

Técnicas para la preparación de esqueletos secos de lepidosaurios

C. A. Scanferla

Laboratorio de Anatomía Comparada y Evolución de los Vertebrados. Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia". Av. Angel Gallardo 470 (C1405DJR) Capital Federal, Argentina. E-mail: agustin_scanferla@yahoo.com.ar

RESUMEN. Se describen en detalle dos técnicas para la preparación de esqueletos secos de lepidosaurios, 1.- La técnica de maceración bacteriana en agua genera la total desarticulación del ejemplar preparado mediante la descomposición de los tejidos blandos, sin producir ninguna alteración química o física de los elementos óseos, permitiendo observar la naturaleza del contacto entre distintos elementos óseos; 2.- La técnica mediante hipoclorito de sodio (NaClO) que propicia la disolución de los tejidos blandos, permitiendo preservar al ejemplar en el estado de articulación deseado. Sin embargo, esta técnica puede producir cierto grado de descalcificación, dependiendo de las concentraciones utilizadas de NaClO y del tiempo de exposición a la misma. Ambas técnicas han sido utilizadas con éxito en otros vertebrados como anuros y pequeños mamíferos.

Palabras clave: Esqueletos secos, Lepidosaurios, Maceración, Hipoclorito de sodio.

ABSTRACT. Two techniques for the preparation of dry skeletons of small-sized lepidosaurs are described here, 1.- The technique of bacterial maceration in water generates total disarticulation of the specimens through anaerobic decomposition of soft tissues, without any chemical or physical modification of bones. This technique has demonstrated to be useful for the observation of articular surfaces or of contact between bony elements; 2.- The diluted solutions of sodium hypochlorite (NaClO) technique is useful to quickly dissolution of soft tissues, allowing the preservation of bony elements in articulation. However, it presents the inconvenience of a slight decalcification of the specimens. These techniques have been also used with positive results in anurans and small-sized mammals.

Key words: Dry skeletons, Lepidosaurians, Maceration, Sodium hypochlorite.

Introducción

La utilización de material osteológico resulta de suma utilidad para el análisis morfológico y sistemático en vertebrados, siendo necesarios diferentes preparados anatómicos para conocer en detalle las distintas estructuras esqueléticas. Para ello, son utilizados especímenes en diferentes estados de articulación, usualmente preparados bajo técnicas de esquelización (las cuales producen esqueletos secos) en conjunto con técnicas de transparentación y tinción diferencial del esqueleto (ver Wassersug, 1976; Taylor & Van Dyke, 1985).

Debido a que la información acerca de técnicas de esquelización no suele publicarse, la bibliografía resulta ser escasa y poco aplicable a ciertos grupos de vertebrados. Una revisión de las técnicas publicadas permite diferenciar tres grandes tipos de preparación de esqueletos secos. En primer lugar se encuentran las técnicas de maceración bacteriana en agua, las cuales producen una descomposición total de los tejidos blandos, con la subsiguiente desarticulación total de los elementos óseos (Roche, 1954). Por otro lado se encuentran los métodos enzimáticos, los cuales utilizan enzimas proteolíticas (e.g. tripsina) para “digerir” los tejidos blandos, logrando una parcial o total desarticulación (Ossian, 1970; Manden & Wiley, 1984). Y por último se encuentran los métodos químicos, los cuales utilizan algún producto inorgánico (e.g. hidróxido de potasio) para producir la disolución de los tejidos blandos, aunque con un mayor o menor grado de descalcificación de los elementos esqueléticos (Simmons, 1977).

Los ejemplares de pequeños escamados representan un gran desafío al esquelizarlos, ya que éstos poseen cráneos con un alto grado de articulación entre los huesos constituyentes del mismo, aumentando considerablemente la desarticulación mientras se produce la disolución de los tejidos blandos. Esta situación se ve más acentuada en los ofidios, en los cuales gran parte de los elementos craneanos (arco palato-maxilar, rostro, etc.) están articulados o unidos débilmente por tejido conectivo. Algo similar ocurre en el caso del autopodio de los saurios, debido al gran número de elementos constituyentes y a su pequeño tamaño (falanges, metapodos, etc.).

Intentando subsanar en parte esta falta de información técnica, el objetivo de esta contribución es detallar dos técnicas empleadas para la obtención de esqueletos secos de pequeños lepidosaurios.

Métodos

Esquelización mediante maceración en agua (obtención de ejemplares desarticulados)

Ejemplares frescos

Esta técnica tiene como principal ventaja que los elementos óseos no son alterados por agentes químicos, evitando la descalcificación de los mismos. Además, permite la limpieza total de elementos óseos que se encuentran unidos mediante suturas (e.g., basicráneo), mostrando la configuración de las superficies en contacto debido a la total desarticulación sufrida entre los distintos huesos.

El primer paso para aplicar esta técnica es la extracción de la piel y vísceras del ejemplar; previo a este paso se recomienda además tomar fotografías de los rasgos característicos y si es posible identificar el sexo del ejemplar. Una vez concluido este paso, se procede a la desarticulación del cráneo a la altura del axis del resto del esqueleto axial y apendicular. En caso de lepidosaurios con miembros desarrollados se puede realizar el mismo procedimiento con las extremidades y cinturas, colocando éstos en recipientes separados y rotulados. Por último, se pasa un hilo de nylon (de la medida adecuada al tamaño del ejemplar) a través del canal neural, asegurándonos así el mantenimiento de la secuencia de articulación vertebral luego de producirse la desarticulación de la columna vertebral.

La técnica del macerado en agua consiste en sumergir a los ejemplares para que la descomposición bacteriana generada disuelva todo resto de tejido blando. El tiempo de preparación puede durar varios días o semanas, dependiendo del tamaño del ejemplar, temperatura ambiente, y si el ejemplar estuvo conservado en formaldehído/alcohol o es un ejemplar fresco. Existe una gran diferencia entre macerar ejemplares frescos y ejemplares fijados/conservados en alcohol. Para los primeros se procede a sumergir al ejemplar durante el tiempo necesario hasta la total descomposición de los tejidos blandos. Como referencia, cráneos de 5 cm de largo han necesitado unos 10 días de maceración, dependiendo de la temperatura. Luego se extrae el agua con sumo cuidado para no perder ningún elemento y se sumerge el ejemplar desarticulado en una solución de 1 parte de hipoclorito de sodio (NaClO) y tres de agua durante varios minutos para eliminar malos olores y algún resto de tejido blando que haya quedado. Luego se neutraliza el NaClO sumergiendo el ejemplar en alcohol etílico (concentración comercial de 96°) durante algunos minutos.

Ejemplares fijados y/o conservados en alcohol/formaldehído

Para los ejemplares conservados en alcohol etílico o formaldehído la maceración resulta mucho más difícil. Primero, se extrae el tegumento y vísceras al igual que con los ejemplares frescos, para luego sumergir el ejemplar en agua durante varios días (dependiendo del tamaño del ejemplar) para extraer todo resto de líquido conservante. En algunos casos se han observado buenos resultados deshidratando al ejemplar en una estufa o al aire libre para luego rehidratarlo antes de la maceración.

Antes de sumergir el ejemplar en agua para su maceración, se debe extraer la mayor cantidad de tejido blando posible mediante instrumental quirúrgico. Esto contribuirá a acelerar el proceso de maceración, mediante una mayor exposición de los tejidos blandos a la degradación bacteriana. Luego de finalizada la maceración, se procede de igual manera que en el caso de los ejemplares frescos.

Esqueletización mediante hipoclorito de sodio (obtención de ejemplares articulados)

Esta técnica permite preparar esqueletos secos con el grado de articulación deseado. Además, tiene la ventaja de optimizar la preparación de ejemplares conservados en colecciones en un tiempo muy corto.

En caso de que los ejemplares hayan sido recientemente colectados, el primer paso consiste en la fijación de los mismos mediante técnicas estándar con una solución de Formaldehído al 10 % durante por lo menos una semana, dependiendo del tamaño del ejemplar. Este paso es esencial, ya que en ejemplares frescos el tejido conectivo que mantiene unidos los elementos óseos se disuelve rápidamente, generando mayor desarticulación del ejemplar. Al igual que en la técnica de maceración en agua, el segundo paso consiste en retirar el tegumento (si es necesario bajo lupa) y las vísceras. Antes de comenzar con la disolución del tejido blando se recomienda deshidratar el ejemplar luego de fijarlo, y una vez seco proceder bajo lupa a extraer con sumo cuidado tejido blando con algún elemento cortante o agujas. De esta manera se homogeniza el espesor de tejido a disolver, evitando exponer al ejemplar a repetidas disoluciones que puedan deteriorar al ejemplar. Una vez extraída la mayor cantidad de tejido se procede a rehidratar el ejemplar en agua durante el tiempo suficiente.

Para esta técnica se ha utilizado hipoclorito de sodio (NaClO) con una concentración de 55 gramos de cloro por litro, concentración presente en la mayoría de las marcas comerciales. Se utilizaron diluciones de una parte de NaClO en 3, 4, 5 y hasta 6 partes de agua, dependiendo del tamaño del ejemplar y del grado de preparación al que se pretende llegar, siempre teniendo en cuenta que a menor tamaño menor será la resistencia del hueso a la descalcificación. La solución se debe utilizar a temperatura ambiente (15-30° C) ya que la temperatura

aumenta la velocidad del proceso y se ha observado una mayor descalcificación al utilizar soluciones a mayores temperaturas que las sugeridas anteriormente.

Una vez elegida la proporción NaClO/agua se procede a sumergir totalmente al ejemplar en la solución. Al principio se observará un leve burbujeo para luego cesar al poco tiempo. Este burbujeo es indicio de que el NaClO está actuando sobre los tejidos. Una vez finalizado el burbujeo, es recomendable mantener el ejemplar inmerso en la misma solución, ya que el NaClO sigue actuando aunque en menor grado al cesar éste. Esto colabora con la disolución de tejido sin un ataque intenso sobre el hueso y muchas veces se completa la preparación del ejemplar sin el empleo de una nueva solución de NaClO. Para este procedimiento es recomendable controlar bajo lupa el avance de la disolución de tejido en el caso de los ejemplares más pequeños (1-2 cm). En caso de que pequeños elementos estén a punto de desarticularse y sea necesario seguir sumergiendo al ejemplar en otra solución, se han utilizado pegamentos compuestos de cianoacrilato para ligar superficialmente estos elementos y evitar su desarticulación.

Los lagartos y serpientes fosoriales deben recibir especial atención, debido a la presencia de tejido conectivo fibroso y la fuerte queratinización que presenta la zona cefálica, características debidas a la utilización de su cabeza como órgano de excavación. Por ello se debe extraer con cuidado la mayor cantidad de tejido, ya que de lo contrario no se llegará a disolver el tejido blando de la región rostral. Para la columna vertebral (en especial para las serpientes y lagartos de cuerpo alargado) se recomienda pasar por el canal neural nylon de pesca (0,2 mm o menos) para mantener en posición a las vértebras que se desarticulen accidentalmente luego de la disolución del tejido blando.

Una vez que se ha alcanzado el nivel de preparación deseado, se debe lavar al ejemplar con agua durante algunos minutos para luego neutralizar el hipoclorito de sodio que podría haber quedado en el ejemplar. Dicha neutralización se realiza mediante la inmersión del ejemplar en alcohol etílico (96°) durante 15-30 minutos.

Luego de finalizado el procedimiento algunos ejemplares (principalmente los de mayor tamaño) pueden presentar cierto grado de grasitud, incluso luego de la neutralización del hipoclorito de sodio, por lo que se recomienda sumergir los ejemplares en acetona durante el tiempo suficiente para desengrasarlos por completo.

Alcances y límites de las técnicas

Ambas técnicas han presentado excelentes resultados para lagartos y serpientes de un muy variado rango de tamaño (Fig. 1), habiéndose preparado con éxito ejemplares muy pequeños (cráneos de 10 mm) hasta ejemplares completos de 3 metros de longitud.

Sin embargo, existen algunos aspectos no deseados que deben ser tenidos en consideración antes de comenzar con la esqueletización. Las técnicas de maceración bacteriana resultan a veces impracticables para materiales pertenecientes a colecciones de museos (conservados en alcohol etílico o formaldehído) debido a que no se produce descomposición de los tejidos en los ejemplares conservados por largos períodos de tiempo. Elementos muy pequeños o difíciles de reconocer en el ejemplar completo (e.g. miembros vestigiales) suelen perderse durante la disolución de tejido indistintamente a la técnica que se esté utilizando, por lo que es recomendable para ciertos ejemplares la utilización de técnicas de transparentación y tinción diferencial en ciertas regiones críticas como por ejemplo la región cloacal. Un aspecto negativo de la técnica que utiliza NaClO es la acción descalcificante de éste sobre las superficies óseas expuestas. Sin embargo, esta alteración se encuentra dentro de rangos aceptables ya que no se modifican estructuras ni se observaron deterioros significativos de los elementos óseos. Lamentablemente, los componentes

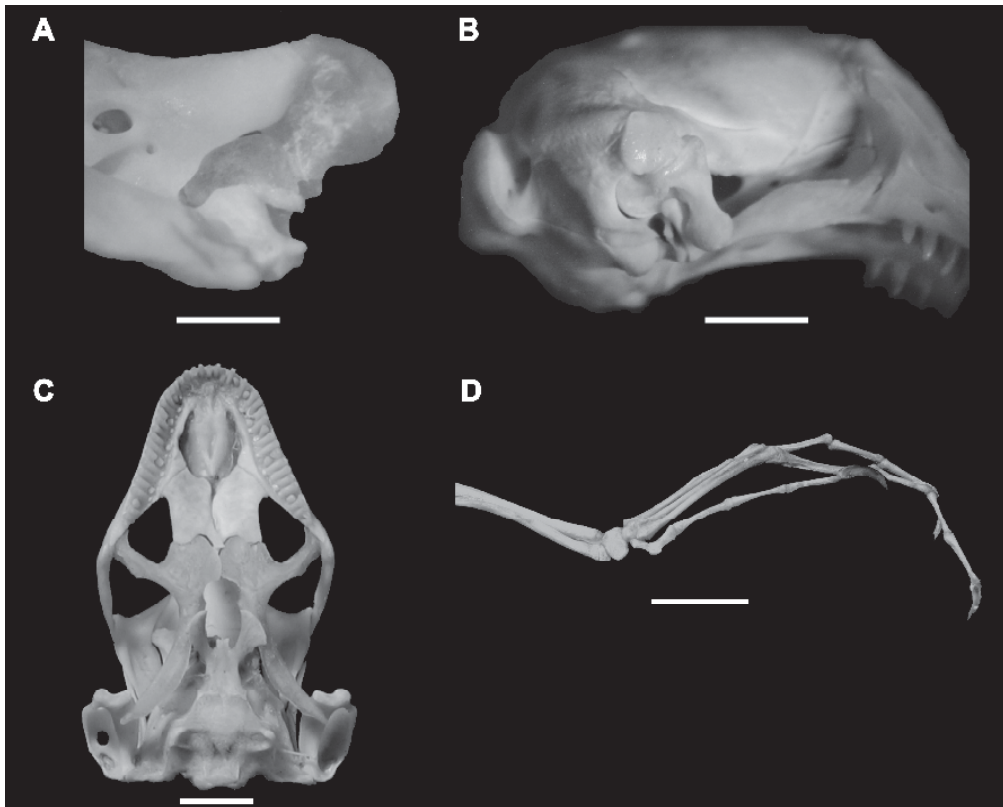


Figura 1. Detalle de ejemplares preparados con hipoclorito de sodio. A, vista lateral del basicráneo del ofidio basal *Anilius scytale* (MACN 8817), sin el hueso cuadrado y mostrando detalles de la columela (escala 2 mm); B, vista láteroposterior del cráneo del lagarto fosorial *Leposternon microcephalum* (escala 2 mm); C, vista ventral del cráneo del scíncido *Mochlus* sp. (escala 4 mm); D, vista lateral del pié derecho del lagarto iguánido *Basiliscus* sp. (escala 10 mm).

esqueletarios cartilaginosos (e.g. parte del complejo hioides, cartílago de Meckel) se disuelven en conjunto con el resto de los tejidos blandos al aplicar ambas técnicas. Por este motivo, se recomienda seleccionar ejemplares lo más adultos posible, evitando así un deterioro importante del ejemplar por disolución del cartílago.

Ambas técnicas poseen una gran versatilidad, ya que se han utilizado también para la esqueletización de anuros e incluso mamíferos de pequeño tamaño, ofreciendo resultados muy satisfactorios.

Agradecimientos

A Diego Pais y Martín Ezcurra por la lectura crítica del manuscrito y sugerencias. Este trabajo fue realizado en el marco del proyecto PICT 13803 financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica.

Referencias

Manden, R. L. & Wiley, E. O. 1984. A method of preparing disarticulated skeletons of small fishes. *Copeia* 1984 (1): 230-232.

- Ossian, C. R. 1970. Preparation of disarticulated skeletons using enzyme-based laundry "pre-soakers". *Copeia* 1970 (1): 199-200.
- Roche, J. 1954. Préparation des pièces ostéologiques. *Mammalia* 18 (14): 420-422.
- Simmons, J. E. 1987. Herpetological collecting and collections management. *SSAR Herpetological Circular* 16: 70 pp.
- Taylor, W. R. & Van Dyke, G. C. 1985. Revised procedure for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybium* 9 (2): 107-119.
- Wassersug, R. J. 1976. A procedure for differential staining of cartilage and bone in whole formalin-fixed vertebrates. *Stain Techniques* 51 (2): 131-134.

Recibido: marzo-08
Aceptado: diciembre-09