

Técnica optimizada de diafanización y tinción: herramienta para estudios ecotoxicológicos en *Actinopterygios*

Diaphanization and staining optimized technique: Tool for ecotoxicological studies in *Actinopterygians*

Oscar Jesús Romero Oliva ¹; Elena María Otazo Sánchez ¹; Judith Prieto Méndez ²;
Francisco Prieto García ^{1,*}

1 Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Carretera Pacguca, Tulancingo km 4.5, Pachuca, Hidalgo, México.

2 Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias. Rancho Universitario, Tylancingo Hidalgo, México.

*Autor correspondiente: prietog@uaeh.edu.mx (F. Prieto Parcia).

ID ORCID de los autores

O. J. Romero Oliva:  <http://orcid.org/0000-0003-4440-8932>

E.M. Otazo Sánchez:  <http://orcid.org/0000-0001-9324-8926>

J. Prieto Méndez:  <http://orcid.org/0000-0002-0859-0901>

F. Prieto García:  <http://orcid.org/0000-0001-8878-3908>

RESUMEN

En el presente artículo de investigación, se genera una propuesta para la creación de una plataforma digital híbrida (tMOOC), que integre de manera exitosa xMOOCs y cMOOCs, para constituir de manera satisfactoria a los cuatro pilares de la educación, propuestos en el informe Delors. El trabajo está orientado a la enseñanza de una técnica histológica que permite transparentar tejidos blandos (diafanizar) y teñir de manera específica tejidos duros (hueso y cartílago), con la finalidad de enseñar osteología comparada de manera masiva y gratuita.

Palabras clave: Curso Masivo Abierto en Línea (MOOC); diafanización; tinción específica; pilares de la educación; modelos digitales.

ABSTRACT

In this research article, a proposal is generated for the creation of a hybrid digital platform (tMOOC), which successfully integrates xMOOCs and cMOOCs, to satisfactorily constitute the four pillars of education, proposed in the Delors report. The work is aimed at teaching a histological technique that makes it possible to make soft tissues transparent (diaphanize) and specifically stain hard tissues (bone and cartilage), in order to teach comparative osteology in a massive and freeway.

Keywords: Massive Open Online Course (MOOC); diaphanization; specific staining; pillars of education; digital models.

Recibido: 26-04-2021.

Aceptado: 23-05-2021.



Esta obra está publicada bajo la licencia [CC BY-NC 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

INTRODUCCIÓN

La diafanización o transparentación es una técnica de conservación anatómica que transparenta (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. 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, y posteriormente la modificaron diferentes investigadores, como Mall, en 1906; Dawson, en 1926; Lipman, en 1935; Cumley y cols., en 1939; Gamble, en 1945; True, en 1947; Staples y Schnell, en 1964; Jensch y Brent, en 1966, Kawamura y cols., en 1990, Webb y Byrd, en 1994 y así hasta nuestros días. 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 (Hernández et al., 2015). Ello permite, además, desarrollar estudios de embriología y anatomía comparadas, con lo cual se han determinado las implicaciones evolutivas de los vertebrados (Sandoval et al., 2016). Generalmente se cree que la contaminación de los ecosistemas tiene como única consecuencia la actividad humana, y a menudo, cae en la simple conclusión de asociar directamente la industria y la contaminación; Por esta razón, se olvida que no todas las industrias generan contaminantes y que también hay contaminación de origen natural.

La toxicología ambiental es una disciplina que está a cargo en gran medida del estudio de los efectos negativos para los organismos de diversos agentes químicos o biológicos en concentraciones y exposiciones variadas. También evalúa los riesgos toxicológicos en el medio ambiente (Szara et al., 2020).

La diafanización es una técnica histológica que hace que los tejidos blandos sean transparentes, permitiendo que la luz pase casi por completo. Para ello, se utiliza una sucesión gradual de compuestos químicos, de los cuales el principal es el hidróxido de potasio (KOH) ya que tiene una actividad altamente corrosiva, que confiere el aclaramiento de tejidos, con la excepción de tejidos duros como el hueso y el cartílago. Esta es una ventaja ya que después de la diafanización se aplica una técnica para manchar específicamente huesos y cartílago utilizando alizarin rojo y azul alcian respectivamente (Romero-Oliva y González-Rodríguez, 2019).

Sin embargo, hay varios métodos para llevar a

cabo la técnica de transparencia y tinción de los organismos, la mayoría comparten un consenso basado en tres etapas: fijación, transparencia y tinción (Tabla 1). Es importante mencionar que al final del método, hay soluciones post-tratamiento que mejoran el aspecto visual de los especímenes. Una de las principales aplicaciones de esta técnica se deriva para establecer centros de osificación de embriones y fetos animales y humanos, así como para comparar las características óseas de diferentes especies. En las pruebas toxicológicas, se utiliza con el fin de buscar malformaciones congénitas (Capó, 2003).

Los MOOCs (Massive Open Online Course) se consideran herramientas pedagógicas emergentes, mismas que se han integrado rápidamente al sistema educativo (Durall et al., 2012). Poseen características significativas, principalmente que son similares a una clase presencial (tienen fecha de comienzo/finalización y recursos evaluativos), son completamente digitales, no tienen criterios exclusivos para ingresar y permiten interacción masiva entre los participantes (Castaño y Cabero, 2013; Sandoval et al., 2016). Existen diversas categorizaciones de los MOOCs, la manera más parsimoniosa de clasificarlos se basa en tres modelos: xMOOCs, cMOOCs y tMOOCs. Ha transcurrido la primera década de los cursos masivos, abiertos y en línea (MOOC), sin duda la modalidad más avanzada de la educación en línea (Medina & Mercado, 2019). Este artículo es una primera aproximación al estudio de los equipos de enseñanza dentro del contexto de los cursos masivos, abiertos y en línea para las ciencias biológicas. Debido a la actual incorporación de la educación virtual en el mundo educativo, este trabajo presenta el diseño y la evaluación del massive online open course (Benet et al., 2018) para estas investigaciones en técnicas de diafanización.

Los xMOOCs son similares a las versiones tradicionales de aprendizaje (lectura, instrucción, redacción, análisis de textos...) pero en un formato completamente digital. Por otra parte, los cMOOCs no se enfocan en la presentación de contenidos formales, más bien en formar el aprendizaje colectivo sustentado en comunidades discursivas (Cabero et al., 2014). Finalmente, los tMOOCs, son una mezcla de los antes mencionados.

En el contexto de la investigación, es preciso mostrar los conceptos generales en los que gira la propuesta: Diafanización, tinción específica y osteología comparada. Al integrarlos, se proyecta la enseñanza de diversas vertientes biológicas con la finalidad de evitar abordar un tema de manera aislada, fomentando la integración de diversas disciplinas para resolver un problema, consolidando así, un aprendizaje significativo y útil en la vida profesional.

MATERIAL Y MÉTODOS

La diafanización (Figura 1) es una técnica histológica que permite transparentar los tejidos blandos de un organismo (Prieto et al., 2020), con la finalidad de exponer tejidos duros (hueso y cartílago). La técnica de diafanización es muy útil para los casos en los que se requiera determinar centros de osificación a partir de especímenes como embriones, fetos y mortinatos humanos o de otros animales, debido a que su esqueleto se encuentra en proceso de osificación endocondral y membranosa. Para lograrlo, se emplea una sucesión de sustancias corrosivas, principalmente hidróxido de potasio (KOH) (Romero y González, 2019) (Tabla 1).

Tabla 1

Consenso de la técnica de diafanización y tinción. Tomado y modificado de Romero-Oliva y González-Rodríguez (2019)

Fase	Objetivo	Reactivos
1. Fijación	Preservar la especie	Alcohol y formaldehído
2. Transparencia	Transparentar tejidos blandos	Hidróxico de potasio
3. Tinción	Teñir específicamente tejidos duros	Rojo de alizarina y azul de alcian
Solución de postratamiento	Mejora la apariencia	Solución clarificadora *

* 40 ml distilled water + 12 ml glycerin + 500 mg KOH + 1 ml H₂O₂



Figura 1. Osteictio diafanizado y teñido con rojo de alizarina. Tomado de Gallery Tomura (<https://www.pinterest.jp/pin/544443042430676299/>)

Posteriormente, se añade rojo de alizarina para teñir de manera específica el tejido óseo por medio

de quelación (Kiernan, 1990) y azul de alcian para la tinción cartilaginosa (Rivera et al., 2015). El proceso de diafanización se desarrolla en varias etapas, las cuales pueden ser reversibles en cualquier momento. En cada etapa se usan soluciones con reactivos que varían en concentración y proporción. El cumplimiento del objetivo de cada etapa debe ser evidenciado mediante una estricta y minuciosa observación y registros en bitácora por parte del investigador, porque solo las características físicas del espécimen, más que los tiempos de trabajo, serán los indicadores para avanzar secuencialmente en las fases del proceso de diafanización (Rivera et al., 2015).

Son muy aplicada para el estudio de malformaciones óseas y cartílago asociadas con ciertos contaminantes. En algunos trabajos, como el de Strecker et al. (2013) los efectos teratogénicos se investigan especialmente en el cartílago y la formación ósea. Para ello, utilizan el organismo *Danio rerio* expuesto durante 144 h al pesticida disulfiram (20-320 µg/L) y a la acylhidrato (0,375-12 g/L). Muestran que el disulfiram induce malformaciones de cartílago después de la exposición a ≥ 80 µg/L, mientras que la acylhidrazina causa alteraciones del cartílago a una concentración de 1,5 g/L.

La técnica de optimización de Romero-Oliva y González-Rodríguez (2019) consta de cinco etapas. La primera se refiere a la fijación de la muestra con alcohol para evitar la autólisis celular. El segundo se hace transparente los tejidos blandos con hidróxido de potasio. El tercero para manchar específicamente el tejido óseo con rojo alizarin. Las etapas cuarta y quinta consisten en mejorar el aspecto visual de los organismos con la solución clarificadora de Mall y reemplazar gradualmente la relación KOH-Glicerina hasta llegar al 100% de glicerina que sirve como conservante indefinidamente.

Por otra lado, el MOOC es un modelo educativo tecnopedagógico emergente, desarrollado en la modalidad en línea y caracterizado por el uso de los recursos de internet y las TIC; se centra en el estudiante, quien es el responsable directo y absoluto de su propio aprendizaje; es masivo, porque es una propuesta formativa dirigida a miles de participantes de modo simultáneo y abierto, por ser de acceso gratuito, es decir, porque cualquier persona puede acceder libremente a los contenidos digitalizados de los cursos sin otro requisito que su motivación para aprender. Por último, los MOOC se fundamentan en diferentes enfoques teóricos, como el conectivismo (cMOOC), el conductismo (xMOOC) y el constructivismo (tMOOC). Se realizó una comparación de plataformas para resaltar las características de xMOOC y cMOOC dentro de los pilares básicos del informe Delors (Tabla 2) (Moya, 2013).

Tabla 2

Características de plataformas digitales (xMOOC y cMOOC) y su relación con los pilares de la educación propuestos por Delors (1996)

Pilares de la Educación (Delors, 1996)	Plataformas	
	xMOOC	cMOOC
Aprender a conocer	Aprendizaje lineal centrado en la transmisión docente: Fundamentos teóricos de la técnica de diafanización y tinción por medio de análisis y comprensión de textos.	El aprendizaje es colectivo: Se brindan los temas de interés a tratar, los alumnos inscritos deberán recabar información, analizarla, compartirla y discutirla
Aprender a hacer	Aprendizaje pasivo: De la técnica realizada en laboratorio, con material audiovisual	Aprendizaje activo: Se intentará resaltar el aprendizaje haciendo "learningbydoing" Los estudiantes han identificado las técnicas y materiales necesarios para diafanizar un ejemplar de interés. Lo harán como evidencia y lo subirán en forma de video mientras lo realizan.
Aprender a vivir juntos	No se contempla este pilar en los MOOCs, puesto que están diseñados para el aprendizaje de manera individual	Debido a la conexión que se establece al compartir y discutir materiales por parte de los participantes, se implica una relación entre la comunidad del curso.
Aprender a ser	Se busca formación, desarrollo y aprendizaje significativo "longlifelearning". Dependerá en su totalidad del participante, ya que, al ser un programa independiente, puede o no desarrollarse.	En esta plataforma se refleja la existencia continua de interacción entre la comunidad participante. Se puede lograr un "longlifelearning"

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diafanizar organismos supone una ventaja para evitar la disección anatómica, ya que a simple vista es posible estudiar cambios morfo-anatómicos del sistema esquelético. Especialmente en ejemplares pequeños, ya que se pueden perder pequeñas piezas óseas al seccionarlos (Rivera-Cardona et al., 2015). El estudio de las diferencias y semejanzas entre diversos grupos biológicos ha sido fundamental para la filogenia. Comparar sistemas óseos brinda información importante para entender homologías biológicas entre organismos (Figura 2) (Rabb, 1967). Derivado de la enseñanza anatómica es preciso iniciar con la introducción de conceptos evolutivos implícitos. Recordando la máxima de Dobzhansky: "Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución".

Es evidente que en la mayoría de los modelos MOOC, el cimiento principal en el que se sustenta el diseño curricular es propiamente el conocimiento tratado como un producto. Esto se refleja en la unidireccionalidad al transmitir los contenidos digitales, que se traduce en una distancia cognitiva considerable entre el profesor y el alumno, más la dificultosa tarea de interacción entre los estudiantes inscritos por el carácter masivo del curso. Como consenso, se podrían generalizar los objetivos de los MOOCs en: Extensión de alcance por parte de las instituciones educativas, acceso masivo a la educación, creación de contenido económico e innovación en el proceso de enseñanza-aprendizaje. No obstante, derivado de la comparativa, es notoria la necesidad de implementar una plataforma híbrida (tMOOC) (Figura 3) para integrar las mejores herramientas de cada plataforma, con la finalidad de satisfacer cada pilar educativo, logrando así un longlifelearning, y evitando sesgos propios de cada plataforma individual.

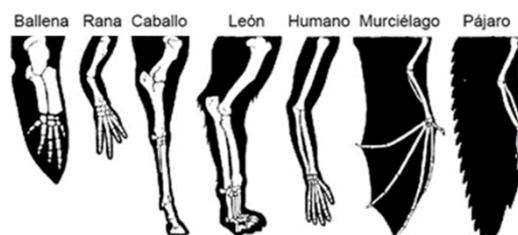


Figura 2. Osteología comparativa de miembros torácicos (Adaptado de Wagner, 2007).

La implementación de MOOCs en instituciones educativas puede extender el acceso a la educación y el alcance de la misma. Actualmente, son pocas instituciones educativas públicas y privadas que integran MOOCs. El problema radica en la poca seriedad con la que se han abordado dichas plataformas, pues existen controversias respecto a la funcionalidad de las mismas (Hollands & Tirthali, 2014; Moreano, 2019). Y es que las instituciones que ofertan educación virtual constantemente están en la búsqueda de las implicaciones éticas relacionadas con el comportamiento de los alumnos tras la pantalla. Al finalizar el curso propuesto en tMOOC, el alumno aprende la técnica correcta de diafanización y sus aplicaciones a nivel de investigación. El mayor obstáculo en la esfera ética es el compromiso del alumno por consolidar lo aprendido, pues resulta imposible evaluar de manera minuciosa a cada alumno en un curso abierto masivo.

La mayoría de los códigos de conducta en cursos digitales están enfocados en aspectos meramente reglamentarios, por lo cual se propone en este curso, implementar un código ético basado en la teoría de las cinco mentes del futuro (Gardner, 2008) (Figura 4), mismo que estará dirigido tanto a profesores como alumnos.

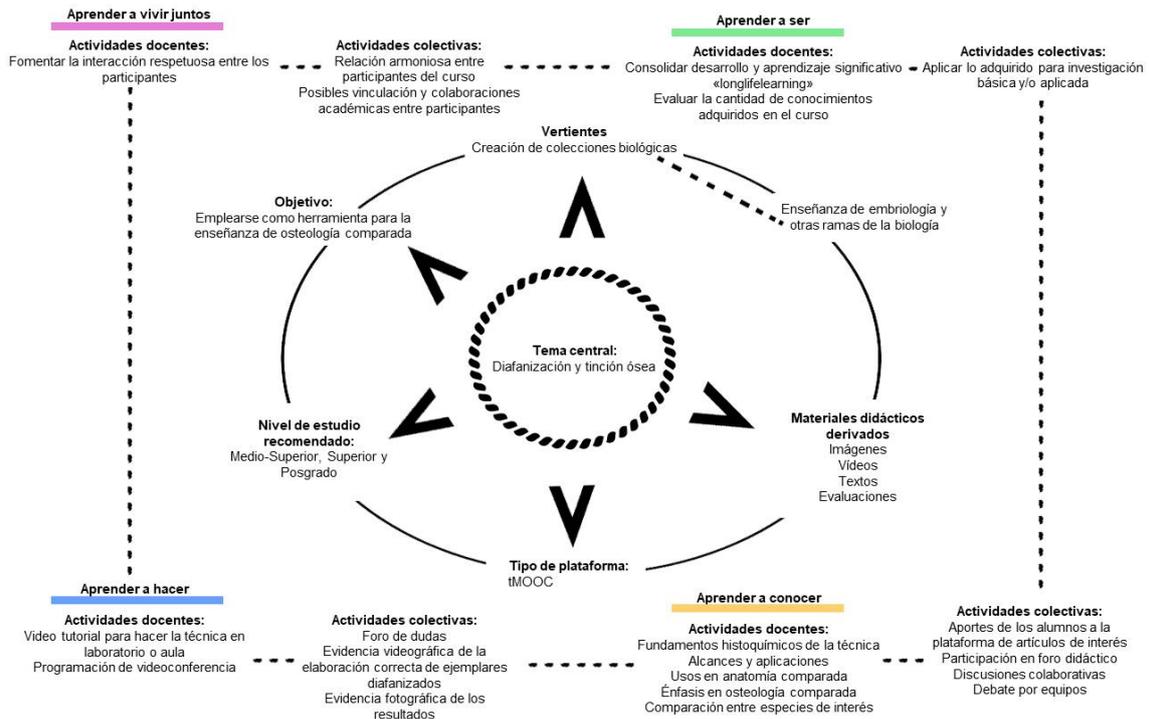


Figura 3. Propuesta de una plataforma tMOOC para la enseñanza de osteología comparada por medio de técnicas histológicas de transparentación.

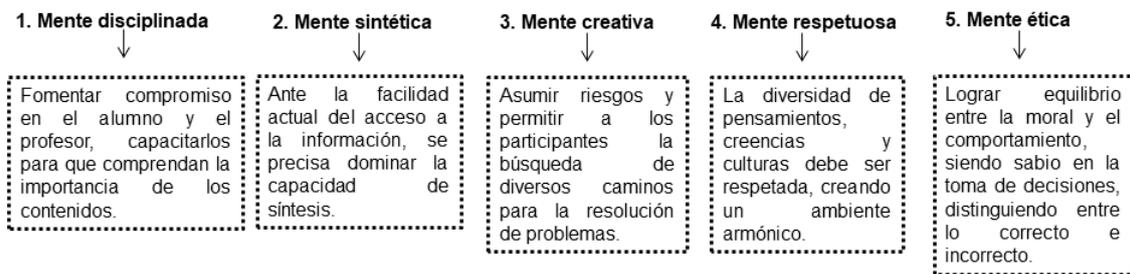


Figura 4. Código ético para los alumnos inscritos en el tMOOC.

CONCLUSIONES

Es muy importante mostrar los conceptos generales en los que gira la propuesta de las técnicas de diafanización, tinción específica y osteología comparada. La osteotoxicidad en vertebrados representa un problema que debe abordarse en la evaluación del riesgo futura. Marcado en políticas relacionadas con la salud de los ecosistemas, además de incluir cuestiones de neurotoxicidad, cardiotoxicidad, hepatotoxicidad, etc. Los estudios ecotoxicológicos proporcionan información sobre posibles riesgos de desarrollo y dosis-respuesta sobre el potencial osteotóxico, mediante la evaluación de manifestaciones de desarrollo anormal. Hay pocos estudios ecotoxicológicos, en altos niveles de organización como ecosistemas o poblaciones debido a la dificultad metodológica que implican. Se pueden generar proyectos relativamente baratos para estudiar parcialmente el potencial del riesgo toxicológico a nivel poblacional. Brindar un

curso orientado hacia la modalidad tMOOC, puede emplearse junto con otros modelos digitales y adaptarse fácilmente en modelos presenciales con mínimas modificaciones. Se deduce que el modelo de los MOOC representa un movimiento cultural mundial, respaldado por organismos internacionales como la ONU y apoyado en las TIC, los recursos de internet y las redes sociales; en dicho modelo destacan los REA, en los que todos pueden tener acceso a los contenidos de aprendizaje para su beneficio personal o laboral sin otra limitación que la propia motivación para aprender. En comparativa con otras estrategias virtuales de formación, la implementación plataformas digitales híbridas (tMOOCs), genera una mejora de la economía mediante la reducción de costos y aumento de matrículas. El aprendizaje de este tipo de técnica, basado en contextos de educación digital es una fuerza disruptiva y con oportunidades prometedoras. El uso apropiado de la

tecnología como plataforma para el aprendizaje ofrece una oportunidad para la modularización del sistema y, por consiguiente, para flexibilizar el aprendizaje.

La innovación en la enseñanza y el aprendizaje permitirá introducir de manera expansiva alumnos

interesados en dicho curso. Este tipo de plataforma educativa puede inspirar a diversas instituciones a generar cursos de contenido técnico-científico, ampliando bastamente los horizontes en la enseñanza de la biología y ciencia en general.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benet, A., Sanahuja Ribés, A., García Molina, I., & Nieto Garoz R. (2018). *Apertura*, 10(1), 88-103.
- Cabero, J., Llorente, M. C., & Vázquez, A. (2014). Las tipologías de MOOC: su diseño e implicaciones educativas. Profesorado. *Revista de Curriculum y formación del profesorado*, 18(1), 13-26.
- Capó, M. A. (2003). La ecotoxicología, una ciencia de hoy. *Medicina Balear*, 18, 101-104.
- Castaña, C., & Cabero, J. (2013). Enseñar y aprender en entornos mlearning. Madrid: Síntesis.
- Delors, J. (1996). L'éducation, un trésor est caché dedans. Odile Jacob.
- Durall, E., Gros, B., Maina, M., Johnson, L., & Adams, S. (2012). *Perspectivas tecnológicas: educación superior en Iberoamérica 2012-2017*. Austin, Texas: The New Media Consortium.
- Gardner, H. (2008). *Las cinco mentes del futuro*, edición ampliada y revisada. Barcelona: Ediciones Paidós Ibérica.
- Hernández-Gil, Y., Lara-Uc, M. M., & Reséndiz Morales, J. E. (2015). Comparación de técnicas de diafanización para la observación de estructuras óseas de crías de *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1824) (Reptilia, Cheloniidae). *Ciencia y Mar*, XXIV(56): 19-27.
- Hollands, F., & Tirthali, D. (2014). MOOCs: Expectations and Reality Full Report. Columbia: Center for Benefit-Cost Studies of Education.
- Kiernan, J. A. (1990). *Histological and histochemical methods. Theory and practice*. Second edition. Pergamon Press: Oxford. 433 pp.
- Medina, N. I., & Mercado, M. A. (2019). Equipos de enseñanza en MOOC: un acercamiento a cuatro universidades mexicanas. *Apertura. Revista de innovación educativa*, 11(1), 136-149.
- Moreano, S. A. (2019). Técnica de diafanización dental. *Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento*, 3(1), 724-741.
- Moya, M. (2013). La Educación encierra un tesoro: ¿los MOOCs/COMA integran los Pilares de la Educación en su modelo de aprendizaje on-line? *Scope Informe*, 2, 157-172.
- Prieto, F., Prieto, J., & Romero-Oliva O. J. (2020). La técnica de diafanización y tinción optimizada, como herramienta para estudios ecotoxicológicos en Actinopterygios. 4to Congreso Nacional de Investigación Interdisciplinaria. Bogotá: México: Ecoediciones. 71-76.
- Rabb, G. B. (1967). Comparative osteology and evolution of the lungless salamanders, family Plethodontidae. En Wake, David B (Ed), *Series: Memoirs of the Southern California Academy of Sciences*; v. 4.
- Rivera-Cardona, G., García, A., & Moreno, F. A. (2015). Técnica de diafanización con alizarina para el estudio del desarrollo óseo. *Rev. colombiana salud libre*, 10, 109-115.
- 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.
- Sandoval, D., Téllez, J., García, A., Rivera, G., Moreno, S., Moreno, F. (2016). Técnica de diafanización para describir el desarrollo embrionario del sistema óseo: revisión de la literatura. *Univ Med.*, 57(4), 488-501.
- Strecker, R., Weigt, S., & Braunbeck, T. (2013). Malformaciones cartilaginosas y óseas en la cabeza de embriones de pez cebra (*Danio rerio*) tras la exposición a disulfiram e hidrazida de ácido acético. *Toxicol. Apl. Pharmacol.*, 268, 221-231.
- Szara, M., Baran, A., & Klimkowicz-Pawlas, A. (2020). Ecotoxicological characteristics and ecological risk assessment of trace elements in the bottom sediments of the Rożnów reservoir (Poland). *Ecotoxicology*, 29, 45-57.
- Wagner, G. P. (2007). The developmental genetics of homology. *Nat. Rev. Genet.*, 8, 473-479.