

1984-2

REGISTRO 080447477



FACULTAD DE CIENCIAS

**MODIFICACION AL METODO RAPIDO DE GOLGI CON
LA SUPRESION DEL TETROXIDO DE OSMIO PARA EL
ESTUDIO CITOMORFOLOGICO DEL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL**

JOSE IGNACIO ALFREDO GONZALEZ BURGOS

**"MODIFICACION AL METODO RAPIDO DE GOLGI CON
LA SUPRESION DEL TETROXIDO DE OSMIO PARA EL
ESTUDIO CITOMORFOLOGICO DEL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL"**

NOMBRE DEL ALUMNO: JOSE IGNACIO ALFREDO GONZALEZ BURGOS

NOMBRE DEL ASESOR: M. EN C. CARLOS BEAS ZARATE

A MIS PADRES Y HERMANDS, CON ETERNO
AGRADECIMIENTO POR HABERME HEREDADO
UNA FORMACION PROFESIONAL.

A MIS MAESTROS, DR. ALFREDO FERIA
VELASCO Y M. EN C. GUADALUPE TAPIA
ARIZMENDI, GUIAS DE MI TRAYECTORIA
ACADEMICA.

A MI ESPOSA, MA. TERESA TAPIA DE
GONZALEZ, POR SU FE Y APOYO INQUE
BRANTABLES EN MI SUPERACION PROFESIONAL.

AL M. EN C. CARLOS BEAS ZARATE,
POR LA AYUDA BRINDADA PARA LOGRAR
LA CULMINACION DE MI TESIS.

A LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA,
POR DARME UN LUGAR EN SUS AULAS
Y POR HABER FORMADO EN ELLAS UN
PROFESIONISTA UTIL A LA SOCIEDAD.

A LA UNIDAD DE INVESTIGACION BIOMEDICA
DE OCCIDENTE, IMSS, POR HABERME BRINDA
DO LA OPORTUNIDAD DE INGRESAR A SUS LA
BORATORIOS Y CON ELLO, AL MUNDO DE LA
CIENCIA.

A TODOS MIS COMPAÑEROS, AMIGOS
Y DEMAS PERSONAS QUE DE ALGUNA
FORMA, COLABORARON EN EL DESA
RROLLO DE MI TESIS.

ESTA TESIS SE LLEVO AL CABO EN LA DIVISION
DE NEUROBIOLOGIA DE LA UNIDAD DE INVESTIGA
CION BIOMEDICA DE OCCIDENTE DEL INSTITUTO
MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL.

CONTENIDO

- INTRODUCCION	1
- GENERALIDADES	3
• METODOS DE ESTUDIO EXPERIMENTAL DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	3
• LAS TECNICAS DE IMPREGNACION METALICA	8
+ FUNDAMENTO	8
+ UTILIDAD	8
+ CARACTERISTICAS PARTICULARES	8
+ CLASIFICACION	11
• EL METODO RAPIDO DE GOLGI	13
+ ORIGEN	13
+ CARACTERISTICAS FUNDAMENTALES DEL METODO	14
+ EVENTOS BIOQUIMICOS HIPOTETICOS	16
+ FUNDAMENTOS GENERALES DE LAS VARIANTES AL METODO	17
- IMPORTANCIA Y OBJETIVO DEL TRABAJO	19
- MATERIAL Y METODOS	20
- RESULTADOS	24
- DISCUSION	28
- CONCLUSIONES	32
- REFERENCIAS	33

INTRODUCCION

Uno de los factores que en gran medida han determinado el desarrollo de la Ciencia, ha sido la implementación de métodos de estudio adecuados y precisos, mediante los cuales el planteamiento de las preguntas que surgen de la observación de los fenómenos naturales, sean factibles de resolver de manera objetiva y clara.

Así, el avance del conocimiento científico en sus diferentes áreas está determinado fundamentalmente por dos factores: el enfoque metodológico utilizado ante el problema que el investigador se plantea y el buen juicio de éste para interpretar atinadamente los resultados obtenidos, dentro del marco de lo conocido y comunicado.

Sin embargo, la dificultad en la acertada interpretación de los resultados estriba, en ocasiones, en la sutileza de los fenómenos en cuestión, lo cual plantea la necesidad de remodelar el diseño experimental o bien, adaptar o mejorar los métodos o técnicas de estudio con las cuales se pretende responder la pregunta formulada.

En el campo de las Ciencias Biológicas y en particular en las Neurociencias, ésta necesidad no ha sido la excepción. Por el contrario, tanto en la neurofarmacología como en la neuroquímica, en la neurofisiología o en la neuromorfología, dicha necesidad ha propiciado el avance en el diseño de nuevas y más sofisticadas formas de abordar, desde un punto de vista metodológico, los problemas que tales disciplinas plantean.

El estudio de la neuromorfología y específicamente la neurocitología, se ha visto favorecida por la implementación de los métodos de impregnación metálica, que desde finales del siglo pasado impulsaron la generación de conocimientos acerca de la citomorfología y la organización histológica del sistema nervioso central.

El método rápido de Golgi (15) fué la primera técnica de impregnación metálica cuya implementación dió por resultado un mayor conocimiento acerca de la estructura de las células nerviosas y constituyó un nuevo enfoque de estudio de las mismas.

La depuración del método de Golgi y la gran cantidad de modificaciones hasta ahora comunicadas en la literatura, han contribuido a aumentar el número de conocimientos que se tienen acerca de la citomorfología del tejido nervioso. Sin embargo, queda aún mucho por investigar y por ello es conveniente contar con métodos de estudio adecuados y accesibles, que incrementen aún más el conocimiento de éste aspecto de la biología del sistema nervioso.

GENERALIDADES

En este trabajo se relaciona con una modificación metodológica

Dado que el presente trabajo se relaciona con una modificación metodológica útil para el estudio de la estructura del tejido nervioso, es conveniente tener bien clara la ubicación de la técnica original dentro de los diversos métodos existentes.

El estudio del sistema nervioso se ha abordado desde varios puntos de vista:

a) Métodos bioquímicos: Están basados en el estudio de la estructura y el metabolismo de los elementos y compuestos químicos que conforman el tejido nervioso y el papel funcional que éstos desempeñan.

b) Métodos electrofisiológicos: Consisten en el registro eléctrico de la actividad neuronal a nivel tanto intracelular como extracelular, con base al uso de microelectrodos.

c) Métodos farmacológicos: Se fundamentan en el estudio de los efectos que tienen algunas sustancias (drogas) de origen exógeno o endógeno, sobre las células nerviosas, al interactuar con los receptores localizados en diversas regiones de éstas; o bien, en el uso de drogas previamente caracterizadas, a fin de investigar la naturaleza química, la localización y procesos metabólicos en los que intervienen los receptores con las que interactúan.

d) Métodos conductuales: Tienen por objeto caracterizar las manifestaciones conductuales asociadas por alguna condición experimental a nivel

4

central. Así, es posible, en ocasiones, saber cuales son las estructuras nerviosas involucradas en las diferentes manifestaciones del comportamiento del individuo.

e) Métodos morfológicos: Son utilizados para estudiar la anatomía de las diversas regiones que constituyen el tejido nervioso y la relación que éstas guardan entre sí. Su fundamento radica en la observación de las estructuras, ya sea en el microscopio de luz o en el microscopio electrónico para lo cual, el tejido requiere de un tratamiento previo específico para lograr la visualización de determinados elementos estructurales y que éstos, a su vez, revelen las características deseadas.

Para ello, existen diversas técnicas cuyos principios y utilidad se mencionan brevemente a continuación:

AUTORADIOGRAFIA. Un elemento precursor de una sustancia se marca radioactivamente y se incuba con el tejido nervioso in vivo o in vitro; subsiguientemente, al incorporarse al tejido dicha sustancia, será fácilmente localizada al observar el tejido con el microscopio óptico o el microscopio electrónico. Esta técnica resulta útil cuando se pretende mapear el trayecto de ciertas vías nerviosas, dado que el transporte de sustancias puede ser anterógrado o retrógrado (21, 23).

TECNICAS BASADAS EN EL USO DE PEROXIDASA O DE COLORANTES FLUORESCENTES.

Tanto la peroxidasa como algunos colorantes (azul de Evans, amarillo lu cifar, etc.) tienen la propiedad de poder ser incorporados por las tej

minales axónicas y transportados retrogradamente al soma neuronal (23), de tal manera que es posible establecer el sitio de origen de algunas fibras nerviosas mediante la observación de la marca fluorescente en el microscopio de luz ultravioleta, en caso de que el tejido se incubó con algún colorante fluorescente; o bien, la observación con el microscopio fotónico o electrónico, de tejidos incubados con peroxidasa (21, 23).

CITOQUIMICA E HISTOQUIMICA. Consisten en la identificación de sustancias tisulares endógenas, mediante la reacción de éstas con un compuesto exógeno determinado, al ser observado el producto de dicha reacción en el microscopio óptico o electrónico (21, 23). Esta técnica es útil para determinar la existencia de sustancias que se localizan en el cilindrosje de ciertas neuronas, lo cual permite conocer el trayecto de tales fibras.

INMUNOCITOQUIMICA E INMUNOHISTOQUIMICA. Las técnicas se basan en la alta afinidad que poseen los anticuerpos, de combinarse con los antígenos correspondientes que se desean identificar; dichos anticuerpos se marcan previamente con una sustancia fluorescente o electrógena y se incuban con el tejido para finalmente ser observados en el microscopio de luz o electrónico, respectivamente. Estas técnicas han hecho posible el mapeo de algunas vías nerviosas que utilizan determinados neurotransmisores (21, 23).

HISTOFLUORESCENCIA. El principio básico de la técnica radica en la propiedad que poseen las monoaminas (catecolaminas y serotonina) biológicamente activas de reaccionar con formaldehído en fase gaseosa (23), de tal manera que se forman complejos fluorescentes visibles en el microscopio de fluorescencia.

CRIOFRACTURA. Consiste en la fractura del tejido que previamente ha sido congelado y tratado especialmente, a fin de observar la réplica de superficie de la fractura en el microscopio electrónico de transmisión. Con el empleo de ésta técnica ha sido posible observar los detalles estructurales de los complejos de unión, de los contactos sinápticos y las características estructurales del fenómeno de liberación del neurotransmisor contenido en vesículas (23).

TINCION CON COLORANTES DE ANILINA. El gran número de técnicas histológicas a base de colorantes de anilina existentes, se basan en la afinidad que poseen las estructuras tisulares por los tintes utilizados, sin deterioro de la organización bioquímica del tejido (28). Esta característica ha facilitado el conocimiento de la estructura y organización histológica de las diversas áreas del tejido nervioso.

IMPREGNACIONES METALICAS. Permiten la visualización de las células del tejido nervioso mediante el depósito de metales sobre la superficie y/o en el interior de la célula y sus prolongaciones. Los metales que más se han empleado para ésta propósito son plata, oro y mercurio (27,

28). Su aplicación ha permitido conocer la morfología de las células nerviosas en toda su extensión y el trayecto de un gran número de vías nerviosas que comunican diversas áreas del sistema nervioso central.

LAS TECNICAS DE IMPREGNACION METALICA

en técnicas de impregnación

FUNDAMENTO. Son técnicas histológicas que requieren del uso de soluciones de compuestos metálicos, los cuales reaccionan con los elementos estructurales de las células, se precipitan en éstas y favorecen así su visualización.

UTILIDAD. Los métodos de impregnación metálica precisan la forma y la coloración de las estructuras que conforman el tejido nervioso y las interrelaciones que éstas guardan entre sí. De ésta forma, su aplicación resulta útil para el estudio de la citoarquitectura normal y patológica del sistema nervioso.

CARACTERISTICAS PARTICULARES. Las técnicas de impregnación metálica es tan consideradas como técnicas histológicas especiales, por la naturaleza de los resultados que con ellas se obtienen, dado el tratamiento que reciben las muestras de tejido. Dicho tratamiento se encuentra fuera del contexto de las técnicas rutinarias de tinción, las cuales se fundamentan en la afinidad de las distintas estructuras que constituyen el tejido nervioso, por los colorantes (26); en tanto que las técnicas de impregnación se basan en la descomposición química tanto de los elementos celulares que se impregnan, como de los reactivos utilizados (27, 28).

Otra característica distintiva de los métodos en cuestión, es que sólo un 1-10% de las células nerviosas existentes en el tejido, se im

pregnan (30, 34) y la variación dentro de esos límites, dependerá de la técnica en particular utilizada. Los factores que determinan la impregnación de ésta bajo porcentaje de neuronas y células gliales e inclusiva de estirpes celulares en particular, son prácticamente desconocidas. Diversos autores se han avocado al estudio de los factores bioquímicos que determinan la impregnación (12, 19, 33), pero hasta ahora existe poca concordancia entre los resultados obtenidos, lo cual explica la dificultad en el dominio de los métodos.

En términos generales, podría decirse que el dominio de una metodología consiste en la obtención de resultados confiables y reproducibles. Lograr éste objetivo al llevar al cabo técnicas de impregnación, resulte poco probable dado lo azaroso de éstas. Sin embargo, la experimentación constante y sistematizada de los métodos, puede resultar en el dominio de éstas si se controlan al máximo las variables conocidas y si se estandarizan los procedimientos de tal manera que los factores desconocidos no interfieran una vez logrados los resultados separados.

De ésta manera, un buen resultado consistirá en la observación clara y nítida de las estructuras deseadas (neuronas y/o células gliales), a pesar de que el resto del tejido tratado adquiera de artificios tales como precipitado parenquimatoso inespecífico o piel, o de patrones de patrones de impregnación indeseables como vasos sanguíneos.

Por otro lado, existe una gran cantidad de estudios basados en la combinación metodológica de las impregnaciones metálicas con otras técnicas, como la contraindicación de los cortes con colorantes de anilina con fines de orientación (25); o bien, la combinación del método de Golgi con técnicas de autorradiografía (14, 31), consistente en el marcaje radioactivo de neuronas in vivo que posteriormente son tratadas con una modificación al método de Golgi (8) y "scleradas" aquellas que se impregnaron, para finalmente observar en el microscopio óptico la marca radioactiva dentro de las células nerviosas e identificar la estirpe celular mediante su patrón morfológico particular, factible de ser observado únicamente con el método de impregnación antes referido. Esta combinación metodológica es útil cuando se trate de establecer cuál es el tipo de neurotransmisor utilizado por una estirpe neuronal en particular.

Asimismo, la combinación de las técnicas de impregnación con la microscopía electrónica de transmisión ha sido fuertemente impulsada (3, 5, 8). Su utilidad radica en la observación de los detalles ultraestructurales de las células impregnadas y las finas interrelaciones que éstas guardan con otros componentes del tejido.

Por otra parte, el estudio morfométrico del sistema nervioso central ha sido posible debido, en parte, al uso de la cámara lúcida o clara, con la cual se realiza el trazo fiel de las estructuras que se observan en el microscopio de luz (Fig. 1). Además, con el uso de la

cámara lúcida o clara, con la cual se realiza el trazo fiel de las estructuras que se observan en el microscopio de luz (Fig. 1). Además, con el uso de la cámara clara y la obtención de cortes seriados, es posible seguir y trazar el trayecto de las prolongaciones nerviosas cuando éstas quedan localizadas en dos o más cortes adyacentes.

La introducción de la computadora al campo de la neuromorfología ha sido también determinante en el progreso de ésta disciplina, ya que se pueden realizar programas especiales para llevar al cabo el estudio tridimensional de las estructuras directamente de las preparaciones histológicas, o bien de los dibujos realizados con la cámara clara.

Con los métodos cuantitativos descritos, en diversas regiones del sistema nervioso se han medido el diámetro del soma neuronal, el patrón de arborización dendrítica, la densidad de las espinas dendríticas o somáticas, la longitud de las dendritas y otras características citomorfológicas en condiciones normales (17) y en ciertas condiciones experimentales en las que se sabe que dichos parámetros se ven afectados (13, 32).

CLASIFICACION. Los datos comunicados en la literatura tendientes a clasificar las técnicas de impregnación metálica son escasos e incompletos (28). Sin embargo, podríamos encuadrar los procedimientos en cuestión de acuerdo a varios criterios:

1) POR EL METAL UTILIZADO:

- a) Plata (impregnaciones argénticas)
- b) Mercurio (impregnaciones mercuríicas)
- etc.

2) POR LA "SELECTIVIDAD ESTRUCTURAL":

- a) Soma y dendritas (métodos de Golgi)
- b) Neuroglia y microglia (métodos de Río-Hortega)
- c) Fibras nerviosas normales (método de Bielschowski, método de nitrato de plata reducida de Cajal)
- d) Fibras nerviosas degeneradas (método "supresivo" de Nauta-Gygax, método de Fink-Heimer, método de Carlsen-de Olmos)

3) POR EL PROCEDIMIENTO DE IMPREGNACION:

- a) En bloque de tejido (métodos de Golgi)
- b) En corte (métodos de Río-Hortega, métodos de impregnación de fibras degeneradas)

EL METODO RAPIDO DE GOLGI

El método rápido de Golgi y algunas de sus variantes son técnicas de impregnación argéntica que hacen posible la visualización de los tres elementos estructurales fundamentales del tejido nervioso: neuronas, células gliales y vasos sanguíneos (Fig. 2) y es uno de los métodos más regularmente utilizados en el estudio estructural de las células neuronales y eventualmente de algunas estirpes gliales.

ORIGEN. En el año de 1873, el científico italiano Camillo Golgi (Fig. 3) publicó un estudio sobre la citomorfología del cerebelo (15). Asimismo, en ese mismo trabajo comunicó un método histológico que hacía posible la visualización de las células nerviosas en toda su extensión y en un reducido porcentaje. Este nuevo método, a base de sales de plata, abrió un espléndido campo de investigación y proporcionó un nuevo enfoque de estudio acerca de la morfología neuronal. Sin embargo, no fue sino hasta la publicación de los primeros trabajos de Don Santiago Ramón y Cajal (Fig. 4) cuando se dió el verdadero valor a esta nueva técnica de estudio, con la cual Ramón y Cajal demostró que las células nerviosas son entidades estructuralmente unitarias (teoría neuronal) y no una trama fibrilar continua (teoría reticular), como se suponía.

Casi la totalidad de los trabajos publicados por Ramón y Cajal, fueron realizados con la utilización del método de Golgi y con un gran número de variantes al método original, las cuales proporcionaron a

Cajal información complementaria acerca de las características estructurales de las células nerviosas descritas por él.

Una de las obras de Ramón y Cajal consideradas clásicas en el terreno de la neurobiología (16), es la descripción, en dos volúmenes, de las características morfológicas de las células de casi la totalidad de los centros nerviosos del hombre y los vertebrados (26), realizada principalmente con la utilización de diversos métodos de impregnación metálica.

CARACTERISTICAS FUNDAMENTALES DEL METODO. El método se basa en seis pasos fundamentales:

- 1.- Induración-fijación. Se realice en una mezcla de una sal de cromo y una solución diluida de un óxido de osmio. El procedimiento consiste en la coagulación de las proteínas del tejido y el consiguiente endurecimiento del mismo (27).
- 2.- Impregnación. Una vez fijado el tejido, se incuba en una solución de una sal de plata, la cual sufre una reducción química al reaccionar con el compuesto fijador depositado en algunas estructuras tisulares, fenómeno que facilite su visualización (12).
- 3.- Corte. El bloque de tejido fijado e impregnado se corta en rebanadas de espesor variable, usualmente en el orden de los micrómetros, en un microtomo de parafina.
- 4.- Deshidratación. Se lleva al cabo en alcohol etílico, cuyo efecto

es la extracción del agua del tejido.

5.- **Aclaramiento.** Se realice en esencias de tipo orgánico (de clavos, de orégano, la creosote, el xileno, etc.), las cuales actúan mediante la eliminación o disminución del contraste de los índices de refracción de los elementos tisulares (27).

6.- **Montaje.** Para la observación de los cortes, éstos se montan entre dos cubresobjetos, a fin de facilitar la observación de las estructuras impregnadas (28).

Los procedimientos mencionados están determinados por diversos factores.

Así, en el procedimiento de fijación influye el tiempo, el cual es variable de una región neural a otra e inclusive de una especie animal a otra; la temperatura; el volumen del fijador en relación al espesor del bloque y las condiciones de luz ambiental (28), entre otras.

En la impregnación influye también el tiempo, las condiciones de incidencia de luz y la concentración de la solución (28), principalmente.

En la deshidratación y en el aclaramiento influye básicamente el tiempo de permanencia de los cortes en las sustancias utilizadas (28).

En términos generales, podría afirmarse que la naturaleza de los reactivos y su pureza, la estricta limpieza del material, la edad del animal, la especie, la cepa y un gran número de factores no determinados

como los eventos celulares postmortem y en general, el estado metabólico del tejido antes de detener sus procesos biológicos previos a la fijación (2, 19), condicionen los resultados finales.

EVENTOS BIOQUIMICOS HIPOTETICOS. El método rápido de Golgi está caracterizado por una serie de eventos bioquímicos cuya naturaleza aún no se conoce con claridad. Sin embargo, se sabe que la reacción que se realiza en el interior de las células principalmente, mediante estudios hechos con microscopía electrónica de transmisión (4, 33). Además, existen fuertes evidencias basadas en estudios con difracción de rayos X, que apoyan la idea de que el precipitado que finalmente se forma, es cromato de plata en su mayoría (12), aunque existen otros trabajos que postulan que dicho precipitado podría ser dicromato de potasio (19). Por otro lado, existe otra hipótesis que supone que el compuesto final es un complejo lipo-protéico-cromo-plata de naturaleza no definida (33).

La controversia generada a éste respecto resulta interesante si se considera la importancia que tiene el conocer mejor los eventos bioquímicos que ocurren en el procedimiento de impregnación, en el sentido de que sería factible la manipulación de las técnicas en función de los objetivos deseados y sin tantos ensayos fallidos.

Otra característica interesante, es el hecho de que sólo se impregna al segmento inicial de los axones mielinizados, aparentemente donde aún no hay mielina (19). Sin embargo, no existe aún una explicación clara de los factores que determinan dicho fenómeno, aunque se postula que

podría deberse a los componentes bioquímicos de la mielina (19).

FUNDAMENTOS GENERALES DE LAS VARIANTES AL METODO. Las modificaciones al método rápido de Golgi hasta ahora propuestas, están encaminadas a mejorar o a estabilizar los resultados que con el método original se obtienen. Algunas de éstas se fundamentan en criterios, tales como la adición de sustancias a la solución de cromo (7, 10) o a la de impregnación (18); y la fijación inicial, antes de la induración con la sal de cromo, ya sea por perfusión intravascular (1, 11) o por inmersión (6, 20).

Algunas de las desventajas que presenta la utilización del tetróxido de osmio en el método rápido de Golgi, son que dicho reactivo es caro y de difícil adquisición; que el período de induración es difícil de controlar; el fondo de la preparación es obscuro, cuando el espesor de los cortes es considerable; su penetración en el tejido es lenta y por ende, se requiere trabajar con bloques pequeños; y la consistencia del tejido es quebradiza y por lo tanto el grado de dificultad en la obtención de cortes íntegros, aumenta (24). Concomitantemente a esto último, la ruptura de las células impregnadas es frecuente.

Así, existen modificaciones que no requieren del uso de tetróxido de osmio, pero que tienden a impregnar preferentemente células gliales (24); otras, utilizan el formaldehído como fijador, pero son limitadas debido a que el período de fijación es excesivamente prolongado (11) o

bien, otras requieren de la variación en el pH de la solución impregnadora para obtener la visualización de determinadas estructuras (1) y en ocasiones, esta limitación va unida a la obtención de resultados poco confiables (20).

IMPORTANCIA Y OBJETIVO DEL TRABAJO

El método rápido de Golgi ha sido y es hoy en día, una de las técnicas más utilizadas en el estudio de la morfología del tejido nervioso. Sin embargo, su aplicación requiere del uso de tetróxido de osmio, un reactivo de difícil adquisición y que además presenta algunas dificultades de tipo técnico; y, por otra parte, algunas de las modificaciones propuestas a dicho método son limitadas y sus resultados son de dudosa confiabilidad.

Así, el objetivo del presente trabajo es implementar una técnica morfológica con la cual, sea posible obtener los mismos o mejores resultados que aquellos que se logran con el método original de Golgi, pero sin la utilización de tetróxido de osmio y que además supere las deficiencias y limitaciones de las modificaciones ya existentes.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas adultas normales de la cepa Sprague-Dawley, las cuales fueron mantenidas en condiciones de iluminación de 12 hrs de luz por 12 hrs de oscuridad y con acceso a alimento y agua ad libitum.

Los animales fueron separados en dos grupos:

El primer grupo de animales fué utilizado para llevar al cabo los experimentos testigo, con el método rápido de Golgi (15), cuyo procedimiento se describe a continuación:

1. Anestesia con tiopental sódico al 2% (0.2 mg/100 gr de peso), por vía intraperitoneal.
2. Craniotomía y obtención del encéfalo completo.
3. Disección en bloques pequeños de 3 mm de espesor de: a) corteza cerebral de asociación parietal, b) cabeza del núcleo caudado, c) hipocampo ventral y d) vermis del cerebelo. La disección se realizó con base a un atlas estereotáxico (22).
4. Baño en yema de huevo (29) e inmersión de los bloques de tejido en 10 ml/bloque de una mezcla a base de:

dicromato de potasio al 3%	_____	20 ml.
tetróxido de osmio al 1%	_____	6 ml.

 por 4 días (corteza cerebral, núcleo caudado e hipocampo) y 5 días (cerebelo), en la oscuridad y a 25°C.

5. Lavado breve de los bloques en 20 ml de nitrato de plata al 0.75% e inserción de los mismos en 15 ml/bloque de nitrato de plata al 0.75%, en la obscuridad y por un período de 48 hrs.
6. Limpieza del precipitado superficial y encastramiento superficial en parafina.
7. Cortes de aproximadamente 125 μ m de espesor en el microtomo.
8. Deshidratación en alcohol etílico absoluto por 10-30 min.
9. Aclareamiento en xileno por 3-5 min.
10. Montaje con resina sintética entre dos cubreobjetos para su observación en el microscopio fotónico.

Los animales del segundo grupo fueron utilizados para la realización de los experimentos de la modificación al método de Golgi, después de una serie de ensayos previos, tendientes a lograr los resultados deseados y a uniformar la metodología.

PROCEDIMIENTO

1. Anestesia con tiopental sódico al 2% (0.2 mg/100 gr de peso, por vía intraperitoneal.
2. Lavado del sistema vascular mediante la perfusión por vía intracarotídea de 200 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M y p^H 7.4 con 10,000 U./lt de heparina sódica, como anticoagulante y 1 gr/lt de hidrocloreuro de procaína como vasodilatador (9); seguido de la perfusión, por la misma vía, de 200 ml de formaldehído al 10% en amor

tiguador de fosfatos 0.1 M y pH 7.4.

3. Craneotomía y obtención del encéfalo completo.
4. Discción de las áreas homólogas a aquellas obtenidas para la realización de los experimentos testigo y además, de médula espinal cervical, en bloques de 3-5 mm de espesor.
5. Inmersión de los mismos en 10 ml/bloque de formaldehído al 10% en un mortiguador de fosfatos 0.1 M y pH 7.4, a temperatura ambiente y por un mínimo de 24 hrs.
6. Incubación de los bloques en 15 ml/bloque de la siguiente mezcla fijadora:

dicromato de potasio al 2% _____ 50 ml.

formaldehído al 40% _____ 10 ml.

ácido acético glacial _____ 5 ml.

El formaldehído y el ácido acético glacial se mezclaron primeramente y por separado; posteriormente, a ésta mezcla se agregó la solución de cromo.

En ésta mezcla, los bloques permanecieron por 48 hrs, a 25°C y la solución se renovó a las 24 hrs.

7. Lavado en abundante volumen de agua desionizada por un mínimo de 30 min, con agitación necesariamente constante y con renovación frecuente del agua.
8. Impregnación en 15 ml/bloque, de nitrato de plata al 0.75% por 24 hrs,

en la oscuridad y a temperatura ambiente.

9. Encastramiento superficial en parafina y cortes de aproximadamente 125μ de espesor en el microtomo.
10. Deshidratación en alcohol etílico absoluto por 10-30 min.
11. Anclamiento en xileno por 3-5 min.
12. Montaje con resina sintética entre dos cubreobjetos para ser observados en el microscopio óptico.

El agua necesaria para preparar las soluciones utilizadas, se purificó en un desionizador.

Con la finalidad de reforzar la validez de la modificación propuesta, se llevaron al cabo una serie de experimentos con bloque de corteza cerebral sensitiva y corteza cerebelosa de gatos, que fueron tratados de la misma manera.

De las preparaciones obtenidas de ambos grupos, se tomaron fotografías en un fotomicroscopio Carl Zeiss.

Por otro lado, se realizaron dibujos de algunas de las células nerviosas impregnadas con la propuesta modificación, mediante su observación en una cámara clara Carl Zeiss.

RESULTADOS

En las diversas áreas del tejido nervioso estudiadas, con la modificación al método de Golgi se obtuvo, tanto en ratas como en gatos, la impregnación del soma neuronal, las dendritas y el segmento inicial del cilindroje de aquellas neuronas de axón mielinizado (Figs. 5B y 10D) y la totalidad de éste en aquellas células nerviosas de axón amielínico (Figs. 9B y 10C).

En la corteza cerebral, la claridad del fondo sobre el cual se observan impregnadas las células neuronales, fué notablemente mayor en los cortes tratados con la variante propuesta con respecto a la técnica de Golgi rápido utilizada como testigo (Fig. 5). Asimismo, la precipitación inespecífica de la sal de plata en el tejido, a manera de grumos densos y la impregnación de vasos sanguíneos, fueron mayores en los cortes correspondientes a la técnica original (Fig. 6), en tanto que el número de neuronas impregnadas con la modificación objeto del presente trabajo, fué considerablemente mayor respecto a la cantidad observada con el método rápido de Golgi (Fig. 6). Además, con la variante se observaron tanto células piramidales como no piramidales de diversa morfología, aunque con cierta tendencia a una mayor impregnación de las primeras (Fig. 6).

Por otra parte, los experimentos correspondientes a la cabeza del núcleo caudado, arrojaron resultados similares a los obtenidos en la

corteza cerebral. La claridad notablemente mayor, la menor cantidad de elementos vasculares impregnados, la menor frecuencia en la observación de precipitado parenquimatoso inespecífico y el mayor número de neuronas impregnadas, caracterizaron los resultados obtenidos con la modificación propuesta en esta región del sistema nervioso central (Fig. 7). La estirpe neuronal impregnada cuya observación fué más frecuente correspondió a las células medianas espinosas.

La precipitación inespecífica de la plata en la línea de somas en el estrato piramidal del hipocampo ventral, se observó exclusivamente en los cortes correspondientes al método rápido de Golgi (Fig. 8A), en tanto que la impregnación de vasos sanguíneos fué notablemente menor en los cortes tratados con el método de Golgi modificado (Fig. 8B). Además, en estos últimos se observó una mayor nitidez e integridad estructural de los elementos neuronales impregnados, al igual que en el resto de las regiones neurales examinadas.

En el cerebelo, con la modificación al método de Golgi se obtuvo la impregnación de todos los componentes neuronales de la corteza cerebelosa (Figs. 9B y C y 10B, C y D), así como de algunas células nerviosas de varios de los núcleos profundos del cerebelo.

El patrón de impregnación de las células cerebelosas visualizadas con la modificación al método de Golgi, fué bastante homogéneo en el sentido de que la frecuencia de impregnación de las diversas estirpes

celulares fué similar, a excepción de las células horizontales de Cajal. En los experimentos testigo, se observó una tendencia hacia la impregnación de células en cascata, células gliales de Bergmann y un reducido número de células de Purkinje (Fig. 10A); en tanto que las células granulares impregnadas con el método original, se observaron ocasionalmente en agregados con precipitados densos (Fig. 9A).

La claridad observada en el fondo de las preparaciones tratadas conforme a la modificación al método original, fué particularmente notable a pesar de que en ocasiones se obtuvieron cortes de mayor espesor (Fig. 10B), así como notable fué también la nitidez e integridad estructural de los elementos observados (Figs. 9B y C y 10B, C y D).

Asimismo, con la modificación al método rápido de Golgi se estudió el patrón de impregnación de la médula espinal cervical, donde se obtuvo la impregnación de motoneuronas en cuyo fondo tisular no se observó precipitado inespecífico, ni vasos sanguíneos impregnados (Fig. 11).

Por otra parte y aunque con menor frecuencia, en el tejido tratado de manera experimental, se obtuvo también la impregnación de algunos elementos neurogliales como astrocitos fibrosos (Fig. 12A) y oligodendrocitos interfasciculares (Fig. 12B), cuya claridad y nitidez fué comparable a aquellas obtenidas en las células nerviosas de las áreas estudiadas (Fig. 13).

Los dibujos de las células nerviosas impregnadas realizados con

la cámara clara inicialmente de manera individual y a partir de diver
sas preparaciones obtenidas con la aplicación del método de Golgi modi
ficado, fueron posteriormente integrados en esquemas representativos
de la citoarquitectura de la corteza cerebral (Fig. 14) y de la corteza
cerebelosa (Fig. 15).

DISCUSION

Se llevó al cabo una modificación al método rápido de Galgi (15), la cual consistió fundamentalmente en la utilización del formaldehído como fijador, en una variación en la vía inicial de fijación y en el uso de ácido acético glacial.

La utilización de formaldehído ha sido considerada por otros autores (1, 10, 11, 18, 20, 24). Sin embargo y a pesar de que ha sido posible la obtención de buenos resultados, en ocasiones, el período de fijación es muy prolongado (11). Algunas otras modificaciones realizadas con base en el uso de este fijador, son limitadas y deficientes (20), ya que en ocasiones, las células presentan un patrón de impregnación poco confiable por la aparición de una impregnación incompleta (20).

Estas y otras características comentadas ampliamente por diversos autores (24, 28), han propiciado que se consideren de escaso valor las modificaciones llevadas al cabo en base al uso de formaldehído. Sin embargo, probablemente no sea éste el único factor que determina la calidad de los resultados finales. Ha sido discutida la importancia de la dosis de anestesia, misma que si es letal, propicia una pobre preservación en la integridad estructural de las células nerviosas impregnadas (19). Asimismo, ha sido postulado que debido a la fijación llevada al cabo por inmersión del tejido fresco, dicha integridad estructural es afectada en mayor grado que en aquellos casos en que el fijador es

introduce al tejido por perfusión intravascular (19). Esto podría ser explicable en función del daño mecánico durante la manipulación del tejido fresco (2), o bien debido al tiempo que transcurre entre la disección del tejido y la penetración del fijador a éste, ya que según diversos trabajos, los eventos celulares postmortem son definitivos en la obtención de patrones de impregnación poco confiables (19). Por el contrario, existen estudios que comunican buenos resultados cuando la fijación se lleve al cabo por perfusión intravascular (11, 19). Estos consisten en la impregnación de una variedad más amplia de estirpes celulares impregnadas, una mayor claridad de los detalles de la estructura fina y una considerable reducción en la cantidad de precipitado pararenquimatoso inespecífico (19). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, concuerdan con tales observaciones.

Otro factor que probablemente contribuyó a la obtención de resultados positivos y confiables, fué la utilización de ácido acético glacial, el cual podría actuar como estabilizador de la mezcla de dicromato de potasio, un reactivo fuertemente oxidante y de formaldehído, que es un fuerte reductor (24). La adición del ácido acético probablemente acidifica la mezcla y de esta manera podría favorecer la obtención de buenos resultados, ya que en la mezcla fijadora utilizada en el método rápido de Golgi, el p^H tiende a la acidez (19), así como en las mezclas utilizadas en otras variantes (1).

Por otra parte, la impregnación de estructuras adyacentes observada en algunas preparaciones obtenidas con la presente modificación, demuestra que es posible la impregnación de estructuras que se encuentren interrelacionadas, contrariamente a lo postulado por otros autores (25).

Algunas de las ventajas que la modificación comunicada en este trabajo ofrece sobre el método original de Golgi y algunas de sus modificaciones propuestas, radican principalmente en la nitidez de las estructuras observadas íntegramente sobre un fondo claro, lo cual es importante ya que esta característica del método permite realizar estudios cualitativos y/o cuantitativos para los cuales, la obtención de cortes de espesor considerable, sean requeridos. Cuando se utiliza el método rápido de Golgi, este requerimiento es difícil de cubrir dado que la obscuridad del tejido no impregnado aumenta considerablemente en relación al espesor de los cortes, según otros autores (24) y los resultados obtenidos en este estudio.

Asimismo, el uniformar los tiempos de tratamiento de las muestras es de gran importancia ya que de esta manera, es posible realizar estudios sobre diversas áreas del sistema nervioso central, sin la necesidad de variar los tiempos de tratamiento, como ocurre con el método rápido de Golgi (28) y algunas de sus variantes propuestas (20).

Otra ventaja del método propuesto en este trabajo es que resulta factible de aplicar para realizar estudios morfométricos, tanto en rata

como en gato. La ventaja de este hecho estriba en que algunos modelos de estudio experimental requieren la utilización de algunos de estos animales de laboratorio, de manera exclusiva.

Finalmente, una de las ventajas más importantes es la supresión del tetróxido de osmio como fijador. Esto es importante ya que este reactivo es de importación y por ende, caro y difícil de adquirir.

CONCLUSIONES

1. Se logró una modificación al método de impregnación de Golgi, de aplicación útil en el estudio citomorfológico cualitativo y cuantitativo de diversas áreas del sistema nervioso central.
2. La modificación propuesta, ofrece valiosas ventajas sobre el método original y algunas de las variantes a este, previamente comunicadas por otros autores.
3. Entre las ventajas de la modificación objeto de este trabajo se encuentran:
 - a) La supresión del tetróxido de osmio
 - b) La impregnación de un mayor número de neuronas
 - c) La visualización clara y nítida de estas sobre un fondo claro y libre de precipitado inespecífico
 - d) Su aplicación en, por lo menos, dos especies animales
 - e) La uniformidad en el tiempo de tratamiento de diversas áreas del sistema nervioso central

REFERENCIAS

1. Bertram, E.G. e Ihrig, H.K.: Staining formalin-fixed nerve tissue with mercuric nitrate. *Stain Technol.* 34: 99-108. 1959.
2. Bertram, E.G. y Sheppard, C.: A possible explanation for the Golgi impregnation of neurons. *Anat. Rec.* 148: 413. 1964.
3. Blacksted, T.W.: Mapping of experimental axon degeneration by electron microscopy of Golgi preparations. *Zeitschrift für Zellforschung.* 67: 819-834. 1965.
4. Blacksted, T.W.: Electron microscopy of Golgi preparations for the study of neuronal relations. En: Nauta, W.J.H. y Ebner, S.O.E. (Eds.): *Contemporary research methods in neuroanatomy.* Springer-Verlag. New York. 1970. pp 200.
5. Brank, M. y Brank, E.: A simple procedure for electron microscopy of Golgi-impregnated nerve cells. *Neurosci. Lett.* 32: 1-4. 1982.
6. Cox, W.: Impregnation des centralen nervensystems mit queckalbersaleen. *Arch. mikr. Anat.* 37: 16-21. 1891.
7. Davenport, H.A. y Combs, C.M.: Golgi's dichromate silver method. 3. Cromating fluids. *Stain Technol.* 29: 165-173. 1954.
8. Fairán, A., Peters, A. y Beldanhe, J.: A new procedure for examining Golgi impregnated neurons by light and electron microscopy. *J. Neurocytol.* 6: 311-337. 1977.

9. Farié-Velasco, A. y Karnovsky, M.J.: Optima preservación ultraseg
tructural del sistema nervioso central por perfusión intravascular
con glutaraldehído. Arch. Inves. Med. 1: 201-220. 1970.
10. Fish, P.A.: The use of formalin in neurology. Am. Micr. Soc.
17: 319-330. 1895.
11. Fox, C.A., Ubode-Purkiss, M., Ihrig, H.K. y Bacoli, D.: Zinc chromate
modification of the Golgi technique. Stain Technol. 26: 109-114.
1951.
12. Fregerslev, S., Blacksted, T.W., Fredens, K. y Holm, M.J.: Golgi
potassium-dichromate silver-nitrate impregnation. Nature of the
precipitate studied by X-ray powder diffraction methods. Histochemia.
25: 63-71. 1971.
13. Globus, A. y Scheibel, A.B.: The effect of visual deprivation on
cortical neurons: a Golgi study. Exp. Neurol. 19: 331-345. 1967.
14. Goebel, D.J. y Pourcho, R.G.: Morphological and neurochemical
characterization of individual retinal neurons: a combined Golgi
and autoradiographic technique. J. Neurosci. Methods. 6: 295-303.
1982.
15. Golgi, C.: Sulla struttura della sostanza grigia del cervello.
Gazz. Med. Ital. Lombarde. 33: 244-246. 1873.
16. Hubel, D.H.: El cerebro. Investigación y Ciencia. Nov. de 1979. pp 10.

17. Kemp, J.M. y Powell, T.P.S.: The structure of the caudate nucleus of the cat: light and electron microscopy. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 262: 383-401. 1971.
18. Kopach, F.: Erfahrungen über die verwendung des formaldehids bei der chromsilberimpregnation. *Anat. Anz.* 11: 727-729. 1896.
19. Morest, D.K. y Morest, R.R.: Perfusion-fixation of the brain with chrome-osmium solutions for the rapid Golgi method. *Am. J. Anat.* 118: 811-832. 1966.
20. Palacios, E.: Two useful variations of the Golgi silver chromate method. *Act. Cient. Venezolana.* 21: 105-106. 1970.
21. Palkovits, M. y Záborszky, L.: Neural connections of the hypothalamus. En: Morgane, P.J. y Penkepp, J. (Eds.): *Handbook of the hypothalamus.* Vol. 1. *Anatomy of the hypothalamus.* Marcel Dekker Inc. New York. 1979. pp 381-390.
22. Paxinos, G. y Watson, Ch.: *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press. 1982. Australia.
23. Pérez de la Mora, M., Fariá-Velasco, A. y García-Muñoz, M.: Métodos para el estudio de neurotransmisores en el sistema nervioso central. En: UNAM (Ed.): *Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas.* México, D.F. 1983. pp 31-42.
24. Ramón-Moliner, E.: A chlorate-formaldehyde modification of the Golgi method. *Stain Technol.* 32: 105-116. 1957.

25. Ramón-Moliner, E.: The Golgi-Cox technique. En: Nauta, W.J.H. y Ebbeaon, S.O.E. (Eds.): Contemporary research methods in neuroanatomy. Springer-Verlag. New York. 1970. pp 41-46, 49-50.
26. Ramón y Cajal, S.: Histologie du systeme nerveu de l'homme et des vertébrés. 2 Vol. Maloine, París. 1911.
27. Ramón y Cajal, S. y Tello y Muñoz, J.F.: Elementos de histología normal y de técnica micrográfica. Ed. 12. Cap. 4. Editora Nacional, S.A. México, D.F. 1955. pp 67, 81.
28. Ramón y Cajal, S. y de Castro, F.: Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso. Ed. 2. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España. 1972. pp 41, 42, 63, 67, 69-73, 75.
29. Schroeder, D.M. : Golgi-Cox impregnation of peripheral zone after coating tissue with egg yolk. Stain Technol. 48: 352-353. 1973.
30. Sait, G.J. y Colon, E.J.: Quantitative analysis of the cerebral cortex. 1. A selectivity of the Golgi-Cox staining technique. Brain Research. 13: 485-510. 1969.
31. Somogyi, P., Freund, T.F., Halász, N. y Kisvárdy, Z.F.: Selectivity of neuronal ³H GABA accumulation in the visual cortex as revealed by Golgi staining of the labeled neurons. Brain Research. 225: 431-436. 1981.

32. Uylings, H.B.M.: A study on morphometry and functional morphology of branching structures, with applications to dendrites in visual cortex of adult rats under different environmental conditions. Thesis doctoral. 1977. Amsterdam.
33. Valverde, F.: The Golgi method. A tool for comparative structural analyses. En: Nauta, W.J.H. y Ebner, S.S. (Eds.): Contemporary research methods in neuroanatomy. Springer-Verlag. New York. 1970. pp 18-22.
34. Van der Loos, H.: Dendro-dendritic connections in the cerebral cortex (in Dutch). Thesis. Amsterdam Univ., Stem, Haarlem. 1959.

Fig. 1.- Célula granular de la segunda capa de la corteza cerebral de rata, impregnada con el método rápido de Golgi (A) y dibujada con la cámara clara (B). Se observa el cilindroaje (c), el soma (s) y varias prolongaciones dendríticas (d) con espinas dendríticas (→) y varicosidades (⇐). (640X).

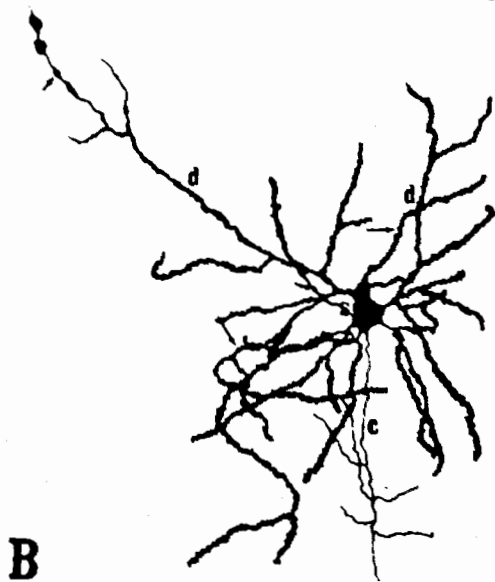
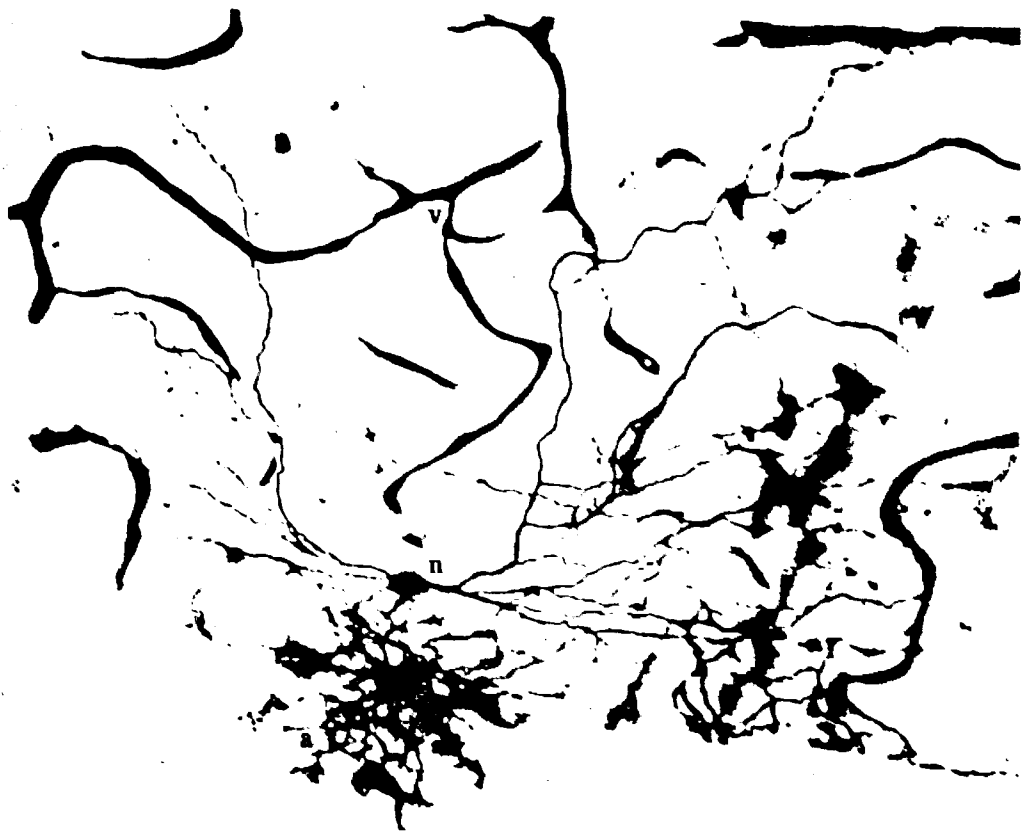


Fig. 2.- Corte de vermis cerebeloso de gato, impregnado con una modificación al método de Golgi, en donde se observan los tres elementos estructurales fundamentales del tejido nervioso: neuronas (n), células gliales (g) y elementos vasculares (v). (1280X).



**Fig. 3.- Fotografía del Dr. Camilo Golgi, a quien se debe
el método cromoargéntico que lleva su nombre.**

**Fig. 4.- Imágen de Don Santiago Ramón y Cajal, eminente his-
tólogo español que aplicó el método de Golgi al es-
tudio de la citomorfología del sistema nervioso
del hombre y de los vertebrados.**

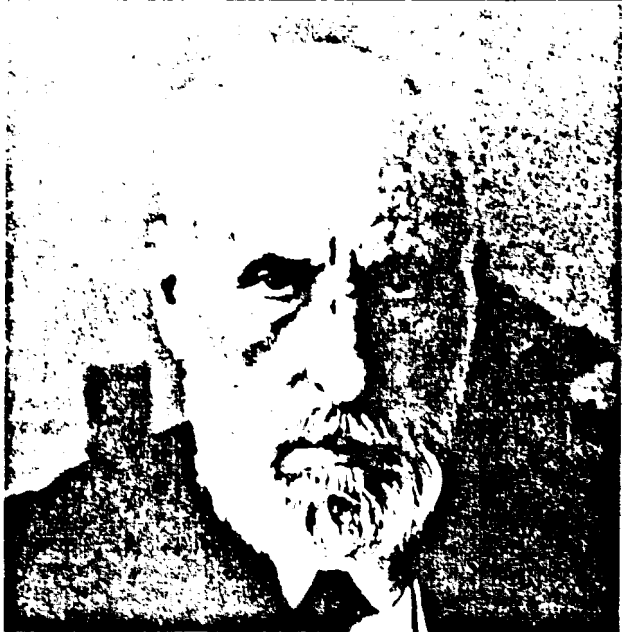


Fig. 5.- Neuronas de la capa piramidal externa de rata (A) y de gato (B), impregnadas con el método de Golgi y con la variante, respectivamente. Nótese la translucidéz y limpieza del fondo tiular obtenidas con la variante, sobre el cual resalta la nitidéz de los detalles finos de la estructura de las neuronas impregnadas, como las espinas dendríticas (→) y el segmento inicial del cilindroje (*), los cuales son menos aparentes en el método control. (A: 364X); (B: 558X).

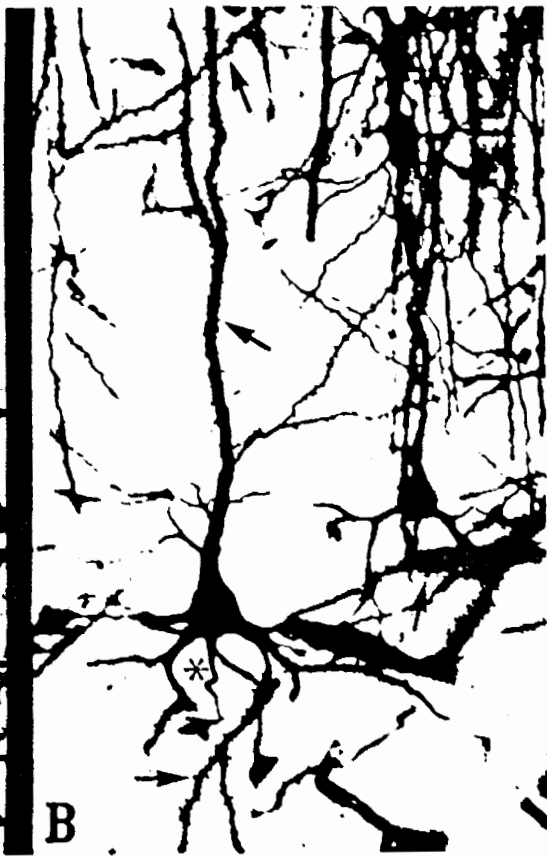


Fig. 6.- Neuronas piramidales de la tercera capa de la corteza cerebral de rata, impregnadas con el método de Golgi (A) y con la modificación propuesta (B). Además de la obscuridad en el fondo de la preparación, es evidente la mayor cantidad de vasos sanguíneos (➤) y de precipitado parenquimatoso (■) en el método original, con respecto a la variante a éste; asimismo, la cantidad de neuronas impregnadas con la técnica experimental, fué mayor (*). (A: 325X); (B: 563X).

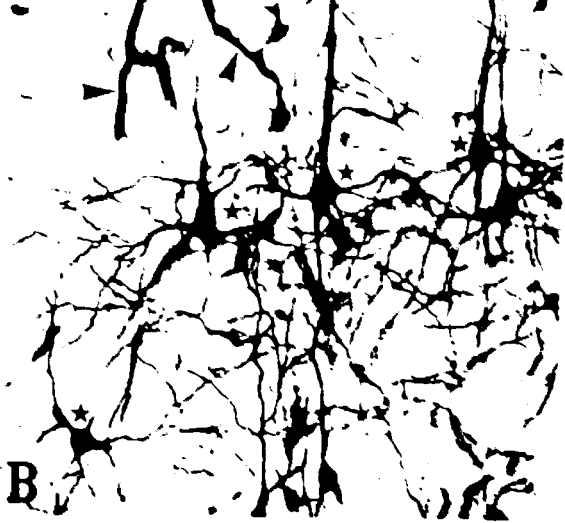


Fig. 7.- Imágenes correspondientes a la cabeza del núcleo caudado de rata, tratados con el método rápido de Golgi (A) y con la modificación a éste (B), con la cual se observa una mayor cantidad de neuronas impregnadas (*) que resaltan sobre un fondo más claro que el que se observa con la técnica original. (A: 244X); (B: 730X).

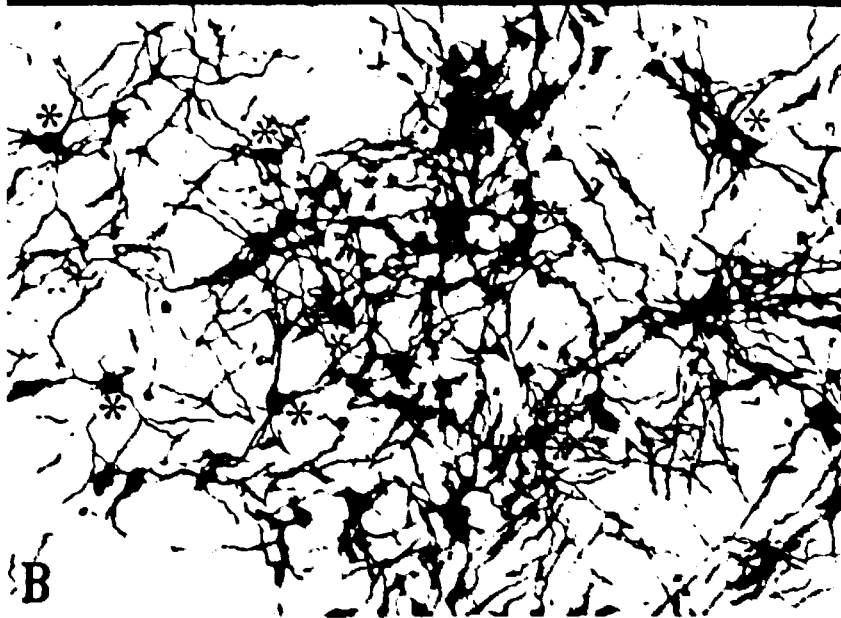
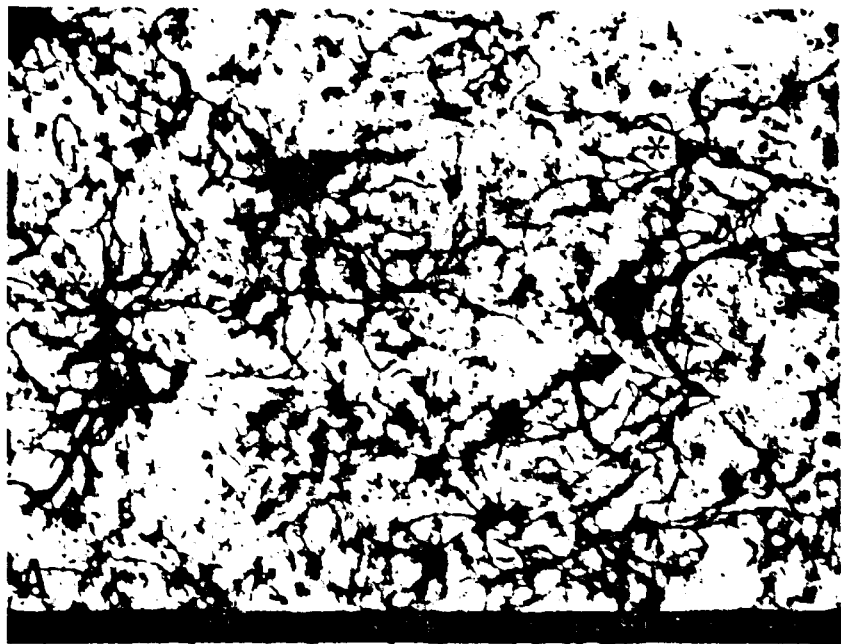


Fig. 8.- Células neuronales del estrato piramidal del hipocampo ventral de rata, impregnadas con el método de Golgi (A), con el cual se observan precipitados densos e inespecíficos (►) a lo largo de la línea de somas de dichas estirpes celulares, así como una mayor cantidad de vasos sanguíneos impregnados (*), en comparación con la modificación en cuestión (B), en la cual se aprecia una mejor definición e integridad de las estructuras impregnadas sobre un fondo claro y exento de precipitado. (A: 320X); (B: 400X).

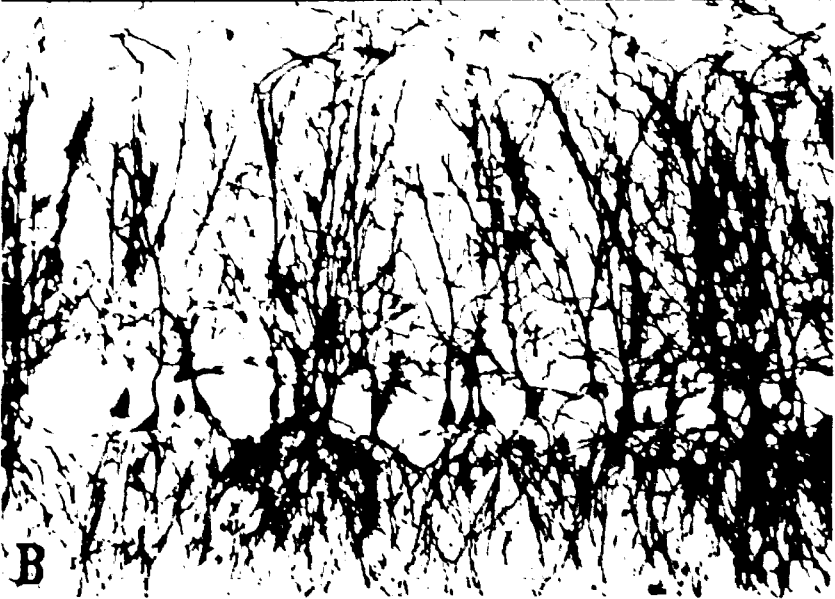
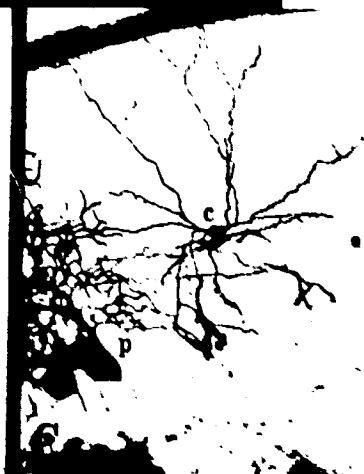
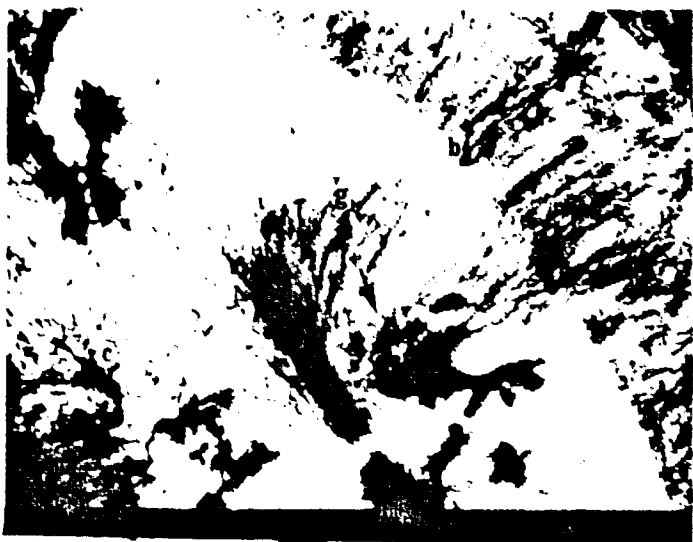


Fig. 9.- Aspecto de la corteza cerebelosa de rata tratada con la técnica testigo (A), donde se aprecian impregnadas algunas de las estructuras que la constituyen: células granulares (g), que en ocasiones se observaron en agregados y con precipitado (→); células en canasta (c); células estrelladas (e); y células gliales de Bergmann (b). Con la modificación (B y C) se observaron impregnadas más nitidamente las células granulares y su cilindroje mielínico (→), en canasta, así como células de Golgi (n) y de Purkinje (p). (A: 114X); (B: 358X); (C: 478X).



B

Fig. 10.- Imágen de diversos aspectos de la estructura citológica de la corteza cerebelosa de rata (A, B y D) y de gato (C), tratada con la técnica de Golgi (A), con la cual se observa una mayor cantidad de precipitado pial (p), e diferencia de lo observado con la técnica modificada de (B y D), con la que se observó también una mayor variedad de estirpes neuronales: (n), célula de Golgi; (P), célula de Purkinje; (b), célula glial de Bergmann; (e) célula estrellada; (g), célula granular. Nótese también las colaterales axónicas de las células en canasta (→) en relación directa con el soma de una célula de Purkinje (*) (C), así como la impregnación del segmento inicial del axón de otra de ellas (→) (D) y la impregnación completa de las profundas ramificaciones del cilindro eje esquelético de una célula de Golgi (*) (C). La nitidez de las estructuras impregnadas con el método modificado es evidente (B, C y D), en comparación con el testigo (A), a pesar del mayor espesor de algunos cortes (B). (A: 244X); (B: 414X); (C: 737X); (D: 377X).

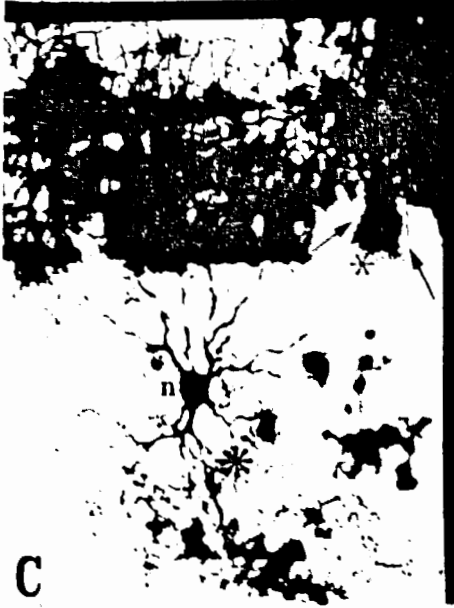
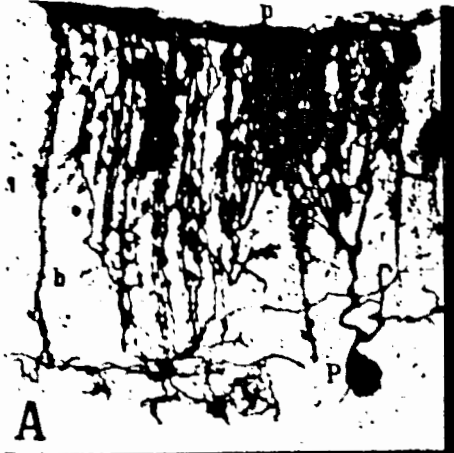


Fig. 11.- Imágen ilustrativa de los resultados adicionales obtenidos con la modificación al método de Golgi, en la médula espinal cervical de rata. Se observan algunas motoneuronas impregnadas (m) sobre un fondo notablemente claro y algunas fibras que constituyen las raíces motoras de los nervios espinales (→). (560X).



Fig. 12.- Fotomicrografías que muestran los resultados de la modificación al método de Golgi, respecto a la impregnación de células gliales. En A, se observan diversos astrocitos de tipo fibroso (F), vasos sanguíneos (V) y los "pies perivasculares" constituidos por la relación anatómica existente entre ambas estructuras (→). En B, se observa la nitidez de un oligodendrocito interfascicular impregnado, cuyo soma (→) y prolongaciones (→) resalten sobre un fondo claro. (A: 860X); (B: 1720X).

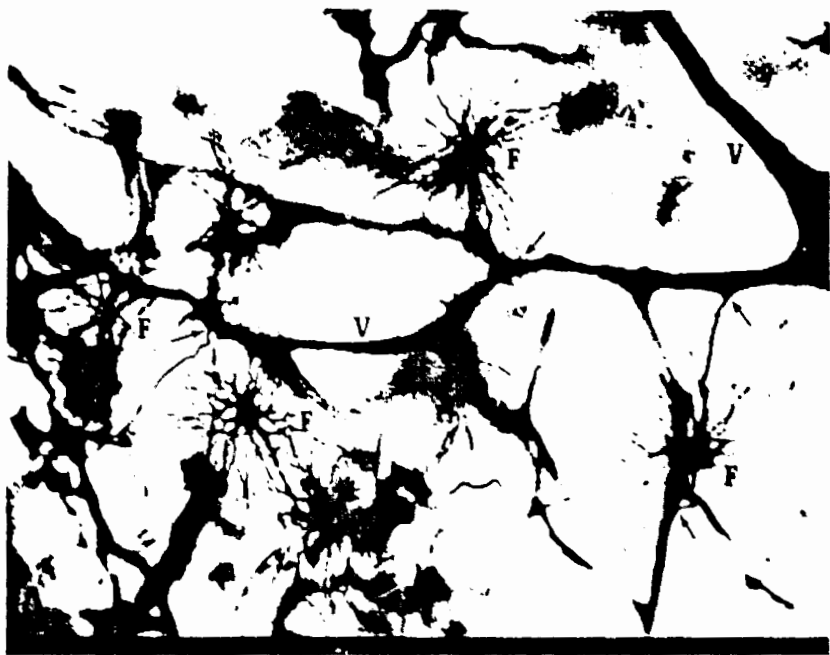


Fig. 13.- Neurona piramidal de la corteza cerebral (A) y arborización dendrítica de una célula de Purkinje de la corteza cerebelosa (B) de gato, impregnadas con la variante al método de Golgi, en las cuales se observa la nitidez de su estructura sobre un fondo translúcido. (▶), espinas dendríticas. (A: 863X); (B: 1178X).



A I B

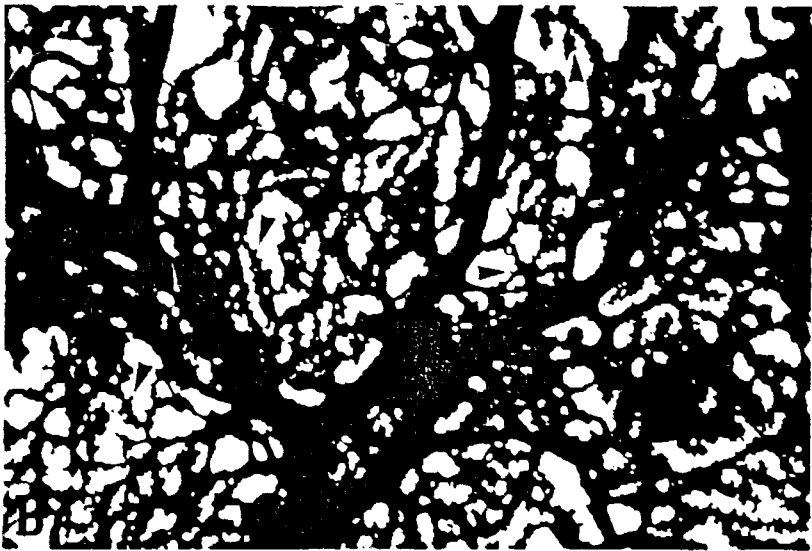


Fig. 14.- Dibujos realizados en una cámara clara e integrados en una composición esquemática de la citoarquitectura de la corteza cerebral. 1, capa molecular o plexiforme; 2, capa molecular externa o de pirámides pequeñas; 3, capa piramidal externa; 4, capa granular interna; 5, capa piramidal interna; y 6, capa de células polimórficas. A, célula horizontal de Cajal; B y E, células granulares; C, D y F, células piramidales; H, célula de Martinotti; G, célula estrellada. Contactos sinápticos (\rightarrow); fibras aferentes de la corteza (\rightarrow); fi bras aferentes a la corteza (\rightarrow). SB, substancia blanca subcortical.

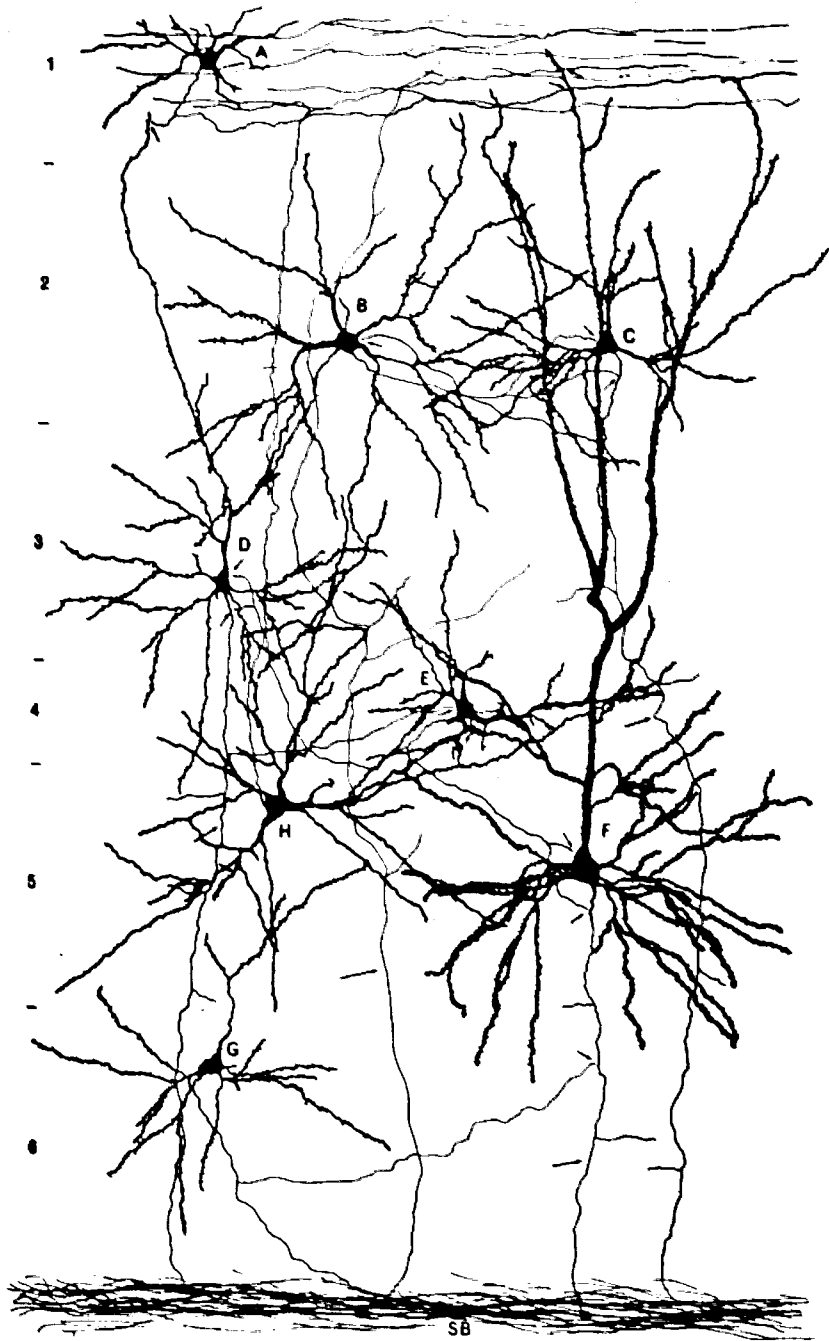


Fig. 15.- Esquema de la citoarquitectura de la corteza cerebelosa, realizada a partir del trazo de sus diferentes componentes con la cámara lúcida. HC, célula horizontal de Cajal; E, célula estrellada; P, célula de Purkinje; G, célula de Golgi; C, célula en canasta; CG, célula granular; T, fibra trepadora; M, fibra musgosa; CM, capa molecular; EG, capa granular; SB, substancia blanca subcortical. (→), contactos sinápticos.

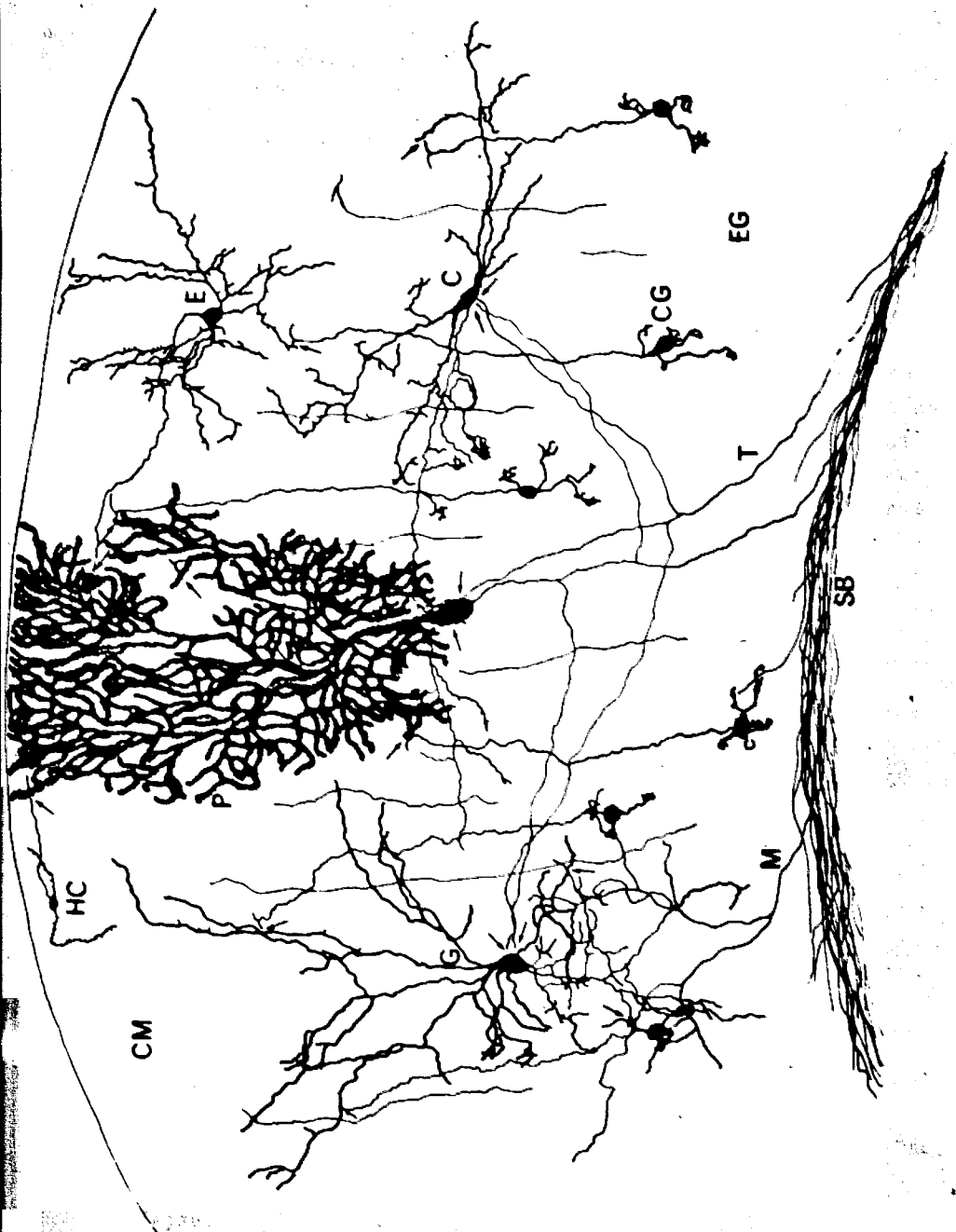


Diagram illustrating the structure of a complex network, showing various components and their interconnections. Labels include HC, CM, E, C, CG, EG, T, P, M, G, M, and SB.



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
Facultad de Ciencias

Expediente

Número 423/85

Sr. José Ignacio Alfredo González Burgos
P r e s e n t e . -

Manifiesto a usted que con esta fecha ha sido -
aprobado el tema de tesis "Modificación al Método Rápido de
Golgi con la Supresión del Tetroxido de Osmio para el Estu-
dio Citomorfológico del Sistema Nervioso Central" para obte-
ner la Licenciatura en Biología, con Orientación Biomédica.

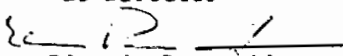
Al mismo tiempo informo a usted que ha sido ---
aceptado como Director de dicha tesis el M.en C. Carlos ---
Beas Zárate.



FACULTAD DE CIENCIAS

A T E N T A M E N T E
"PIENSA Y TRABAJA"
Guadalajara, Jal., Julio 12 de 1985.

El Director


Ing. Edmundo Ponce Adame.

El Secretario

Arq. Mario Patricio Castillo Paredes.

c.c.p. El M.en C. Carlos Beas Zárate, Director de Tesis.-Pte.
c.c.p. El expediente del alumno.

'mjsd.

Guadalajara, Jal. 12 de Noviembre de 1985

C. Ing. Edmundo Ponce Adame
Director de la Facultad de Ciencias
de la Universidad de Guadalajara
P R E S E N T E

Por éste conducto, hago constar que asesoré la Tesis titulada: "Modificación al Método Rápido de Golgi con la Supresión del Tetróxido de Osmio para el Estudio Citomorfológico del Sistema Nervioso Central", que presenta el C. pasante de la carrera de Lic. en Biología de ésta facultad a su digno cargo, José Ignacio Alfredo González Burgos.

Asimismo, testifico la honesta realización de la presente Tesis.

Atte.


M. en C. Carlos Benítez Zárate