

APLICABILIDAD DEL MÉTODO DE GOLGI MODIFICADO EN CULTIVOS DE CÉLULAS NEURONALES

Zulma Peña-Contreras*, Rosa Virginia Mendoza-Briceño, Delsy Dávila-Vera, Saraid Rivera-Valecillos, Ernesto Palacios-Prü †

Centro de Microscopía Electrónica “*Dr. Ernesto Palacios-Prü*”. Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela

*Autor de correspondencia: Zulma Peña-Contreras E-mail: cme@ula.ve
Tlf: 274-2403160, Fax: 274-2403156

Recibido: Febrero 2010. Aprobado: Marzo 2010.

Publicado: Mayo 2010.

RESUMEN

Se estudió el desarrollo in vitro de la región cerebral parietal del ratón aplicando el método de Golgi a cultivos de tejidos rotatorios, para identificar los importantes cambios morfológicos que se producen durante la maduración de las células piramidales de la corteza parietal, utilizando una variación del método de Golgi, fácil de realizar y que, a diferencia del método clásico, ofrece resultados rápidos. A los 3 y 5 días de desarrollo postnatal, se observaron signos de inmadurez neuronal; mientras que a partir del día 7 postnatal aparecen las primeras señales de maduración y diferenciación celular, como es la aparición de espinas dendríticas, elemento morfológico indispensable para la formación de contactos sinápticos interneuronales. Esto demuestra que el día 7 postnatal corresponde al Período Crítico de la corteza parietal en el ratón, porque es el momento cuando se desencadenan los procesos que permitirán el funcionamiento adecuado de esa corteza. El uso combinado de ambos procedimientos: cultivo de tejidos e impregnación cromo-argéntica, constituye una importante y versátil herramienta para el estudio ontogénico de las diferentes regiones del sistema nervioso.

Palabras claves: método de Golgi, cultivos histotípicos, desarrollo, corteza cerebral

GOLGI' S METHOD PARTICULARLY USEFUL FOR CULTURED NERVE CELLS

ABSTRACT

In vitro development of the parietal cortex of mice was studied, applying the Golgi' s method to rotary culture tissues, to identify the important morphologic changes that take place during the pyramidal cells maturation of the parietal cortex, using a variation of the Golgi' s method by a simple procedure and unlike the classic method, offers faster results. Signs of neuronal immaturity were observed after 3 and 5 days old postnatal development, whereas at postnatal day 7 the first signals of cellular differentiation appears as dendritic thorns, which is the morphological structure essential for the formation of interneural synaptic contacts. This demonstrates that day 7 postnatal corresponds to the Critical Period of the mouse parietal cortex, at this stage important features of differentiation are present. The combined use of both procedures: tissue culture and chromo-argentic impregnating, provides an important and versatile tool for the ontogenic study of the different regions from the nervous system.

Keywords: Golgi' s method, histotypic cultures, development, cerebral cortex.

INTRODUCCIÓN

Es un hecho que el conocimiento de los procesos de maduración de las células neuronales es crucial para la comprensión del funcionamiento del sistema nervioso adulto; es así cómo el análisis de la maduración de las células neuronales tanto del sistema nervioso central como del periférico ha sido motivo de estudio desde épocas no tan recientes hasta el momento actual [1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11].

En la búsqueda de mejores resultados en el estudio de neuronas en desarrollo se ha tratado de utilizar diversas técnicas, entre ellas una de las más utilizadas ha sido el cultivo in vitro de tejidos [12, 13, 18, 19, 20, 21, 22] que ha permitido el estudio del comportamiento migratorio neuronal y del establecimiento de conexiones celulares corticales durante el desarrollo neuronal. Los cultivos in vitro constituyen un modelo experimental para el estudio

simplificado de colectividades neuronales de diversas regiones del sistema nervioso, lo cual ha facilitado el estudio de la neurogénesis y de la maduración neuronal, así como el análisis experimental del tejido nervioso desde el punto de vista bioquímico, farmacológico y toxicológico, entre otros [14, 15, 16, 17].

Otro método ampliamente utilizado en las neurociencias es el método cromoargéntico desarrollado por Camilo Golgi [23] y aplicado sabiamente por Santiago Ramón y Cajal [3]. Este método cromoargéntico, conocido hoy día como método de Golgi, ha sido modificado innumerables veces tratando de obtener resultados más óptimos y reproducibles, ya que es un método conocido por su caprichosidad para impregnar las neuronas [1, 2, 3, 23, 24, 25, 26, 27]; sin embargo, hoy día sigue siendo la técnica utilizada para el estudio fenotípico del sistema nervioso [27, 28, 29, 30].

En este trabajo estudiaremos el desarrollo *in vitro* de la corteza cerebral parietal de ratón desde el día 3 de edad postnatal (P3) hasta el día 9 de edad postnatal (P9), utilizando la técnica de cultivo de tejidos rotatorios desarrollada por Moscona y Garber [31, 32] y modificada en nuestro laboratorio [18, 19, 33], conjuntamente con la aplicación del método de Golgi modificado por Palacios-Prü [25]. Conociendo la capacidad de impregnación de las neuronas cultivadas, se espera que la combinación de ambas técnicas sea de gran utilidad para la comprensión del desarrollo neuronal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones NMRI de 3 (P3), 5 (P5), 7 (P7) y 9 (P9) días postnatal, suministrados por el Bioterio de la Universidad de Los Andes.

Cultivos de Corteza Cerebral Parietal

Fueron preparados siguiendo el procedimiento para cultivos rotatorios modificado por Palacios-Prü y col. [18,

19, 33] a partir de la técnica básica propuesta por Moscona [31] y por Garber y Moscona [32]. A los ratones de las diferentes edades antes indicadas, después de ser anestesiados vía intraperitoneal con pentotal sódico (80 mg/kg-peso), se les removió el encéfalo e inmediatamente este fue colocado en solución Tyrode. Bajo una lupa estereoscópica y en un ambiente estéril, se extrajo la corteza cerebral parietal y se seccionó en pequeños trozos de 1 a 3mm³, los cuales fueron lavados repetidamente en solución Tyrode y transferidos a un frasco Erlenmeyer que contenía 6 ml de medio de cultivo reconstituido y previamente oxigenado (95% O₂ + 5% CO₂), el cual estaba compuesto por 90% de medio basal de Eagle con L-glutamina (GIBCO), 9% de suero de caballo (GIBCO) y 1% de solución de penicilina (5000 UI/ml) y estreptomycin (5 mg/ml). Los cultivos fueron incubados durante 6 días a 37°C, con rotación constante a 70 rpm; el medio fue cambiado cada 48h y oxigenado durante un min cada 24h. Una vez transcurrido el tiempo programado de incubación, los tejidos fueron retirados del medio de cultivo para iniciar la impregnación cromoargéntica con la variación al método de Golgi.

Método de Golgi

Los tejidos cultivados fueron lavados con abundante agua destilada e inmediatamente incubados en la mezcla cromante Golgi 44 [25], la cual fue preparada, en el momento previo a ser utilizada, mezclando 44 ml de solución acuosa de dicromato de sodio al 2%, 2 ml de glutaraldehído al 50%, 3ml de formaldehído al 37% y 1 ml de ácido acético glacial. En esta mezcla, los tejidos fueron incubados durante 4h y luego lavados con agua destilada, para después ser incubados en una solución de nitrato de plata al 1,5% durante 4h. Transcurrido este tiempo, el material fue lavado nuevamente con abundante agua destilada. Para realizar los cortes, los cultivos fueron colocados sobre bases de parafina y utilizando un microtomo Sorvall JB-4, se procedió a realizar cortes de 50 µm de espesor, los cuales fueron recogidos en una

cubeta con agua destilada, después fueron deshidratados en alcohol isopropílico al 80, 90 y 100% y finalmente, fueron clarificados con xilol. Para la observación de los cortes se utilizó un microscopio Polyvar Reichert Jung.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los cultivos provenientes de ratones de edad P3 se identifican células piramidales de forma redondeada e irregular, con prolongaciones de aspecto indefinido emergiendo del cuerpo celular y orientadas en diferentes sentidos, características propias de neuronas inmaduras (Fig. 1). A esta edad el número de células impregnadas es escaso.

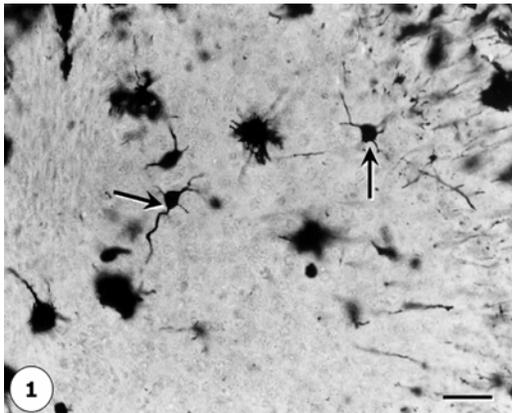


Fig. 1. Cultivo de corteza cerebral parietal de ratón P3, se observan algunas neuronas piramidales (flechas) inmaduras con escasas e irregulares ramificaciones dendríticas. Barra: 83µm.

Al analizar los cultivos preparados de ratones de edad P5, morfológicamente las células piramidales son todavía de aspecto primitivo, el cuerpo es de forma esferoidal, con múltiples prolongaciones celulares, distinguiéndose entre ellas algunas más alargadas y que empiezan a mostrar características de prolongaciones dendríticas y que se originan de diversos sitios del soma celular (Fig. 2).

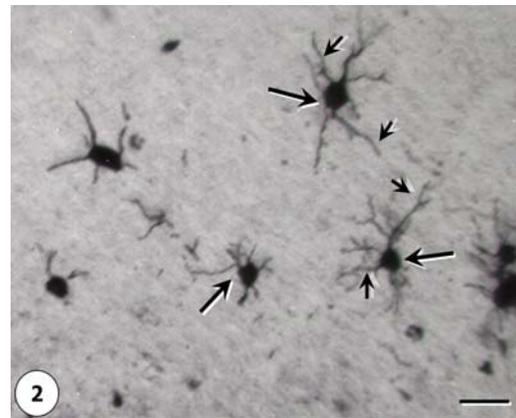


Fig. 2. En esta sección de un cultivo de corteza parietal de ratón P5, se pueden apreciar neuronas piramidales aun con un alto grado de inmadurez (flechas largas) y con pocas ramificaciones dendríticas (flechas cortas). Barra: 83 µm.

El tejido cerebral parietal cultivado de ratones de edad P7, histológicamente presentan características propias de una organización cortical, es decir, las neuronas ya no se observan de manera aislada sino que empiezan a organizarse en láminas o capas. Las neuronas piramidales a esta edad muestran un mayor desarrollo celular, se observan algunos cuerpos de neuronas piramidales de forma triangular del cual emergen, de dos o tres sitios ramificaciones dendríticas con espinas dendríticas bien conformadas. Pueden identificarse también prolongaciones con características propias de los axones (Fig. 3).

Finalmente, cuando los cultivos son preparados de ratones de edad P9 la organización de las células en capas es más definida. La mayoría de las células piramidales ya se han transformado en células multipolares organizadas en diferentes niveles, iniciándose el proceso de regionalización tisular (Fig. 4), como ocurre normalmente en condiciones *in situ*.

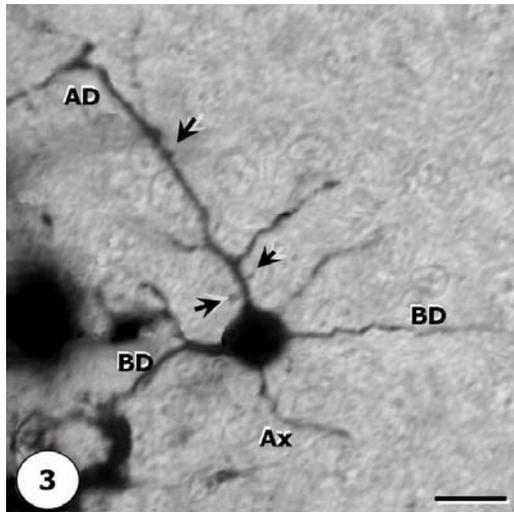


Fig. 3. En esta fotografía se muestra una neurona piramidal de un ratón P7 después de 6 días de cultivo. En esta edad se comienzan a identificar dendritas basales (BD), la dendrita apical (AD) y una extensión celular que muestra características de axón (Ax). En las dendritas de estas células piramidales cultivadas es posible observar algunas espinas dendríticas (flechas). Barra: 18 μ m

Las dendritas de las neuronas piramidales de estos cultivos están más desarrolladas y tienen mayor cantidad de espinas dendríticas que las observadas en cultivos de edades anteriores; siendo importante destacar que las dendritas apicales son muy ramificadas en el extremo distal y se hacen más alargadas que las dendritas basales (Fig. 5), de igual manera como se observa en la corteza cerebral de un animal adulto.

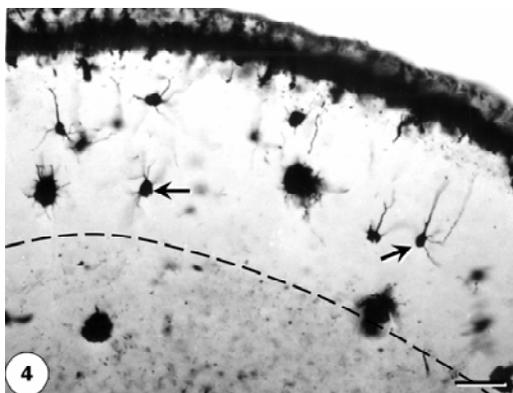


Fig. 4. En esta imagen de un cultivo de corteza cerebral de ratón P9, se aprecian neuronas piramidales (flechas), con dendritas apicales bien diferenciadas. La línea punteada indica la separación entre la zona cortical del cultivo y el área central. Barra: 83 μ m

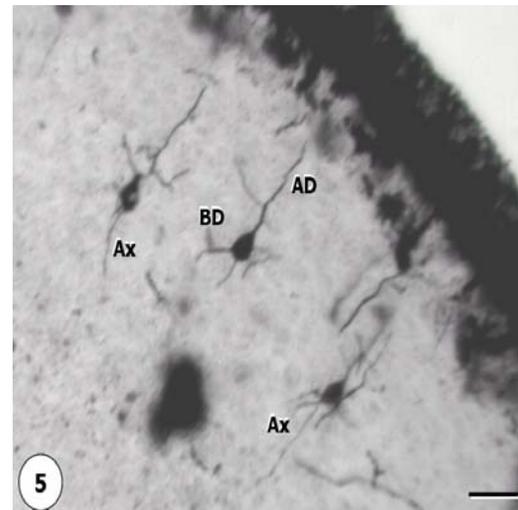


Fig. 5. Corte de un cultivo de corteza cerebral parietal de un ratón P9 donde se pueden observar neuronas piramidales con características fenotípicas más desarrolladas que las observadas en las edades previas. Estas neuronas tienen dendritas apicales (AD) y dendritas basales (BD) bien diferenciadas y prolongaciones axónicas bien desarrolladas (Ax). Barra: 83 μ m

Los procesos de migración y diferenciación neuronal en la corteza cerebral parietal del ratón se extienden hasta el séptimo día postnatal, edad en la cual las células piramidales se ubican en la corteza cerebral en el lugar definitivo que les corresponde y expresan por primera vez las características morfológicas externas que permiten reconocerlas como tales. Este breve lapso de tiempo es conocido como Período Crítico [34]. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, para las células piramidales de la corteza parietal en el ratón el Período Crítico sucede al día $P7 \pm 12h$. Es a partir de este momento cuando la neurona piramidal parietal expresa las condiciones morfológicas y en consecuencia las funcionales, necesarias para establecer las diversas interconexiones celulares que le permiten al cerebro actuar como una unidad sincronizada. El Período Crítico es la expresión de los procesos de plasticidad que influyen en la maduración y en el adecuado funcionamiento de los circuitos neuronales corticales para el modelaje final de la maduración de las neuronas [14, 35, 36, 37]. Este

comportamiento funcional ha sido observado anteriormente en cultivos de otras regiones del sistema nervioso central, tales como hipotálamo, bulbo olfatorio y corteza cerebelosa [36, 38, 39].

El método de Golgi, diseñado originalmente por Camilo Golgi [23] y perfeccionado por Santiago Ramón y Cajal [1], es una técnica clásica que no requiere de grandes exigencias ni costosos equipos y tiene la ventaja que impregna selectivamente algunas células, lo cual le permite expresar de manera exacta, la morfología de cada neurona en particular, tanto del cuerpo como de sus prolongaciones celulares; sin embargo, tiene como inconveniente que es una técnica que requiere prolongados períodos de tiempo para obtener la impregnación del tejido [26; 27]. En 1970, Palacios-Prü, publicó las modificaciones realizadas por él al método de Golgi, con las cuales se obtienen resultados en aproximadamente 8h.

La técnica de cultivo *in vitro* de tejidos permite reproducir las condiciones fisiológicas que una población celular en particular tiene en el animal de experimentación, pero además permite también que una población celular pueda ser estudiada de forma aislada sin que tenga la interacción con otros tejidos.

Por su parte, el tejido en desarrollo constituye un modelo experimental que ofrece ventajas sobre el tejido adulto, en razón a que el primero es un modelo más simplificado en cuanto a la organización tisular, ya que no se han establecido todavía todas las relaciones celulares definitivas.

La utilización en conjunto de estas tres herramientas: tejido en desarrollo, cultivo de tejidos y método de Golgi, permitieron observar el desarrollo neuronal *in vitro* de la corteza cerebral parietal y determinar el Período Crítico, como se demuestra con los resultados obtenidos a partir

de cultivos de corteza cerebral parietal de ratones de edades P3, P5, P7 y P9, en los cuales observamos células neuronales con un alto grado de inmadurez (P3) hasta neuronas bien desarrolladas con ramificaciones dendríticas y axónicas bien establecidas (P7 y P9) y organizadas tisularmente en capas como sucede en la corteza cerebral *in situ*.

Nuestros resultados reafirman la importancia que tienen los cultivos *in vitro* y la modificación al método de Golgi realizada en nuestro laboratorio hace más de tres décadas, como herramientas valiosas para el estudio del desarrollo del sistema nervioso central.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Nancy Pacheco, Francisco Durán-Montilla, Emilitza Labarca-Villasmil y José Ramírez por su asistencia técnica durante la presente investigación y preparación de manuscrito.

REFERENCIAS

- [1] Ramón y Cajal S. (1960) *Studies on Vertebrate Neurogenesis*, Thomas, Springfield III. 1929. Traducido por L. Guth. Ramón y Cajal S. (1952) "Structure and connections of neurons" *Bull Los Angel Neuro Soc* 17:5-46.
- [2] Ramón y Cajal S., Tello y Muñoz J.F. (1966) *Elementos de Histología Normal y de Técnica Micrográfica*, 12 ed. Editora Nacional. México.
- [3] Wykoff R., Young J. (1956) "The motor neuron surface" *Proc R Soc London Biol Sci* 144:440-450.
- [4] Sosa J.M., Palacios E., Sosa H. de. (1971) "Heterotopic cerebellar granule cells inside the plexiform layer" *Acta Anat* 80:91-98.
- [5] DeFelipe J., Jones E. G. (1988) *Cajal on the Cerebral Cortex*. New York, Oxford University Press.

- [6] DeFelipe J., Jones E.G. (1991) *Santiago Ramón y Cajal's Degeneration and regeneration of the Nervous System*. New York: Oxford University Press.
- [7] Shepherd, G.M. (1991) *Foundations of the Neuron Doctrine*, Oxford, Oxford University Press.
- [8] Shepherd, G.M. (1996) "The dendritic spine: a multifunctional integrative unit" *J Neurophysiol* 75:2197-2210.
- [9] Parnavelas J.G. (2000) "The origin and migration of cortical neurones: new vistas" *Trends Neurosci* 23:126-131.
- [10] De Marchis S., Fasolo A., Puche A.C. (2004) "Subventricular zone-derived neuronal progenitors migrate into the subcortical forebrain of postnatal mice" *J Comp Neurol* 476:290-300.
- [11] Yamamoto N., Yamada K., Kurotani T., Toyama K. (1992) "Laminar specificity of extrinsic cortical connection studied in coculture preparations" *Neuron* 9:217-228.
- [12] Hatanaka Y., Murakami F. (2002) "In vitro analysis of the origin, migratory behavior, and maturation of cortical pyramidal cells" *J Comp Neurol* 454:1-14.
- [13] Gähwiler B.H., Capogna M., Dehance D., MacKinney R.A., Thompson S.M. (1997) "Organotypic slice cultures: a technique has come of age" *Trends Neuroscience* 20:471-477.
- [14] Lesuisse C., Martín L.J. (2002) "Long-term of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death" *J Neurobiol* 51:9-23.
- [15] Dumitriu D., Cossart R., Huang J., Yuste R. (2007) "Correlation between axonal morphologies and synaptic input kinetics of interneurons from mouse visual cortex" *Cereb Cortex* 17:81-91.
- [16] Ren M., Yoshimura Y., Takada N., Horibe S., Komatsu Y. (2007) "Specialized inhibitory synaptic actions between nearby neocortical pyramidal neurons" *Science* 316:758-61.
- [17] Palacios-Prü E.L., Garber B.B., Larramendi L.M.H. (1974) "Silver-chromate impregnation of chick embryo brain cell aggregates" *Brain Res* 66:173-178.
- [18] Palacios-Prü E.L., Palacios L., Mendoza R.V. (1978) "Cultivos neuronales histotípicos: Significación y perspectivas" *Acta Cient Venezolana* 29:295-308.
- [19] Miranda-Contreras L., Mendoza-Briceño R.V., Zambrano E., Palacios-Prü E.L. (1992) "Release of neurotransmitters and neurosecretory maturation of mouse hypothalamic cultures" *Developmental Neurosci* 14:377-385.
- [20] Humphreys P., Jones S., Hendelman W. (1996) "Three-dimensional cultures of fetal mouse cerebral cortex in a collagen matrix" *J Neurosci Methods* 66:23-33.
- [21] Benítez-Díaz P., Miranda-Contreras L., Mendoza-Briceño R.V., Peña-Contreras Z., Palacios-Prü E. (2003) "Prenatal and postnatal contents of amino acid neurotransmitters in mouse parietal cortex" *Developmental Neurosci* 25:366-374.
- [22] Golgi C. (1903) *Opera Omnia*. Ulrico Hoepli (Ed.) Milano 1:99-111.
- [23] Ramón y Cajal S. (1911) *Histologie du Systeme Nerveux de l'homme et des vertebres*, Paris, Maloine.
- [24] Palacios-Prü E.L. (1970) "Two useful variations of the Golgi silver-chromate method" *Acta Cient Venezolana* 21:105-106.
- [25] Gibb R., Kolb B. (1998) "A method for vibratome sectioning of Golgi-Cox stained whole rat brain" *J Neurosci Methods* 79:1-4
- [26] Zhang H., Weng S.J., Hutsler J.J. (2003) "Does microwaring enhance the Golgi methods? A quantitative analysis of disparate staining patterns in the cerebral cortex" *J Neurosci Methods* 124:145-153.
- [27] Valverde F., Santacana M., Heredia M. (1992) "Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization" *Neuroscience* 49:255-275.

- [28] Marin-Padilla M. (1999) "The development of the human cerebral cortex. A cytoarchitectonic theory" *Rev Neurol* 29:208-216.
- [29] Tsiola A., Hamzei-Sichani F., Peterlin Z., Yuste R. (2003) "Quantitative morphology classification of layer 5 neurons from mouse primary visual cortex" *J Comp Neurol* 461:415-428.
- [30] Moscona A.A. (1961) "Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cell. A quantifiable approach to cell interactions in vitro" *Exp Cell Res* 22:455-475.
- [31] Garber B.B., Moscona A.A. (1972) "Reconstruction of brain tissue from cell suspensions. I. Aggregation patterns of cells dissociated from different regions of the developing brain" *Develop Biol* 27:217-234.
- [32] Palacios-Prü E.L., Palacios L., Mendoza R.V. (1976) "In vitro vs in situ development of Purkinje cells" *J Neurosci Res* 2:357-362.
- [33] Palacios-Prü E.L., Palacios L., Mendoza R.V. (1981) "Synaptogenetic mechanisms during chick cerebellar cortex development" *J Submicroscopic Cytology* 13:145-167.
- [34] Palacios-Prü E.L., Palacios L., Mendoza R.V. (1979) "In vitro formation of neuroglial synapses" *J Neurosci Res* 4:115-122.
- [35] Palacios-Prü E.L., Miranda-Contreras L., Mendoza-Briceño R.V., Zambrano E. (1991) "In vitro hypothalamic neurogenesis: morphological maturation of mouse hypothalamic cultures and in vitro versus in situ biochemical analysis" *Developmental Neurosci* 13:110-120.
- [36] Molnár E., Pickard L., Duckworth J.K. (2002) "Developmental change in ionotropic glutamate receptors: lessons from hippocampal synapses" *Neuroscientist* 8:143-153.
- [37] Miranda-Contreras L., Benítez-Díaz P.R., Mendoza-Briceño R.V., Delgado-Saez M.C., Palacios-Prü E.L. (1999) "Levels of amino acid neurotransmitters during mouse cerebellar neurogenesis and in histotypic cerebellar cultures" *Developmental Neurosci* 21:147-158.
- [38] Miranda-Contreras L., Ramírez-Martens L.M., Benítez-Díaz P.R., Peña-Contreras Z., Mendoza-Briceño R.V., Palacios-Prü E.L. (2000) "Levels of amino acid neurotransmitters during mouse olfactory bulb neurogenesis and in histotypic olfactory bulb cultures" *International J Developmental Neurosci* 18:83-91