

Optimización de un protocolo de diafanización para el estudio del desarrollo óseo en chame (*Dormitator latifrons*)

Optimization of a clearing and staining protocol for the study of skeletal development in chame (Dormitator latifrons)

Stephany Salazar-Guevara¹, Francisco Navarrete-Mier², Patricia Castillo-Briceno³

1 Grupo de Investigación Bioma Ecuatorial y Acidificación Oceánica EBIOAC, Facultad Ciencias de la Vida y Tecnologías, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí ULEAM. <https://orcid.org/0009-0004-4605-110X>

2 Grupo de Investigación Bioma Ecuatorial y Acidificación Oceánica EBIOAC, Facultad Ciencias de la Vida y Tecnologías, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí ULEAM. <https://orcid.org/0000-0001-5571-4527>

3 Grupo de Investigación Bioma Ecuatorial y Acidificación Oceánica EBIOAC, Facultad Ciencias de la Vida y Tecnologías, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí ULEAM. <https://orcid.org/0000-0001-9122-6002>

Autor de correspondencia: pat.castillobriceno@gmail.com

DOI: <https://doi.org/10.63804/CIBEN.25.icta.e9>

Resumen

El pez chame (*Dormitator latifrons*) tiene una alta relevancia en la acuicultura y pesca artesanal en Ecuador. Considerando la escasa información biológica base sobre esta especie, se estudia aquí la morfología y desarrollo mediante la técnica de diafanización, que permite observar el esqueleto a través de los tejidos. En chames juveniles de 9–16cm (n=6) se usó KOH 0.1N para transparentar los tejidos blandos, y se evaluó dos pigmentos para tinción ósea: Rojo no.40 y Rojo de alizarina. El Rojo de alizarina tuvo mayor especificidad para el tejido óseo por su afinidad con el calcio, con mejores resultados en la visualización e identificación de estructuras esqueléticas. Asimismo, se pudo observar calcificación de huesos en todas las tallas analizadas, lo que sugiere que este proceso se inicia antes de los 9cm de longitud. Este protocolo optimizado constituye así una herramienta eficaz para el estudio de peces de tamaño y anatomía similar.

Palabras clave: Diafanización, Histología, Peces, Calcificación.

Abstract

The chame fish (*Dormitator latifrons*) is highly relevant to aquaculture and artisanal fisheries in Ecuador. Considering the limited baseline biological information available for this species, its morphology and development were studied here using the clearing and staining technique, which allows skeletal observation through transparent tissues. Juvenile chame specimens measuring 9–16 cm ($n = 6$) were treated with 0.1 N KOH to clear soft tissues, and two bone-staining pigments were evaluated: Red No. 40 and Alizarin Red. Alizarin Red showed greater specificity for bone tissue due to its affinity for calcium, providing better results in the visualization and identification of skeletal structures. In addition, bone calcification was observed in all analyzed size classes, suggesting that this process begins before 9 cm in length. This optimized protocol therefore constitutes an effective tool for the study of fish species with similar size and anatomy.

Keywords: Clearing and staining, Histology, Fish, Calcification.

Introducción

El chame (*Dormitator latifrons*) es un pez con una amplia distribución natural en zonas costeras tropicales y subtropicales, desde el sur de Estados Unidos hasta el Perú. En Ecuador se encuentra en zonas de estuarios y humedales (Bravo y de la Cruz, 2019), principalmente en las provincias de Manabí, Esmeraldas, Guayas y Los Ríos, donde la población local la cultiva, pesca y consume como parte de sus tradiciones. Los estudios morfológicos y de producción sobre esta especie son necesarios para poder establecer programas de conservación y cría fundamentados (González-Martínez et al., 2020). Sin embargo, el conocimiento sobre esta especie es aún escaso, incluso sobre aspectos básicos de su biología y ciclo de vida, pese a la relevancia como recurso alimenticio y especie nativa.

La diafanización es una técnica que, a través de transparentar los tejidos blandos, permite visualizar estructuras óseas y cartilagosas aplicando tinciones específicas. No obstante, los protocolos no están optimizados por especie y talla, sino que se generalizan para grupos de peces (Romero y González, 2019), existiendo la necesidad de la puesta a punto según las características de especímenes a estudiar.

En este estudio se ajusta el protocolo de diafanización en chame y se comparan dos alternativas de tinción para determinar cuál ofrece mayor eficacia en la visualización de los componentes óseos en juveniles de *Dormitator latifrons*, lo que contribuirá al conocimiento

morfológico de esta especie.

Metodología

Los individuos a estudiar se obtuvieron por medio de granjas acuícolas de chames (chame-ras) dentro de la provincia de Manabí, en San Vicente. Se seleccionó peces entre 9 cm a 16 cm, a los que se les aplicó eutanasia por sobredosis de anestésico mediante inmersión en una solución de 70 ppm de eugenol en agua, durante 10 minutos, de acuerdo con protocolos de bienestar animal (Millán-Ocampo, et al., 2012).

Para el proceso de diafanización se empleó la técnica propuesta por Piovesana (2014), adaptada para peces. Se utilizó formol (formaldehído 37,74%), etanol, hidróxido de potasio (KOH), agua potable, glicerina, colorante rojo n°40 y rojo de alizarina. El procedimiento consistió en la aplicación de soluciones de KOH en diferentes concentraciones, seguidas de conservación en glicerina, con el fin de transparentar los tejidos blandos y exponer las estructuras óseas y cartilaginosas. La tinción se realizó utilizando rojo n°40 de grado alimenticio (Rodríguez y Algarilla, 2017) y rojo de alizarina (Hyote, 1960), empleados para resaltar los componentes óseos (Liutenko et al., 2023). Todo el proceso detallado se presenta en la tabla 1, donde se describe los pasos, tiempos y concentraciones utilizadas para cada etapa de la diafanización además de una comparativa entre las tinciones utilizadas.

Tabla 1. Comparativa de protocolos de diafanización con rojo n°40 y rojo de alizarina aplicados en juveniles de chame.

	Rojo n°40		Rojo de Alizarina	
	Solución	Tiempo	Solución	Tiempo
Fijación	Formaldehído 4%	2 días	Formaldehído 4%	1 día
Deshidratación	Etanol 70%	1 día	Etanol 70%	1 día
Transparentación / Diafanización	Solución acuosa de KOH al 5%	20 días	Solución acuosa de KOH al 5%	15 - 24 días
Tinción	Solución acuosa de KOH al 5% + 2 g de colorante rojo n°40.	2 días	Solución acuosa de KOH al 5% + 2 g de colorante rojo de alizarina.	2 días
Aclarado	Solución acuosa de KOH al 5% + Glicerina en proporción creciente desde 75:25 hasta 25:75	7 días por cada dilución	Solución acuosa de KOH al 5% + Glicerina en proporción creciente desde 75:25 hasta 25:75	20 días en la primera dilución y un día entre la segunda hasta la última dilución
Preservación	Glicerina 100%		Glicerina 100%	

Resultados y discusión

En este trabajo, presentamos por primera vez un análisis de las estructuras óseas en juveniles de *Dormitator latifrons* a través de un proceso de diafanización utilizando dos tinciones diferentes para las estructuras óseas, esta información es generada por primera vez para esta especie con resultados que evidencian su viabilidad en estos peces. Diversos autores que han empleado esta técnica han mencionado que el tiempo de exposición durante la tinción es menor en comparación con el utilizado en el presente estudio, lo que indica la necesidad de ajustar el tiempo de tinción de acuerdo con talla de los especímenes de interés.

Respecto a las tinciones, se puede observar que el rojo n°40 (fig.1A) efectivamente tiñe las estructuras óseas y el tiempo del protocolo para los resultados finales es igual entre tinciones, con un total de dos meses; pero la duración de la tinción del tejido con rojo n°40 es de aprox. dos meses, mucho menor que con el rojo de alizarina con la que se mantendría indefinidamente (fig.1B). Estas diferencias tendrían relación con la afinidad específica del rojo de alizarina con el calcio que se acumula típicamente en el tejido óseo (Kiernan, 1990). Asimismo, se observó diferencias cualitativas entre secciones anatómicas, por ejemplo, para identificar las estructuras determinantes del cráneo, que son: maxilares, premaxilares osificados, dentarios, paraesfenoides, etmoides laterales, vómer, proóticos, pteróticos, branquioestegals, opérculo, preopérculo, subopérculo, otolitos, cintura pectoral, cleitrum (Valdez-Moreno et al., 2009), huesos que aunque fueron visibles en ambas tinciones se visualizaron con mayor claridad y definición con el rojo de alizarina.

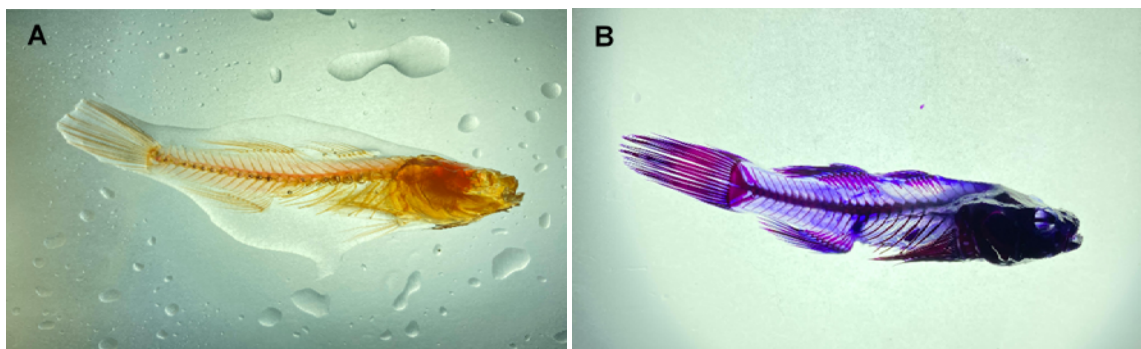


Figura 1. Resultado final de la diafanización en *Dormitator latifrons*, longitud total = 9cm, con tinción de rojo n°40 (A) y rojo de alizarina (B).

En el caso de la sección del tronco, las estructuras óseas principales como son: 3 espinas neurales, 9 vertebras torácicas, 18 espinas costales, 7 pterigóforos con 7 radios, aletas pectorales con 15 radios y las aletas pélvicas; fueron todas observadas en cada espécimen, en todas las tallas y para ambas tinciones. Es decir, que en esta sección el uso de rojo n°40 o rojo de alizarina son efectivos, probablemente debido a menor espesor en esta parte del cuerpo, que

facilitaría la penetración de los pigmentos hasta los huesos a través de los tejidos blandos.

En la sección más larga, la cola se identificó: 14 vertebras caudales, 9 pterigóforos dorsales con sus respectivos radios, 10 pterigóforos anales, un hypural con 15 radios principales y 8 radios secundarios en todos los peces, de lo cual se infiere que no existen cambios en la forma y tamaño de los huesos entre tallas. Al igual que en la sección torácica, en este segmento del cuerpo la identificación de sus estructuras ósea es igual para ambas tinciones, sin embargo, el espacio entre huesos por articulaciones cartilagosas se reconoce más definidamente con la tinción de rojo de alizarina.

Finalmente, no se encontró mayor diferencia de osificación entre tallas, lo que sugiere que los procesos de calcificación en *Dormitator latifrons* estarían ya iniciados a partir de los 9 cm de longitud o menos, lo que refuerza la idea de que esta especie posee un rápido desarrollo óseo, posiblemente vinculado a sus estrategias adaptativas en ambientes de transición (Vega-Villasante et al., 2021).

Conclusiones

La diafanización es una técnica eficaz para la observación de las principales estructuras óseas en chames, incluyendo las vértebras, el cráneo y los huesos de las aletas. Tanto como en especímenes de 9 cm y 16 cm se identifican patrones similares de osificación, lo que confirma la consistencia morfológica de la especie. En cuanto a la tinción, ambos pigmentos son funcionales; el rojo de alizarina mantiene la pigmentación en todas las fases del proceso, mientras que el rojo n°40 constituye una alternativa económica para observaciones de menor duración. El espesor de los organismos influye directamente en el tiempo, las concentraciones y la calidad de la tinción, lo que determina la necesidad de ajustar los procesos de pigmentación y transparentación según la talla y morfología de los especímenes.

Referencias bibliográficas

Bravo, Farías, C. D., & De La Cruz Balón, A. M. (2019). Caracterización morfométrica y merística del chame (*dormitator latifrons*) de producción silvestre para la conservación del recurso zoogenético endógeno, Manabí-Ecuador.

González-Martínez, A., Lopez, M., Molero, H.M., Rodríguez, J., González, M., Barba, C., & García, A. (2020). Morphometric and Meristic Characterization of Native Chame Fish (*Dormitator latifrons*) in Ecuador Using Multivariate Analysis. *Animals*, 10, 1805. <https://doi.org/10.3390/ani1010180>

Liutenko, M. A., Hromko, Y. A., Tretiakov, A. V., Myroshnychenko, M. S., Vovk, O. Y., Grigorenko, S. N., Upatova, I. P., Dekhtiarova, O. O., & Kadenko, I. V. (2023). History of origin, advantages and disadvantages, vectors of application of the diaphonization method: Current state of the problem. *Polski Mercuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 51(6), 632–637. <https://doi.org/10.36740/merkur202306109>

Hoyte D. A. (1960). Alizarin as an indicator of bone growth. *Journal of anatomy*, 94(Pt 3), 432–442.

Piovesana, M., Gerbasi, J., & Vigliano, F. (2014). Diafanización: Una técnica que permite la visualización diferencial de cartílago y hueso para el estudio del desarrollo y malformaciones en peces. *Revista de la Sociedad Argentina de Histotecnología*, 25(1), 10–14. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/31142>

Rodríguez, F., & Algarilla, D. (2012). Diafanización: Técnica Modificada por Solución Rojo Carmín. *Morfovirtual2012, Primer Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas*, 3. <http://www.morfovirtual2012.sld.cu/index.php/morfovirtual/2012/rt/printerFriendly/216/472>

Romero-Oliva, O. J., & González-Rodríguez, K. A. (2019). Optimización de la técnica diafanización y tinción de Piovesana (2014), aplicada para el pez *Gymnocorymbus ternetzi*. *PÄDI boletín científico de ciencias básicas e ingenierías del ICBI*, 7(13), 41–46. <https://doi.org/10.29057/icbi.v7i13.3424>

Vega-Villasante, F., Ruiz-González, L., Chong-Carrillo, O., Basto-Rosales, M., Palma-Cancino, D., Tintos-Gómez, A., Montoya-Martínez, C., Kelly-Gutiérrez, L., Guerrero-Galván, S., Ponce-Palafox, J., Valenzuela-Zapata, A., Musin, G., & Badillo-Zapata, D. (2021). Biology and use of the Pacific fat sleeper *Dormitator latifrons* (Richardson, 1844): state of the art review. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 49(3). <https://doi.org/10.3856/VOL49-IS-SUE3-FULLTEXT-2637>