

## Investigación Científica

# Técnica de diafanización con alizarina para el estudio del desarrollo óseo\*

## *Diaphanization technique with alizarin for the study of the bone development*

GUILLERMO ADRIÁN RIVERA CARDONA<sup>1</sup>, ANGÉLICA GARCÍA<sup>2</sup>, FREDDY ALONSO MORENO GÓMEZ<sup>3</sup>

### Resumen

La diafanización es una técnica anatómica útil para el estudio del desarrollo óseo y dental, así como para la determinación de los centros de osificación en animales vertebrados. El proceso de diafanización se desarrolla en tres etapas: fijación con formaldehído, tinción con rojo de alizarina, corrosión y conservación. En la diafanización se usan diferentes reactivos como la alizarina roja al 0,1% en agua o alcohol etílico, la solución de KOH 2% en agua y glicerina. Una ventaja importante de la diafanización es que los especímenes no son conservados en formaldehído sino en glicerina.

*Palabras clave:* Alizarina, Diafanización, Osificación.

### Abstract

Diaphanization in an anatomical technique useful for research in bone and dental development, as for, deter-

mination of ossification centers in vertebrate animals. Diaphanization process is develop in three phases: formaldehyde fixation, alizarin red staining, corrosion and conservation. Diaphanization used different reactive as alizarin red 0,1% solved in water or ethylic alcohol, KOH 2% solution in water and glycerin. A diaphanization important advantage is that specimens are not conserved in formaldehyde but in glycerin.

*Keywords:* Alizarin, Diaphanization, Ossification.

### Introducción

La implementación de las técnicas anatómicas en el laboratorio de morfología macroscópica, descriptiva, funcional e incluso clínica, ha evolucionado en los últimos años, debido a la necesidad de preservar material anatómico duradero, estético y de buena calidad para la investigación y el estudio de las ciencias biomédicas y básicas aplicadas a la clínica<sup>1-5</sup>. Las

\* Este artículo es un derivado del estudio financiado a través de la Convocatoria Interna de Investigaciones Capital Semilla 2014-2015 de la Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia.

<sup>1</sup> Profesor de anatomía, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana Cali, Colombia. Enfermero, Universidad del Cauca, Magíster en Ciencias Biomédicas de la Universidad del Valle, Especialista en técnicas anatómicas y plastinación de la Universidad Santo Tomás de Chile. Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Clínicas de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana, Categoría C Colciencias. e-mail: grivera@javerianacali.edu.co

<sup>2</sup> Profesora de farmacología y célula, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana Cali, Colombia. Doctora en Ciencias Químicas de la Universidad del Valle, Tecnóloga en Química de la Universidad del Valle. Cali, Colombia. Química, Universidad del Valle, Doctora en Ciencias Químicas, Universidad del Valle, Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Clínicas de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana, Categoría C Colciencias. e-mail: angelicagarcia@javerianacali.edu.co

<sup>3</sup> Profesor de histología y biología del desarrollo, Departamento de Ciencias Básicas de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana Cali, Colombia. Odontólogo, Universidad del Valle, Magíster en Ciencias Biomédicas, Universidad del Valle. Grupo de Investigación en Ciencias Básicas y Clínicas de la Salud, Pontificia Universidad Javeriana, Categoría C Colciencias. e-mail: fmorenog@javerianacali.edu.co

Recibido: noviembre 8 de 2015 Aceptado: diciembre 17 de 2015

Como citar: Rivera Cardona GA, García A, Moreno Gómez FA. Técnica de diafanización con alizarina para el estudio del desarrollo óseo. *Rev Colomb Salud Libre*, 2015; 10 (2): 109-115.

técnicas anatómicas disponibles en la actualidad son diversas e innovadoras y su estudio cobró mucho interés y trascendencia debido al descubrimiento de la plastinación por el alemán Gunther von Hagens y a la preparación de nuevas soluciones fijadoras y conservadoras que han permitido disminuir las concentraciones de químicos tóxicos y nocivos como el formaldehído y fenol, reemplazándolos por otros químicos menos nocivos para la salud humana y más amigables con el medio ambiente<sup>6-11</sup>.

El estudio de la osteogénesis o desarrollo óseo y odontogénesis son temas de gran importancia en áreas como la histología, embriología y anatomía<sup>12-15</sup>. 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. Por eso, si se pretende determinar la edad de aparición de los puntos de osificación durante el desarrollo embrionario y fetal, la diafanización será la mejor técnica para cumplir con este objetivo<sup>16-20</sup>.

El presente artículo de revisión de tema se realizó mediante búsqueda a través de las bases de datos Science Direct, PubMed y Scopus, al igual que el uso del motor de búsqueda Google Académico, con las palabras clave diafanización, alizarina roja, desarrollo óseo, corrosión, formaldehído, fijación, técnicas anatómicas. Una de las limitaciones de la búsqueda en relación con el tema de diafanización para determinación de centros de osificación y estudio de desarrollo óseo, es que no existen suficientes publicaciones en los últimos años.

### Técnica de diafanización

La diafanización es una técnica anatómica usada desde hace más de un siglo, con el objetivo de transparentar los tejidos para poder observar estructuras profundas teñidas previamente con algún tipo de colorante; su uso

fue bastante amplio hasta la década de 1980 y luego su empleo disminuyó, a pesar de que el desarrollo de su proceso implica baja toxicidad y bajo riesgo químico. 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.

Los reactivos utilizados durante el proceso corresponden a rojo de alizarina, hidróxido de potasio sólido, glicerina y opcionalmente el alcohol etílico (Tabla 1). Es de aclarar que para el manejo y uso operativo de cada uno de los reactivos es necesario conocer previa y detalladamente la ficha de seguridad con el objeto de darle un uso óptimo al químico, evitar el riesgo por accidente químico y usar de manera efectiva el producto durante el proceso de diafanización.

El laboratorio o escenario donde se desarrollará el proceso de diafanización debe cumplir con las condiciones necesarias de infraestructura, estabilidad térmica, bioseguridad y demás normas relacionadas con la manipulación de componentes anatómicos con fines académicos e investigativos. Las etapas de la diafanización corresponden a fijación inicial, impregnación, corrosión, transparentación y conservación final del espécimen (Tabla 2).

**Fijación.** La primera condición necesaria para iniciar la aplicación de una técnica anatómica a material orgánico de cualquier tipo, es frenar el proceso de descomposición por medios físicos o químicos y para ello se debe fijar de manera inicial el componente anatómico. El fijador químico tiene como reto evitar la retracción

**Tabla 1. Químicos usados durante el proceso de diafanización**

Químico	Presentación	Cuidados especiales	Observaciones
Alizarina roja (C <sub>14</sub> H <sub>6</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S)	Polvo liofilizado	Conservar en lugar seco y protección de la luz solar	En solución debe conservarse en refrigeración
Hidróxido de potasio (KOH)	Hojuelas y lentejas	Conservar en lugar seco y aislado de solventes inflamables	En solución con agua debe conservarse en recipiente plástico
Alcohol etílico (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)	Líquido	Riesgo de combustión	Ninguna
Glicerina	Líquido	Ninguno	Ninguna

**Tabla 2. Etapas del proceso de diafanización con rojo de alizarina para determinación de centros de osificación**

Etapas	Soluciones y químicos	Características del espécimen
Fijación inicial	Formaldehído 10%-20% en solución acuosa	Edema y espasticidad generalizada
Impregnación y tinción	Rojo de alizarina al 0,1% en agua o alcohol etílico	Coloración generalizada ojo remolacha
Corrosión de barrera superficial	KOH 2% en agua	Edema y disminución de espasticidad
Transparentación	Mezclas de KOH 2% y glicerina en diferentes proporciones	Atenuación del color rojo hacia una transparencia de tejidos blandos y pigmentación roja de centros óseos
Conservación final	Glicerina	Transparencia total y pigmentación roja de centros óseos

del tejido, razón por la cual, si un componente anatómico queda sumergido en una solución fijadora conservará sus dimensiones reales, también la inactivación enzimática, sobre todo para aquellas enzimas catalizadoras de reacciones químicas de descomposición tisular y un efecto desinfectante de la pieza anatómica para evitar la colonización de agentes microbianos que puedan interferir con la conservación del tejido orgánico. Tradicionalmente la sustancia fijadora más usada en laboratorios de morfología y patología es el formaldehído, cuya

concentración máxima alcanza entre 37% a 40% y se usa mediante inyección intravascular, infiltración o para sumergir los especímenes anatómicos que se van a usar<sup>21-25</sup>.

El proceso de la aplicación de la técnica de diafanización se inicia con la fijación en formaldehído a concentraciones que pueden oscilar entre 10% y 20% dependiendo del tamaño del embrión o feto, del tiempo pasado desde el deceso y de la especie con la que se va a trabajar (aves, humanos, batracios, peces,

etc.). El espécimen deberá ser sumergido en la solución de formaldehído diluida en agua, de tal manera que la solución lo cubra totalmente. El tiempo de fijación oscila entre 4 y 8 semanas preferiblemente a temperaturas iguales o inferiores a 15°C. Durante el tiempo que dure el proceso de fijación el espécimen experimentará un ligero edema y espasticidad generalizada por la compactación de las moléculas tisulares.

**Impregnación y tinción.** Pasado el proceso de fijación con formaldehído, se procede a extraer los embriones o fetos de la solución fijadora y si se desea se puede realizar un proceso de disección para eviscerar la cavidad toracoabdominal y pélvica y luego sumergirlos en una solución de alizarina al 0,1% en agua o alcohol etílico<sup>26-30</sup>, la cual se debe haber conservado previamente en refrigeración y evitar la exposición directa a la luz. La inmersión debe ser total y debe durar al menos 6 horas continuas para lograr una buena impregnación de la alizarina a la piel del espécimen, hasta que se observe una tinción generalizada de un color similar al rojo de remolacha (Figura 1).



Figura 1. Mortinato de conejo impregnado con solución de rojo de alizarina al 0,1% en agua durante 6 horas.

**Corrosión de barrera superficial.** La corrosión de barrera superficial se realiza mediante el uso de una solución de KOH al 2% en agua. El KOH es un químico sólido, inodoro, corrosivo con un pH de 13,5 y una solubilidad de 1.120 g por litro de agua a 20°C. El objetivo en el proceso de corrosión de barrera superficial es que se pierda toda la epidermis por proceso de epidermolisis

química y se formen fisuras y poros a nivel de la dermis para facilitar el paso de la alizarina del tejido blando superficial a las estructuras óseas. Durante este proceso el espécimen experimentará un edema generalizado y disminución de la espasticidad; la solución de KOH al 2% en agua deberá ser supervisada diariamente y si se observan muchos fragmentos de epidermis se sugiere eliminar la solución empleando los protocolos de bioseguridad y de eliminación de residuos químicos y biológicos y posteriormente reemplazarla por una solución de igual composición pero limpia. Este proceso requiere de una observación diaria y detallada, porque si el espécimen queda inmerso en la solución de KOH de manera prolongada y no controlada, se puede perder debido a que el efecto corrosivo lesionaría no solo epidermis sino los demás tejidos blandos profundos incluso los cartílagos. La corrosión de la barrera superficial puede durar aproximadamente dos semanas, dependiendo de la cantidad de epidermis que se aprecie en la solución y del grado de edema<sup>31-35</sup>.

**Transparentación.** El proceso de transparentación tiene como objetivo final la visualización de los centros de osificación teñidos con rojo de alizarina a través de la diafanización o transparentación de todos los tejidos blandos por acción del KOH al 2% en agua y por conservación de la glicerina en reemplazo del formaldehído. Este proceso está condicionado al cambio de soluciones dependiendo de las características físicas del espécimen (Tabla 3). La observación en los cambios de los tejidos superficiales como brillantez y coloración, al igual que los centros de osificación, teñidos con rojo de alizarina serán los factores determinantes para realizar los cambios en las soluciones (Figuras 2 y 3).

**Conservación final.** El producto final de los especímenes diafanizados se conserva en glicerina, la cual cumple funciones de conservación y reemplaza al formaldehído y de esta manera se disminuyen los impactos negativos sobre la salud humana y medioambiental, debido a

Tabla 3. Características de las soluciones durante las etapas del proceso de transparentación de tejidos

Etapa de transparentación	Solución	Características del espécimen
Primera	75% de volumen de solución de KOH 2% en agua 25% de volumen de glicerina	Atenuación del color rojo remolacha y persistencia del edema
Segunda	50% de volumen de solución de KOH 2% en agua 50% de volumen de glicerina	Coloración rosada, brillantez en tejidos superficiales y disminución de edema
Tercera	25% de volumen de solución de KOH 2% en agua 75% de volumen de glicerina	Transparentación de tejidos blandos y observación de los centros de osificación teñidos con rojo de alizarina



Figura 2. Feto vacuno en segunda transparentación.



Figura 3. Feto de conejo en tercera transparentación activa con presencia de algunos centros de osificación teñidos con rojo de alizarina en pata delantera derecha.

que la glicerina no genera vapores irritantes ni ocasiona graves efectos sobre la salud como si lo hace el formol<sup>36-50</sup>. Los productos diafanizados son delicados, por tanto se debe evitar al

máximo la manipulación mecánica y se sugiere el uso del estereoscopio o videoflex para su descripción.

### Conflicto de intereses

Los autores no tienen conflictos de intereses.

### Referencias

1. Cañizares O, Sarasa N. El paradigma sociomédico cubano: un reto para la enseñanza de la anatomía humana. *Rev Cubana Educ Med Super.* 2000; 14 (2): 148-54.
2. Cañizares O, Sarasa N. A didactic proposal for the cognitive problems in human anatomy. *Educ Med Super.* [Internet]; 2004 [acceso 10 septiembre 2015]; 18 (4): 1-1. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21412004000400004&lng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21412004000400004&lng=es)
3. Vásquez R. *La evolución de las técnicas morfológicas. La aportación de Pedro Amat. Del individualismo al trabajo en equipo.* Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca; 2014.
4. Condemayta D, Condemayta A, Orós O, Medina M. Estudio comparativo de técnicas de conservación anatómica de especímenes de cadáveres ovinos en altura, utilizando soluciones de formol y prives. *Rev Investig Altoandín.* 2014; 16 (1): 33-8.
5. Arias L. Exploración de la técnica de plastinación en la preparación de modelos anatómicos como material docente para la enseñanza de la morfología humana en la Universidad Nacional de Colombia. [Internet]. Bogotá; 2010. [acceso 16 mayo 2015]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8938/1/05599078.2012.pdf>

6. Wolff D, Villa P, Neirreitter A, Ruibal C, Ugon G, Salgado G, *et al.* Estudio comparativo entre soluciones conservadoras con y sin formol en placenta humana. *Int J Morphol.* 2012; 30 (2): 432-8.
7. Jones DG. The public display of plastinates as a challenge to the integrity of anatomy. *Clin Anat.* 2016; 29: 46-54. doi:10.1002/ca.22647
8. Pandit S, Kumar S, Mishra BK. Comparative study of anatomical specimens using plastination by araldite HY103, polypropylene resin, 6170H19 Orthocryl and silicone - A qualitative study. *Med J Armed Forces India.* 2015; 71 (3): 246-53.
9. Riederer BM. Plastination and its importance in teaching anatomy. Critical points for long-term preservation of human tissue. *J Anat.* 2014; 224 (3): 309-15.
10. Duque J, Díaz J. El formol su génesis, normas, aplicaciones e incidencia sobre la salud humana. *Medicina UPB (Medellín).* 1999; 18 (1): 35-46.
11. Muñetón C, Ortiz J. Conservación y elaboración de piezas anatómicas con sustancias diferentes al formol en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de La Salle. *Rev Med Vet.* 2011; 22: 51-5.
12. Chuegüe-Vargas N, Cervantes-Amador F, Moreno-Castillo E, Espinosa-Reyes I, Bautista-Pastrana M. Técnica de diafanización en dientes humanos extraídos como material didáctico para el conocimiento del sistema de conductos radiculares. *Med Oral.* 2007; 9 (3): 79-80.
13. Rojas J, Ayala J. V Congreso Colombiano de Morfología. Experiencias en repleción-diafanización, nueva alternativa docente-investigativa. *Int J Morphol.* 2010; 28 (1): 337-40.
14. Papakonstantinou M, Pan WR, Roux C, Richardson M. New approach to the study of intraosseous vasculature. *ANZ J Surg.* 2012; 82: 704-7.
15. Tamayo LJ, Suárez PA, Cano AI, Cuartas BA, Yepes SA, Mejía CA, *et al.* Didactic model of the chicken embryo development using modified Dawson's diaphanization and staining technique. *Rev Colomb Cien Pecuár.* 2012; 25 (4): 620-4.
16. Schultze O. Über herstellung and conservierung durchsichtigen embryonen zum stadium der skelettbildung. In *verhandlungen der anatomischen gesellschaft.* *Anat Anz.* 1897; 13: 3-5.
17. Mall FP. On ossification centers in human embryos less than 100 days old. *Am J Anat.* 1906; 5: 433-58.
18. Dawson AB. A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Stain Tech.* 1926; 1: 123-4.
19. Lipman HJ. Staining the skeleton of cleared embryos with alizarin red S. *Stain Tech.* 1935; 10: 61-3.
20. Cumley RW, Crow JF, Grifflfen AB. Clearing specimens for the demonstration of bone. *Stain Tech.* 1939; 14: 7-11.
21. Kelly L. Anatomy dissections and student experience at Irish universities, c.1900s-1960s. *Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences.* 2011; 42: 467-74. doi:10.1016/j.shpsc.2011.08.001
22. Fonseca-Matheus J, Rojas E, Gallardo J, Peraza M. Efecto conservador de soluciones con bajo contenido de formol y sustancias antisépticas en la perfusión arterial de piezas anatómicas. *Gaceta de Ciencias Veterinarias.* 2012; 17 (2): 43-8.
23. Coleman R, Kogan I. An improved low-formaldehyde embalming fluid to preserve cadavers for anatomy teaching. *J Anat.* 1998; 192 (3): 443-6.
24. Al-Saraj A. Use of saturated sodium chloride solution as a tissue fixative. *Iraqi J Veterin Sci.* 2010; 24 (1): 53-8.
25. Guimarães da Silva RM, Matera JM, Ribeiro AA. Preservation of cadavers for surgical technique training. *Vet Surg.* 2004; 33 (6): 606-8.
26. Frizo I, Pickler T, Grotto D, Gerenutti M. Alterations in the reproductive performance of the female rats and fetotoxicity of *Lentinula edodes* (Shiitake). *Reproduct Toxicol.* 2014; 48: 23-36.
27. Gottlieb S, Quesada F, Corte S, Rama F. El esqueleto fetal de la nutria (*Myocastor coypus*) coloreado con alizarina-alcian blue. *Bol Soc Zool Uruguay.* 1993; 8: 313-7.
28. Biotti M, Rodríguez E, Fernández M. Comparación de técnicas roentgenográfica y tinción diafanizado, en los centros primarios de osificación del hueso coxal. *An Anat Norm.* 1984; 2 (2): 133-5.
29. Abreu K, Rodrigues A, Monteiro M, Franciulli L, Costola-Souza C, Roballo C, *et al.* Estudio microscópico e macroscópico, com enfoque radiográfico e de alizarina, no desenvolvimento embrionário e fetal de gatos domésticos (*Felis catus*) em diferentes idades gestacionais. *Pes Vet Bras.* 2011; 31: 57-66.
30. Rojas RM, Montenegro RMA. Embriogénesis del área mandibular en oveja y gato. *Rev Chil Anat.* 1996; 14 (1): 59-66.
31. Bravo R, Valenzuela M, Cáceres F, Soto R. Aplicación de técnica de hidróxido de potasio y glicerina para diafanización dentaria. *Internat J Morphol.* 2015; 33 (2): 673-7.
32. Yoshida S, Ohshima H, Kobayashi S. Vascularization of the enamel organ in developing molar teeth of rats-scanning electron microscope study of corrosion casts. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 1989; 66 (2-3): 99-111.
33. Saldarriaga B, Pinto A, Ballesteros L. Expresión morfológica de la arteria renal: un estudio anatómico directo en población mestiza colombiana. *Internat J Morphol.* 2008; 26 (1): 31-8.
34. Rogers M, Sherman R, Spieler R. Studying vascularization in fishes using corrosion casting and microscopy: a review. *Methods.* 2014; 7: 11-5.
35. Viscuso M, Arcamone M, Corrado M, Piscopo A. Variaciones del árbol traqueobronquial: metodología de estudio. *Rev Arg Anat Online.* 2011; 2 (1): 15-22.
36. Arts JHE, Rennen MAJ, Heer CD. Inhaled formaldehyde: Evaluation of sensory irritation in relation to carcinogenicity. *Regulat Toxicol Pharmacol.* 2006; 44: 144-60.
37. Minako H, Yoshitaka O, Hideaki C, Syuji Y, Daiju S, Shigetoshi H, *et al.* The influence of environmental exposure to formaldehyde in nasal mucosa of medical students during cadaver dissection. *Allergol Internat.* 2011; 60 (3): 373-9.

38. Malek F, Möritz K, Fanghanel J. A study on the effect of inhalative formaldehyde exposure on water labyrinth test performance in rats. *Ann Anat.* 2003; 185 (3): 277-85.
39. Speit G, Schmid O, Frohler-Keller M, Lang I, Triebig G. Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells. *Mut Res.* 2007; 627: 129-35.
40. Heck H, Casanova M. The implausibility of leukaemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity. *Regulat Toxicol Pharmacol.* 2004; 40: 92-106.
41. Janczyka P, Weigner J, Luebke-Becker A, Kaessmeyer S, Plendl J. Nitrite pickling salt as an alternative to formaldehyde for embalming in veterinary anatomy. A study based on histo- and microbiological analyses. *Ann Anat.* 2011; 193: 71-5.
42. Fagundes L, Murtaa G, Balthar A, Rodrigues C, Limac W, Silva F. Short-term exposure to formaldehyde promotes oxidative damage and inflammation in the trachea and diaphragm muscle of adult rats. *Ann Anat.* 2015; 202: 45-51.
43. Fu-Cheng L, Jia Z, Tao L, Lei Q, Sheng-Dong W, Hajime N, et al. Induction of endoplasmic reticulum stress and the modulation of thioredoxin-1 in formaldehyde-induced neurotoxicity. *NeuroToxicology.* 2012; 33: 290-8.
44. Cheng G, Shi YL, Sturla SJ, J alas JR, McIntee EJ, Villalta PW, et al. Reactions of formaldehyde plus acetaldehyde with deoxyguanosine and DNA: formation of cyclic deoxyguanosine adducts and formaldehyde cross-links. *Chem Res Toxicol.* 2003; 16: 145-52.
45. Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M, Ozen OA. Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. *J Chem Neuroanat.* 2005; 29: 173-8.
46. Harris JC, Rumack BH, Aldrich FD. Toxicology of urea formaldehyde and polyurethane foam insulation. *JAMA.* 1981; 245: 243.
47. Lim SK, Kim JC, Moon CJ, Kim GY, Han HJ, Park SH. Formaldehyde induces apoptosis through decreased Prx 2 via p38 MAPK in lung epithelial cells. *Toxicology.* 2010; 271: 100-6.
48. Martínez M, Ballut J, Lozano E. Evaluación microscópica en conejos (*Oryctolagus cuniculus*) de biocompatibilidad de aloimplante de meniscos conservados en glicerina al 98%. *Rev Cient.* 2012; 22 (4): 332-40.
49. Berrio D, Suárez V, Martínez M. Evaluación geométrica de meniscos frescos y conservados en glicerina al 98%. Estudio en conejos (*Oryctolagus cuniculus*). *Rev Med Veterin.* 2014; 28: 23-30.
50. Muñetón C, Ortiz J. Preparación en glicerina: una técnica para la conservación prolongada de cuerpos en anatomía veterinaria. *Rev Med Veterin.* 2013; 26: 115-22.