



Técnica de diafanización para describir el desarrollo embrionario del sistema óseo. Revisión de la literatura*

DAVID SANDOVAL, JELUA TÉLLEZ¹, ANGÉLICA GARCÍA,
GUILLERMO RIVERA², SANDRA MORENO², FREDDY MORENO²

Cómo citar: Sandoval D, Téllez J, García A, Rivera G, Moreno S, Moreno F. Técnica de diafanización para describir el desarrollo embrionario del sistema óseo: revisión de la literatura. Univ Med. 2016;57(4):488-501. doi: <http://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.umed57-4.tddd>

Resumen

Introducción: La técnica anatómica de diafanización consiste en transparentar los tejidos blandos de organismos vertebrados (aclaramiento), para teñir los tejidos mineralizados y poder visualizar los componentes óseos y cartilagosos (tinción). **Objetivo:** Revisar los reportes disponibles en la literatura especializada que han descrito el desarrollo embrionario del sistema óseo de mamíferos a través de técnicas de diafanización y tinción simple o tinción doble. **Materiales y métodos:** Se revisó la literatura sobre el tema en PubMed, Google Académico y SciELO, basándose en la metodología PRISMA, a través de la asociación del término *double staining* con los descriptores en salud del Medical Subject Headings (MeSH) *alizarin red*, *alcian blue*, *bone* y *cartilage*, y la combinación con los operadores booleanos + y &. **Resultados:** En esta revisión de la literatura se incluyeron 22 artículos que describieron la técnica de diafanización y tinción simple o tinción doble empleada en la observación, registro y análisis del

* Esta revisión de la literatura deriva del proyecto de investigación *Atlas histológico del desarrollo embrionario —estadios de Witschi— de la rata albina Wistar (Rattus norvegicus)*, el cual fue financiado a través de la Convocatoria Interna de Investigaciones Capital Semilla 2014-2015 de la Pontificia Universidad Javeriana (Cali, Colombia).

- 1 Programa de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana, sede Cali, Colombia.
- 2 Departamento de Ciencias Básicas de la Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana, sede Cali, Colombia.

Recibido: 15/02/2015

Revisado: 19/02/2015

Aceptado: 13/05/2015

desarrollo embrionario del sistema óseo de mamíferos. **Conclusión:** La diafanización y tinción simple o tinción doble es una técnica anatómica de estudio —versátil y de bajo costo— del desarrollo embrionario del sistema óseo, la cual puede emplearse en estudios toxicológicos, para descartar la posibilidad de anomalías de desarrollo durante la formación del cartilago (condrogénesis) y del hueso (osteogénesis), asociadas a la exposición de un posible agente teratógeno.

Palabras clave: anatomía comparada, desarrollo embrionario y fetal, desarrollo óseo, hueso, cartilago.

Title: Diaphanization Technique for the Description of the Embryonic Development of the Skeletal System. Systematic Literature Review

Abstract

Introduction: The anatomic diaphanization technique consists in the transparency of soft tissues of vertebrate organisms (clearing), in order to dye the mineralized tissue and visualize bone and cartilage (staining). **Objective:** To review the reports available on specialized literature that describes the embryonic development of mammal's skeletal system through the diaphanization technique and simple staining or double staining processes. **Materials and methods:** A literature review was made on PubMed, Academic Google and SciELO, based on PRISMA, through the association of the term *double staining* with the health descriptors of the Medical Subject Headings (MeSH) *alizarin red*, *alician blue*, *bone* and *cartilage*, and the combination of the Boolean operators + and &. **Results:** There were included 22 articles that described the diaphanization technique and the simple staining or double staining technique used in the observation, registration and analysis of the embryonic development of mammal's skeletal system. **Conclusion:** The diaphanization technique and simple staining or double staining technique is

an anatomic study technique—versatile and of low cost—of the embryonic development of mammal's skeletal system, which may be used in toxicology studies, discarding the possibility of developmental anomalies during the cartilage or bone formation (chondrogenesis and osteogenesis, respectively) associated to the exposure to a possible teratogenic agent.

Key words: comparative anatomy, embryonic and fetal development, bone development, bone, cartilage.

Introducción

La diafanización o transparentación es una técnica de conservación anatómica que transparente (despigmenta o aclara) los tejidos blandos para equilibrar el índice de refracción de la luz dentro de un organismo y fuera de este, y que tiñe (pigmenta) los tejidos mineralizados para visualizar los componentes óseos y cartilagosos. El fundamento de la técnica se basa en: 1) fijar el espécimen con formol o alcohol mediante la formación de enlaces cruzados entre las proteínas y la inactivación de enzimas autolíticas para impedir la degradación *post mortem* de los tejidos y para mantener la citomorfología de las células; 2) llevar a cabo la diafanización propiamente dicha, con la cual se transparentan los tejidos blandos con una solución alcalina altamente corrosiva de hidróxido de potasio, que deshidrata los tejidos mediante una reacción de óxido-reducción; 3) teñir los tejidos mineralizados que quedaron expuestos en la diafanización con colorantes que tengan alta afinidad

por los tejidos mineralizados, por lo general rojo de alizarina para tejido óseo y azul alción (etanol y ácido acético glacial) para tejido cartilaginoso; y 4) conservar la muestra diafanizada con los tejidos mineralizados teñidos en una solución de glicerina y alcohol [1].

Esta técnica anatómica de observación de los tejidos mineralizados —dirigida principalmente a la tinción del tejido óseo con rojo de alizarina—, inicialmente, la desarrolló Schultze, en 1897 [2], y posteriormente la modificaron diferentes investigadores, como Mall, en 1906 [3]; Dawson, en 1926 [4]; Lipman, en 1935 [5]; Cumley y cols., en 1939 [6]; Gamble, en 1945 [7]; True, en 1947 [8]; Staples y Schnell, en 1964 [9]; Jensch y Brent, en 1966 [10], y Kawamura y cols., en 1990 [11] (figura 1).

Finalmente, Simons y VanHorn, en 1971 [12]; Inouye, en 1976 [13]; Whittaker, en 1979 [14]; Kimmel y Trammel, en 1981 [15]; McLeod, en 1980 [16]; Boardman y cols., en 1984 [17], y Webb y Byrd, en 1994 [18], desarrollaron una técnica de doble tinción en la que, además de teñir el tejido óseo con rojo de alizarina, se incluyó la tinción del tejido cartilaginoso con azul alción, lo que se constituyó en un método ideal para estudiar la osificación endocondral durante el desarrollo embrionario (figura 2). De igual forma, Williams, en 1941 [19], y Burdi, en 1965 [20], emplearon una técnica de doble tinción con rojo de alizarina y azul de toluidina.

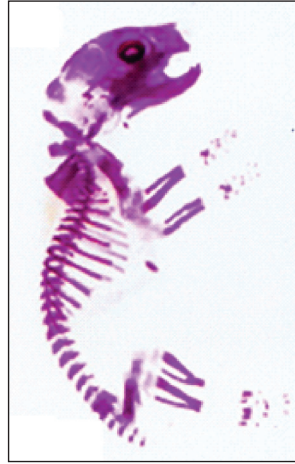


Figura 1. Neonato de ratón preparado con la técnica de diafanización y tinción simple (rojo S de alizarina: tejido óseo)

Fuente: modificado de Philbrick WM. Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption [PowerPoint Slide for Teaching]. PNAS [internet]. 1998;95(20):11846-51. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/95/20/11846/F1.expansion.html>

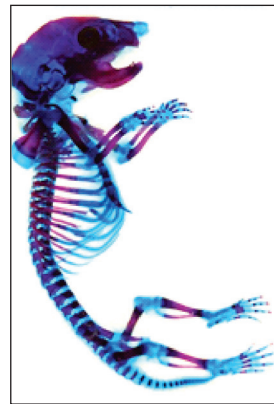


Figura 2. Feto de ratón preparado con la técnica de diafanización y tinción doble (rojo S de alizarina [tejido óseo] y azul alción 8 GX [tejido cartilaginoso])

Fuente: modificado de Sylva M, Li VSW, Buffing A, Van Es J, van der Born M, van der Velden S, Gunst Q. The BMP Antagonist Follistatin-Like 1 Is Required for Skeletal and Lung Organogenesis [figure 3]. PLoS ONE [internet]. 2011;6(8). Disponible en: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0022616#pone-0022616-g003>

A partir de Dawson, si bien la técnica de tinción de los tejidos mineralizados se ha mantenido, la técnica de diafanización se ha modificado con el propósito de corroer o macerar de una forma más eficiente los tejidos blandos. Así, en la actualidad, las técnicas de diafanización de mayor uso son la modificada de Dawson, en la que los tejidos son fijados y deshidratados en alcohol al 70%, transparentados con hidróxido de potasio y aclarados con hidróxido de amonio y glicerina; y la de Dawson-Shultze, en la que los tejidos son fijados indistintamente en alcohol o en formol, y son transparentados en una solución de glicerina e hidróxido de potasio al 15% [21].

Este perfeccionamiento de la técnica de diafanización y el empleo de la doble tinción ha permitido el estudio del desarrollo embrionario del sistema óseo de los vertebrados, debido al contraste que se genera entre los tejidos óseo y cartilaginoso durante la morfogénesis, a partir de los centros de osificación intramembranosa y endocondral. Ello permite, además, desarrollar estudios de embriología y anatomía comparadas, con lo cual se han determinado las implicaciones evolutivas de los vertebrados [22-25].

Además, la posibilidad de la técnica de diafanización ha resultado de gran utilidad, dada su relativa rapidez y bajo costo, para desarrollar estudios de teratogénesis por citotoxicidad a partir de

la comparación de las anomalías congénitas del desarrollo del sistema óseo en diferentes biomodelos animales [14]. Se tiene como estándar la descripción con la misma técnica del desarrollo normal [26-28], de tal forma que se ha podido identificar en qué momento del desarrollo embrionario se evidencian las alteraciones morfofuncionales del hueso y el cartílago [29].

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue revisar los reportes disponibles en la literatura especializada que han descrito el desarrollo embrionario del sistema óseo a través de técnicas de diafanización.

Materiales y métodos

Se revisó literatura sobre el tema en las bases bibliográficas electrónicas PubMed, Google Académico y SciELO, a partir de la metodología PRISMA [30], a través de la asociación del término *double staining* con los descriptores en salud del Medical Subject Headings (MeSH) *alizarin red*, *alcian blue*, *bone* y *cartilage*, y la combinación con los operadores booleanos + y &.

Se incluyeron artículos que describen el desarrollo embrionario del sistema óseo a través de técnicas de diafanización y que emplean el método de tinción simple con rojo de alizarina para tejido óseo, o el método de tinción doble con rojo de alizarina para el tejido

óseo y azul alcían para el tejido cartilaginoso. En total se seleccionaron 22 artículos identificados en las bases de datos electrónicas, por medio de los títulos, de los resúmenes y de las palabras clave, de los cuales se extrajeron los datos requeridos: autores, año, biomodelo mamífero, objetivo del estudio, técnica empleada y conclusión.

Resultados

De acuerdo con la metodología PRISMA, se obtuvieron 443 artículos, de los

cuales se excluyeron 401 (sin contar las referencias duplicadas), porque no describían el desarrollo embrionario del sistema óseo de mamíferos. De las 42 referencias tenidas en cuenta, 17 se excluyeron porque no describieron el desarrollo de los tejidos óseo y cartilaginoso a través de la técnica de diafanización con tinción simple o tinción doble (figura 3). Finalmente, se seleccionaron 22 artículos que cumplieron con los criterios de inclusión y cuya información fue organizada en la tabla 1.

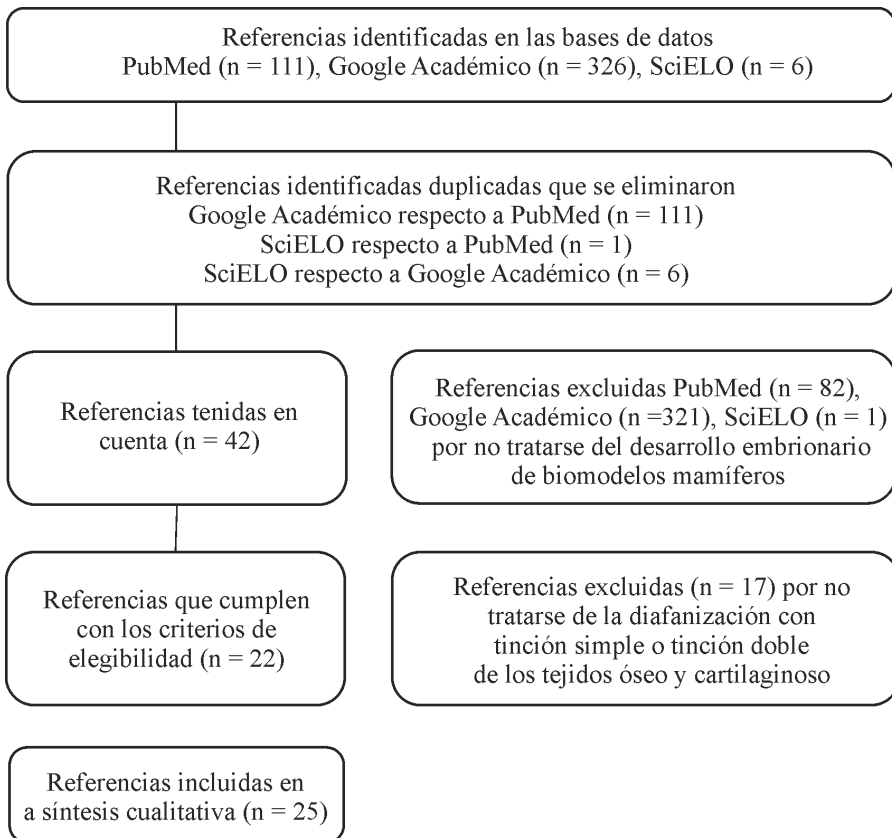


Figura 3. Búsqueda de referencias de acuerdo con la metodología PRISMA

Tabla 1. Organización de las referencias tenidas en cuenta según los criterios de inclusión

Autor	Año	Modelo	Objetivo	Técnica	Conclusiones
MC Green [21]	1952	Ratón	Demostrar la existencia de hueso a partir de una tinción	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción simple con rojo de alizarina, mantenimiento con glicerina	La técnica empleada es efectiva para demostrar la existencia de hueso en los embriones de ratón
AD Randle [31]	1969	Ratón	Diseño de una secuencia de procesamiento en masa de especímenes para analizar el sistema óseo a través de diafanización	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción simple con rojo de alizarina, mantenimiento con glicerina y agua	La diafanización, tinción y mantenimiento masivo de especímenes de ratón se puede emplear en estudios de teratogénesis optimizando tiempo y costos
M Inouye [13]	1976	Ratón	Implementación de una técnica de diafanización con tinción doble para contrastar los tejidos óseos y cartilaginosa durante el desarrollo embrionario	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con plastinación y con glicerina	La diafanización y tinción doble permite describir el proceso de osificación endocondral, que permite la diferenciación del tejido óseo y del tejido cartilaginosa
PW Tipton y ME Burt [32]	1977	Rata y ratón	Estandarización de una técnica masiva de diafanización	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción simple con rojo de alizarina, mantenimiento con glicerina y alcohol	La diafanización, la tinción y el mantenimiento masivo de especímenes de ratón se puede emplear en estudios de teratogénesis, para optimizar tiempo y costos
J Whitaker y KM Dix [14]	1979	Rata	Implementación una técnica de diafanización y doble tinción para diferenciar el tejido óseo del tejido cartilaginosa durante el desarrollo embrionario	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con glicerina	La tinción de rojo de alizarina para tejido óseo y azul alcian para tejido cartilaginosa permite diferenciar estos dos tejidos durante el desarrollo embrionario del tejido óseo de ratas
MJ McLeod [16]	1980	Ratón	Adaptación de la técnica de diafanización y doble tinción de Inouye en embriones de ratón	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con glicerina	La tinción de Inouye modificada de rojo de alizarina para tejido óseo y azul alcian para tejido cartilaginosa empleadas permite diferenciar estos dos tejidos durante el desarrollo embrionario del tejido óseo de ratón
JP Boardman y cols. [17]	1984	Rata	Adaptación de la técnica de diafanización y doble tinción en embriones de rata	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y ácido acético para cartilago, mantenimiento con glicerina	La diafanización y tinción doble de rojo de alizarina para tejido óseo y ácido acético para tejido cartilaginosa (de color púrpura) permite diferenciar estos dos tejidos durante el desarrollo embrionario del tejido óseo de ratón

Autor	Año	Modelo	Objetivo	Técnica	Conclusiones
CA Kimmel y C Trammel [15]	1981	Roedores	Implementación una técnica de diafanización y doble tinción simultánea para diferenciar el tejido óseo del tejido cartilaginoso durante el desarrollo embrionario	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con glicerina	La tinción de rojo de alizarina para tejido óseo y azul alcian para tejido cartilaginoso empleadas simultáneamente durante el protocolo permite diferenciar estos dos tejidos durante el desarrollo embrionario del tejido óseo
GN Webb y RA Byrd [18]	1994	Roedores	Implementación una técnica de diafanización y doble tinción para diferenciar el tejido óseo del tejido cartilaginoso durante el desarrollo embrionario de utilidad en estudios de toxicología	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian (combinado con tálato de hidrógeno de potasio) para cartilago, mantenimiento con glicerina	La tinción de rojo de alizarina para tejido óseo y azul alcian modificado para tejido cartilaginoso permite diferenciar estos dos tejidos durante el desarrollo embrionario del tejido óseo
D Trueman y cols. [33]	1999	Rata y conejo	Implementación una técnica de diafanización y doble tinción para diferenciar el tejido óseo del tejido cartilaginoso durante el desarrollo embrionario de utilidad en estudios de toxicología	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con glicerina	La tinción de rojo de alizarina para tejido óseo y azul alcian para tejido cartilaginoso permite diferenciar estos dos tejidos durante el desarrollo embrionario del tejido óseo
BG Redfern y cols. [24]	2007	Ratón y rata	Descripción del tejido cartilaginoso durante el desarrollo embrionario de ratón y de rata	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con glicerina	La tinción con azul alcian resulta fundamental al observar y describir el desarrollo del cartilago durante la osificación endocondral
N Cortés-Delgado y cols. [29]	2009	Roedores y murciélago	Descripción del sistema esquelético (cartilago y hueso) en dos especies de mamíferos	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con glicerina	La técnica empleada resultó efectiva para el estudio del sistema óseo en roedores y murciélago
Nagy y cols. [34]	2009	Ratón	Descripción de la osificación endocondral durante el desarrollo posnatal del ratón	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción simple con rojo de alizarina, mantenimiento con glicerina	La técnica permitió describir la osificación endocondral durante el desarrollo embrionario posnatal del ratón
D Ovchinnikov [35]	2009	Ratón	Descripción simultánea de los tejidos óseo y cartilaginoso durante el desarrollo embrionario del ratón	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con glicerina	Durante la osificación endocondral, el hueso y el cartilago se pueden describir simultáneamente a través del contraste de dos tinciones

Autor	Año	Modelo	Objetivo	Técnica	Conclusiones
JJ Rasweiler y cols. [36]	2009	Murcié-lago	Descripción del paso de cartilago a hueso durante el desarrollo embrionario del murciélago	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con glicerina	La doble tinción permitió determinar el paso de tejido cartilaginoso a tejido óseo durante el proceso de osificación endocondral en embriones de murciélago
LD Wise y CT Winkelmann [37]	2009	Conejos	Comparación en el desarrollo embrionario del sistema óseo entre el método de diafanización y tinción simple y el escaneo con microtomografía computarizada	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción simple con rojo de alizarina, mantenimiento con glicerina	El escaneo con microtomografía computarizada resultó ser más fiable al estudiar el desarrollo embrionario del sistema óseo y la aparición de anomalías congénitas asociadas a la acción de teratógenos en conejo
LD Wise y CT Winkelmann [38]	2009	Rata	Comparación en el desarrollo embrionario del sistema óseo entre el método de diafanización y tinción simple y el escaneo con microtomografía computarizada	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción simple con rojo de alizarina, mantenimiento con glicerina	El escaneo con microtomografía computarizada resultó ser más fiable al momento de estudiar el desarrollo embrionario del sistema óseo y la aparición de anomalías congénitas asociadas a la acción de teratógenos en rata
MM Setayesh y cols. [25]	2013	Rata	Comparar los métodos de plastinación y glicerina para mantener especímenes diafanizados y teñidos para estudiar el sistema esquelético	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con plastinación y con glicerina	La plastinación es una técnica que mantiene de mejor forma los especímenes diafanizados y teñidos en comparación con la glicerina
S Schneider [39]	2013	Ratón	Estudio de los efectos teratógenicos de pesticidas en el desarrollo del sistema óseo en embriones	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con plastinación y con glicerina	La diafanización y la técnica de tinción doble se constituye en una técnica adecuada para el estudio de anomalías congénitas de los tejidos óseo y cartilaginoso ante la acción teratógena de pesticidas en biomodelos animales
D Riqueur y KM Lyons [40]	2014	Ratón	Descripción del desarrollo embrionario y posnatal del sistema óseo de ratón	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con plastinación y con glicerina	La diafanización y la técnica de tinción doble permite describir el proceso de osificación endocondral durante el desarrollo embrionario y posnatal del ratón

Autor	Año	Modelo	Objetivo	Técnica	Conclusiones
L Revnaud y A Jocteur-Monrozier [41]	2013	Ratón, rata, conejo y cerdo pigmeo	Descripción del desarrollo embrionario del sistema óseo	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción simple con rojo de alizarina, mantenimiento con glicerina	La diafanización y la técnica de tinción simple permite examinar el tejido óseo durante el desarrollo embrionario de diferentes especies de mamíferos
D Trueman y J Stewart [42]	2014	Ratón	Estandarizar la técnica de diafanización y doble tinción para la observación del desarrollo embrionario del sistema óseo	Diafanización con hidróxido de potasio, tinción doble con rojo de alizarina para hueso y azul alcian para cartilago, mantenimiento con plastinación y con glicerina	La técnica de diafanización y doble tinción resulta de gran utilidad en estudios de toxicología durante el desarrollo embrionario de los tejidos óseo y cartilaginoso

Discusión

La osificación es un proceso del desarrollo embrionario de los mamíferos por el cual se conforma el tejido óseo (histogénesis) para constituir los huesos (morfogénesis). Dicho proceso ocurre por medio de dos vías: la osificación intramembranosa y la osificación endocondral. En la primera, el tejido óseo deriva directamente del mesénquima, como es el caso de la morfogénesis de los huesos planos; mientras que, en la segunda, el tejido óseo deriva de una plantilla de tejido cartilaginoso derivado del mesénquima, como es el caso de los huesos largos, los cuales siguen con su crecimiento y desarrollo durante la vida posnatal [43].

En el caso de la osificación endocondral, células del mesoderma en presencia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y proteína morfogénica de hueso (BMP) se diferencian

a células condroprogenitoras y estas, a su vez, a condroblastos, los cuales se agrupan en un centro de condricación, secretan la matriz extracelular cartilaginosa y quedan atrapados en esta, para diferenciarse en condrocitos. Una vez queda constituida una plantilla de cartilago hialino, esta crece por aposición (desde el pericondrio) o de forma intersticial (desde los grupos isógenos). Posteriormente, células mesodérmicas indiferenciadas del pericondrio se diferencian a células osteoprogenitoras, que dan paso al periostio. De allí, los condrocitos del cartilago hialino se hipertrofian y empiezan a secretar fosfatasa alcalina para cambiar el pH, de tal forma que las células osteoprogenitoras se diferencian en osteoblastos, los cuales cambian la matriz extracelular cartilaginosa a matriz extracelular ósea (osteoide) y luego depositan fosfatos y calcio para mineralizar dicha matriz, lo que ocasiona que los condrocitos atrapados experimenten muerte celular

programada al imposibilitarse su nutrición por agua de solvatación difundida desde lo que era el pericondrio. Este proceso, gradual y muy regulado, ocurre durante el desarrollo embrionario y el crecimiento y desarrollo posnatal, de tal forma que la plantilla de cartílago es totalmente remplazada por tejido óseo con la excepción del cartílago articular [43-47].

Por supuesto, este proceso puede verse afectado por diferentes factores genéticos y medioambientales (teratógenos) durante los diferentes niveles de diferenciación, razón por la cual se hizo fundamental estandarizar el desarrollo normal de la formación de tejido cartilaginoso desde el mesodermo (condrogénesis) y la formación de tejido óseo desde el tejido cartilaginoso (osteogénesis) a través de la osificación endocondral. Con este fin, la técnica de diafanización y tinción simple con rojo de alizarina desarrollada inicialmente por Schultze, Mall y Dawson, les ha permitido a diferentes investigadores describir el tejido óseo durante el desarrollo embrionario y posnatal [21,31,32,34,37,38,41], debido a que esta tinción tiene gran afinidad (en un pH básico) por los depósitos de calcio de la matriz extracelular ósea mineralizada [48].

Sin embargo, fue necesario incorporar otra técnica de tinción que permitiera contrastar el tejido cartilaginoso precur-

sor de la osificación endocondral, de tal forma que todo el proceso se hiciera visible desde la condrogénesis. El azul alcian cuenta con una gran afinidad por los glucosaminoglicanos (en un pH ácido) [49], los cuales abundan en la matriz extracelular cartilaginosa, principalmente en el matriz territorial alrededor de los condrocitos. Con ello, Simons y Van-Horn e Inouye desarrollaron una técnica de diafanización y tinción doble, rojo de alizarina para el tejido óseo y azul alcian para el tejido cartilaginoso, usada por diferentes autores para describir el proceso de osificación endocondral [13-18,24,25,29,33,35,36,39,40,42].

Finalmente, y debido al bajo costo de la técnica, la fácil estandarización del protocolo técnico y lo relativamente rápido de la obtención de resultados, la diafanización y tinción simple o doble se ha constituido en uno de los procedimientos de elección para estudios de toxicidad y acción teratógena durante los estudios experimentales de diferentes agentes de la industria agrícola, avícola, manufacturera y farmacológica, en lo referente al desarrollo embrionario del sistema óseo en biomodelos animales [1,18,37-39,50].

Conclusiones

Esta revisión hace un recorrido de la literatura especializada desde el origen de la técnica, las modificaciones del protocolo y sus posibles aplicaciones.

La diafanización y tinción simple o tinción doble es una técnica anatómica de estudio (versátil y de bajo costo) del sistema óseo durante su desarrollo embrionario y posnatal, la cual permite contrastar el tejido cartilaginoso y del tejido óseo durante el proceso de osificación endoncondral. De esta forma, la técnica descrita puede emplearse en estudios de 1) descripción del desarrollo del sistema esquelético con fines pedagógicos; 2) correlación de la aparición de los centros de condricación y de osificación con el crecimiento y desarrollo del organismo; 3) análisis de la correcta formación del cartílago (condrogénesis) y del hueso (osteogénesis); 4) estandarización de biomodelos vertebrados de desarrollo del sistema esquelético para estudios de embriología y de anatomía comparada; y 5) estandarización de biomodelos mamíferos para el estudio de anomalías congénitas de origen medioambiental ante la exposición de un posible agente teratogénico.

Conflictos de interés

Los autores del artículo hacen constar que no existe, de manera directa o indirecta, ningún tipo de conflicto de interés que pueda poner en peligro la validez de lo comunicado.

Referencias

1. Tamayo LJ, Suárez PA, Cano AI, Cuartas BA, Yepes SA, Mejía CA, Lenis YY. Didactic model of the chicken embryo development using modified Dawson's diaphanization and staining technique. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 2012;25(4):620-4.
2. Schultze O. Über herstellung and conservirung durchsichtigen embryonen zum stadium der skeletbildung. *Anat Anz.* 1897;13:3-5.
3. Mall FP. On ossification centers in human embryos less than 100 days old. *Amer Jour Anat.* 1906;5:433-58.
4. Dawson AB. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Stain Tech.* 1926;1:123-4.
5. Lipman HJ. Staining the skeleton of cleared embryos with alizarin red S. *Stain Tech.* 1935;10:61-3.
6. Cumley RW, Crow JF, Griffen AB. Clearing specimens for the demonstration of bone. *Stain Tech.* 1939;14:7-11.
7. Gamble JT. A combination bleaching-clearing agent and its use in the processing of "Spalteholz" preparations. *Stain Tech.* 1945;20:127-8.
8. True RM. Staining of embryonic and small mammalian skeletal systems. *Stain Tech.* 1947;22:107-8.
9. Staples RE, Schnell VL. Refinements in rapid clearing technique in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Technol.* 1964;39:61-3.
10. Jensch RP, Brent RL. Rapid schedules for KOH-clearing and alizarin red S staining of fetal rat bone. *Stain Technol.* 1966;41:179-85.
11. Kawamura S, Hirohashi A, Kato T, Yasuda M. Bone-staining technique for fe-

- tal rat specimens without skinning and removing adipose tissue. *Cong Anom.* 1990;30:93-5.
12. Simons EV, Van Horn JR. A new procedure for whole-mount alcian blue staining of the cartilaginous skeleton of chicken embryos, adapted to the clearing procedure in potassium hydroxide. *Acta Morphol Neerl Scand.* 1971;8:281-92.
 13. Inouye M. Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and alizarin red. *Congenit Anom (Kyoto).* 1976;16:171-3.
 14. Whitaker J, Dix KM. Double staining technique for rat fetus skeletons in teratological studies. *Lab Anim.* 1979;13:309-10.
 15. Kimmel CA, Trammel C. A rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone in fetal and adult animals. *Stain Technol.* 1981;56:271-3.
 16. McLeod MJ. Differential staining of cartilage and bone in whole mount fetuses by Alcian blue and alizarin red S. *Teratology.* 1980;22:299-301.
 17. Boardman JP, Mitala JJ, Carrano RA, Iuliucci JD. Cartilage staining technique for the examination of unskinned fetal rat specimens previously processed with alizarin red S. *Teratology.* 1984;30:383-4.
 18. Webb GN, Byrd RA. Simultaneous differential staining of cartilage and bone in rodent fetuses: an Alcian blue and alizarin red S procedure without glacial acetic acid. *Biotechnol Histochem.* 1994;69:181-5.
 19. Williams TW. Alizarin red S and toluidine blue for differentiating adult and embryonic bone and cartilage. *Stain Technology.* 1941;16:23-5.
 20. Burdi AR. Toluidine blue-alizarin red S staining of cartilage and bone in whole-mount skeletons in vitro. *Stain Technology.* 1965;40:45-8.
 21. Green MC. A rapid method for clearing and staining specimens for the demonstration of bone. *Ohio Journal of Science.* 1952;52(1):31-3.
 22. Marr MC, Myers CB, George JD, Price CJ. Comparison of single and double staining for evaluation of skeletal development: the effects of ethylene glycol (EG) in CD rats. *Teratology.* 1988;37:476.
 23. Erdodon D, Kadiodlu D, Peker T. Visualization of the fetal skeletal system by double staining with alizarin red and alcian blue. *Gazi Medical Journal.* 1995;6:55-8.
 24. Redfern BG, Wise LD, Spence S. An alternative alcian blue dye variant for the evaluation of fetal cartilage. *Birth Defects Res (Part B).* 2007;80:171-6.
 25. Setayesh MM, Esfandiari E, Rabiei AA, Hanaei MS, Rashidi B. Comparing two methods of plastination and glycerin preservation to study skeletal system after Alizarin red-Alcian blue double staining. *Adv Biomed Res.* 2013;2(2):19-23.
 26. Young AD, Phipps DE, Astroff AB. Large-scale double-staining of rat fetal skeletons using alizarin red S and alcian blue. *Teratology.* 2000;61:273-6.
 27. Menegola E, Broccia ML, Giavini E. Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. *Teratology.* 2001;64:125-33.
 28. Salaramoli J, Sadeghi F, Gilanpour H, Azarnia M, Aliesfehiani T. Modified double skeletal staining protocols with Aliza-

- rinred and Alcian blue in laboratory animals. *AMHSR*. 2015;13:76-81.
29. Cortez-Delgado N, Pérez-Torres J, Hoyos JM. Staining procedure of cartilage and skeleton in adult bats and rodents. *Int J Morphol*. 2009;27(4):1163-7.
 30. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JP. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *PLoS Med*. 2009;6(7):e1000100.
 31. Randle AD. Automation of skeletal staining in the evaluation of teratogenicity. *Laboratory Animals*. 1969;3:197-205.
 32. Tipton PW, Burt ME. A method for mechanized staining of rat and mouse fetuses for teratological examination. *Laboratory Animals*. 1977;11(4):265-7.
 33. Trueman D, Jackson SW, Trueman B. An automated technique for double staining rat and rabbit fetal skeletal specimens to differentiate bone and cartilage. *Biotech Histochem*. 1999;74(2):98-104.
 34. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. Alizarin red staining of post-natal bone in mouse. *Cold Spring Harb Protoc*. 2009;3.
 35. Ovchinnikov D. Alcian blue/alizarin red staining of cartilage and bone in mouse. *Cold Spring Harbor Protoc*. 2009;3. doi:10.1101/pdb.prot5170
 36. Rasweilier JJ, Cretokos CJ, Behringer RR. Alcian blue/alizarin red staining of cartilage and bone of short-tailed fruit bat (*Carollia perspicillata*). *Cold Spring Harb Protoc*; 2009;3. doi: 10.1101/pdb.prot5165
 37. Wise LD, Winkelmann CT. Evaluation of hydroxyurea-induced fetal skeletal changes in Dutch belted rabbits by micro-computed tomography and alizarin red staining. *Birth Defects Res (Part B)*. 2009;86:220-6.
 38. Wise LD, Winkelmann CT. Micro-computed tomography and alizarin red evaluations of boric acid-induced fetal skeletal changes in Sprague-Dawley rats. *Birth Defects Res (Part B)*. 2009;86(3):214-9.
 39. Schneider S. Skeletal examination by double staining for ossified bone and cartilaginous tissue. *Methods Mol Biol*. 2013;947:215-21.
 40. Riqueur D, Lyons KM. Whole-mount skeletal staining. *Methods Mol Biol*. 2014;1130:113-21.
 41. Revnaud L, Jocteur-Monrozier A. Skeletal examination by alizarin staining. *Methods Mol Biol*. 2013;947:201-13.
 42. Trueman D, Stewart J. An automated technique for double staining mouse fetal neonatal skeletal specimens to differentiate bone and cartilage. *Biotech Histochem*. 2014;89(4):315-9.
 43. Ross MH, Pawlina W. *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular*. 5a ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2007.
 44. Geneser F. *Histología*. 3a ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2000.
 45. Gartner LP, Hiatt JL. *Texto atlas de histología*. 3a ed. México: McGraw-Hill; 2008.
 46. Cui D. *Histología con correlaciones funcionales y clínicas*. Barcelona: Wolters Kluwer; 2011.

47. Lowe JS, Anderson PG. Stevens y Lowe histología humana. 4a ed. México: Elsevier-Mosby; 2015.
48. Meloan SN, Puchtler H, Valentine LS. Alkaline and acid alizarin red S stains for alkali-soluble and alkali-insoluble calcium deposits. *Arch Pathol.* 1972;93(3):19-27.
49. Dingerkus G, Uhler LD. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technol.* 1977;52(4):229-32.
50. Yamazaki Y, Yuguchi M, Kubota S, Isokawa. Whole-mount bone and cartilage staining of chick embryos with minimal decalcification. *Biotech Histochem.* 2011;86(5):351-8.

Correspondencia

Freddy Moreno

Departamento de Ciencias Básicas
de la SaludFacultad de Ciencias de la Salud
Pontificia Universidad Javeriana

Edificio Raúl Posada, segundo piso

Calle 18 # 118-250

Cali, Colombia

fmorenog@javerianacali.edu.co