

**LA ALIZARINA EN EL ESTUDIO Y CLASIFICACION DE LAS ESCAMAS
SU UTILIDAD EN EL ESTUDIO DEL SISTEMA ESQUELETICO DE
PECES, ANFIBIOS Y AVES**

Por: Gonzalo Estrada C. (1)

RESUMEN

Se establecen técnicas que permiten:

1. *Teñir y diferenciar claramente los tipos de escamas del teleosteo *Astyanax fasciatus* y del selacio *Rhizoprionodon terranovae*.*
2. *Diferenciar tejido óseo en ranas y pollos.*

INTRODUCCION

El uso de sustancias con propiedades tintoriales, se remonta al siglo XVI. El informe más antiguo aparece en *De Miraculis Oculis Naturae* (1951) publicado por L. Lemnius, quien anota que la raíz de la rubia teñía el hueso. En 1736 John Belchier experimentó con dicha raíz y confirmó tal observación. En 1853, utilizando hidróxido de sodio, Beale transparentó el primer embrión humano. En 1866, Strecker descubrió la fórmula de la alizarinaina ($C_{14}H_8O_4$)(2), la cual fue confirmada por Graebe y Lieberman en 1968, quienes produjeron alizarina sintética. En 1897, con los trabajos de O. Schultze, se inicia la técnica de maceración y clarificación de los tejidos blandos de los especímenes, por medio de hidróxido de potasio 10/o y glicerina. En 1906, Mall introdujo la técnica de Schulze en América, tratando los especímenes con solución de 1 parte de alizarina en 10.000 partes de KOH 10/o. En 1929, Ignalsi usó formol como fijador y en 1934 G. Hollister trabajó con peces grandes y observó que la penetración de la alizarina en los huesos densos es más lenta y que los peces de aguas profundas, específicamente los isospondilos, sólo toman trazas de alizarina en algunas porciones de su esqueleto, por ejemplo las aletas. Se sabe también que los otolitos no se tiñen con la alizarina. Según Signor Bercighi del Museo de Paleontología de Florencia, los otolitos contienen 94.870/o de carbonato de calcio y sólo 0.350/o de fosfato de calcio. Al analizar los huesos se ve que su mayor componente es el fosfato de calcio con sólo una pequeña cantidad de carbonato de calcio. El hueso humano es 850/o de Ca_3PO_4 y sólo 100/o de $CaCO_3$.

La tabla I muestra el contenido de sales de calcio en las vértebras de algunos peces.

TABLA I

Contenido de sales de calcio en las vértebras de algunos peces

Especie	Fosfato de Calcio	Carbonato de Calcio
Bacalao	57.650/o	4.810/o
Lucio	38.700/o	14.300/o
Salmón	36.740/o	1.010/o
Anguila	32.700/o	3.640/o

Tomado de Hollister G. (1935).

Los datos anteriores muestran cierta correlación concerniente a la afinidad química de la alizarina con el fosfato de calcio del hueso y también la aparente incapacidad del carbonato de calcio para absorber la alizarina en ciertas partes del esqueleto de los peces de las profundidades del mar (Hollister, 1935).

En 1934, Hollister utilizó la luz ultravioleta para aclarar los tejidos y para remover el exceso de alizarina y pigmentos del cuerpo. También se ha utilizado la luz solar para tal fin.

(1) Profesor de Embriología Dpto. de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
(2) La Alizarina corresponde a 1-2 dihidroxiantraquinona.

En 1939, Cumley clarific6 espec6menes con toluol saturado con naftaleno e igualmente aceite de anis saturado con naftaleno.

En el mismo a6o, Sayles ti6o con alizarina tegumento de *Squalus acanthyas*. Anot6 que su t6cnica es 6til para el estudio de escamas as6 como para su clasificaci6n, pero no es buena para Fotomicrografas.

En 1946, Williams utiliz6 escamas de tele6steos para te6irlas *insitu*. En 1948, y en vista de los problemas que para su tinci6n representaban espec6menes como aves, debido a la gran cantidad de grasas y prote6nas que poseen, True ide6 una t6cnica para eliminarlas por medio de: glicerina, agua destilada y alcohol de 95o/o, en partes iguales. Adem6s, us6 soluci6n acuosa de pesina al 10o/o, incubaci6n a 40°C e inyecci6n de cellosolve.

Como hace notar Hollister, (1939) con la alizarina es posible estudiar estructuras como barbas, tent6culos, filamentos de la cabeza en peces de las profundidades marinas, espinas cortas y r6dios de las aletas a veces ocultos y s6lo visibles cuando se transparenta el ejemplar. La direcci6n y las estructuras de la l6nea lateral se aprecian as6 m6s f6cilmente. Los fot6foros de la piel y las aletas, as6 como su n6mero y distribuci6n, no se habfan podido ver de otro modo. El pez *Dolichopteryx* se consider6 sin escamas hasta cuando fue te6ido y transparentado. Se puede ver el esmalte que cubre la dentina debido a que permanece sin tomar la alizarina.

Aunque nunca se han observado otolitos te6idos por la alizarina, se pueden localizar f6cilmente por contraste con el color de los huesos del cr6neo. La escamas placoides o dent6culos d6rmicos de los selacios, son estructuras de inte-

r6s particular para el anatomista comparativo, ya que en los vertebrados primitivos como los placodermos, la superficie externa de la piel presenta crestas formadas por una substancia parecida a la dentina, una cavidad profunda o de la pulpa y una capa superficial dura y brillante como el esmalte del diente.

Toda la cresta recordaba bastante al diente y es muy probable que los dientes de los animales actuales provengan de dichas crestas.

MATERIALES Y METODOS

Para este trabajo se utiliz6 el siguiente material

TECNICA A.

1. Los peces cartilaginosos y 6seos, se fijaron previamente en formol 8o/o y 10o/o respectivamente, durante 7 d6as.
2. Se tomaron de ellos pedazos de piel ventral los que se colocaron en soluci6n de hidr6xido de potasio al 3o/o durante 3 d6as, renovando la soluci6n cada 12 horas.
3. Se separaron luego a una soluci6n colorante formada por soluci6n alcoh6lica saturada de alizarina en hidr6xido de potasio al 2o/o durante dos d6as.
4. Se deshidrataron a trav6s de dos cambios de cellosolve cada dos horas.
5. Se colocaron luego en soluci6n 25o/o y 75o/o de salicilato de metilo en cellosolve.
6. Se inmergieron en salicilato de metilo puro en donde permanecieron indefinidamente o se montaron peque6os cortes en portaobjetos usando b6lsamo de Canad6. (Figs. 1 y 2).

TABLA 2

No. de espec6menes	Especie	Edad de gestaci6n presentada	Perfodo normal de gestaci6n
1*	Pez <i>Rhizo- prionodon terranovae</i>	No hay datos de edad	
15*	Peces <i>Astyanax fasciatus</i> .	No hay datos de edad	
16	Pollos <i>Gallus gallus</i>	Adultos	20 d6as a 21
10	Ranas <i>Hyla sp.</i>	Adultos	79 d6as a 81

* Los anteriores espec6menes fueron suministrados por la Escuela Nacional de Ciencias Biol6gicas de M6xico D.F., Secci6n de Ictiolog6a.



Figura 1:
Fotomicrograf6a de piel ventral de *Rhizoprionodon terranovae*.



Figura 2:
Fotomicrografía de piel de *Astyanax fasciatus*. Se ven claramente las escamas y los radios teñidos.

7. En Anatomía Comparada, el estudio de las escamas es de gran importancia y, con esta técnica, se puede identificar todo tipo de escamas incluyendo las especializadas de la línea lateral.

TECNICA B.

1. Ranas *Hyla sp* y pollos se fijaron en alcohol de 96o/o durante 18 días.
2. Se transfirieron a hidróxido de potasio al 5o/o, calentando gradualmente hasta 60° C durante 11 minutos.
3. Se pasaron a solución de alcohol 70o/o a la que se le agregó 10 gotas de hidróxido de amonio durante un día para lavar el tejido.
4. Se pasaron luego a alcohol de 96o/o durante 5 días.
5. Se pasaron a hidróxido de potasio al 2o/o durante 7 días.
6. Se transfirieron a una solución de hidróxido de potasio al 2o/o a la que se le agregó, por gotas, solución alcohólica saturada de alizarina durante un día.
7. Se asaron a glicerina al 50o/o por un día, 60o/o por un día, 80o/o dos días y se guardaron definitivamente en glicerina pura a la que se le agregaron unos cristales de fenol. (Fig.3).

Una vez concluidas las técnicas descritas anteriormente, se procedió a la observación microscópica de algunos especímenes. Para ello se siguieron las técnicas histológicas usuales tales como: Técnica de Nissl, de toluidina, de alizarina, de hematoxilina eosina, Klüver Barrera e impregnación argéntica.

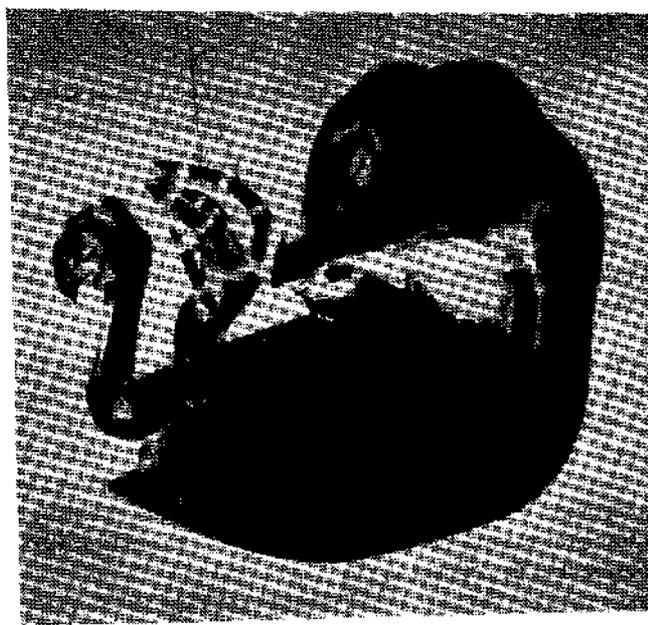


Figura 3:
Pollo procesado de acuerdo a la técnica B donde se ve claramente los centros de osificación.

En el aspecto histológico se utilizó piel ventral de pez y de tiburón. Las fotomacrorraffas y las fotomicrografías fueron tomadas directamente de los especímenes preparados. Para ello se empleó cámara Pentax ssp 500 con lentes Super Tukamar de 50 mm. con fuelle de extensión. Para aumentar la distancia focal, se utilizaron tubos de extensión de 9.5 m. 19 mm y 28.5 mm. Se usó filtro IA para tratar de corregir la aberración cromática producida por la luz fluorescente que se usó en la transiluminación, para lo cual se utilizó un negatoscopio.

Al someter los especímenes preparados a la luz, y a la oscuridad se confirmó que no se alteraba la coloración aplicada.

En las técnicas descritas se usó, además, el siguiente material:

1. Trípode metálico.
 1. Termómetro.
 1. Bombilla de 100 vatios General Electric.
 1. Microscopio de disección marca Zeiss.
- La alizarina empleada fue de la casa Carlo Erba de Milán.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

1. Se confirmó el poder tintorial irreversible de la alizarina una vez fijada en el hueso y en las escamas.
2. Se vió que la alizarina roja utilizada en este trabajo es insoluble en agua destilada.

3. Se comprobó que se puede usar con éxito formol al 8 y al 10o/o o alcohol al 96o/o como fijadores para este tipo de trabajos.
4. En la técnica B se obtuvieron buenos resultados empleando hidróxido de potasio al 5o/o y calentando hasta 60°C, pero cuando se calentó hasta la ebullición, se destruyeron algunos especímenes utilizados con tal propósito.
5. La técnica en piel de peces dio resultado positivo aplicable al campo de la Ictiología. Esta técnica permite:
 - a) Clasificar los diferentes tipos de escamas.
 - b) Realizar provechosas prácticas de laboratorio y obtener buenas fotomicrografías (Figs.4,5 y 6)

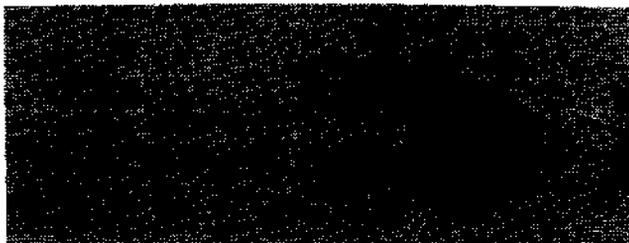


Figura 4:
Teleosteo procesado y guardado como pieza de demostración. Se observan todas sus estructuras óseas por transparencia.

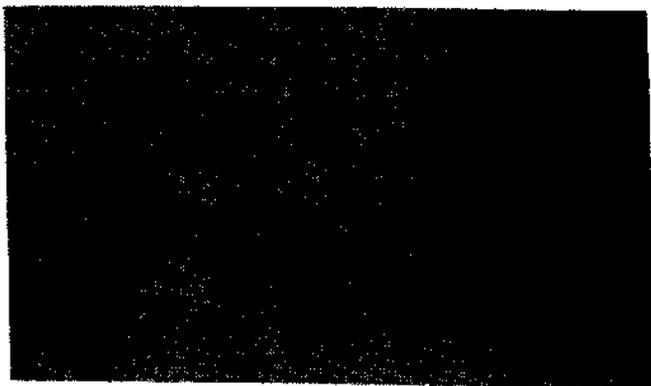


Figura 5:
Fotomicrografía de piel de *Astyanax fasciatus*.

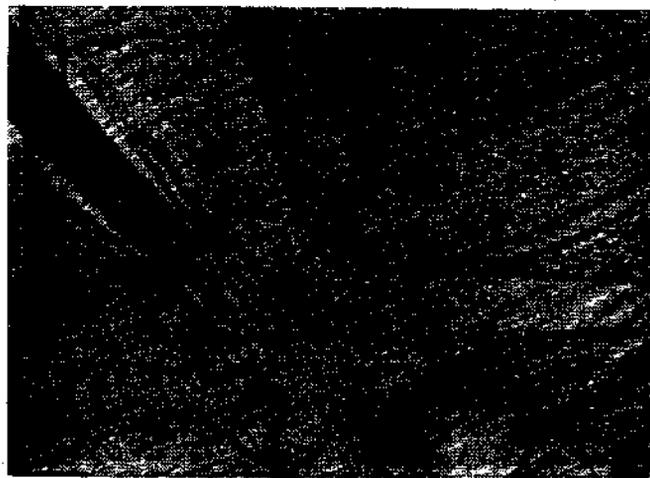


Figura 6:
Fotomicrografía de escamas y radios de *Astyanax fasciatus* (tomada y aumentada de la figura 2).

DISCUSION

Hay controversia acerca de la fijación de los especímenes para trabajos de este tipo. Dos de los fijadores más usados son el formol al 10o/o y el alcohol de 96° Dawson (1906) y Lipman (1935) por ejemplo, utilizaron alcohol, Williams (1946) encontró que tejidos fijados durante una semana en formol al 10o/o, pueden manejarse mejor durante la maceración con hidróxido de potasio. También anota que los tejidos fijados en alcohol corren constante peligro de llegar muy pronto al punto de maceración total que ocasiona destrucción de la pieza. Además, dicha destrucción rara vez ocurre si son fijados en formol y no se requiere una vigilancia constante para prevenirla; también Williams (1946) y Sedra (1948) emplearon formol. En este trabajo se utilizaron ambos fijadores con éxito. Cumley y Griffin (1939) anotan que el método de aclaramiento con glicerina parece no producir la transparencia obtenida en preparaciones aclaradas en varios aceites. Obtuvieron buenos resultados al utilizar hidróxido de potasio y glicerina con peces muy delgados

CONCLUSIONES

1. Aunque algunos autores (Cumley, 1939), Dawson (1926), Lipman (1935) prefieren y recomiendan el uso del alcohol como fijador, otros (Mall (1906) Sedra (1950), Williams (1948) hacen lo mismo con el formol. (4)
2. Según Estrada (1972), tanto el formol al 8o/o como al 10o/o, así como el alcohol 96o/o utilizados adecuadamente, son buenos fijadores, para este tipo de trabajos (4).
3. De acuerdo con el tiempo (72 meses más o menos) que llevan teñidos algunos de los especímenes de este trabajo y por las observaciones hechas por Hollister

en esqueletos de los peces igualmente teñidos y guardados durante varios años, podemos concluir también que no se decoloran.

4. A pesar de los anotados por algunos autores (1,5) la alizarina utilizada por nosotros no es soluble en agua destilada (4).
5. El uso de hidróxido de potasio, alizarina y cellosolve para aclarar, teñir y deshidratar respectivamente, tiene ventajas sobre otros métodos en los que los especí-

menes son macerados y sus huesos son separados y tratados. Dichas ventajas son: a) no hay pérdida de huesos pequeños, b) Los huesos permanecen en su posición original, c) se identifican fácilmente, d) una vez concluido el trabajo, los huesos se pueden desarticular y e) se pueden procesar muchos animales simultáneamente sin peligro de que se mezclen sus huesos.

6. Una de las ventajas de la alizarina sobre otros colorantes es que la tinción de las superficies ósea es irreversible, y otra es la simplicidad de su preparación (3).

BIBLIOGRAFIA

1. Cumley, R. W. J. F. Crown and A. B. Griffin. 1939. "Clearing specimens for the demonstration of bone". Stain Techn. 14:7-11.
2. Dawson, A. B. 1926. "A note on the staining of the skeleton of cleared specimens in alizarin red S". Stain Techn. 1:123-4.
3. Estrada C. G., 1972. "El Transparentado de especímenes y tinción de su sistema esquelético", Tesis de M.Sc. Escuela Superior de Medicina, México D.F.
4. Estrada C. G., 1973. "El Transparentado de especímenes y su utilidad en ciencias biométricas". Antioquia Médica, V.23: 381-396, No. 7-8.
5. Hollister, G. 1934. "Clearing and dyeing fish for bone study". Zoológica 10:89-101.
6. Lipman, H. J. 1935. "Staining the skeleton of cleared embryos with alizarin red S". Stain Techn. 10:61-63.
7. Mall, F. P. 1906. "On ossification Centers in Human Embryos less than one Hundred Days old". Am. J. Anat. 5:433-58.
8. Noback, y R. Charles 1944. "Demonstrating the osseous skeleton of human embryos and fetuses". Stain. Techn. 12:77-79.
9. Sayles, L. P. 1939. "Alizarin red D. Techn. applied to elasmobranch integument". Stain Techn. 13:143-4.
10. Sedra, S. N. 1948. "Making dry preparations of vertebrate material". Stain Techn., 25: 205-7.
11. True, R. M. 1947. "Staining of embryonic and small mammalian skeletal systems." Stain Techn. 22:107-8.
12. Williams, T. W., 1946. "The differentiation of placoid, ctenoid and cycloid scales by means of alizarin red S." Stain Techn. 21:55-8.
13. Vilman, H. 1969. "The in vivo Staining of bone with alizarin red S." J. of Anat. 105:533-45.