

# Comparación de técnicas de diafanización para la observación de estructuras óseas de crías de *Lepidochelys olivacea* (Eschscholtz, 1824) (Reptilia, Cheloniidae)

Yoalli Hernández-Gil<sup>1</sup>, María Mónica Lara-Uc<sup>2</sup>, Jesús Eduardo Reséndiz Morales<sup>3</sup>

## Resumen

Dentro de la familia Cheloniidae, los adultos poseen un esqueleto óseo, formado de escamas, cubierto de piel y queratina; las crías presentan un caparazón coriáceo (presencia únicamente de dermis) permitiendo la aplicación de técnicas de diafanización. El principal problema en cuanto a la diafanización de crías de tortugas marinas es que no existe un proceso registrado adecuado para este tipo de organismo. A pesar de que se ha utilizado técnicas histopatológicas para observar los diferentes tejidos, estas no son adecuadas para la observación de los huesos. El objetivo de este trabajo fue probar tres diferentes técnicas de diafanización para estandarizar una para el caso de crías de tortuga golfina (*Lepidochelys olivacea*), lo anterior, sin dañar la anatomía del espécimen. Se diafanizaron noventa y nueve organismos tratados equitativamente mediante tres técnicas diferentes: Técnica de Dawson, Técnica de doble-tinción y Técnica de doble-tinción modificada sustituyendo Tripsina por Papaína. Se realizó una prueba de independencia de ji cuadrada obteniendo que la Técnica de Dawson y la Técnica de doble-tinción son las más efectivas para diafanizar este tipo de organismos; sin embargo, la técnica que más se recomienda es la de doble-tinción ya que a pesar de su elevado costo, arroja excelentes resultados.

**Palabras clave:** Doble-tinción, Técnica de Dawson, Tripsina, Papaína, Clarificación de tortugas.

## Abstract

Within the family Cheloniidae, adults have a bony skeleton formed by scutes, covered by skin and keratin. Hatchlings present a coriaceous shell (dermal shell) that allows the application of diaphanization techniques. One of the most problems with using diaphanization on marine turtle hatchlings is that a registered adequate process doesn't exist for this type of organism. Rather histopathological techniques have been used previously to observe different tissues, but they didn't being usefull for observing bones. The objective of this work was to compare different diaphanization techniques to standardize to the case of olive ridley turtle hatchlings (*Lepidochelys olivacea*) searching optimal results. Ninety-nine organisms were tested using three different techniques: Dawson technique, Double-staining technique and a modified Double-staining technique replacing Tripsin with Papain. Using independent t test applied to Chi2 statistical test, the Dawson technique and Double-staining technique are the most effective diaphanization techniques in this organism, but we recommend Double-staining technique because it shows excellent results.

**Key words:** Double-staining, Dawson Technique, Tripsin, Papain, Turtle clarification.

<sup>1</sup> Yoalli Hernández-Gil (Responsable) Universidad Autónoma de Baja California Sur. Departamento de Ciencias Marinas y Costeras. Carretera al Sur km 5.5 La Paz, B.C.S., México. C.P. 23080 Email: yohegi.91@gmail.com

<sup>2</sup> Dra. María Mónica Lara-Uc. Proyecto Salud de Tortugas Marinas. Departamento Académico de Ciencias Marinas y Costeras, Área de Conocimiento de Ciencias del mar y de la tierra. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Carretera al Sur KM 5.5. Apartado postal 19-B, C.P. 23080, La Paz, Baja California Sur, México.

<sup>3</sup> Dr. Jesús Eduardo Reséndiz Morales. Proyecto Salud de Tortugas Marinas. Departamento Académico de Ciencias Marinas y Costeras, Área de Conocimiento de Ciencias del mar y de la tierra. Universidad Autónoma de Baja California Sur. Carretera al Sur KM 5.5. Apartado postal 19-B, C.P. 23080, La Paz, Baja California Sur, México.

## Introducción

En el período Cretácico existieron cuatro familias de tortugas marinas: Toxochelyidae, Protostegidae, Cheloniidae y Dermochelyidae (Frazier 1999, Dick *et al.* 2004). Las dos últimas son las únicas que sobreviven actualmente, diferenciándose porque la familia Dermochelyidae son tortugas que poseen un caparazón sin placas o escamas y están cubiertas por una gruesa capa de piel; mientras que las tortugas de la familia Cheloniidae, presentan un caparazón con escudos o placas evidentes (Dick *et al.* 2004, Wyneken 2004). La familia Dermochelyidae, incluye sólo a una especie, *Dermochelys coriacea* y la familia Cheloniidae, incluye a seis especies: *Caretta caretta*, *Chelonia mydas*, *Eretmochelys imbricata*, *Lepidochelys kempii*, *Lepidochelys olivacea* y *Natator depressus* (Frazier 1999).

Todas las especies de tortugas marinas están protegidas legalmente ya que se encuentran en situación vulnerable, peligro de extinción o en peligro crítico de extinción (Márquez 1990, Abella-Pérez 2010); a nivel nacional están protegidas por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA), además de algunas leyes y programas, por ejemplo la Ley de Especies Amenazadas y el Programa Nacional de Protección, Conservación, Investigación y Manejo de Tortugas Marinas, mientras que a nivel internacional las protege The Secretariat of the Bonn Convention on Migratory Species (CMS), WWF, Committee of Environmental Protection, entre otras. Algunas causas que las han colocado en estas condiciones son la captura selectiva, captura incidental, la alteración y destrucción del hábitat, la contaminación marina, el consumo directo (tanto de juveniles, adultos y huevos), la proliferación de especies invasoras, los cambios en el clima y las enfermedades, entre otras (Marcovaldi & Chaloupka 2007, Viejobuena *et al.* 2012). Recientemente la mortalidad en crías ha aumentado debido a malformaciones resultantes de mutaciones y errores a la hora del desarrollo embrionario (Blaustein & Johnson 2003), por lo que se hace necesario el contar

con técnicas que permitan analizar estos problemas.

Para observar las malformaciones óseas que presentan los organismos, se utilizan distintas técnicas de diafanización, como la desarrollada por Hollister en 1934 que consistió en la tinción del hueso o tejido calcificado del esqueleto de peces con rojo alizarina. Esta técnica es aún de gran utilidad para realizar estudios esqueléticos porque proporciona gran claridad de la estructura interna en pequeños vertebrados (Conn 1960).

En 1926 Alden B. Dawson creó otra técnica de diafanización, la cuál ha sido modificada gran cantidad de veces, sin embargo actualmente es utilizada en pequeños vertebrados (Estrada *et al.* 2009). Otra de las técnicas que se ha utilizado es la de Taylor, que en 1967 empleó enzimas para aclarar el tejido de varios órganos de tamaño pequeño para ser teñidos posteriormente con el colorante azul alcian (Dingerkus & Uhler 1977).

Dingerkus y Uhler (1977), inventaron una técnica para aclarar la vista de estructuras internas en pequeños vertebrados, entre los que estaban crías de tortuga terrestre utilizando una enzima digestora llamada Tripsina.

Las técnicas de clarificación son distintas unas de otras, ya que utilizan diferentes reactivos y manejan tiempos desiguales durante los pasos que las integran, pudiendo ser sometidas a cambios o modificaciones para adaptarlas a cada tipo de organismo (Darias *et al.* 2010) debido a las diferencias en densidades de tejidos y complejidad de los organismos a ser estudiados.

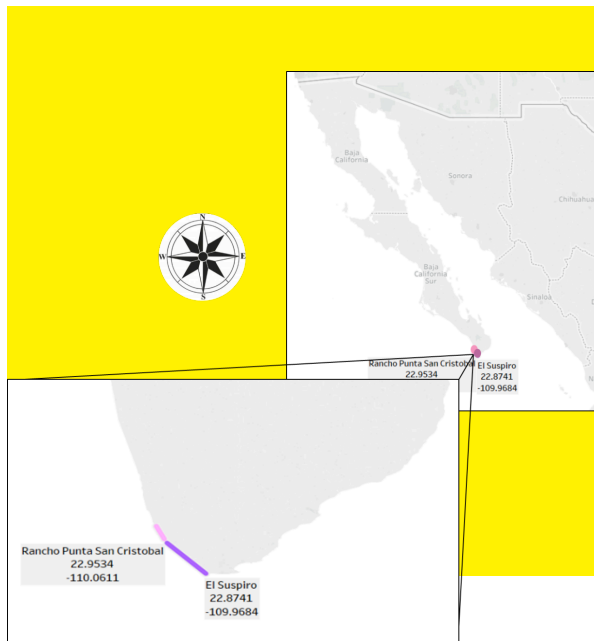
Para algunos grupos taxonómicos ya está establecida la técnica de diafanización que mejor se le adecua, sin embargo en el caso de las tortugas marinas aún no ha sido establecida por lo que se busca comparar y encontrar la mejor técnica para estos organismos.

## Material y métodos

### Área de estudio

Parte del trabajo se realizó en el campamento tortuguero Asociación Sudcaliforniana

de Protección al Medio Ambiente y la Tortuga Marina, A.C. de Los Cabos, B.C.S (ASUPMATOMA, A.C.), que tiene bajo su protección dos playas de anidación: Rancho Punta San Cristóbal (22°95'34'', 22°98'30''N y -110°06'11'', -110°07'88''E) de 5 km de longitud ubicado en el km 111 de la Carretera Federal #19 del tramo Cabo San Lucas - Todo Santos y El Suspiro (22°94'43'', 22°87'40''N y -110°05'50'', -109°96'83''E) de 16.5 km de longitud ubicado a la altura del km 119 (Fig. 1).



**Figura 1.** Área de estudio. Campamento tortuguero ASUPMATOMA A.C. donde se muestran las playas de anidación que tiene a su cargo en Baja California Sur: 1. Playas Rancho Punta San Cristóbal y 2. El Suspiro.

Las muestras de crías de la tortuga golfina (*L. olivacea*), se obtuvieron de los nidos del corral del campamento ASUPMATOMA A.C., cuando se revisaron los nidos del corral extra- yéndose las crías que murieron de causa natural y se colocó a cada espécimen en bolsas ziploc, mismas que fueron guardadas en una nevera con hielo para su transportación al laboratorio. Se obtuvo un total de 99 crías muertas durante la temporada de anidación 2014-2015 (permisos de colecta de la Dirección de Vida Silvestre-SEMARNAT, Oficio núm.

SGPA/DGVS/07211/14 y Oficio núm. SGPA/DGVS/01564/15).

Los ejemplares de tortuga golfina (*L. olivacea*) se trasladaron al laboratorio de oceanografía de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS), donde fueron descongelados para su procesamiento.

La diafanización, se logra con diferentes técnicas que igualan los índices de refracción de la luz interior del órgano con el individuo que lo contiene y así poder observar su estructura interna, principalmente su sistema óseo.

El total de las 99 crías se dividió en tres grupos: treinta y tres crías para la técnica de Dawson, treinta y tres crías para la técnica de doble-tinción y treinta y tres crías para la técnica modificada de doble-tinción utilizando semillas de papaya (Enzima Papaína). La técnica de doble-tinción original (Tripsina), se modificó sustituyendo la enzima Tripsina por la enzima Papaína, por lo que se consideraron dos técnicas diferentes (Dawson, Tripsina y Papaína).

Posteriormente los organismos fueron preparados mediante la técnica de extracción de órganos, la cual consistió en hacer una incisión a cada tortuga por la parte lateral del plastrón y retirar todos los órganos internos; se lavaron y se dejaron secar agregando una solución de boratos para eliminar el mal olor y conservar los organismos en las mejores condiciones posibles, para esto fueron colocados en frascos de vidrio con 150 ml de formol al 10% durante 3 días, pasado este tiempo se lavaron con agua para aplicar cada técnica.

### Técnica de Dawson

Se colocaron treinta y tres crías de tortuga golfina en 100ml de formol al 10% durante ocho días, haciéndose revisiones diarias. Posteriormente se lavaron directamente con agua, a continuación fueron puestas en frascos y se agregaron 100 ml de una solución sobresaturada de yodo en alcohol al 70% durante dos días. Cada vez que fueron cambiadas a distintas soluciones, se realizaron lavados con agua. Se colocaron en 100 ml de una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 2% durante

24 hrs. Se procedió al aclaramiento de tejidos blandos poniendo los organismos en 100 ml de una solución de KOH al 2% - 5%  $\text{NH}_4\text{OH}$  y glicerina al 100%, el tiempo se determinó hasta que se observó un cambio en la coloración de la piel, se realizaron revisiones diarias. Cuando se observó el cambio de color de piel, se colocaron en 100 ml de glicerina al 100% para asegurar la clarificación del ejemplar, esto fue hasta que se observó a contra luz la anatomía esquelética, considerándose una clarificación al 100%. Posteriormente se procedió a teñir en una solución de Azul alcian (100 ml) por espacio de 12hrs, pasado este tiempo, se cambió a un segundo colorante Rojo alizarina (100 ml) por 90 min. Para eliminar el exceso de los colorantes, los ejemplares se colocaron en alcohol al 96%, realizando de cinco a seis recambios. Se pusieron nuevamente en 100 ml de glicerina al 100% durante 60 días y finalmente se encapsularon con parafina en gel, esta se derritió y se les agregó a cada una de las tortugas en frascos.

#### *Técnica original doble-tinción (Tripsina)*

Se colocaron treinta y tres crías de tortuga golfinina en 100 ml de formol al 10% por 24 hrs. Posteriormente se lavaron con agua durante un día haciendo cambios cada dos horas hasta eliminar el formol, en seguida se pusieron en 100 ml de solución blanqueadora (véase preparación al final de la metodología) por cinco horas, posteriormente se colocaron en un primer colorante Azul alcian (100 ml) por dos horas. Se realizó una deshidratación del tejido con diferentes concentraciones de alcoholes, cada uno con una duración de una hora, empezando con la concentración de más alta a la más baja 96%, 96%, 96%, 75%, 40% y 15%, respectivamente. Posteriormente se colocaron los organismos en vasos de precipitado y se cubrieron con agua destilada durante 5-10 min., se cambió el agua destilada por 100 ml de la solución digestora (Tripsina) y se colocaron en un horno a 38°C hasta que la piel de los ejemplares cambió de color. El paso siguiente fue colocar los ejemplares en el segundo colorante Rojo alizarina por 90 minutos. Al finalizar este tiempo se cambiaron a

vasos de precipitados con 100 ml de KOH al 1% durante 24 hrs., posteriormente se realizaron tres cambios en soluciones de 25 ml de Glicerina con 75 ml de KOH al 5%, 50 ml de Glicerina con 50 ml de KOH al 5% y 75 ml de Glicerina con 25 ml de KOH al 5% cada 24 hrs. Finalmente fueron encapsulados con parafina en gel, esta se derritió y se les agregó a cada una de las tortugas en frascos.

#### *Técnica modificada de doble-tinción (Tripsina modificado a Papaína)*

Se colocaron treinta y tres crías de tortuga golfinina en 100 ml de formol al 10% por 24 hrs. Posteriormente se lavaron con agua durante un día haciendo cambios cada dos horas hasta eliminar el formol, en seguida se pusieron 100 ml de solución blanqueadora por cinco horas, posteriormente se colocaron en un primer colorante Azul alcian (100 ml) por dos horas. Se realizó la deshidratación del tejido con diferentes concentraciones de alcoholes, cada uno con una duración de una hora, empezando de la concentración más alta a la más baja 96%, 96%, 96%, 75%, 40% y 15%, respectivamente. Posteriormente se colocaron los individuos en vasos de precipitados y se cubrieron con agua destilada durante 5-10 min., se cambió el agua destilada por 100 ml de la solución digestora (Papaína), ésta solución se obtuvo utilizando 3.5 g de semillas de papaya verde maceradas y mezcladas con 95 ml de agua destilada y 1gr de borato de sodio. Posteriormente se colocaron en un horno a 38°C hasta que la piel de los ejemplares cambió de color, el paso siguiente fue colocar los ejemplares en el segundo colorante Rojo alizarina por 90 minutos. Al finalizar este tiempo se cambiaron a vasos de precipitados con 100 ml de KOH al 1% durante un día, posteriormente se realizaron tres cambios 24 ml de Glicerina con 75 ml de KOH al 5%, 50 ml de Glicerina con 50 ml de KOH al 5% y 75 ml de Glicerina con 25 ml de KOH al 5% cada 24 hrs. Finalmente fueron encapsulados con parafina en gel, esta se derritió y se les agregó a cada una de las tortugas en frascos.

Se determinaron los porcentajes de evaluación para la clarificación de cada una de las técnicas (Tabla I) a través de una escala visual



análoga (EVA), esta escala se realiza a través de la observación y posteriormente el criterio de los observadores, los cuales deben ser especialistas en el tema. La Eva es un instrumento de medida que mide una característica o actitud continua que no puede ser medido directamente ya que depende de la perspectiva de las personas (Gould *et al.* 2001), sin embargo para hacerlo más objetivo se realizaron diez encuestas al público en general (estudiantes de licenciatura y maestría y doctores), se graficaron los resultados obtenidos y se realizó una prueba de independencia de ji cuadrada de un criterio la cual es una prueba estadística no paramétrica, para determinar si los resultados eran significativos o no a un nivel de confianza de 95% y 2 grados de libertad y en caso de serlo se procedió a hacer una prueba de homogeneidad.

**Tabla I.** Porcentaje de clarificación de crías de tortuga golfina (*L. olivacea*)

| Técnica  | Total<br>(71%-100%) | Moderado<br>(36%-70%) | Leve<br>(0%-35%) |
|----------|---------------------|-----------------------|------------------|
| Dawson   | X                   |                       |                  |
| Tripsina | X                   |                       |                  |
| Papaína  |                     |                       | X                |

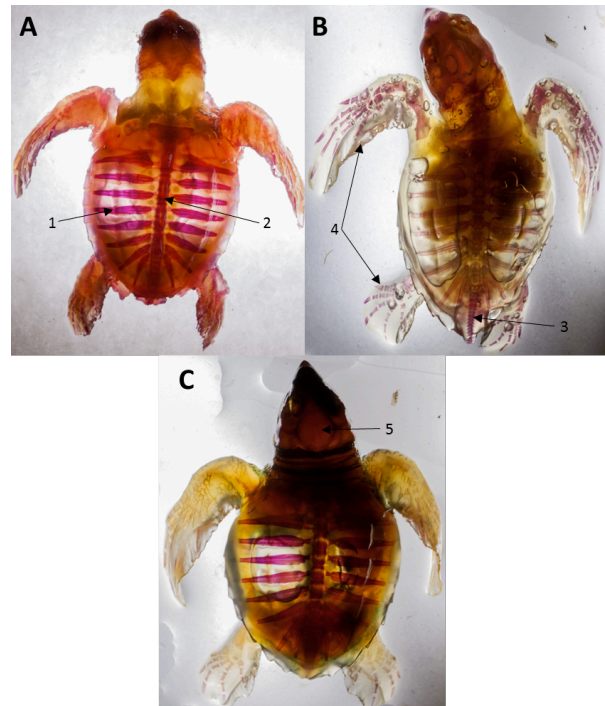
## Resultados

Durante el proceso se presentaron ciertas complicaciones, entre ellas los casos de algunos organismos que no se tiñeron, otros se desintegraron parcialmente y otro porcentaje se desintegro por completo.

De las noventa y nueve crías de tortuga golfina que se sometieron al proceso de diafanización, sesenta y nueve de ellas (60%) obtuvieron excelentes resultados.

A continuación; se presenta las imágenes obtenidas por cada técnica aplicada, mostrando la anatomía esquelética completa.

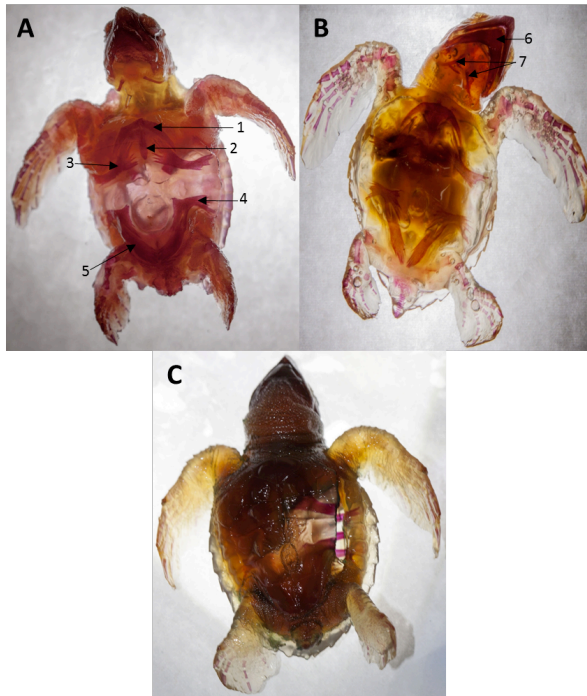
Con las tres técnicas se pueden observar en la vista dorsal la escama nugal, las vértebras dorsales y caudales, las costillas y las aletas anteriores y posteriores (Fig. 2).



**Figura 2.** Vista dorsal de la anatomía esquelética de crías de tortuga golfina (*L. olivacea*) diafanizadas. A) Técnica de Dawson (1. Costillas y 2. Vértebras dorsales), B) Técnica de doble-tinción (3. Vértebras caudales y 4. Aleta anterior y posterior) y C) Técnica modificada de doble-tinción (5. Escama nugal).

El plano ventral de las crías diafanizadas, nos da acceso visual a la ramfoteca, a algunos de los huesos que conforman el plastrón y a un par de huesos pertenecientes al sistema hioideo llamados ceratobranquiales (Fig. 3), los cuales son distintivos de cada especie.

La escala comparativa de los porcentajes de clarificación del cuerpo de los individuos trabajados mediante las tres técnicas utilizadas, y obtenido a través de encuestas se muestra en la figura 4, donde a) representa del 100 al 71% de clarificación obteniendo la Técnica de Dawson y la Técnica de doble-tinción los valores más altos con 82% y 84% de aceptación respectivamente mientras que la Técnica modificada de doble-tinción presenta el valor de aceptación más bajo con 17%, b) representa del 70 al 36% siendo la Técnica modificada de doble-tinción el valor más alto con 38% de aceptación y los valores más bajos pertenecen a la Técnica de Dawson y a la Técnica



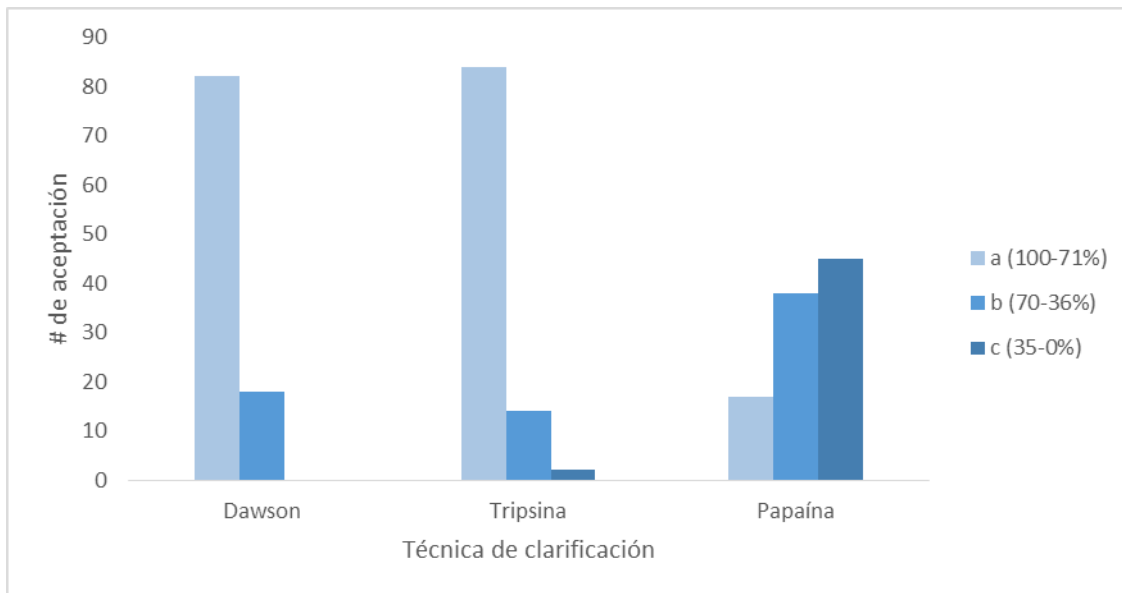
**Figura 3.** Vista ventral de la anatomía esquelética de crías de tortuga golfina (*L. olivacea*) diafanizadas. A) Técnica de Dawson (Huesos que conforman el plastrón: 1. Epiplastrón, 2. Entoplastrón, 3. Hioplastrón, 4. Hipoplastrón y 5. Xifiplastrón), B) Técnica de doble-tinción (6. Ramphoteca y 7. Ceratobranquiales) y C) Técnica modificada de doble-tinción.

de doble tinción presentando 18% y 14% de aceptación respectivamente y c) del 35 al 0% donde nuevamente la Técnica modificada de doble-tinción presenta el valor más alto con una aceptación del 45%, mientras que la Técnica de Dawson y la Técnica de doble-tinción tienen un porcentaje de aceptación de 0% y 2% respectivamente.

En cuanto a los análisis estadísticos a través de la prueba de ji cuadrada se obtuvo que la Técnica de Dawson y la Técnica de doble-tinción resultaron estadísticamente significativas (ji cuadrada= 11.14,  $p < 0.005$  y ji cuadrada= 8.82,  $p < 0.01$  respectivamente), mientras que la Técnica de doble-tinción modificada no resulto significativa (ji cuadrada= 1.27,  $p > 0.95$ ).

### Discusión

La anatomía esquelética de una tortuga marina se divide en tres partes principales: el cráneo que incluye la caja craneal (Fig. 2C), el aparato mandibular y el aparato hioideo (Fig. 3B). El esqueleto axial que está compuesto por las vértebras, las costillas, los derivados de las costillas y el caparazón (Fig. 2A) el cual, exteriormente está compuesto con escudos de



**Figura 4.** Comparación del porcentaje de clarificación de las tres técnicas (donde a=100-71%, b=70-36% y c= 35-0%) con respecto al número de aceptación de los encuestados.

queratina. Y finalmente el esqueleto apendicular que incluye las aletas, que son las extremidades delanteras y traseras, y sus estructuras de apoyo (Fig. 2B) (Wyneken 2004).

El plastrón es un compuesto que incluye los derivados del esqueleto axial y del esqueleto apendicular, así como escudos de queratina exteriormente. Está compuesto de cuatro pares de huesos nombrándose de anterior a posterior: epiplastrón, hioplastrón hipoplastrón y xifiplastrón y por un hueso sin pareja llamado entoplastrón (Fig. 3A). La forma del hueso entoplastrón a veces se usa como una característica para identificar las especies de tortugas marinas adultas, así como los de la mandíbula (ramfoteca o pico corneo) (Fig. 3B) (Wyneken 2004).

Con la técnica de Dawson los huesos de cada región se observaron perfectamente debido a que quedaron fuertemente teñidos, sin embargo, el tejido en las aletas y parte del caparazón no quedó totalmente aclarado (Fig. 2A) en contraste con la técnica de doble-tinción.

La técnica de Dawson presenta un porcentaje de aclaración total (71%-100%) (Tabla I), coincidiendo con los resultados obtenidos en las encuestas donde este rango de porcentajes obtuvo un 82% de aceptación (Fig. 4).

Esta técnica fue utilizada en el pasado principalmente para diafanizar organismos y observar su sistema vascular (Rodríguez-Baeza 2004, Tilotta 2009, Coronado 2014) sin embargo, actualmente se le suma una técnica de tinción para poder observar el sistema óseo. Villegas y colaboradores (2012) utilizaron esta técnica con la tinción en mamíferos para observar el desarrollo óseo en los fetos, con resultados no satisfactorios en la transparentación del espécimen y visualización del sistema óseo. No obstante, al aplicar la misma técnica en tortugas marinas, obtuvimos resultados satisfactorios, ya que el tejido quedó transparentado y se pudieron observar las estructuras óseas. Por lo tanto los resultados que se obtengan en cada una de las técnicas va a variar dependiendo del organismo al que se le desee aplicar, al igual que las modificaciones

que requiera hacerse para tal fin (Concha 2006, Coronado 2014).

La técnica de doble-tinción fue utilizada para describir la esqueleto-génesis y para detectar malformaciones esqueléticas en varias especies (Daoulas *et al.* 1991, Koumoundouros *et al.* 1997, Boglione *et al.* 2001, Gavaia *et al.* 2002, Sfakianakis *et al.* 2004, Fernández *et al.* 2008, Mazurais *et al.* 2008, Darias *et al.* 2010) y ha sido modificada a lo largo del tiempo por distintos autores (Potthof 1984, Taylor & Van Dyke 1985, Dingerkus & Uhler 1977, Gavia *et al.* 2000, Daria *et al.* 2010). Sin embargo los resultados obtenidos en este trabajo utilizando la técnica original sin ninguna modificación fueron satisfactorios, ya que el tejido quedó totalmente clarificado (71%-100%) con excepción de la clarificación parcial presentada en la parte superior del caparazón y la cabeza (Fig. 2B). Las estructuras cartilaginosas por otro lado no se tiñeron, esto pudo deberse a la fecha de caducidad del colorante utilizado ya que Conte (2012) menciona que los reactivos pierden su efectividad después de tres meses.

Como se mencionó previamente, la técnica de doble-tinción también fue modificada para el presente trabajo, ya que la enzima Tripsina pura tiene un costo muy elevado, utilizándose la enzima Papaína. La Técnica de doble-tinción modificada resultó la más económica de las tres, sin embargo, la clarificación obtenida fue pobre (35%-0%) (Tabla I) y no se pudo observar gran parte de las estructuras internas (Fig. 2C y 3C). Para que los resultados fueran comparables, los organismos se dejaron en la solución digestora con la enzima natural el mismo tiempo que es necesario para alcanzar la clarificación de los organismos con la enzima Tripsina pura; la falta de clarificación puede ser explicada por el tiempo empleado y la utilización de la enzima natural (Papaína), ya que la velocidad de la reacción está relacionada directamente con la concentración de la enzima y esta velocidad es diferente para cada enzima (Franklin 2011). Por lo tanto, se necesita mayor tiempo para que la diafanización con la enzima Papaína reaccione así como una concentración mayor, aproximadamente de 7-10 gr de semillas de papaya.



La técnica de Dawson y la técnica de doble-tinción, fueron las que mejores resultados dieron. Las observaciones de las personas encuestadas y el porcentaje obtenido demostraron que la diafanización en los ejemplares fue satisfactoria, permitiendo ver detalladamente los huesos. Sin embargo la técnica de doble-tinción no presentó una fuerte tinción ósea en comparación con la tinción obtenida con la técnica de Dawson, esto debido a que las estructuras óseas se destiñeron ligeramente, ya que el colorante rojo alizarina se debilita con la enzima digestora (Cortés-Delgado 2009) por lo que los organismos diafanizados por medio de digestión quedaron menos teñidos que los diafanizados con la técnica de Dawson. A su vez, al ser la Tripsina una enzima digestora pura, el efecto que tendrá sobre el colorante será mayor que el de la enzima natural Papaína. Esta falta de coloración confundió a los encuestados, a pesar de especificar que se tenían que fijar en la transparentación del tejido y no en la intensidad de la tinción ósea, esto fue el principal factor por el que la técnica de doble-tinción tuvo dos votos a una clarificación leve (35%-0%).

No hay registro de trabajos a la fecha que comparen estas tres técnicas para el estudio de tortugas marinas, por lo que a partir de las evaluaciones realizadas a distintos observadores (Fig. 4) se determinó que la tabla I obtenida utilizando la Eva es adecuada. Greco-Machado y colaboradores (2008) utilizaron la EVA para determinar la transparencia de cada una de sus muestras por lo que esta forma de evaluación es certera y la mejor opción.

A partir de la prueba de independencia con ji cuadrada se determinó que las técnicas de transparentado más adecuadas para crías de tortuga golfina son en orden de importancia la de doble-tinción y la de Dawson, sin embargo, se necesita un presupuesto menor para la técnica de Dawson que para la técnica de doble-tinción, aunque un tiempo más prolongado para obtener resultados similares. No obstante, que la técnica de doble-tinción modificada no presentó los mejores resultados, es la más económica de todas y no necesita un periodo largo para que los organismos

queden ligeramente clarificados, sin embargo, si se aplica más tiempo y una concentración mayor de Papaína, es posible que se obtenga mejores resultados con un bajo presupuesto.

### Agradecimientos

Se agradece a la Universidad Autónoma de Baja California Sur y al laboratorio de Oceanografía por el espacio brindado al proyecto. A Carlos A. Aguilar, Stephanie Rousso, Juan Manuel López-Vivas y Alejandro Gómez-Gallardo por sus aportes y comentarios. A Abilene Colín, Carolina Escobar, René Pinal del campamento ASUPMATOMA por permitirnos colectar a los organismos y por la confianza que han puesto en nosotros, muchas gracias, a Ramiro Arcos por las fotografías de las tortugas y a Alexandra E. Espinosa-Gil por la traducción del resumen al francés.

### Referencias

- Abella-Pérez E. 2010. Factores Ambientales y de Manejo que Afectan al Desarrollo Embrionario de la Tortuga Marina *Caretta caretta*. Implicaciones en Programas de Incubación Controlada. Tesis doctoral. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. España. 238pp.
- Blaustein, A. y P. Johnson. 2003. The complexity of deformed amphibians. *Ecol Environ*. 1(2): 87-94.
- Concha, I. 2006. Diafanización. Universidad Santo Tomas. 12pp.
- Conn H. 1960. Staining Procedures. 2da edición. The Williams and Wilkins Company Baltimore. USA. 289p.
- Conte, E. 2012. La caducidad de los medicamentos y las consecuencias de usar medicamentos vencidos. Nota informativa. Ministerio de salud. Panamá. 3pp.
- Coronado, J. 2014. Elaboración de material docente mediante la técnica de diafanización para la enseñanza de la morfogénesis ósea. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de maestría. 116 pp.
- Cortés-Delgado N., J. Pérez-Torres, y J. Hoyos. 2009. Staining procedure of cartilage and skelton in adult bats and rodents. *Int. J. Morphol*. 27: 1163-1167.
- Darias, M. O., Lan Chow Wing, C. Cahu, J. Zambonini-Infante y D. Mazurais. 2010. Double stainig protocol for developing European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Applied Ichthyology*. 26: 280-285.
- Dick, B. J. Montes de Oca y E. Zúñiga. 2004. Una Introducción a las especies de tortugas marinas del mundo. Secretaría Pro Tempore de la conservación



- interamericana para la protección y conservación de las tortugas marinas. Costa Rica. 10p.
- Dingerkus, G. y L. Uhler. 1977. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Technology*. USA. 52:229-232.
- Franklin, B. 2011. Las enzimas. Tesis doctoral. Capítulo 1: 41-137pp.
- Frazier, J. 1999. Generalidades de la Historia de Vida de las Tortugas Marinas. Centro de Conservación e Investigación. Smithsonian Institution. EUA. 16pp.
- Gould, D. D. Kelly, L. Goldstone y J. Gammon. 2001. Visual Analogue Scale (VAS). *Blackwell Science, Journal of Clinical Nursing*. 10: 697-706.
- Greco-Machado, Y., J. García-Molina, R. Bueno-Martínez, M. Manzaranes-Céspedes y V. Lozano- De Luaces. 2008. Técnicas de diafanización: estudio comparativo. *Endodoncia*. 26: 85-92.
- Marcovaldi, M. y M. Chaloupka. 2007. Conservation status of the logehead sea turtle in Brazil: an encouraging Outlook. *Endangered Species Research*. 3:133-143.
- Márquez M. R. FAO species catalogue. 1990. Sea turtles of the world. An annotated and illustrated catalogue of sea turtle species known to date. FAO Fisheries Synopsis 11. Rome, FAO. 81 p
- 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 medula espinal. Universidad Autónoma de Barcelona. 10pp.
- Tilotta, L.B. 2009. A study of the vascularization of the auricle by dissection and diaphanization. *Surgical and Radiologic Anatomy*. 31: 259-265.
- Viejobueno, S. C. Adams y R. Arauz. 2012. Conservación e Investigación de tortugas marinas en el Pacífico de Costa Rica. PRETOMA. Costa Rica. 68pp.
- Villegas, A. M. Quiroga y D. Cleves. 2012. Diafanización: visualización del desarrollo óseo en fetos. Universidad de los Andes. 116 pp.
- Wyneken J. 2004. La anatomía de las tortugas marinas. Department of Commerce. E.U.A. 181p.

Recibido: 21 de junio de 2016

Aceptado: 28 de febrero de 2017