

## La tinción de Golgi en la comprensión del sistema nervioso

Jennifer López Garcilazo<sup>1,2</sup>, Amaya Zaldivar Verdier<sup>1,2</sup>, Brandon Salvador Pacheco Avila<sup>1,2</sup>, Isabella Ximena Morales Galindo<sup>1,2</sup>, Javier Iván Hernández Monzón<sup>1,2</sup>, Fernando Axel León Ventura<sup>1,2</sup>, Esther Juárez Cortes<sup>1,3</sup>, José Vicente Negrete Díaz<sup>1,2,3</sup>.

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

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

<sup>3</sup>Programa 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](mailto:jv.negrete@ugto.mx), [esther.juarez@ugto.mx](mailto:esther.juarez@ugto.mx)

### Resumen

La tinción de Golgi es un método histológico que revolucionó la neurociencia al revelar la citoarquitectura y la morfología detallada de una neurona, fue desarrollado por Camillo Golgi en 1873, y ha sido el más usado para la observación y análisis de la morfología neuronal (Hauéis, 2022). Este método se basa en una impregnación metálica de las neuronas para la observación del soma, los axones, las dendritas y las espinas dendríticas, mismas que permiten una obtención de datos acerca de las conexiones neuronales y los cambios en respuesta a múltiples influencias genéticas y ambientales, asociadas a alteraciones en la fisiología y el comportamiento de los organismos. Este artículo tiene como propósito hacer una descripción general de los orígenes y aplicaciones de este método histológico, que cambió para siempre a las neurociencia a finales del siglo XIX, y sigue vigente, así mismo reconocer que a pesar de que existen métodos de tinción que actualmente revelan la morfología de la neurona con una buena calidad, la tinción de Golgi es conocida por ser práctica, a un costo accesible y que se mantiene vigente por la calidad de revelado de la morfología de las neuronas.

**Palabras clave:** tinción de Golgi, neuronas, morfología neuronal.

### Introducción

A lo largo de la historia se han dado un sinnúmero de grandes avances y descubrimientos científicos que han sentado el estudio de las modernas neurociencias. El papel en el conocimiento de la estructura celular de tejidos juega un papel crucial en esta disciplina, y es gracias al desarrollo del microscopio y la introducción del uso de sustancias colorantes para teñir tejidos biológicos, que hoy podemos contar con herramientas que facilitan su estudio. A pesar de que existen modernas tecnologías, como el marcaje con fluorescencia que permite visualizar en detalle la estructura de una neurona, inclusive in vivo, la inyección de la sustancia fluorescente requiere de equipo sofisticado y usualmente costoso, con el inconveniente de que se marca una o pocas neuronas a la vez, con un marcaje relativamente mucho más breve y lábil. Al contrario, con el Golgi puede impregnarse prácticamente todo el cerebro, y con ello obtener cientos de neuronas teñidas, de múltiples regiones, y que pueden visualizarse con un microscopio óptico convencional, accesible a cualquier colegio de educación básica, con grado de investigación, y con una vida útil de años con una adecuada conservación. Este trabajo de revisión se complementa con el trabajo experimental de la puesta a punto de la técnica en cuestión, se invita a los lectores a consultarlo para que pueda apreciarse la belleza y el detalle de las preparaciones obtenidas por los estudiantes de este XXIX Verano de la Ciencia UGto., mismo que pueden encontrar por el autor principal o el título (Amaya Zaldivar Verdier y cols., 2024, "Aplicación del Método Golgi-Cox para la tinción de tejido cerebral).

### Golgi y Cajal: premio Nobel y controversias

En 1873, Camilo Golgi desarrollo un método de tinción tisular que permitió ver las células y sus prolongaciones teñidas de negro; donde se podía observar las terminaciones neuronales y su relación dentro del tejido nervioso. El método, llamado "reacción negra" se basaba en sumergir muestras de tejido nervioso

en disoluciones de bicromato y ácido ósmico durante varios días, y después en una solución de nitrato de plata para precipitar el cromato argéntico, que se depositaba en el tejido nervioso. Este método le permitió a Golgi el estudio de la sustancia gris cerebral, el cerebelo y el bulbo olfatorio. La base de su teoría reticular describía la estructura nerviosa como una red continua formada por la unión de ramas terminales y colaterales, donde afirmaba que las dendritas no formaban parte de las fibras nerviosas, solo se relacionaban con los vasos sanguíneos y el tejido conectivo (Lopera Ch., M. C., 2011).

El científico español Santiago Ramón y Cajal conoció el método de coloración de Golgi en 1887, y comenzó a perfeccionarlo, determinando las condiciones de la reacción crómo-argéntica para cada paso particular, estabilizándola y fijando la preparación. Introdujo en el método el “proceder la doble y triple impregnación”, donde se reducía el tiempo de preparación y lograba colorear el tejido cortado en bloques de algunos milímetros. La técnica de tinción que había mejorado producía coloraciones más estables y le permitió estudiar el desarrollo de las células nerviosas en embriones. Su primera publicación donde utiliza el método de Golgi fue en 1888, trabajando en el cerebelo de las aves, en su trabajo se detallan las primeras descripciones de las terminaciones libres en estructuras nerviosas centrales, y le permitió formular la Teoría Neuronal, que contradecía a la teoría reticular de Golgi. En su teoría, Cajal postuló y llegó a demostrar la independencia de la célula nerviosa como unidad morfológica y funcional: “Nosotros no hemos podido ver una malla de semejante red, ni en el cerebro, ni en la médula, ni en cerebelo [...] las células nerviosas son elementos independientes jamás anastomosados ni por sus expansiones protoplasmáticas [...] y que la propagación de la acción nerviosa se verifica por contactos a nivel de ciertos aparatos o disposiciones de engranajes; cuyo objeto es fijar la conexión, multiplicando la superficie de influencia (Ramón y Cajal, 1888)”.

En 1906, Cajal y Golgi recibieron el premio Nobel de Fisiología y Medicina por su trabajo sobre la estructura del sistema nervioso. Lamentablemente se dañó enormemente la reputación del Golgi en la neurociencia debido a que defendió obstinadamente sus ideas que apoyaban una organización reticular del sistema nervioso, el cual fue refutado por Ramon y Cajal al usar su método de tinción a partir del de Golgi, donde detectó que había espacios entre las dendritas (Bentivoglio et al., 2019).

El 11 de diciembre 1906, Camilo Golgi ofreció su lectura Nobel en el cual presenta su trabajo titulado como “Doctrina neuronal, teoría y hechos” y aunque el contenido es opuesto a la teoría neuronal utilizó este nombre debido a sus investigaciones, describió sus aportaciones y atacó a las tres ideas más importantes de Ramón y Cajal sobre la teoría neuronal, el concepto de polarización y la idea del origen de las células nerviosas. Por su parte, Ramon y Cajal ofreció su lectura de Nobel el día 12 de diciembre de 1906, hablando de su trabajo científico en el campo de la histología y fisiología del sistema nervioso, defendió la postura en que las células nerviosas son unidades morfológicas y se refiere a ellas con el término “neurona” (De et al., 2006).

Fue la primera vez que un premio Nobel fue compartido. Hubo antecedentes significativos que influyeron para que el comité Nobel tomará esta decisión. Camilo Golgi no fue candidato en 1901 sino hasta que se decidió en 1906 otorgar el premio a Camilo Golgi y Ramon y Cajal. En este año Kölliker, de Würzburg, Retzius, de Estocolmo, y Furst de Lund, propusieron a Golgi y Cajal, pero Retzius propuso solo a Ramon y Cajal como candidato único siendo apoyado por otros miembros. Holmgren acentuaba que Cajal era superior a Golgi en cuanto a investigaciones, por último, refirió a favor de Cajal “no solo ha servido a la ciencia con correcciones a lo dicho por otros, o al añadir conceptos importantes al conocimiento científico, sino que ha sido él sólo (Cajal) el que ha construido el entramado estructural del pensamiento, y abrió un amplio campo para que otros también contribuyan con sus investigaciones sobre el tema” (De et al., 2006)

## **El método en el campo de la histología**

El desarrollo de la investigación histológica, encargada del estudio de la estructura a nivel microscópico de tejidos, células y orgánulos celulares para describir su morfología y posible función, estuvo estrechamente relacionado con la invención de instrumentos y técnicas de observación microscópica. La facilitación del estudio de la estructura celular y los tejidos fue posible gracias al desarrollo del microscopio y otros elementos auxiliares. (Das et al., 2013).

En la segunda mitad del siglo XVII Marcello Malpighi estudió tejidos animales y vegetales, entre los tejidos que estudio fue el cerebro y describió algunas células grandes de la corteza cerebral, demostró que todos los tejidos están formados por células. Fue el primero en observar con microscopios de esa época glóbulos rojos de la sangre, descubrió la continuidad de los capilares arteriales y los venosos. Confirmando hipótesis de la circulación cerrada de la sangre, sin duda Malpighi se considera el primer histólogo de la historia. La histología, como ciencia moderna, inicia en 1841 con la aparición del tratado de Henle *Allgemeine Anatomie* y la publicación del primer texto de histología humana de Kölliker: *Handbuch der Gewebelehre des Menschen* (1852), (Shan et al., 2022b). El problema consistía en el desarrollo de una técnica que permitiese visualizar directamente los elementos y componentes del sistema nervioso con claridad y distinción, con el fin de visualizar la célula nerviosa con toda extensión, desde sus ramas más distantes y distinguiendo individualmente cada célula dentro del bosque celular (Felie & Jones, 1992; Mazarello 2010; Fiorentini, 2011). Por su parte, en 1854, Joseph von Gerlach introdujo la técnica de usar sustancias colorantes para tejidos biológicos, dando simultáneamente apertura a la histoquímica, técnica que determina el tipo de colorante para cada tejido. Las técnicas y los métodos empleados para la coloración fueron importantes por el progreso de la industria química que producía los colorantes y la observación de que tejidos y tipos de células reaccionaban de manera diferente a diversas sustancias, resultando teñirse de manera distinta. Como ejemplo de lo anterior, Von Gerlach tiñó las células nerviosas con carmín y cloruro de oro, dando como resultado el haber visto las fibras que unían diversas dendritas nerviosas en forma de red. Paul Ehrlich realizó parte de su investigación sobre la teoría y práctica de la tinción histológica (*Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung*, Facultad de Medicina de Leipzig, 1878), donde demostró la existencia de la barrera hematoencefálica al colorear con anilina la sangre de un ratón y observar que el cerebro del animal no se teñía, además contribuyó en la innovación en el uso de azules de metileno y de indofenol para la tinción de diferentes tipos de células (Shan et al., 2022).

Sin embargo, no fue hasta 1873 que Camillo Golgi desarrolla un método de tinción usando sales de plata para teñir neuronas (Torres-Fernández, 2006) que se revolucionó la historia de la neurociencia como hoy la conocemos, varios investigadores lo llaman el "método revolucionario" ya que continúa vigente a pesar de los avances tecnológicos modernos (Cimino 1999; Shepherd 2015; Bentivoglio et al. 2019). El método consistía en que después de agregar dicromato de potasio al tejido cerebral para fijar la muestra, se sumergía al tejido en una solución de nitrato de plata; la solución de nitrato de plata reacciona con el dicromato de potasio teñiendo las neuronas con cromato de plata, permitiendo visualizar selectivamente, en color negro, los cuerpos celulares, dendritas y axones de algunas pocas células por pieza, sobre un trasfondo de color amarillo (Barberis & Barberis, 2022). Golgi llamó a este método "reacción negra", que después sería conocido también como el método o tinción de Golgi (Torres-Fernández, 2006).

Golgi publicó la descripción del método y el primer reporte de resultados, en un comunicado preliminar de la *Gaceta Médica Italiana* de 1873 (Barberis & Barberis, 2022): "Aprovechando el método, encontrado por mí, de la tinción negra de los elementos del cerebro, tinción obtenida por la inmersión prolongada de las piezas, previamente endurecidas con bicromato de potasio o amonio, en una solución al 0,50 o al 1,0% de nitrato de plata, descubrí algunos hechos sobre la estructura de la materia gris cerebral que creo que merecen comunicación inmediata.", (Golgi, 1873). Gracias a su método, Golgi describe por primera vez, en 1875, la morfología de las células del bulbo olfatorio del perro con una lámina que muestra la primera visualización de la arquitectura completa de una región cerebral (Das et al., 2013).

En la comunidad científica, el método de Golgi estuvo latente un tiempo, pero en 1888 los estudios micrográficos del tejido nervioso del anatomista Santiago Ramon y Cajal mejoraron el método de Golgi. Ramon y Cajal inventó un procedimiento de doble y triple impregnación, como se ha comentado antes, que reducía el tiempo de preparación, mejoró la nitidez de las piezas y la replicabilidad de los resultados. Aplicó la técnica sobre tejido nervioso embrionario, pues en los embriones los axones todavía no están recubiertos de mielina, por lo que pueden impregnarse mejor y visualizarse hasta su terminación. La importancia de la técnica de tinción de Golgi y su posterior perfeccionamiento se reduce en lo que Fairén decía: "la técnica de Golgi es sencilla en su ejecución y generosa en la información que proporciona", tanto así que gran parte de la información derivada por este método ha alcanzado grandes descubrimientos relevantes en la historia de la ciencia (Vints et al., 2019).

Las contribuciones de Camillo Golgi continuaron con el método de tinción para apoyar la teoría reticular, que establecía que el sistema nervioso estaba compuesto de una sola red continua de células, basado en las descripciones del complejo de Golgi en el citoplasma celular, además de la identificación de interneuronas en la corteza cerebral y cordones posteriores de la médula espinal (células Golgi tipo II). Por su parte, Ramón y Cajal usó el método de Golgi para apoyar su visión de que el sistema nervioso consistían en neuronas

individuales al detectar espacios entre las dendritas, dando como resultado el rechazo de la teoría de la red continua de Golgi, como se describió antes.

Albert Von Kölliker jugó un papel determinante en la importancia del uso del método de tinción de Golgi, publicando las primeras descripciones neurohistológicas de la corteza cerebral con esta técnica, dando nombre de "piramidales" a las células corticales principales, estas neuronas están entre las que mejor responden a la técnica de tinción de Golgi. Uno de los discípulos de Cajal, Rafael Lorente de Nó, continuó con los estudios neurohistológicos utilizando la técnica de Golgi. El primer diagrama de los microcircuitos de la neocorteza fue una contribución famosa de Lorente de Nó basada exclusivamente en la técnica de Golgi. Después de años del descubrimiento de la técnica de Golgi, a pesar del avance tecnológico de la neurociencia, continúa siendo el procedimiento de mayor utilidad práctica para la revelación de la morfología neuronal completa, por ser sencillo y de bajo costo, permitiendo que esté al alcance de laboratorios modestos.

## **Comparación con otros métodos de tinción**

En comparación con otras técnicas de tinción más modernas, como lo es la microscopía confocal de neuronas marcadas con fluorescencia, el método de tinción de Golgi tiene varias ventajas, como lo es la aplicación a prácticamente cualquier tejido, incluido el cerebro postmortem, además de que la adquisición de imágenes basada en el método de Golgi son ampliamente disponibles para quien tenga acceso a un microscopio simple o una cámara, a diferencia de las configuraciones de microscopía confocal más costosas. Otro ejemplo es que el tejido teñido con Golgi requiere microscopía de campo claro y el tejido teñido con fluorescencia solo se puede obtener con epifluorescencia de campo amplio, así como con microscopía confocal.

Las técnicas de inmunotinción a nivel molecular han sido utilizadas popularmente para la investigación de los tejidos nerviosos, pero la tinción de Golgi cuenta con más ventajas que no se pueden alcanzar con la inmunotinción. Es imposible inmunotefir neuronas si no hay un anticuerpo muy específico, esto hace que la tinción de Golgi siga siendo muy valorada para los estudios morfológicos porque hay innumerables proteínas a las que no se pueden dirigir anticuerpos específicos (Das et al., 2013). Además, existe una importante limitación de la inmunotinción en el tejido cerebral humano, porque en los humanos la desnaturalización de las proteínas ocurre inevitablemente, esto hace que se disminuya el etiquetado específico de las neuronas; por su parte, en la tinción de Golgi, no existen estas limitaciones porque las neuronas se tiñen de forma aleatoria y completa. Por último, los citoarquitectónicos resultantes de la tinción de Golgi pueden ser una guía para analizar los resultados de la inmunotinción (Valverde, 1970).

A diferencia de cualquier otra técnica de tinción, como la tinción de Nissl, la tinción de Golgi revela toda la microestructura de una neurona individual. La aplicación de tinción de Nissl se recomienda a neuronas de cuerpo grande ya que puede no detectar neuronas con cuerpos pequeños o interneuronas., esto deja posicionada a la tinción de Golgi con la ventaja para teñir toda la estructura de la neurona, incluidos los axones, las dendritas y las espinas. Ahora bien, la técnica de tinción de Golgi proporciona información detallada sobre la morfología neuronal de las pocas neuronas que marca, la mayoría de las neuronas permanecen sin teñir, por el otro lado, la técnica de tinción de Nissl permite un teñido consistente de la mayor parte de la población neuronal, pero con información muy limitada sobre la morfología neuronal.

Otras ventajas del método de tinción de Golgi sobre otros es que, en combinación con el análisis avanzado de imágenes, proporciona una metodología de referencia para el rastreo y el análisis citoarquitectónico de neuronas individuales, ya que el tejido teñido de Golgi se puede analizar con varios programas de software, entre ellos se encuentran softwares comerciales, como Imaris o Naurolicida para identificar y medir las espinas dendríticas, aunque su adquisición usualmente es cara, lo que hace que el análisis tenga un costo prohibitivo para muchos investigadores.

## Descripción del método de tinción de Golgi

La técnica de Golgi es un procedimiento histológico que revela la morfología neuronal completa en tres dimensiones. Permite la visualización de neuronas enteras a través de la impregnación de plata, tiene la característica de ser selectiva con la tinción de las neuronas, es decir, que no se tiñen todos los cuerpos neuronales del tejido cerebral, solo se tiñe entre el 1-3 % del total de neuronas, lo cual es un misterio hasta el día de hoy. Se utiliza para visualizar toda la citoarquitectura de una neurona individual sobre un fondo relativamente claro. Este método se basa en la formación de depósitos opacos intracelulares de cromato argéntico, producto de la reacción entre el bicromato de potasio y el nitrato de plata. Existen variantes de la tinción de Golgi, al ser un método comúnmente utilizado en laboratorios de neurociencia se llega a clasificar en tres clases principales de métodos: Golgi Rápido, Golgi-Kopsch y Golgi-Cox (Torres-Fernández, 2006). Enseguida se comentan brevemente tales variantes.

### **Golgi-Cox**

La impregnación, la protección del tejido y el desarrollo del color son los pasos principales del método de Golgi-Cox. En la impregnación, el nitrato de plata se reemplaza con cloruro de mercurio y se utiliza dicromato de potasio y cromato de potasio en este paso. Los tejidos tratados con solución se mantienen en la oscuridad durante 7 a 10 días porque con una impregnación más larga, se encontró que las secciones del cerebro eran menos adecuadas para la evaluación morfométrica debido a una mayor precipitación de manchas y artefactos (Narayanan et al., 2014). En nuestro laboratorio el tiempo es de 14 días, en base a resultados experimentales, donde la tinción resulta de alta calidad.

En la protección de los tejidos se utilizan una solución tampón y una solución crioprotectora que contiene sacarosa y polivinilpirrolidona, y se almacena en una habitación oscura a 4 ° C durante aproximadamente 4 a 7 días. En nuestro caso, preferimos utilizar sólo la sacarosa al 30% durante 4 días, en el caso de que el revelado de la tinción se vaya a realizar semanas después, se cambia a solución de sacarosa al 6%, para evitar la proliferación de gérmenes u otros artefactos, no recomendamos que el revelado se postergue por más de 1-2 meses, por la misma razón, y en el caso de que sea inevitable, dicha solución debe renovarse cada 2 semanas al menos. La decisión de extender el tiempo de espera antes del revelado sólo corresponde a los investigadores y en función de sus resultados, con la advertencia que ya se mencionó. Después se realiza el paso de seccionamiento utilizando un vibrátomo. En el desarrollo del color, el tejido se deshidrata y se revela. La deshidratación se hace con etanol y la limpieza con xilol se repiten muchas veces, lo que resulta en una mayor mejora de la calidad (Zaqout y Kaindl, 2016). Por último, se montan y observan los tejidos. Para una descripción detallada y observación de los resultados de la tinción puede consultarse el trabajo de Zaldivar Verdier y cols., 2024.

Este variante es ideal para analizar la estructura completa de la neurona y la glía, además de observar las correlaciones neuronales, permite examinar los diferentes tipos de neuronas en las regiones cerebrales. Se han realizado estudios que demuestran que al seccionar cortes de 150 micrómetros se pueden observar con claridad las espinas dendríticas, las cuales permiten hacer análisis enfocados a la longitud y cantidad de espinas, pues estas son clave para entender funciones como el aprendizaje y memoria. En modelos animales, específicamente en ratas, se han realizado pruebas de comportamiento que evalúan estas funciones y que permiten visualizar los cambios a nivel neuronal en las regiones del hipocampo (Zhong F, 2019), mientras que en el tejido seccionado a 200 micrómetros se visualizan estructuras como el soma, las dendritas y los axones, ambas estructuras han sido investigadas en múltiples investigaciones. En un estudio en el que se investigó acerca del trastorno del espectro autista (TEA) midiendo las espinas dendríticas en las células piramidales corticales con impregnación de Golgi, se encontró que en las espinas había una mayor densidad en la capa II de corteza del lóbulo temporal en los sujetos con TEA que los del grupo control. Esto ayudó a que se pudieran encontrar sugerencias hacia los cambios dentro de la corteza en términos de cálculos corticales alterados en sujetos con este trastorno (Jeffrey J, 2009).

### **Golgi rápido**

El método rápido de Golgi comprende los procesos de prefijación, enjuague, postfijación, tinción e inclusión (Smitha y Roopa, 2012). Los factores por considerar a la hora de la selección de este método son que esté método es favorable a los procesos de investigación encaminados al análisis de la corteza cerebral, ya que la corteza se tiñe más claramente que las otras partes del cerebro en este método. Además, si el tejido es



más joven, se tiñe más claramente, tal como lo describió Cajal. Otros factores por considerar son la temperatura del laboratorio que no debe ser de  $<10^{\circ}\text{C}$  durante el procedimiento; al obtener bloques de corte, es conveniente completar el procesamiento de Epon lo más rápido posible y sumergir las muestras en nitrato de plata durante al menos 5 días; después de cubrir con bálsamo y cubrir el deslizamiento, las observaciones de los tejidos deben completarse dentro de los 3 meses, ya que comienzan a desimpregnarse (Ahn et al., 1990). Esta es una desventaja del método en general, en sus diferentes variantes, ya que es sensible a la luz, de ahí la necesidad de preservar las laminillas con preparaciones permanentes en completa oscuridad, sobre todo esta precaución debe tomarse al momento de observar el tejido, conservando las preparaciones que no están siendo analizadas protegidas de la exposición a la luz.

El Golgi rápido es un método desarrollado por Cajal, quien tuvo como base el método original de la impregnación argéntica de Golgi, solo que hizo una modificación al añadir tetraóxido de osmio a la solución original de dicromato de potasio, esto permitió que numerosas células del tejido se tiñeran. Algunos estudios han utilizado esta variante para impregnar espinas dendríticas del hipocampo y la corteza prefrontal de la rata, asegurando que los productos químicos premezclados son más seguros de usar para obtener una mejora en la impregnación y de una nula visualización de los desechos que pueden quedar en el fondo de la tinción, además de que ofrece poder estudiar cualquier región del cerebro (Frankfurt M, 2021). Otros estudios han demostrado que cerebros de animales más viejos se tiñeron mejor con este método, que el de los animales más jóvenes (Torres-Fernández, 2006).

### **Golgi- Kopsch**

Este método utiliza un producto químico a base de aldehído en lugar de tetróxido de osmio. El Triton X-100 puede añadirse para mejorar la tinción de muestras con períodos de fijación cortos, que de otro modo no estarían bien teñidas (Tokuno et al., 1990). En el año de 1896 Kopsch fue el primero en utilizar una mezcla de bicromato de potasio y formaldehído, esto permitió que hoy en día esta impregnación se use especialmente en muestras almacenadas en formalina, como sucede con los cerebros humanos. Este método presenta una gran ventaja al facilita el trabajo con material preservado en aldehídos, y mejora la calidad de la morfología neuronal, sobre todo con apoyo de microscopios electrónicos (Torres-Fernández, 2006).

## **Tinción de Golgi con Kits comerciales**

Hoy en día existe una amplia variedad de enfoques para la tinción de Golgi, todos especialmente útiles para determinar las características morfológicas de los árboles dendríticos y la visualización de tejidos sobre un fondo claro. La creación de kits comerciales para la aplicación del método de tinción de Golgi surge a raíz de obstáculos como la fiabilidad y lo largo que resulta el proceso, que a consideración de algunos ha hecho que la aplicación de esta técnica no sea del todo cómoda, práctica o factible. Lo anterior debido en gran medida a que la técnica puede ser considerada por algunos aún como artesanal, ya que a pesar de que el procedimiento es relativamente sencillo, no siempre se obtienen resultados favorables ni reproducibles en todas las ocasiones, o en todos los laboratorios, inclusive, en base a nuestra experiencia, ni en el mismo laboratorio, lo cual llegar a considerarse un inconveniente.

Algunos laboratorios han desarrollado su propia versión del método de tinción, como es el caso de “FD Rapid GolgiStain Kit” (FD NeuroTechnologies, Inc., Ellicott City, MD) basado en los métodos descritos por Ramón Moliner en 1970 y Glaser y Van der Loos en 1981. Este kit se describe como una versión mejorada y simplificada de la técnica de Golgi-Cox. Ha demostrado ser confiable para visualizar detalles morfológicos de las neuronas, permitiendo el análisis de varios parámetros de la morfología dendrítica como la longitud y el patrón de ramificación, así como el número, forma y tamaño de las espinas dendríticas, tanto en cerebros animales y humanos desde los períodos perinatales hasta la edad adulta, e incluso postmortem. También se han observado resultados satisfactorios en la tinción de cerebros fetales para visualizar gran variedad de neuronas completas y, en particular, observar estructuras detalladas, como espinas inmaduras (Koyama y Tohyama, 2012).

Algunas de las versiones del FD Rapid GolgiStain Kit se resumen así: Solución A 250 ml, solución B 250 ml, dos soluciones C 250 ml, solución D 250 ml, Solución E 250 ml, dos vidrios Specimen Retriever, dos pinceles de pelo natural, un frasco gotero y un manual de usuario. Excluye materiales como agua bidestilada o desionizada, tubos o viales, suministros y equipo histológico como portaobjetos de microscopio recubiertos

de gelatina, cubreobjetos, frascos de tinción, etanol, xileno o sustitutos del xileno, medio de montaje resinoso y un microscopio óptico.

Algunas de estas técnicas comerciales de tinción de Golgi pueden llegar a ser una mejora notable con respecto al método original, porque los productos químicos premezclados son más seguros de usar, existe una mejora consistentemente en la impregnación de las neuronas, hay mucho menos desechos de fondo y, para una región determinada, como la médula espinal, hay pequeñas variaciones entre los resultados de los experimentos. (Frankfurt M, Bowman R. 2021)

## **Alcances del método de tinción de Golgi**

Las técnicas de tinción de Golgi son los métodos más ideales para visualizar las neuronas en su conjunto, sobre todo en cerebros conservados en formol y secciones de parafina, ya que permite adquirir información sobre caracteres morfológicos y morfométricos del árbol dendrítico, además de estimar la morfología de las espinas y la densidad de espinas, resaltando el perfil de las células nerviosas con claridad y precisión únicas. Además, permite el estudio de las conexiones topográficas entre las neuronas y los circuitos neuronales en condiciones normales, y el seguimiento de las alteraciones morfológicas espaciotemporales que se producen durante los procesos degenerativos (Baloyannis, 2015), o en cualquier otra condición donde la plasticidad depende de la experiencia o de factores genéticos.

En la visualización de las etapas de la degeneración y muerte neuronal, la tinción de Golgi desempeña un papel destacado, pues permite la visualización de axones y dendritas en degeneración, botones sinápticos y terminales axonales y orgánulos del cuerpo celular. Las versiones modernas del método de Golgi aumentan la capacidad de observación precisa de la degeneración neurofibrilar, la proliferación de astrocitos, la activación de la microglía y la morfología de los capilares en el material de autopsia de enfermedades debilitantes del sistema nervioso central (Baloyannis, 2015).

Se ha reportado también una aplicación exitosa del método de tinción de Golgi en tejido cerebral almacenado hasta 15 años en un congelador, dando como resultados impregnaciones confiables y reproducibles de dendritas y espinas en diversas áreas corticales. Este hecho amplió significativamente el estudio de diversos tejidos descartados por prolongados lapsos de congelación (Meléndez-Ferro et al., 2009).

Se ha utilizado la tomografía de matriz y tinción de Golgi en conjunto para analizar los cambios morfológicos en la corteza prefrontal medial (PFC) de la rata después de que se expusiera a 14 días de autoadministración de cocaína y 7 días de abstinencia forzada. Los resultados indicaron que la ramificación dendrítica general y la densidad sináptica total se reducen significativamente en el PFC de rata; y la densidad de las espinas dendríticas delgadas aumenta significativamente en las neuronas piramidales de la capa V del PFC. Estos descubrimientos indican que se producen cambios estructurales dinámicos durante la abstinencia de la cocaína que pueden contribuir a la hipoactividad observada del PFC en individuos adictos a la cocaína en la corteza prefrontal medial (Rasakham et al., 2014).

La combinación del método de Golgi con otras técnicas de tinción, como la inmunofluorescencia, ha permitido el estudio de modelos murinos de Alzheimer, donde se ha identificado una pérdida significativa de espinas dendríticas en las neuronas próximas a las placas de proteína beta amiloide que han sido marcadas previamente con fluorescencia (Kartalou et al., 2020). También, la aplicación del método de Golgi es eficiente para el estudio de las influencias del entorno durante el desarrollo de los individuos, como en las experiencias tempranas de estimulación positiva; en un estudio, con dos grupos de roedores donde uno ha sido estimulado positivamente y otro privado de esta estimulación, como el lamido y acicalamiento materno, los resultados obtenidos fueron significativos en el desarrollo celular y en la plasticidad cerebral (Mychasiuk et al., 2013).

Algunas regiones cerebrales importantes que se han estudiado mediante el método de Golgi es el hipocampo y la amígdala, está última debido a la comunicación que sostiene con la corteza prefrontal. En un estudio realizado en dos grupos de cepas, el primero requería la menor cantidad de estimulaciones de la amígdala para provocar una convulsión de etapa 5 y otro grupo que requería una mayor cantidad de estimulaciones, propensas y resistentes a la epileptogénesis respectivamente. El objetivo fue examinar la morfología dendrítica de las neuronas piramidales en los cerebros de ratas macho y hembras de las dos cepas obteniendo resultados relativamente interesantes (Reinhart et al., 2021).

Otro punto a destacar es la utilidad del método Golgi para investigar el efecto del dimorfismo sexual del sistema nervioso. En un estudio en mamíferos, se encontraron diferencias entre machos y hembras en el número de neuronas, el tamaño de núcleos neuronales, la proporción de tipos de neuronas, la arborización dendrítica, entre otras características citológicas e histológicas, para realizar estudios cada vez más controlados y dedicados a ambos sexos para obtener resultados satisfactorios y precisos (Cordero, Rodríguez et al., 2001).

## La tinción de Golgi-Cox en el México contemporáneo

Este apartado aborda de manera breve la relevancia del trabajo del Dr. Gonzalo Flores Álvarez, un distinguido Investigador Nacional Emérito del Sistema Nacional de Investigadores del Conahcyt, reconocido entre los mejores neurocientíficos a nivel nacional e internacional. Su trabajo de investigación, realizado en el Laboratorio de Neuropsiquiatría, ubicado en el Instituto de Fisiología, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, está enfocado en el estudio de la morfología neuronal, aplicando a un nivel de excelencia la tinción Golgi-Cox, reflejada en decenas de artículos de alto impacto, abordando temas que incluyen a la esquizofrenia, la depresión, el autismo y las adicciones, entre otros, en modelos animales. Su propósito es el de conocer los cambios de conducta y de las estructuras del cerebro, que permitan comprender con más claridad estas enfermedades y experimentar herramientas terapéuticas en su tratamiento (“Gonzalo Flores Álvarez, investigador BUAP, entre los mejores neurocientíficos de México”, 2022). En palabras del Dr. Gonzalo Flores: “Las neuronas se caracterizan por tener axones y dendritas. Nosotros estudiamos estas células del cerebro y cómo se afecta la comunicación entre estas a través de las dendritas, dependiendo de la presencia de cierta patología” (Flores G., 2022).

Su trabajo de investigación se caracteriza por el empleo y uso de la técnica de Golgi-Cox, como metodología de tinción para obtener información entre neuronas, a través de las dendritas o espinas dendríticas. En sus investigaciones, hay cambios en la conectividad entre regiones de las espinas dendríticas, lo que explicaría conductas de animales y humanos; igual que ha comprobado el efecto de neurolépticos de primera y segunda generación usados para corregir estas disminuciones, para entender el mecanismo de acción de estos fármacos, principalmente en roedores con afecciones neurológicas. (“Gonzalo Flores Álvarez, investigador BUAP, entre los mejores neurocientíficos de México”, 2022; Bringas et al., 2012). También, la utilización del método de tinción de Golgi-Cox ha sido especialmente importante en investigaciones como el uso continuo de anfetaminas y la relación con el daño causado en el hipocampo en un modelo de adicción, un estudio de su grupo de trabajo nos revela que se genera un importante deterioro en la memoria a corto y largo plazo y una disminución de la densidad neuronal en la región CA1, ya que un aumento en el tono dopaminérgico causado por la sensibilización a anfetaminas desarrolla estrés oxidativo, muerte neuronal y cambios morfológicos en el hipocampo que afectan comportamientos cognitivos como la memoria a corto y largo plazo (Arroyo-García et al, 2020).

También, el grupo de investigación del Dr. Gonzalo Flores ha empleado modelos animales, administrados con estreptozotocina para inducirles diabetes mellitus, estudiando los cambios, producidos por el aumento de la glucemia, en la morfología de las neuronas piramidales en la corteza prefrontal, occipital y el hipocampo. Gracias al método de Golgi-Cox se corrobora que la diabetes mellitus puede afectar la morfología neuronal de estas estructuras límbicas, implicadas en los trastornos mentales (Martínez-Tellez et al., 2005). Algunos otros papeles importantes de la aplicación de la tinción a modelos animales han sido en el neurodesarrollo, para imitar trastornos relacionados con el estado de ánimo. Por ejemplo, mediante la separación materna neonatal en ratas y el manejo humano sustitutivo se ha investigado el efecto sobre la morfología dendrítica en regiones cerebrales en ratas, llegando a la conclusión que la condición de cuidado materno afecta la morfología dendrítica de las neuronas en la corteza prefrontal, el hipocampo ventral CA1 y en el núcleo accumbens (Monroy et al, 2010). Los efectos del estrés prenatal en descendientes masculinos es otra investigación realizada en su laboratorio empleando modelos animales y el método Golgi-Cox, sus resultados indican que el estrés prenatal llevado a cabo durante la mitad del embarazo aumenta la locomoción de los individuos, además de la densidad de las dendritas basales de las neuronas piramidales del hipocampo y la morfología dendrítica del núcleo accumbens, esto puede manifestar cambios importantes en la transmisión dopaminérgica mesocorticolímbica y comportamientos asociados con el desarrollo de enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia (Martínez-Téllez et al., 2009). En otro de los múltiples estudios del Dr. Gonzalo, se destacan los efectos del aislamiento social post-destete en la morfología de las neuronas



piramidales de la parte medial de la corteza prefrontal y el hipocampo en ratas. La morfología dendrítica mostró una disminución en la longitud de las células piramidales del CA1 del hipocampo y una disminución en la densidad de espinas dendríticas en las células piramidales de la corteza prefrontal e hipocampo. Los resultados sugieren que el aislamiento social post-destete puede afectar parte de la morfología dendrítica en las estructuras límbicas implicadas en la esquizofrenia. (Silva-Gómez et al, 2003).

Finalmente, cabe destacar que la técnica de tinción que se comenta en este trabajo, nuestro grupo de investigación la tiene montada en el laboratorio y está disponible para quienes deseen conocerla más de cerca. Concluimos esta sección comentando que tenemos la fortuna de haberla aprendido directamente en el laboratorio del Dr. Gonzalo Flores, y bajo su dirección se lograron algunas publicaciones aplicando la tinción Golgi-Cox.

## Neurolucida360

Para concluir este trabajo comentaremos brevemente el estado del arte en el análisis de las neuronas teñidas con el método Golgi. Así, se describe de manera general el sistema Neurolucida360, un software enfocado en la reconstrucción rápida y precisa de toda especie de neurona contando con una amplia variedad de técnicas de etiquetado y microscopía. Más detalles sobre el mismo se pueden encontrar en Neurolucida®, 2022, donde se detallan las aplicaciones para el análisis, desde redes neuronales complejas y multicelulares hasta componentes neuronales subcelulares como espinas dendríticas, varices y sinapsis putativas, así como el análisis de células gliales como oligodendrocitos, microglía y astrocitos (Neurolucida360, 2022).

Este programa está diseñado para funcionar eficientemente incluso con los conjuntos de datos de imágenes multicanal 3D más grandes, utilizando inteligencia artificial en el manejo de imágenes precognitivas, siendo compatible con la mayoría de formatos de archivo adquiridos en los distintos modelos de microscopios de investigación.

Dentro de las principales ventajas de Neurolucida360 se encuentran:

- Crear reconstrucciones de neuronas precisas y cuantificables automáticamente.
- Clasificar axones, dendritas, somas, espinas dendríticas, varices, sinapsis putativas y tipos de puntos.
- Utilizar herramientas de edición integrales en los especímenes más desafiantes para crear las reconstrucciones más precisas y los datos reales sobre el terreno.
- Trabaje con la IA y los algoritmos más avanzados para una detección y segmentación precisas.
- Realizar visualización y exploración 3D dinámicas.
- Producir datos fiables, abiertos y FAIR con métodos en los que confía la comunidad de neurociencias.

### ***Aportaciones científicas con neurolucida360***

La determinación de la densidad y morfología de las espinas dendríticas es de gran importancia biológica dado el papel de las espinas en la plasticidad sináptica y en los trastornos neurodegenerativos y neuropsiquiátricos. La cuantificación precisa de las espinas en tres dimensiones (3D) es esencial para comprender los determinantes estructurales de la función neuronal normal y patológica. Esta unidad presenta métodos para el análisis morfométrico objetivo de la columna dendrítica, al proporcionar los parámetros de adquisición de imágenes necesarios para garantizar series de datos óptimas para la detección, caracterización y cuantificación adecuadas. Estos protocolos serán una referencia valiosa para los científicos que trabajan en la cuantificación y caracterización de las espinas (Dickstein, et al., 2016).

## Conclusiones

La tinción de Golgi, desarrollada por Camillo Golgi en 1873 y perfeccionada por Ramon y Cajal en 1888, ha sido un pilar fundamental en la neurociencia al permitir una de las primeras imágenes detalladas de la morfología neuronal, se continúa realizando con pocas variantes desde casi 100 años y sigue vigente y útil, permitiendo

la observación del soma, los axones, las dendritas y las espinas dendríticas, y obtención de datos acerca de las conexiones neuronales. También, a lo largo de los años, el método ha evolucionado complementándose con otras técnicas, dando como resultado una amplia variedad en las iteraciones de la tinción de Golgi, entre las que se encuentran los métodos de Golgi-Cox, Golgi rápido y Golgi-Kopsch. La persistencia y la adaptabilidad de la tinción de Golgi demuestran su relevancia continua en la investigación neurocientífica, permitiendo una comprensión profunda de las neuronas individuales y sus conexiones en diversas condiciones experimentales, especialmente útil para el estudio de la citoarquitectura y las alteraciones neuronales en condiciones patológicas, como en el caso de enfermedades neurodegenerativas y estudios de la plasticidad cerebral. Aunque los avances tecnológicos han introducido técnicas modernas que ofrecen excelentes resoluciones, el método de Golgi sigue siendo ampliamente valorado por su accesibilidad, costo relativamente bajo y capacidad para proporcionar imágenes completas de la estructura neuronal. Su capacidad para revelar la compleja red de conexiones neuronales y su accesibilidad económica aseguran que esta técnica continúe siendo un recurso esencial para investigadores de todo el mundo. A medida que la tecnología avanza, la tinción de Golgi se mantiene como un estándar de referencia, demostrando su capacidad para adaptarse y seguir contribuyendo al avance del conocimiento.

## Referencias

- Ahn B K, Park M J, Kim E H, Bae Y C, Hong H S, Cho H J, and Joo K (1990) A study on staining techniques of Golgi methods. *Kyungpook Univ. Med. J.* 31, 313-322.
- Arroyo-García LE, Tendilla-Beltrán H, Vázquez-Roque RA, Jurado-Tapia EE, Díaz A, Aguilar-Alonso P, Brambila E, Monjaraz E, De La Cruz F, Rodríguez-Moreno A, Flores G. Amphetamine sensitization alters hippocampal neuronal morphology and memory and learning behaviors. *Mol Psychiatry.* 2021 Sep;26(9):4784-4794. doi: 10.1038/s41380-020-0809-2. Epub 2020 Jun 17. PMID: 32555421.
- Baloyannis SJ. Staining of dead neurons by the Golgi method in autopsy material. *Methods Mol Biol.* 2015;1254:167-79. doi: 10.1007/978-1-4939-2152-2\_13. PMID: 25431065.
- Barberis, Sergio Daniel. (2022). Cambio conceptual e innovación técnica: los desafíos de las neurociencias a la filosofía de las revoluciones científicas. *Revista de humanidades de Valparaíso*, (20), 165-181. Epub 01 de diciembre de 2022. <https://dx.doi.org/10.22370/rhv2022iss20pp165-181>
- 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>
- Campaña, A. D., Sanchez, F., Gamboa, C., Gómez-Villalobos, M.deJ., De La Cruz, F., Zamudio, S., & Flores, G. (2008). Dendritic morphology on neurons from prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens is altered in adult male mice exposed to repeated low dose of malathion. *Synapse (New York, N.Y.)*, 62(4), 283–290. <https://doi.org/10.1002/syn.20494>Narayanan, S. N., Bairy, L. K., & Srinivasamurthy, S. K. (2020b). Determining factors for optimal neuronal and glial Golgi-Cox staining. *Histochemistry And Cell Biology*, 154(4), 431-448. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01891-9>
- Cordero ME, Rodriguez A, Torres R, Valenzuela CY. Human Raphe Magnus Nucleus: a morphometric Golgi-Cox study with emphasis on sex differences. *Brain Res Dev Brain Res.* 2001 Nov 26;131(1-2):85-92. doi: 10.1016/s0165-3806(01)00266-8. PMID: 11718839.
- Das, G., Reuhl, K., & Zhou, R. (2013). The Golgi-Cox method. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1018, 313–321. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-444-9\\_29](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-444-9_29)
- Dickstein, D. L., Dickstein, D. R., Janssen, W. G. M., Hof, P. R., Glaser, J. R., Rodriguez, A., O'Connor, N., Angstman, P., & Tappan, S. J. (2016). Automatic dendritic spine quantification from confocal data with *NeuroLucida* 360. *Et al [Current Protocols in Neuroscience]*, 77(1). <https://doi.org/10.1002/cpns.16>
- Du F. Tinción de Golgi-Cox de dendritas neuronales y espinas dendríticas con FD Rapid GolgiStain™ Kit. *Curr Protoc Neurosci.* junio de 2019; 88(1):E69. doi: 10.1002/cpns.69. PMID: 31216393.
- 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](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)
- Frankfurt M, Bowman R. Rapid Golgi Stain for Dendritic Spine Visualization in Hippocampus and Prefrontal Cortex. *J Vis Exp*. 2021 Dec 3;(178). doi: 10.3791/63404. PMID: 34927620.
- Gómez-Villalobos, M., Gordillo, A. C., López, J. R. H., & Flores, G. (2009). The utility of the Golgi–Cox method in the morphological characterization of the autonomic innervation in the rat heart. *Journal Of Neuroscience Methods*, 179(1), 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2009.01.004>
- Gonzalo Flores Álvarez, investigador BUAP, entre los mejores neurocientíficos de México. (2022, junio 5). *Boletines BUAP*. <https://www.boletin.buap.mx/node/2477>
- Haueis, P. (2023). Exploratory Concept Formation and Tool Development in Neuroscience. *Philosophy of Science*, 90(2), 354–375. doi:10.1017/psa.2022.79
- Kang, H. W., Kim, H. K., Moon, B. H., Lee, S. J., Lee, S. J., & Rhyu, I. J. (2017). Comprehensive Review of Golgi Staining Methods for Nervous Tissue. Han-guk Hyeonmigyeong Hakoeji/Applied Microscopy, 47(2), 63–69. <https://doi.org/10.9729/am.2017.47.2.63>
- Kartalou GI, Endres T, Lessmann V, Gottmann K. Golgi-Cox impregnation combined with fluorescence staining of amyloid plaques reveals local spine loss in an Alzheimer mouse model. *J Neurosci Methods*. 2020 Jul 15;341:108797. doi: 10.1016/j.jneumeth.2020.108797. Epub 2020 May 30. PMID: 32479974.
- Koyama Y, Nishida T, Tohyama M. Establishment of an optimised protocol for a Golgi-electron microscopy method based on a Golgi-Cox staining procedure with a commercial kit. *J Neurosci Methods*. 2013 Aug 15;218(1):103–9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2013.05.004. Epub 2013 May 28. PMID: 23721893.
- Martínez-Tellez R, Gómez-Villalobos Mde J, Flores G. Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain Res*. 2005 Jun 28;1048(1-2):108–15. doi: 10.1016/j.brainres.2005.04.048. PMID: 15916754.
- Martínez-Téllez RI, Hernández-Torres E, Gamboa C, Flores G. Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring. *Synapse*. 2009 Sep;63(9):794–804. doi: 10.1002/syn.20664. PMID: 19489049.
- Melendez-Ferro M, Perez-Costas E, Roberts RC. A new use for long-term frozen brain tissue: golgi impregnation. *J Neurosci Methods*. 2009 Jan 30;176(2):72–7. doi: 10.1016/j.jneumeth.2008.08.021. Epub 2008 Aug 26. PMID: 18789970; PMCID: PMC2637610.
- Mishqat, Isra, "Camillo Golgi's Black Reaction for Staining Neurons". *Embryo Project Encyclopedia* ( 2017-05-26 ). ISSN: 1940-5030 <https://hdl.handle.net/10776/11522>
- Monroy E, Hernández-Torres E, Flores G. Maternal separation disrupts dendritic morphology of neurons in prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in male rat offspring. *J Chem Neuroanat*. 2010 Oct;40(2):93–101. doi: 10.1016/j.jchemneu.2010.05.005. Epub 2010 May 27. PMID: 20553852.
- Mychasiuk R, Gibb R, Kolb B. Visualizing the effects of a positive early experience, tactile stimulation, on dendritic morphology and synaptic connectivity with Golgi-cox staining. *J Vis Exp*. 2013 Sep 25;(79):e50694. doi: 10.3791/50694. PMID: 24121525; PMCID: PMC3935738.
- (N.d.). Researchgate.net. Retrieved July 29, 2024, from [https://www.researchgate.net/post/Are\\_there\\_opensource\\_alternatives\\_to\\_Neurolucida\\_for\\_neuron\\_tracing\\_and\\_reconstruction](https://www.researchgate.net/post/Are_there_opensource_alternatives_to_Neurolucida_for_neuron_tracing_and_reconstruction)
- Narayanan, S. N., Bairy, L. K., & Srinivasamurthy, S. K. (2020). Determining factors for optimal neuronal and glial Golgi-Cox staining. *Histochemistry and cell biology*, 154(4), 431–448. <https://doi.org/10.1007/s00418-020-01891-9>
- Narayanan S N, Jetti R, Gorantla V R, Kumar R S, Nayak S, and Bhat P G (2014) Appraisal of the effect of brain impregnation duration on neuronal staining and morphology in a modified Golgi-Cox method. *J. Neurosci. Methods* 235, 193–207. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.07.007>
- Neurolucida® 360. (2022, March 28). MBF Bioscience. <https://www.mbfbioscience.com/products/neurolucida-360/>
- 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>

- Pilati N, Barker M, Panteleimonitis S, Donga R, Hamann M. A Rapid Method Combining Golgi and Nissl Staining to Study Neuronal Morphology and Cytoarchitecture. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2008;56(6):539-550. doi:10.1369/jhc.2008.950246
- Rasakham K, Schmidt HD, Kay K, Huizenga MN, Calcagno N, Pierce RC, Spires-Jones TL, Sadri-Vakili G. Synapse density and dendritic complexity are reduced in the prefrontal cortex following seven days of forced abstinence from cocaine self-administration. *PLoS One*. 2014 Jul 29;9(7):e102524. doi: 10.1371/journal.pone.0102524. PMID: 25072653; PMCID: PMC4114454.
- Reinhart CJ, McIntyre DC, Pellis SM, Kolb BE. Prefrontal neuronal morphology in kindling-prone (FAST) and kindling-resistant (SLOW) rats. *Synapse*. 2021 Sep;75(9):e22217. doi: 10.1002/syn.22217. Epub 2021 Jul 6. PMID: 34120374.
- Risher WC, Ustunkaya T, Singh Alvarado J, Eroglu C (2014) Rapid Golgi Analysis Method for Efficient and Unbiased Classification of Dendritic Spines. *PLOS ONE* 9(9): e107591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107591>.
- Rosario A, Howell A, Bhattacharya SK. A revisit to staining reagents for neuronal tissues. *Ann Eye Sci*. 2022 Mar;7:6. doi: 10.21037/aes-21-31. Epub 2022 Mar 15. PMID: 36177475; PMCID: PMC9518810.
- Sánchez, F., Gómez-Villalobos, M.deJ., Juárez, I., Quevedo, L., & Flores, G. (2011). Dendritic morphology of neurons in medial prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in adult SH rats. *Synapse (New York, N.Y.)*, 65(3), 198–206. <https://doi.org/10.1002/syn.20837>
- Shan, Q., Qin, X., & Zhou, J. (2022). Expansion-Based Clearing of Golgi-Cox-Stained Tissue for Multi-Scale Imaging. *International Journal Of Molecular Sciences*, 23(7), 3575. <https://doi.org/10.3390/ijms23073575>
- Silva-Gómez AB, Rojas D, Juárez I, Flores G. Decreased dendritic spine density on prefrontal cortical and hippocampal pyramidal neurons in postweaning social isolation rats. *Brain Res*. 2003 Sep 5;983(1-2):128-36. doi: 10.1016/s0006-8993(03)03042-7. PMID: 12914973.
- Smitha J and Roopa R (2012) Rapid Golgi Technique for staining pyramidal neurons in rat hippocampus. *IJBAMS* 2, 98-102.
- Solis, O., Limón, D. I., Flores-Hernández, J., & Flores, G. (2007). Alterations in dendritic morphology of the prefrontal cortical and striatum neurons in the unilateral 6-OHDA-rat model of Parkinson's disease. *Synapse*, 61(6), 450-458. <https://doi.org/10.1002/syn.20381>
- Taddeo, Sarah, O'Neil, Erica, "Golgi Staining Technique". *Embryo Project Encyclopedia* ( 2017-03-06 ). ISSN: 1940-5030
- Tendilla-Beltrán, H., Arroyo-García, L. E., Díaz, A., Camacho-Abrego, I., de la Cruz, F., Rodríguez-Moreno, A., & Flores, G. (2016). The effects of amphetamine exposure on juvenile rats on the neuronal morphology of the limbic system at prepubertal, pubertal and postpubertal ages. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 77, 68–77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.05.004>
- Tokuno H, Nakamura Y, Kudo M, and Kitao Y (1990) Effect of Triton X-100 in the Golgi-Kopsch method. *J. Neurosci. Methods* 35, 75-77. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(90\)90096-X](https://doi.org/10.1016/0165-0270(90)90096-X)
- Torres-Fernández, Orlando. (2006). La técnica de impregnación argéntica de Golgi. *Conmemoración del centenario del premio nobel de Medicina (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal. Biomédica*, 26(4), 498-508.
- Vints, K., Vandael, D., Baatsen, P., Pavie, B., Vernailen, F., Corthout, N., ... & Gounko, N. V. (2019). Modernization of Golgi staining techniques for high-resolution, 3-dimensional imaging of individual neurons. *Scientific reports*, 9(1), 130.
- Zaqout, S., & Kaindl, A. M. (2016). Golgi-Cox Staining Step by Step. *Frontiers In Neuroanatomy*, 10. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00038>
- Zhang, J. W., Tabassum, S., Jiang, J. X., & Long, C. (2020). Optimized Golgi-Cox Staining Validated in the Hippocampus of Spared Nerve Injury Mouse Model. *Frontiers in neuroanatomy*, 14, 585513. <https://doi.org/10.3389/fnana.2020.585513>