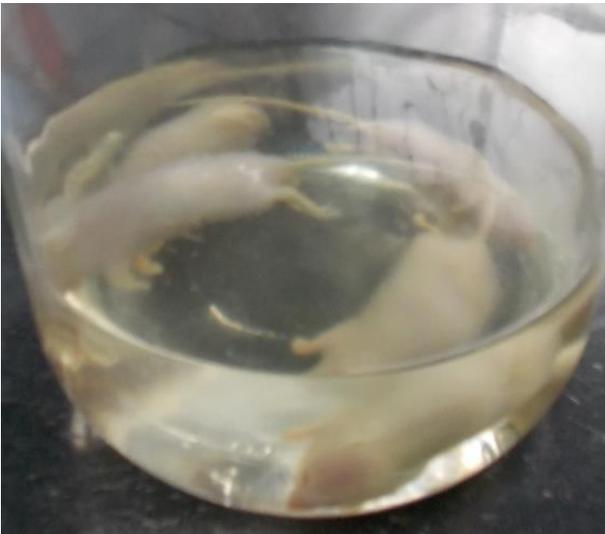
Fuente: *Elaboración propia*. Semanas 1 y 2. . Ratones fijados en formol al 10% por 48 horas y al tercer (3) día se colocan inmersos en una solución de hidróxido de potasio al 75 % volumen (KOH 10%,) + 25% de volumen de glicerina técnica.

Fotografía 54. Inmersión en solución de hidróxido de potasio 10%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semanas 3 y 4. Los ratones se colocan en inmersión en una solución de hidróxido de potasio al 65 % de volumen (KOH 10%,) + 35% de volumen de glicerina técnica, el líquido se torna amarillo claro, no hay cambios que reflejen diafanización.

Fotografía 55. Inmersión de solución de hidróxido de potasio 0,2% y 0,3%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semanas 5 y 6. La inmersión y recambio de solución de hidróxido de potasio durante las dos semanas, no hay cambios significativos.

Fotografía 56. Inmersión de solución de hidróxido de potasio 0,3% y 0,35%.



Fuente: *Elaboración propia*. Semanas 7 y 8. Inmersión y recambio de solución de hidróxido de potasio y espécimen pierde todo su pelo.

11.6.1 FIJACIÓN DE CENTROS DE OSIFICACIÓN: SEXTA FASE.

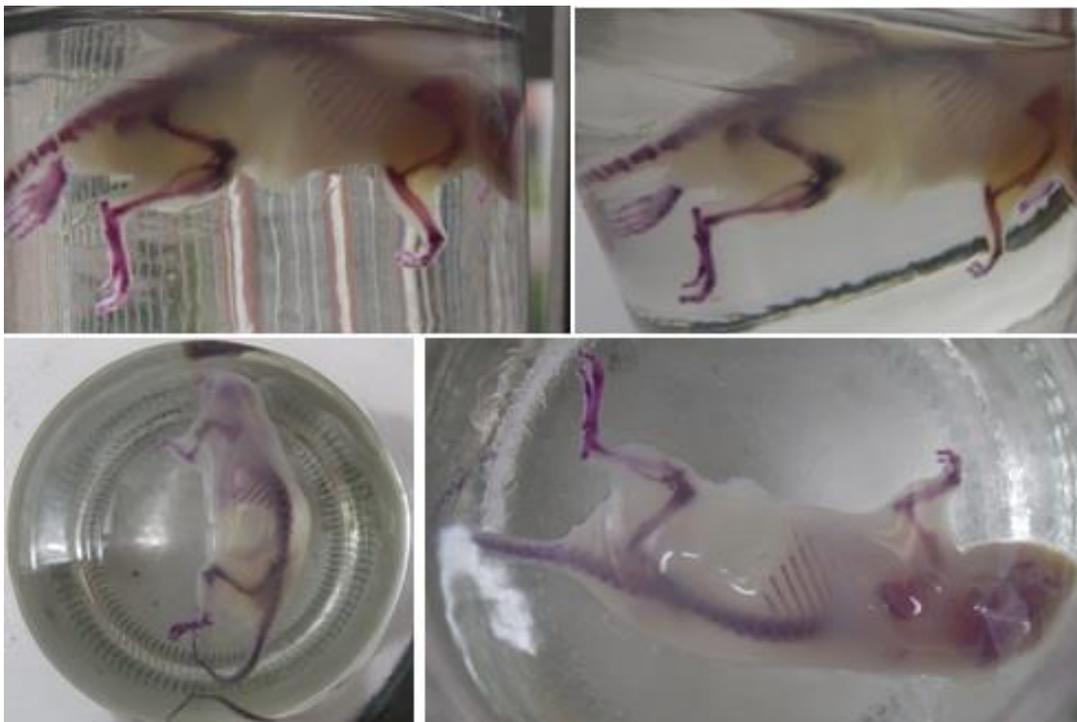
La fijación de centros de osificación en la sexta fase se realizó a partir de la experiencia de la cuarta fase asociado a la revisión bibliográfica. La técnica de tinción de centros de osificación en la fase seis se realizó de la siguiente manera: en un recipiente de uno (1) litro se preparó una solución de 800cc de agua estéril se adiciono 0,8gr de rojo de alizarina. Cuando la solución estuvo disuelta y homogénea se agregaron: 2cc de acetona al 99%, 2cc de alcohol al 99% e hidróxido de potasio 0,5gr, se mezcló hasta lograr encontrar un estado homogéneo. Se sumergió al espécimen por seis horas y se llevó un control secuencial fotográfico como se observa a continuación:

Fotografía 57. Coloración de centros de osificación.



Fuente: *Elaboración propia*. Semanas 10 y 11. Coloración de centros de osificación con rojo de alizarina por 6 horas. Posteriormente se pone inmerso en agua estéril, se lava y se recambia cada 2 horas por 8 horas. Evidenciándose desmanchado y retiro de la alizarina de la piel del espécimen casi en su totalidad. Posteriormente se deja inmerso en solución de hidróxido de potasio a 0,45%.

Fotografía 58. Inmersión en glicerina pura.



Fuente: *Elaboración propia*. Semana 12. Inmersión y recambio de glicerina pura para mejorar diafanización en espécimen.

11.6.2 CONCLUSIÓN FASE SEIS: PROTOCOLO DE DIAFANIZACIÓN SEGÚN EXPERIENCIAS POSITIVAS DE FASES 1,2, 4, 5 EN CUATRO RATONES DE 17 DIAS.

Se lograron diafanizar cuatro ratones en 12 semanas en menor tiempo en comparación con las fases anteriores, permitiendo generar y replicar un protocolo de diafanización en especies mayores de 4 cm de longitud basado en la evidencia que mejora la eficacia en tiempo y calidad en diafanización.

11.7. PROTOCOLO DE DIAFANIZACIÓN SEGÚN EXPERIENCIA PRELIMINAR UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.

El proceso, según el protocolo que propone la presente investigación para realizar la diafanización es el siguiente:

1. Fijación de la muestra en formol 10% por 48 horas.
2. Diafanizar siguiendo el esquema:
 - a) Solución de Hidróxido de potasio + H₂O estéril 75% volumen (KOH 10%) + 25% volumen de glicerina técnica. (7 días).
 - b) Solución de 65% volumen de (KOH 10%)+ 35% de glicerina técnica. (14 días)
 - c) Solución de hidróxido de potasio 0,2% por dos (2) semanas.
 - d) Solución de hidróxido de potasio 0,3% por dos (2) semanas.
 - e) Solución de hidróxido de potasio 0,35% por dos (2) semanas.
 - f) Solución de hidróxido de potasio 0,4% por dos (2) semanas.
3. Técnica de tinción de centros de osificación al terminar el paso (f) de la siguiente manera:
 - a) En un recipiente de uno (1) litro preparar una solución de 800cc de agua estéril disolver 0,8gr de rojo de alizarina, cuando la solución este disuelta agregar: 2cc de acetona 99%, 2cc de alcohol al 99% y 0,5gr de hidróxido de potasio. Cuando la mezcla esté totalmente homogénea, se sumerge el espécimen por seis (6) horas.
 - b) Introducir al espécimen en agua estéril y recambiar cada dos horas hasta retirar la coloración del rojo de alizarina de la piel.
 - c) Para completar el desmanchado de piel y tegumentos introducir al espécimen en hidróxido de potasio (0,2%) por una (1) semana.
4. Solución de 100% de glicerina técnica. Si en esta etapa la muestra no se torna transparente, se puede volver al paso dos (2) puntos e y f. (Por lo general se requiere cambiar varias veces la solución en glicerina pura hasta obtener una transparencia adecuada).

11.8 ANÁLISIS GENERAL DE RESULTADOS DE CADA FASE, DURANTE LA ELABORACIÓN DE LAS PIEZAS ANATÓMICAS DIAFANIZADAS.

Se elaboran las siguientes tablas 9 y 10 de reactivos y resultados de cada fase para el análisis global comparativo de las fases del proyecto de investigación las cuales se muestran a continuación:

Tabla 9. Resumen de reactivos y resultados fases 1,2 y 3 durante las técnicas de diafanización.

	FASE 1. PRUEBA PRELIMINAR	FASE 2. PROTOCOLO UNIVERSIDAD DE LOS ANDES	FASE 3. PROTOCOLO UNIVERSIDAD DE CHILE
REACTIVOS	Solución de hidróxido de potasio (KOH) en concentración no superior a 0,5% sin glicerina.	KOH en concentración de 10% y 2% mezclado con glicerina.	KOH en concentración a 2% sin glicerina.
RESULTADOS	Diafanización de tejido y visualización de sistema óseo con tinción de centros de osificación no adecuada, manchado y aspecto muy rojizo del modelo anatómico.	Diafanización de tejido no satisfactorio pero en menor tiempo, asociado a mejor tinción de centros de osificación basado en evidencia experimental.	Se descarta protocolo sumamente corrosivo en espécimen. Diafanización no adecuada.

Tabla 10. Resumen de reactivos y resultado fases 4,5,6 y 7 durante las técnicas de diafanización.

	FASE 4. EXPERIENCIAS POSITIVAS FASE 1 Y 2.	FASE 5.FETOS RATONES	FASES 6 y7. PROTOCOLO DIAFANIZACIÓN SEGÚN EXPERIENCIAS DE FASES 1, 3,4 y 5 EN CUATRO RATONES DE 17 DIAS.
REACTIVOS	Inicio de KOH a concentraciones de 10% con glicerina y finaliza KOH 0,5% sin glicerina.	KOH a concentración no superior de 0,2% en fetos ratones	Inicio de KOH a concentraciones de 10% con glicerina y finaliza KOH 0,5% sin glicerina.
RESULTADOS	Diafanización satisfactoria y se logra estandarizar la tinción de centros de osificación.	La solución de KOH no debe superar la concentración de 0,1% para conservar integridad cutánea y calidad en diafanización.	Se diafaniza en 12 semanas menor que en fases anteriores, se elabora y replica protocolo de diafanización basado en evidencia real que mejora eficacia en tiempos y calidad de diafanización.

12. CONFIABILIDAD Y VALIDEZ.

Enfocando el proyecto de investigación hacia el concepto de la confiabilidad que se refiere a la consistencia, coherencia y estabilidad de la información recolectada, en el presente proyecto, los puntos anteriormente mencionados estarán soportados por: la calidad de los reactivos, buen estado de los elementos a utilizar, idoneidad del investigador que se fortalecerá mediante asesorías de personal experto en la técnica de diafanización, como la Doctora Zoila Emilia Castañeda Murcia, profesora pensionada e invitada de la Maestría de Morfología Humana Universidad Nacional de Colombia y docente Universidad del Rosario.

13. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

La técnica de diafanización en la facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia abre posibilidades a los alumnos de pregrado y posgrado que quieran incursionar en el desarrollo de la técnica de conservación anatómica en anatomía humana y diafanizar otros sistemas como el cardiovascular, digestivo nervioso. La alternativa de la técnica de diafanización como línea de profundización e investigación de correlación teórico-práctica de morfogénesis ósea, anatomía comparada y embriología que permita el fortalecimiento y posicionamiento de la Maestría de Morfología Humana.

La diafanización, así como el desarrollo de otras técnicas de preservación de modelos anatómicos se convierte en un elemento constructor de aprendizaje significativo para el estudiante que aprenda en contacto directo e inmerso con la técnica y piezas diafanizadas, que permite reforzar sus conocimientos de morfogénesis ósea, anatomía y embriología.

Con el fin de responder al objetivo de investigación, se exploraron e implementaron varias técnicas de diafanización en ratones y se elaboró un protocolo de normatización que incluye reactivos químicos utilizados, pureza, concentración y tiempos empleados con sugerencias y recomendaciones explícitas en cada fase del procedimiento de la diafanización.

Los resultados obtenidos con esta investigación deben permitir la utilización de la técnica de diafanización utilizando, el protocolo aquí consignado para ser implementada en el estudio de la anatomía humana, por consiguiente, se estima que es conveniente la realización de otros estudios posteriores para mejorar el proceso y estandarizar el protocolo definitivo en esta área.

Se encontraron diferencias significativas en relación a concentraciones y usos de reactivos, como es el caso de la solución de hidróxido de potasio para diafanizar y se deja evidencia normativa basada en la experiencia de marcación de tejido óseo con rojo de alizarina sobre pureza, concentración y tiempos, ya que había una gran ausencia teórica de los

procedimientos durante la revisión del reactivo (rojo de alizarina) para la marcación de los centros de osificación.

A pesar de la corrosión para la diafanización con solución de hidróxido de potasio en los modelos anatómicos como investigador sugiero el uso de la glicerina durante el proceso para conservar integridad cutánea, friabilidad de los tejidos y fidelidad de los detalles anatómicos en modelos anatómicos que superen los 4cm de longitud.

Se logró estandarizar de alguna manera la técnica de diafanización en modelos que superen los 4 cm de longitud y se recomienda con base en la evidencia, que modelos como fetos y embriones menores a 3 a 4cm de longitud se deben diafanizar solamente con solución de hidróxido de potasio que no supere el 0,1%.

14. CRONOGRAMA.

Tabla 11: CRONOGRAMA SEGUNDO SEMESTRE 2013

MESES	AGOSTO				SEPTIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE			
SEMANA																				
ACTIVIDADES																				
Formulación del problema																				
Revisión del marco teórico																				
Aprobación de propuesta de investigación																				
Revisión de técnicas de diafanización.																				

Tabla 12: CRONOGRAMA PRIMER SEMESTRE 2014

MESES	FEBRERO				MARZO				ABRIL				MAYO				JUNIO				JULIO			
SEMANA																								
ACTIVIDADES																								
Revisión de técnicas de diafanización																								
Realización de inventario y solicitud de laboratorio de histo-tecnología.																								
Compra de reactivos.																								
Compra de especímenes.																								
Prueba preliminar fase(1)																								
Protocolo U. Andes																								

15. PRESUPUESTO.

15.1 PRESUPUESTO GENERAL.

El valor total del proyecto: **1.061.000\$** mil pesos Mcte.

Tabla 14: Presupuesto.

RUBROS	VALOR
TALENTO HUMANO	
1 Investigador	No aplica
2 Docentes asesores	Proporciona la Universidad
<i>Subtotal</i>	\$ 0.0
LABORATORIOS, EQUIPOS Y MATERIALES	
Arrendamiento de laboratorio.	Proporciona la Universidad
<i>Equipos y materiales.</i>	596.000\$
<i>Subtotal</i>	596.000\$
REACTIVOS QUIMICOS	
Hidróxido de potasio, agua destilada, rojo de alizarina, glicerina, formol, agua destilada, acetona y alcohol etílico.	323.000\$
<i>Subtotal</i>	323.000\$
ESPECIMENES	
Ratones (Mus Musculos) colonia ICR 21	142.000\$
<i>Subtotal</i>	142.000\$
GRAN TOTAL	1.061.000\$

15.2 PRESUPUESTO DETALLADO

Tabla 15: presupuesto detallado.

TALENTO HUMANO				
RECURSOS	UNIDAD	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	VALOR TOTAL
1 Investigadores	Mes	1	-	No aplica
2 Docentes asesores	Mes	4	-	Proporciona la Universidad
TOTAL				\$0.0

LABORATORIOS, EQUIPOS Y MATERIALES			
RECURSOS	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	VALOR TOTAL
ARRENDAMIENTO DE LABORATORIOS			
Anfiteatro y laboratorio de histo-tecnología	1	Proporciona la Universidad /mes	Proporciona la Universidad
Subtotal	\$0.0		
EQUIPOS Y MATERIALES			
Frascos de vidrio 5L	5	5.000	25.000
Cámara fotográfica marca Nikon coolpix L320 16 megapixeles.	1	499.000\$	499.000\$
Gafas de seguridad industrial	1	22.000\$	22.000\$
batas desechables talla L	20	40.000\$	40.000\$
Vaso precipitado x 500cc	1	8000\$	8000\$
Papel higiénico	1	2000\$	2000\$
Bascula gramera		Proporciona la Universidad	Proporciona la Universidad

Guantes limpios talla L	1 cajas x 100 unid	Proporciona la Universidad	Proporciona la Universidad
Tapa boca x 50 unidades	1 caja x 50 unid	Proporciona la Universidad	Proporciona la Universidad
Protectores de vía aérea	1 caja	Proporciona la Universidad	Proporciona la Universidad
Probeta graduada	1	Proporciona la Universidad	Proporciona la Universidad
Balón aforado x 1000	1	Proporciona la Universidad	Proporciona la Universidad
Balón aforado x 500	1	Proporciona la Universidad	Proporciona la Universidad
Pipeta	1	Proporciona la Universidad	Proporciona la Universidad
<i>Subtotal</i>			\$596.000
TOTAL	\$596.000		

ESPECIMENES			
RECURSO	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	VALOR TOTAL
Ratón(Mus Musculus) colonia ICR 21	8	9000\$	72000\$
Ratón(Mus Musculus) copulado colonia ICR 21	1	70000\$	70000\$
TOTAL	142000\$		

Tabla 16: Presupuesto Reactivos químicos.

REACTIVOS QUIMICOS			
REACTIVO	CANTIDAD	VALOR UNITARIO	VALOR TOTAL
Hidróxido de potasio 99% en lentejas por 250mg.	4	9.000\$	36.000\$
Glicerina técnica x 500ml	8	2500	20.000
Glicerina técnica x galón.	3	20000	60000
Rojo de alizarina MERCK	FCOx25gr	186.000	186.000
Agua destilada por galón.	1	10.000	10.000
Alcohol etílico al 96% por galon	1	11.000	11.000
Acetona	1	Proporciona la Universidad	Proporciona la Universidad
TOTAL			323000\$

ANEXOS.

Anexo A.

HOJA DE REGISTRO DE DATOS

FORMATO DE REGISTRO DE ESPECIMENES DIAFANIZADO

PROCEDIMIENTO: _____

MUESTR A	SEMANA	REAC TIVO EMPL EADO	CANTIDA D REACTIV O	% DEL REACTIV O	FECHA INICIO Y HORA	FECHA FINALIZACIÓN Y HORA

Anexo B.

CONTROL FOTOGRAFICO DE DIAFANIZACIÓN

PROCEDIMIENTO: _____

SEMANA 1
SEMANA 2
SEMANA 3
SEMANA 4
SEMANA 5

Anexo C

COMITÉ DE ETICA

ACTA DE EVALUACION No 076-14



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

CE - 013
ACTA DE EVALUACIÓN: N°. 076-14
Fecha: 26 de junio de 2014

Nombre completo del proyecto "ELABORACIÓN DE MATERIAL DOCENTE MEDICINATE LA TÉCNICA DE DIAFANIZARÍAN PARA LA ENSEÑANZA DE LA MORFOGÉNESIS ÓSEA".

Versión número: 01

Sometido por: el estudiante Jonathan Coronado Casallas

Presentado por: el profesor Jaime Alfonso Beltrán Guerra Coordinador

Departamento o Sección: Departamento de Morfología de la Facultad de Medicina

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 26 de junio de 2014

EL COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACION DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acta No. 43 del 5 de diciembre de 1996 actualizado mediante resolución 008 (acta 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

El Comité de Ética de la Facultad de Medicina certifica que:

1. Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:

- ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
- ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron el trabajo)
- ✓ Copia del proyecto completo de investigación,
- ✓ Dos resúmenes ejecutivos
- ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerite).
- ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto
- ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
- ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)

2. El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

- | | | |
|---|--------------------------------|---|
| 1 | Amador Luis Roberto | Departamento de Patología |
| 3 | Arteaga Díaz Clara Eugenia | Departamento de Obstetricia y Ginecología |
| 4 | Figueredo Vargas Shirley | Asesora Jurídica Facultad de Medicina |
| 6 | Guerrero Fonseca Carlos Arturo | Presidente Comité de Ética |
| 7 | Parra Pineda Mario Oriando | Departamento de Obstetricia y Ginecología |

Elb/ Jeannette P. Al.-

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401
Teléfono: (57-1) 316 5251 Conmutador: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 - 15008
Correo electrónico: eticasalud_fmbog@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
SEDE BOGOTÁ
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

3. El Comité consideró que el presente estudio:

- a. Es válido desde el punto de vista ético.
- b. El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger animales experimentales son adecuadas

4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:

- a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
- b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:

- a. Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- b. Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité

6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.

7. El Investigador principal deberá:

- a. Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA) excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- b. Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- c. Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética), de acuerdo con la normatividad que el INVIMA a generado a este respecto.
- d. Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- e. Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- f. Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
- g. Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance integrado.
- h. Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

8. Observaciones:

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite **Concepto Aprobatorio**.

Nombre: CARLOS ARTURO GUERRERO FONSECA
Título: PhD Doctorado en Bioquímica, MD en Farmacología y MSc. en Genética Humana
Cargo: Presidente Comité de Ética

E/b/, Jeannette P. AL-

16. BIBLIOGRAFÍA.

Bulfon, M., Carabajal, M., & Porcari, C. (Noviembre de 2012). Diafanización y tinción diferencial de hueso y cartílago en embriones y pequeños vertebrados. H. Rios (Presidencia), I Jornada Virtual Nacional e Internacional de Educacion e Investigacion en Ciencias Morfologicas, Cordoba, Argentina.

Carlson, B. M. (2005). Embriología Humana y Biología del Desarrollo (pp.173-193). España: Elsevier.

Concha, I. (2006). *Diafanizacion*. Universidad Santo Tomas:Unidad de Anatomia veterinaria. Recuperado de www.anato.cl/global/9-tecanatomicas/diaf/9Agd0001.pps

E-centro. (2013). *Alizarina, Historia, Estructura y propiedades, Aplicaciones*. Recuperado de http://centrodeartigos.com/articulos-utiles/article_102851.html

Eternod, R. M. (2010). *Osteologia infantil*. Recuperado de <http://www.monografias.com/trabajos90/osteologia-infantil/osteologia-infantil.shtml>

Euro Chlor. (2014). Hidroxido de potasio. Recuperado de <file:///C:/Users/JONATHAN/Downloads/hidr%C3%B3xido%20pot%C3%A1sico%20GPS.pdf>

Hernández, A. (2012). *Diafanización en fetos de gato*. Recuperado de <http://prezi.com/2lesnenuryid/diafanizacion/>

IPCS INCHEM. (1999). *ACETONE*. Recuperado de <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/67641.pdf>

La Guía. (2010). *quimica.laguia2000*. Recuperado de <http://quimica.laguia2000.com/compuestos-quimicos/glicerol#ixzz3GX1xZops>

MedlinePlus en español. (2014). Craneo del recién nacido. Recuperado de http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/1127.htm

Mejía, C. A. (2013). Secuencia de aparición de centros de osificación en embriones y fetos bovinos mediante la técnica de diafanización y tinción ósea con alizarina. Recuperado de <http://es.slideshare.net/caliya1953/diafanizacion-y-tincin-sea-con-alizarina>

Mikolji, I. (2010, Julio 11). Diafanizado [Archivo de video]. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=eQSljTRcihY>

Ministerio de Salud de la República de Colombia. (2010). *Resolucion N° 008430 DE 1993*. Recuperado de Universidad de la Sabana http://www.unisabana.edu.co/fileadmin/Documentos/Investigacion/comite_de_etica/Res__8430_1993_-_Salud.pdf

Moore, K. L., Persaud, & Torchía, M. G. (2013). Sistema esquelético. Embriología Clínica. España: Elsevier Saunders, (pp. 159-360).

Pedro Henrique Duarte França De Castro, J. V. (2013). Evaluation of marginal leakage of different temporary restorative materials in Endodontics. *Contemp Clin Den*, 4(4), 472–475. doi: 10.4103/0976-237X.123045

Persia, F., Vera, M., Mariani, M., & Penissi, A. (2010). *Cámara de dióxido de carbono: optimización de un método para eutanasia de ratas de laboratorio*. Universidad Nacional de Cuyo. Recuperado de <http://www.fcm.uncu.edu.ar/jornadas2010/index.php/articulos/view/135>

QuimiNet. (2011). La glicerina y sus usos en la industria farmacéutica. Obtenido de <http://www.quiminet.com/articulos/la-glicerina-y-sus-usos-en-la-industria-farmacéutica-2583383.htm>

Reyes Rios, V. d., & Vanesa del Carmen, A. A. (2012). *Diafanización de embriones de Codorniz como experiencia didáctica*. Primer Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas. Congreso llevado a cabo en la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Recuperado de <http://www.morfovirtual2012.sld.cu/index.php/morfovirtual/2012/paper/view/109>

Rodríguez Baeza, A. (2004). *Determinación mediante técnicas de corrosión, diafanización y microscopía electrónica de barrido de los territorios vasculares arteriales, con especial referencia a la irrigación de la médula espinal*. Universidad Autónoma de Barcelona. Recuperado de <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ZcmIHMdrHeQJ:www.raco.cat/index.php/RevistaRAMB/article/download/71183/91011+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gl=co> .

Sadler, T. W., & Langman, J. (2011). Embriología Médica. Argentina: Lippincott Williams & Wilkins.

Tamayo LJ, S. P. (2012). Modelo didáctico del desarrollo del embrión de pollo con diafanización modificada de Dawson y técnica de maquillaje. *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 25:620-624. Recuperado de <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/825/914>

Tilotta F, L. B. (2009). A study of the vascularization of the auricle by dissection and diaphanization. *Surgical And Radiologic Anatomy* 31:259–265. Recuperado de http://www.unboundmedicine.com/medline/citation/19023512/A_study_of_the_vascularization_of_the_auricle_by_dissection_and_diaphanization_

Villegas, A. C., Quiroga, M. D., & Cleves, D. (2012). *Diafanización: visualización del desarrollo óseo en fetos*. Recuperado de <http://www.pdfio.com/k-3611418.html>

