

Aplicación del método Golgi-Cox para la tinción de tejido cerebral

Amaya Zaldivar Verdier^{1,2}, Isabella Ximena Morales Galindo^{1,2}, Fernando Axel León Ventura^{1,2}, Brandon Salvador Pacheco Avila^{1,2}, Esther Juárez Cortes^{1,3}, José Vicente Negrete Díaz^{1,2,3}.

1Laboratorio de Plasticidad Cerebral y Neurociencia Integrativa, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, México.

2Programa de Licenciatura en Psicología Clínica, Departamento de Enfermería Clínica, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato, México.

3Programa de Licenciatura en Fisioterapia, Departamento de Enfermería Clínica, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato.

jv.negrete@ugto.mx, esther.juarez@ugto.mx

Resumen

En este artículo se describe el protocolo de tinción Golgi-Cox, que fue estandarizado por los participantes en el XXIX Verano de la Ciencia UGto., en el laboratorio de Plasticidad Cerebral y Neurociencia Integrativa de la UGto., y que se usará para estudiar la plasticidad neuronal en modelos murinos, especialmente. En 1873 Camillo Golgi desarrolla el método de la impregnación argéntica de tejido neuronal, el cual permite una observación detallada de la morfología neuronal y un análisis de las conexiones neuronales, y que posteriormente le dio junto a Don Santiago Ramón y Cajal el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1906. Este método tiene la peculiaridad de que tiñe sólo cierto porcentaje de las neuronas, en torno al 1%, la reacción exacta de por qué se tiñen sólo algunas neuronas y otras no se desconoce a la fecha; sin embargo, el método permite estudiar estas células de forma individual a detalle y observar claramente sus componentes: el soma, las dendritas, las espinas dendríticas y los axones. Existen diferentes protocolos para la tinción de Golgi, suelen tener diversas modificaciones que tienen como fin favorecer los resultados esperados de acuerdo al estudio, algunas de esas modificaciones suelen carecer de detalle, por ejemplo al teñir espinas dendríticas, y los procedimientos son más costosos, por ello en este artículo se describe el protocolo de Golgi-Cox como un método sencillo y accesible para los laboratorios que estudian el tejido nervioso, que en nuestro caso, se emplea para investigar el impacto de los cambios plásticos en la citoarquitectura neuronal, asociados a modificaciones en la conducta, la fisiología y los procesos cerebrales superiores.

Palabras clave: morfología neuronal, Golgi-cox, impregnación argéntica, conexiones neuronales.

Antecedentes

El método de tinción Golgi-Cox ha sido empleado ampliamente para el estudio de alteraciones en la plasticidad sináptica asociada a la experiencia, incluyendo cambios en la estructura neuronal en el neurodesarrollo normal y durante alteraciones del comportamiento, por ejemplo las asociadas a trastornos mentales, en tejido humano o en modelos animales, como es el caso de modelos para el estudio de la esquizofrenia, que al realizarse en animales, permite una mayor aproximación a los cambios que ocurren a nivel sináptico, en un menor periodo de tiempo y a bajo costo, así como aquellos cambios que subyacen a los procesos de aprendizaje y memoria, también en roedores (Bringas et al., 2012; Penagos-Corzo et al., 2015).

Esta tinción proporciona una imagen de las estructuras neuronales que se encuentran en el cerebro y su característica más significativa es su integridad tridimensional; así, es posible ver en secciones sucesivas las neuronas del cerebro, en zonas específicas. (Dubey et al., 2024). En condiciones no patológicas, los entornos enriquecidos facilitan el aprendizaje mediante el ejercicio físico y las interacciones sociales, en un estudio sobre este tema se utilizó la tinción de Golgi-Cox, permitiendo evidenciar el papel favorable del entorno enriquecido sobre el crecimiento neuronal. (Faherty et al., 2003), también las experiencias tempranas modifican la plasticidad cerebral, lo que en humanos son abrazos, caricias y palabras de aliento en animales está representado por cuidados y acicalamiento materno, permitiendo medir posteriormente los cambios

neuroplásticos mediante la tinción Golgi-Cox, al comparar los resultados obtenidos de roedores estimulados positivamente y aquellos que no recibieron estimulación (Mychasiuk et al., 2013). El método Golgi-Cox se ha empleado en combinación con otras técnicas de tinción, permitiendo extender su alcance, por ejemplo, en modelos murinos de Alzheimer, se ha combinado con inmunofluorescencia, para identificar la pérdida de espinas dendríticas en la vecindad de las placas de proteína beta amiloide que fueron sido marcadas con fluorescencia (Kartalou et al., 2020).

En este trabajo se presenta en detalle la puesta a punto de la técnica, además de proporcionar detalles de todas las etapas del proceso, desde el manejo de los organismos hasta la visualización de las neuronas.

Material y Métodos

a. Organismos

Se emplearon ratas adultas de la cepa Sprague-Dawley machos y hembras, n=4, de 350 gr, mantenidas con libre acceso a agua y alimento, en un ciclo de luz oscuridad 12/12, en el Bioterio del Campus Celaya Salvatierra de la Universidad de Guanajuato.



Figura 1. Ratas adultas (hembras), cepa: Sprague-Dawley.

b. Preparación de la solución de Golgi.

- 1) Solución A: 250 ml de agua destilada + 37.5 g de dicromato de potasio;
- 2) Solución B: 250 ml de agua destilada + 37.2 g de cloruro de mercurio, se mezcla en agua a 80°C.
- 3) Solución C: 600 ml de agua destilada + 30 g de cromato de potasio.

Se mezclan las soluciones A, B y C + 1500 ml de agua destilada se filtra al enfriarse. Se almacena en un recipiente que la proteja de la luz, durante 5 días, luego de los cuales se filtra nuevamente para eliminar precipitados.



Figura 2. Solución A, B y C para la preparación de solución de Golgi.

c. Preparación de portaobjetos gelatinizados.

En un vaso de precipitado se colocan 800 ml de agua y se calentó a 80°C, hasta ese punto se agregan 1.6 gramos de gretina, sin ningún grumo, se deja reposar la mezcla hasta que alcance los 40-50°C. Se prepararon tres rejillas metálicas donde cada una contenía 50 laminillas nuevas, estas laminillas se cubrieron completamente con el volumen de la mezcla durante dos minutos. Posteriormente, se escurrió la rejilla y se almacenó en un lugar cerrado, y con una inclinación leve sobre una charola para que el secado sea adecuado. Las laminillas se dejaron secar cuatro días, tras lo cual estuvieron listas para usarlas.

d. Obtención del tejido cerebral.

Los animales son anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg), se evalúan los signos hasta alcanzar la anestesia quirúrgica, tales como pérdida del equilibrio, disminución del tono muscular, ausencia del reflejo palpebral y pérdida de la sensibilidad al dolor. Posteriormente se realiza la maniobra de disección durante la cual se perfunde con solución salina al 0.9% vía intracardiaca a través del ventrículo izquierdo, a fin de retirar el fluido sanguíneo del tejido cerebral. Posteriormente, el cerebro se remueve y se sumerge en una serie de soluciones como sigue, almacenándolos siempre en total oscuridad: 1) 20 ml en solución Golgi-Cox por 1 día; 2) solución Golgi-Cox nueva por 14 días; 3) solución de sacarosa al 30% por 3-4 días (Bringas et al., 2012), renovando la solución de sacarosa al 6% al menos cada 15 días hasta el momento de corte.

e. Guía de extracción cerebral

Los instrumentos a utilizar deben de ser preparados previamente a la intervención del animal.

Se preparan algunos recipientes para depositar los cerebros, pueden añadirse hasta dos cerebros por recipiente, estos se mantendrán en la solución seleccionada para el estudio, en este caso, Golgi.

Es necesaria la fabricación de solución salina para la perfusión del corazón, para ello se combinan 0.9gr de NaCl en 100ml de H₂O. Generalmente se utilizan 180 ml de solución salina por rata, por lo que es necesario elaborar la cantidad correspondiente dependiendo el número de ratas que se intervendrán. Junto a esto se necesitan de una a dos jeringas de 60 ml para la perfusión.

Los utensilios quirúrgicos son:

- Tijera romo-aguda, se utiliza para cortar pelaje, piel, músculo y hueso.
- Tijera sanvenero, para cortar arterias, ligamentos y realizar la punción craneal.
- Pinzas mayo-Hegar, se pueden emplear para sujetar y abrir el tórax, ampliando la visión interna del animal.
- Estilete, se emplea para interactuar con los órganos del animal y localizar fácilmente las arterias necesarias, otra función es liberar el cerebro del cráneo y evitar el uso de tijeras en zonas delicadas.

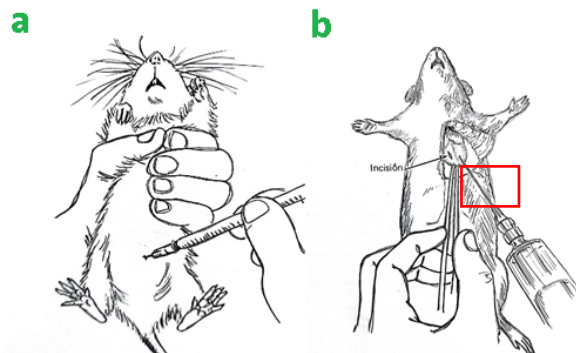


Figura 3. En a, la imagen se muestra un ejemplo de la vía de administración intraperitoneal en la rata. En b, se observa el sitio de inyección para la perfusión cardiaca en una rata.

A continuación, se prepara una charola de acero para realizar el procedimiento, debe contar con orificios en uno de los extremos, ya que se trabajará con abundante agua para permitir un correcto drenado de sangre, evitando la acumulación y coagulación de líquido en espacios de trabajo.

Es necesario tener en cuenta que un ambiente limpio y ordenado facilita el procedimiento, por lo que se intenta trabajar solo con los materiales esenciales a la mano para evitar confusiones.

La manipulación del animal debe ser, desde un principio, libre de estrés, ya que un animal estresado dificulta tanto la inyección del anestésico como la eficacia del mismo, alargando así el procedimiento. Se coloca al animal en una caja con alimento, agua y se cubre con una manta para su traslado al área de extracción. El trayecto de un punto a otro puede estresar al animal si no es privado visualmente.

Para el anestesiado del animal es necesario sujetarlo de tal manera que le impida el movimiento, ya que al pinchar intentará defenderse, por lo que el movimiento debe ser lo más rápido posible para evitar el estrés.

Para sujetar a la rata es conveniente usar los dedos índice y corazón en su cuello, de esta manera se imposibilita el movimiento de la cabeza y limitaremos la visión. Los dedos pulgares, anular y meñique rodearán el torso del animal, esto limita el movimiento casi por completo. Mientras esto es realizado con una mano, se tendrá que mantener lista la jeringa de anestésico con la mano contraria para realizar la inyección intraperitoneal, se puede llevar a cabo en la zona del vientre, tomando como guía las piernas traseras y así conectar un punto medio para pinzar justo en el costado del mismo.

La administración de la sustancia se realiza de forma constante y ligeramente apresurada para evitar estrés en el animal para posteriormente reubicarlo en su caja de transporte. Si todo salió correctamente el animal quedará inconsciente en un plazo de cinco a diez minutos para continuar con las pruebas de dolor y reflejos. Estas pruebas se realizan consecutivamente para percatarse del estado del animal.

La primera prueba consiste en presionar con la punta del pulgar la cola de la rata, rodeando con el resto de los dedos la circunferencia de la cola, de esta manera se demuestra alguna reacción física que indique sensación de dolor en la rata como espasmo o contracción muscular. Si cuenta con alguno de estos signos, es indicativo de que el animal aún siente dolor, por lo que se deberá esperar unos minutos extra para hacer surgir un mejor efecto del anestésico.

La segunda prueba se realiza utilizando algodón, tocando la zona de la córnea, si el animal cierra los ojos o tiene algún movimiento del párpado, esto indica que los reflejos del animal sigan activos, mientras esto permanezca es necesario esperar, ya que el animal sigue consciente. Si la rata muestra signos de consciencia habiendo esperado el tiempo suficiente, será necesario administrar una dosis extra de anestésico y se realizarán las pruebas de dolor y reflejos una vez más. Cuando el animal esté inconsciente se llevará al área de extracción.

La siguiente parte explica el proceso de la extracción del cerebro, pero antes de la intervención craneal es necesario realizar la perfusión, un drenado de los vasos sanguíneos que conforman las venas y arterias del cuerpo. Con esta técnica se busca limpiar de suciedad y liberar los vasos sanguíneos del tejido cerebral. Para iniciar el procedimiento es necesario la tijera previamente preparada para realizar los primeros cortes, posicionando al animal en posición supino se podrá localizar el tórax, justo debajo de las costillas flotantes. Guiándose del área central del tórax se encuentra el esternón, será un punto guía para el primer corte, ya que se realiza justo debajo.

Se procede con un corte horizontal buscando rodear la zona torácica hasta llegar a los brazos del animal, de esta manera los órganos quedan expuestos.

Es importante señalar que para llegar a los órganos se deben cortar tres capas de tejido, pelaje, piel y músculo, después de eso se llegará a los órganos. Una vez identificado el corazón, justo detrás de los pulmones, se prepara la jeringa con solución salina y una pinza mayo. Localizando la arteria aorta descendente se pinzará con las pinzas mayo para evitar la circulación sanguínea, se encuentra por debajo del corazón y se localiza por ser la más grande y oscura. Posteriormente se procede a cortar la aurícula derecha del corazón, con esto nos aseguramos que el drenado de sangre sea irrigado por un solo conducto.

Se ubica la zona ventricular del corazón, la parte más angosta e inferior para realizar la inyección, al penetrar de uno a tres milímetros se procede a suministrar solución salina hasta agotar la jeringa, este paso se realizará un par de veces procurando pasar por el mismo orificio de la aguja hecho previamente. El agua deberá correr mientras se perfusión para evitar acumulación de sangre, permite una mejor circulación al administrar la solución salina, por lo que el agua es muy importante para este procedimiento.

Una vez realizada la perfusión, se puede comprobar si ha tenido éxito mirando las extremidades del animal, ojos y órganos, estos tejidos perderán tonalidad, volviéndose de un color blanquecino o pálido. Cuando estoy esté confirmado se procederá a la división de la cabeza, haciendo cortes en el cuello con la tijera romo-aguda, ya que se cortará tanto el músculo como hueso, separando totalmente la cabeza del cuerpo.

Una vez hecho esto, se limpia el cuello de restos de tejido y hueso que hayan quedado del corte anterior, se traza una línea en el centro de la cabeza que vaya del inicio del cuello a la nariz para separar la piel del cráneo. El cráneo expuesto tendrá una capa de tejido traslúcido y fibroso que lo cubre completamente, se separará del cráneo con tijeras romo-aguda, apoyándose de la hoja más gruesa para raspar el cráneo, llevándose el periostio a los bordes de la piel previamente cortada.

Después, se harán tres cortes en el cráneo, dos horizontales (izquierdo y derecho) y uno vertical hacia la base craneal (zona parietal). Estos cortes se realizan para facilitar la división del cráneo y marcar una línea guía que se conectará más tarde al momento de la punción.

Para este paso será necesario utilizar la tijera iris, ubicando la zona frontal del cráneo, esto se realiza tomando los ojos como punto de referencia, posicionando las tijeras de dos a cuatro milímetros por debajo, aproximándose a la zona nasal, presionando con la punta de la tijera el hueso para punzar y abrir el cráneo en dos hemisferios. Esta punción se conectará con el corte vertical realizado previamente, provocando un corte en línea recta en la zona superior del cráneo. Para separar de mejor manera se abrirán las tijeras horizontalmente respecto al corte y se expondrá el cerebro con facilidad.

El cerebro podrá salir con el cuidado suficiente, facilitando su extracción con el estilete para cortar ligamentos alrededor del cerebro y separarlo del cráneo. El cerebro deberá ser depositado en un contenedor previamente preparado con la sustancia de Golgi y mantenerse cubierto de la luz durante la preparación.

f. Pasos para los cortes del tejido cerebral.

Para la obtención de los cortes de tejido cerebral impregnado con Golgi-Cox se utilizó el vibrotomo, este aparato permite que el tejido esté fresco y que se pueda seccionar en 150 o 200 micras de grosor, lo que es ideal para elaborar un análisis de la morfología neuronal.

El cerebro en sacarosa se coloca sobre una charola metálica para realizar un corte en la zona frontal del cerebro y otro corte en la parte occipital para retirar el cerebelo.

Se coloca una ligera película de pegamento rápido sobre la base de la placa del vibrotomo, dejando dos minutos para una mejor resistencia al colocar el tejido cerebral. La cámara del vibrotomo se llena con agua destilada para cubrir el tejido. Los cortes se toman con un pincel con cerdas suaves, que ayudará a colocarlo en el portaobjetos gelatinizado, se toma en cuenta una cantidad de 3 a 6 cortes por laminilla, esto dependerá del tamaño de los cortes. Para estas muestras se realizaron cortes de 150 y 200 micras para observar el soma, axón, dendritas y espinas dendríticas.

Cuando se han colocado los cortes en el portaobjetos, se retira el exceso de agua bidestilada con una capa de papel filtro y papel absorbente aplicando una ligera presión, esto para posteriormente colocar los portaobjetos en una cámara húmeda, en esta se coloca un 80% H₂O y 20% de etanol, la cantidad debe ser procurando que en el recipiente la mezcla no toque el tejido, esta cámara se protege de la luz debido a que el tejido es fotosensible.

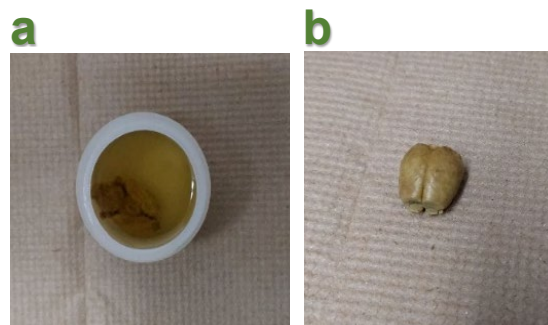


Figura 3. En "a" se observa el cerebro en sacarosa, mientras que en "b" se muestra el tejido cerebral después de realizar los dos cortes, uno en la zona frontal para retirar el bulbo olfativo, y otro en la zona occipital para retirar el cerebelo.

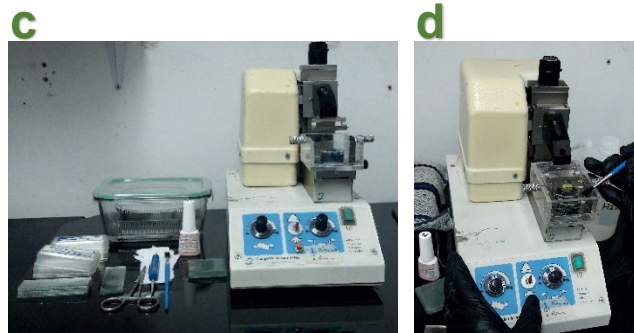


Figura 4. En la imagen "c" se muestra el vibrotomo preparado junto con los materiales necesarios para realizar los cortes del tejido cerebral, como lo son: cuchilla nueva, 200 ml de agua bidestilada, pincel con cerdas suaves, portaobjetos gelatinizados, pegamento rápido, papel filtro, papel absorbente, pinzas (para sostener el tejido) y cámara húmeda. En "d" se observa el corte pegado a la base del vibrotomo y cubierto de agua bidestilada.



Figura 5. Cortes seccionados a 200 micras de tejido cerebral de la rata en cámara húmeda.

g. Soluciones para el protocolo de Golgi-Cox.

Para el revelado se necesitaron 600 ml de cada una de las siguientes soluciones:

- 1-. Agua bidestilada.
- 2-. Etanol al 50, 70, 96 y 100%
- 3-. Hidróxido de amonio.
- 4-. Fijador Kodak.
- 5-. Xileno.

h. Instrucciones previas a la tinción.

- 1-. Los productos químicos deben almacenarse en botellas de vidrio.
- 2-. El tiempo indicado para los distintos pasos del protocolo no afectan significativamente en la calidad de la tinción, por lo que hay cierta flexibilidad al momento de seguir con el protocolo.
- 3-. Es necesario filtrar las sustancias entre cada tinción para evitar los posibles residuos a la hora del revelado en el microscopio.
- 4-. El cuarto donde se elaborará la tinción debe estar en oscuridad, utilizando solamente luz roja, del mismo modo que las soluciones deben almacenarse en la oscuridad.
- 5-. Tener cuidado con todas las soluciones pues el contacto directo con la piel y/o inhalación de estos productos es dañina para el ser humano debido a su toxicidad y carcinogénesis. Esto se evita utilizando guantes de látex, mascarillas para laboratorio, gafas y cubrebocas.
- 6-. Importante mantener el espacio en el que se realice el procedimiento en constante ventilación.

i. Protocolo de revelado de la tinción Golgi-Cox.

1. Agua bidestilada, por 1 minuto.
2. Hidróxido de amonio por 25 minutos.
3. Agua bidestilada, 10 lavados, la rejilla se sacará y meterá en el recipiente con agua bidestilada 10 veces.
4. Fijador Kodak, por 25 minutos.
5. Agua bidestilada, 10 lavados.
6. Etanol al 50%, por 1 minuto.
7. Etanol al 70%, por 1 minuto.
8. Etanol al 96%, por 5 minutos.
9. Etanol al 100% (1) por 10 minutos.
10. Etanol al 100% (2) por 10 minutos.
11. Xileno, por 15 minutos, al menos.



Figura 6. Todas las soluciones se conservaron en frascos de vidrio que sellaron adecuadamente para no dejar escapar gases. Las soluciones deben filtrarse después de cada tinción.

j. Montaje.

El portaobjetos debe permanecer en una superficie plana para colocar cinco gotas de resina sintética sobre el tejido teñido. Luego los portaobjetos son cubiertos con un cubreobjetos, al momento de colocarlo sobre el tejido se debe realizar una ligera presión que permitirá eliminar las burbujas de aire formadas por la resina. Se retira el exceso de resina de los bordes con ayuda de una sanita, después se colocan los portaobjetos en una rejilla metálica para almacenarla en la oscuridad por al menos tres días para un secado completo. Después se podrán observar las neuronas con un microscopio, las diferentes regiones se identificarán usando el Atlas Estereotáxico de Paxinos y Watson de 1998.

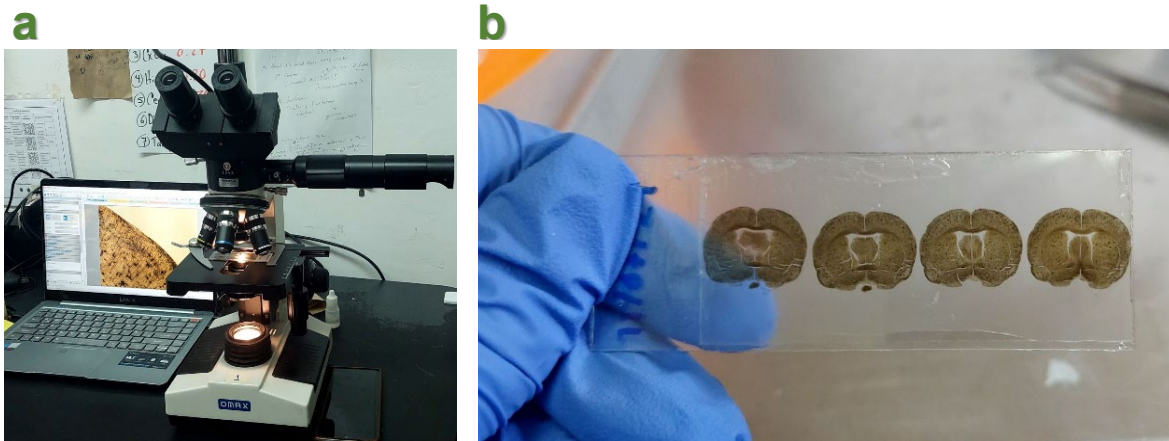


Figura 7. En "a" se observa un corte teñido con tinción de Golgi-Cox con ayuda de un microscopio con una vista panorámica de 4x. En la imagen "b" se muestra un ejemplo del montaje del tejido, el cubreobjetos cubre el tejido con resina y son visibles los cortes de cerebro de la rata en sentido rostro-caudal.

Consideraciones éticas

Todos los procedimientos experimentales se harán conforme a la Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y a las regulaciones internacionales, a saber: Guide for the Care and Use of Laboratory Animals , 8th edition, National Research Council (US), del Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institute of Health, National Academies Press, 2011). El protocolo es parte del proyecto aprobado por el Comité de Ética para la Investigación de la Universidad de Guanajuato CIBIUG-P09-2020. Los estudiantes fueron adecuadamente capacitados para el manejo y uso de roedores para experimentación. Se realizaron todos los esfuerzos para minimizar el número de animales utilizados y su sufrimiento, que en este caso sólo fueron cuatro animales, como se ha mencionado antes.

Resultados

A continuación se presentan una serie de imágenes de cortes de cerebro de la rata, de regiones, de neuronas, de dendritas y de espinas dendríticas, tomadas con diferentes tipos de microscopios y a diferentes órdenes de magnificación. Se pretende de esta manera hacer una presentación bastante gráfica, de la morfología neuronal, en imágenes que se espera resulten atractivas, interesantes y útiles.



Figura 8. En la presente imagen se muestra una serie de cortes de cerebro de la rata en sentido rostro-caudal a diferente altura, el número consecutivo indica su posición en dicho eje. Puede apreciarse la variación del área ocupada a nivel frontal, medial y posterior, así como las diferentes estructuras ubicadas a lo largo del mismo eje.

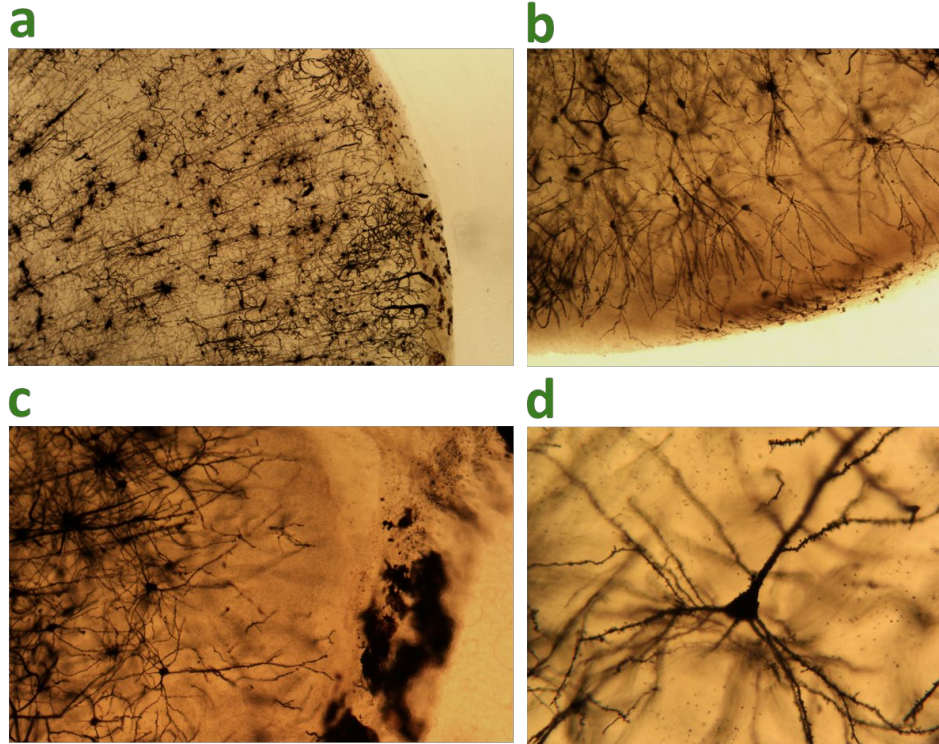


Figura 9. En estas imágenes se muestran vistas a diferente amplificación, en a una vista panorámica a 4X, puede apreciarse la corteza cerebral en su borde de manera semejante a b y c ambas a 10X. Finalmente en d se observa una neurona piramidal a 40X.

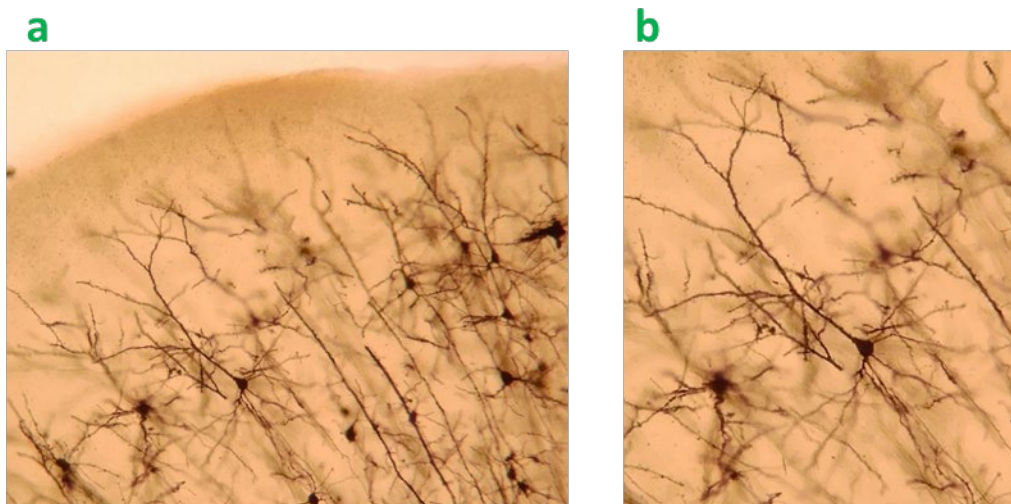


Figura 10. En a se presenta una fotomicrografía de un corte histológico de corteza cerebral, teñido con la técnica Golgi-Cox. Puede apreciarse un conjunto de células piramidales de capas II/III de corteza cerebral, próximas al borde de dicha corteza, así como las dendritas apicales de neuronas piramidales de capas más profundas IV y V; además, en la mitad derecha puede apreciarse un conjunto de neuronas piramidales organizadas posiblemente en columna, a diferente profundidad. En b se observa en primer plano una neurona piramidal de tamaño medio, de capa II/III de corteza cerebral, se aprecia la estructura característica de las neuronas multipolares, con varias ramas dendríticas que emergen del soma, formando hacia arriba el árbol dendrítico apical, con las ramas que se derivan precisamente de la dendrita apical, claramente de mayor grosor y longitud, así como las dendritas que emergen del soma en la región más baja, que se extienden hacia los lados y abajo. Dispuestos en una línea imaginaria continua que atraviesa al soma de arriba hacia abajo se encuentran alineados la dendrita apical y el axón, de mucho menor grosor que la dendrita apical y que algunas dendritas basales.

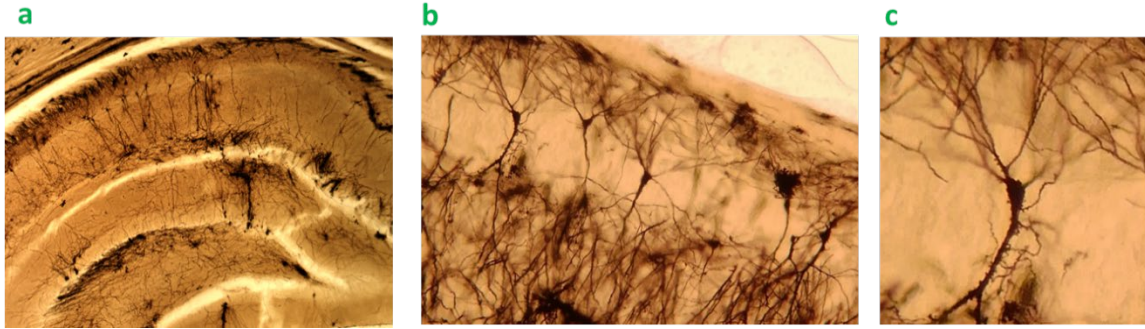


Figura 11. En a, se muestra una vista panorámica de la formación hipocámpal, apreciándose claramente las regiones de Giro Dentado y de CA1 (Cornu ammonis 1), con grupos de neuronas granulares en el primero, a manera de racimos, y algunas neuronas piramidales en el segundo. Puede apreciarse la estructura laminar de esta estructura. En b, se aprecian neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo, con sus somas alineados sobre la capa piramidal, con sus árboles dendríticos basales ricamente ramificados (arriba) y los árboles dendríticos apicales (abajo, nótese el mayor grosor de la dendrita apical), esta disposición es debida a la organización radial de las capas, que parecieran "dan vuelta". En c, se observa un detalle de neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo presentadas en la figura 4. Pueden apreciarse pequeñas varicosidades denominadas espinas dendríticas, los sitios postsinápticos de comunicación neuronal, tanto en el soma como en las dendritas.

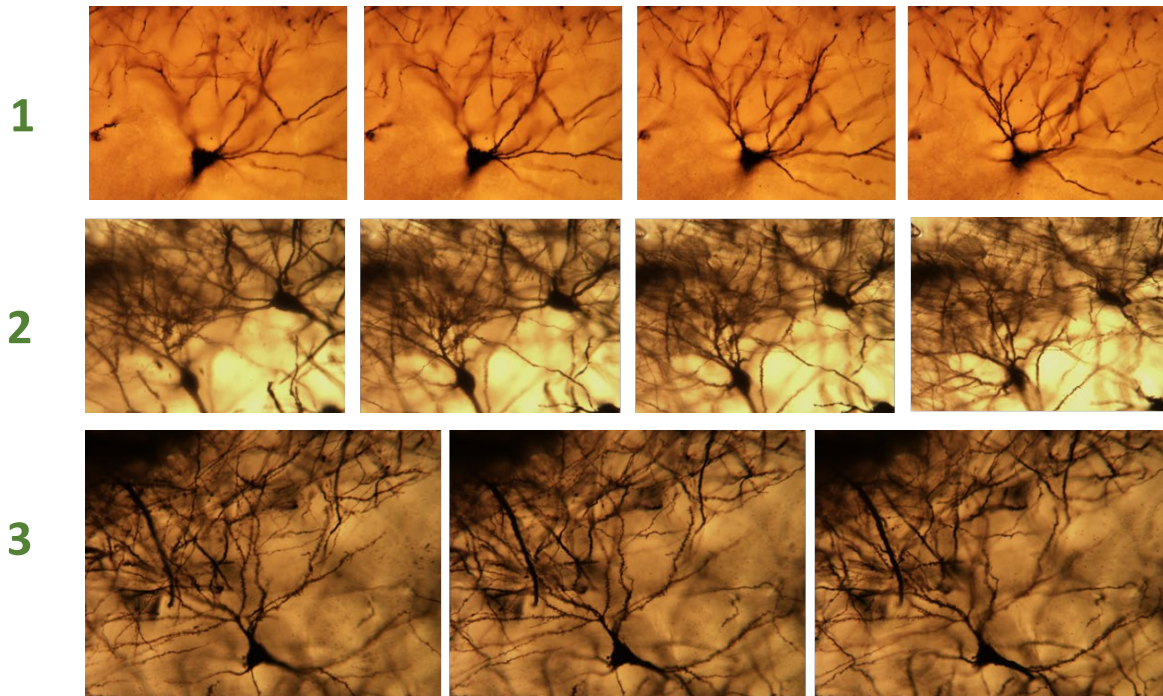


Figura 12. En la siguiente serie de imágenes se muestran diferentes neuronas piramidales del área CA1 del hipocampo, donde se puede observar el soma y árbol dendrítico basal a distintos enfoques.

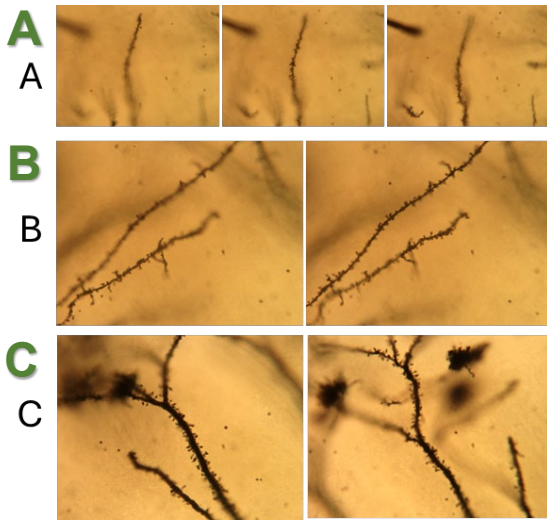


Figura 13. En A se aprecia una serie de fotomicrografía de una dendrita con sus respectivas espinas a diferente enfoque. En B se aprecian dos dendritas con espinas igualmente a diferente enfoque y en C un conjunto de dendritas con sus respectivas espinas. Puede apreciarse el diferente grosor, longitud y densidad de espinas lo que da diferente función a la neurona a la que pertenecen.

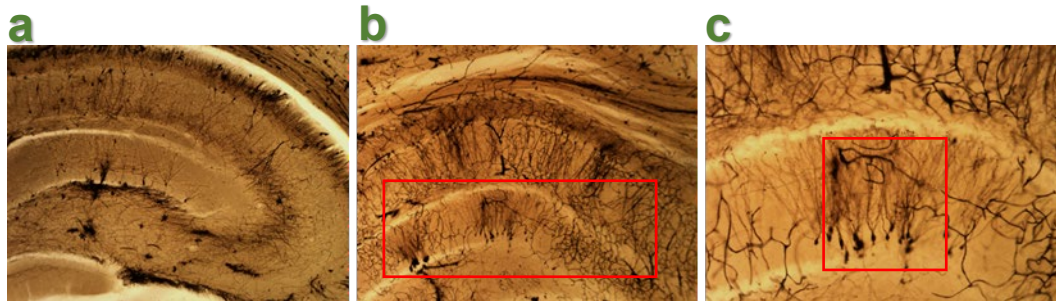


Figura 14. En la presente figura se observa la formación hipocampal a diferentes aumentos 5X, 10X y 40X, puede apreciarse al interior del recuadro la región del giro dentado (b), así como un conjunto de células granulares con su árbol dendrítico extendiéndose hacia CA1 (c).

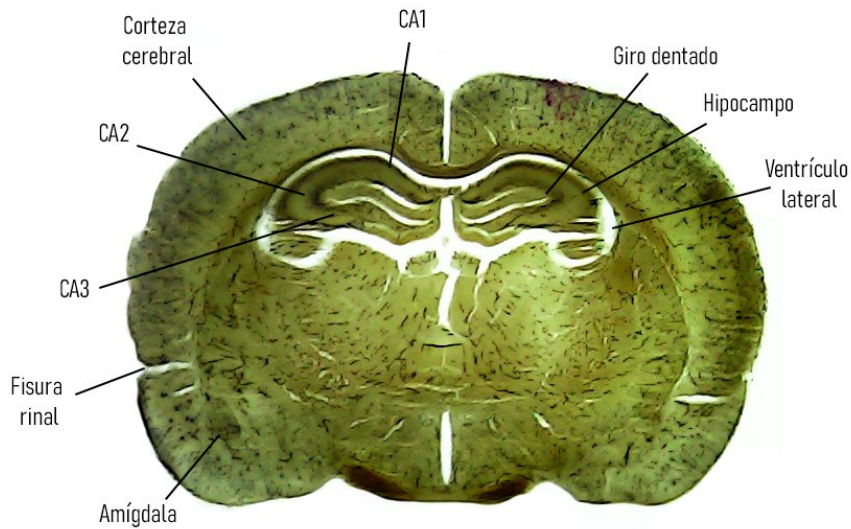


Figura 14. En la imagen se muestran las regiones que se pueden observar en un corte de cerebro de rata en sentido rostro-caudal.

Conclusión

El protocolo es flexible a los tiempos de los químicos en la fase de tinción, ya que a pesar de la variabilidad se identifica detalladamente la estructura de las neuronas, compuesta por somas, dendritas, axones y espinas dendríticas.

Nuestros resultados sugieren que el protocolo de tinción de Golgi-Cox es factible para la impregnación de neuronas en tejido cerebral en la rata además de la identificación de regiones neuronales ya que el principal objetivo del laboratorio hace énfasis en el estudio de la estructura además de la función del sistema nervioso central y su capacidad de plasticidad, tomando como ejemplo el hipocampo el cual principalmente se relaciona con funciones cognitivas como el aprendizaje y la memoria se puede observar claramente la estructura celular de dicha región lo que nos permite realizar comparaciones en diversos tejidos con múltiples alteraciones, dando resultados útiles para investigaciones posteriores y de distintos enfoques clínicos.

Agradecimientos

Agradecemos la sustancial contribución de los miembros del Laboratorio de Plasticidad Cerebral y Neurociencia Integrativa, en la asesoría y acompañamiento de los participantes en el Verano de la Ciencia, en particular a Carlos Francisco Reyes García, Diana Torres Luna, Javier Iván Hernández Monzón; a la Universidad de Guanajuato, que a través de la Convocatoria Institucional de Investigación Científica 2020, se obtuvieron equipos y reactivos; a la Universidad de Guanajuato que a través del XXIX Verano de la Ciencia otorgó apoyos sociales a los alumnos participantes; y a la Rectoría de Campus Celaya-Salvatierra por las facilidades y apoyos económicos para la habilitación del área de trabajo del laboratorio, así como para el mantenimiento y cuidado de los animales empleados.

Referencias

- Bringas, M. E., Morales-Medina, J. C., Flores-Vivaldo, Y., Negrete-Díaz, J. V., Aguilar-Alonso, P., León-Chávez, B. A., Lazcano-Ortiz, Z., Monroy, E., Rodríguez-Moreno, A., Quirion, R., & Flores, G. (2012). Clozapine administration reverses behavioral, neuronal, and nitric oxide disturbances in the neonatal ventral hippocampus rat. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.12.008>
- Dubey, V., Dixit, A. B., Tripathi, M., Sarat Chandra, P., & Banerjee, J. (2024). Quantification of Neuronal Dendritic Spine Density and Lengths of Apical and Basal Dendrites in Temporal Lobe Structures Using Golgi-Cox Staining. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2761). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3662-6_5
- Faherty, C. J., Kerley, D., & Smeyne, R. J. (2003). A Golgi-Cox morphological analysis of neuronal changes induced by environmental enrichment. *Developmental Brain Research*, 141(1–2), 55–61. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(02\)00642-9](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(02)00642-9)
- Kartalou, G. I., Endres, T., Lessmann, V., & Gottmann, K. (2020). Golgi-Cox impregnation combined with fluorescence staining of amyloid plaques reveals local spine loss in an Alzheimer mouse model. *Journal of Neuroscience Methods*, 341, 108797. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2020.108797>
- Mychasiuk, R., Gibb, R., & Kolb, B. (2013). Visualizing the effects of a positive early experience, tactile stimulation, on dendritic morphology and synaptic connectivity with Golgi-cox staining. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 79. <https://doi.org/10.3791/50694>
- Paxinos G, Watson C (1998). The rat brain in stereotaxic coordinates academic. 4th ed. Academic Press, New York.
- Penagos-Corzo, J. C., Bonilla, A., Rodríguez-Moreno, A., Flores, G., & Negrete-Díaz, J. V. (2015). Conditional self-discrimination enhances dendritic spine number and dendritic length at prefrontal cortex and hippocampal neurons of rats. *Synapse*, 69(11). <https://doi.org/10.1002/syn.21847>