

Proyecto de Investigación

“Estandarización de técnicas de impregnación argéntica para el análisis morfológico de células neurales de ratón”

Datos de los autores:

Francisca Ignacia Díaz Díaz

20.956.824-1

+56 9 90400820

francisca.diazd@alumnos.uv.cl

Cristóbal Ignacio Gómez Mansilla

20.318.040-3

+56 9 57725038

cristobal.gomez@alumnos.uv.cl

Carla Noemí González Aracena

21.310.384-9

+56 9 64520288

carla.gonzaleza@alumnos.uv.cl

Monserrat Valentina González Arismendi

20.999.301-5

+56 9 77247626

monserrat.gonzaleza@alumnos.uv.cl

Datos Profesora guía:

Daniela López Espíndola

Doctora en Biociencias Moleculares

Académica, Escuela de Tecnología Médica

15.852.110-5

+56 32 2603932

daniela.lopez@uv.cl

Datos Profesores Coguí:

Juan Francisco Varas Muñoz

Tecnólogo Médico, Magíster en Educación

Coordinador de Laboratorio, Escuela de Medicina

16.183.024-0

+56 32 2603929

juan.varas@uv.cl

Elizabeth Leiva Pastén

Tecnóloga Médica

Coordinadora de Laboratorio, Escuela de Tecnología Médica

20.359.473-9

+56 32 2603932

elizabeth.leivapa@uv.cl

Índice

1. Duración del proyecto	3
2. Lista de acrónimos	3
3. Resumen y palabras clave	3
5. Presentación del problema de investigación	6
5.1. Planteamiento del problema	6
5.2. Pregunta de investigación	7
5.3. Relevancia	7
6. Objetivos	7
6.1. General	7
6.2. Específicos	7
7. Metodología:	8
7.1. Tipo de estudio	8
7.2. Población	8
7.3. Muestra	8
7.3.1. Definición	8
7.3.2. Tipo de muestreo	8
7.3.3. Tamaño muestral	8
7.3.4. Criterios de elegibilidad	9
7.4. Variables de investigación	9
7.5. Fuentes y métodos de recolección de datos	12
7.6. Plan de análisis estadístico	15
7.7. Consideraciones éticas	15
8. Resultados	16
8.1. Estandarización de las técnicas argénticas	16
8.1.1. Técnica de Bielschowsky	16
8.1.2. Técnica de Golgi Clásico	17
8.1.3. Técnica de Río Hortega	18
8.2. Comparación técnica de la marcación de las técnicas argénticas	20
9. Plan de trabajo	23
10. Bibliografía	23
11. Anexos	26

1. Duración del proyecto

Este trabajo de investigación tiene una duración de tres semestres. Durante el primer semestre se diseñará el proyecto de investigación, durante el segundo semestre se ejecutarán los experimentos planificados y durante el tercer semestre se escribirá en un formato de publicación científica.

2. Lista de acrónimos

- WT: Wild Type.
- TA: Temperatura Ambiente.

3. Resumen y palabras clave

Las técnicas argénticas son el gold standard para el estudio histológico del sistema nervioso, caracterizándose por su complejidad y larga duración cuando se desarrollan en forma manual, por lo que se suelen utilizar en kits comerciales que poseen un alto costo, lo que limita su uso. Por esta razón, con el propósito de implementar las técnicas de impregnación argéntica Golgi Clásico, Bielschowsky y del Río Hortega con protocolos realizados en forma manual, se estandarizaron siguiendo y modificando protocolos de la literatura, las que posteriormente se compararon técnicamente en cuanto a su marcaje en neuronas y glía en la corteza cerebral de ratones silvestres y establecer cuál de ellas es la más apropiada para la identificación de cada estructura y tipo celular.

En este estudio se llegó a la conclusión de que la mejor técnica de impregnación argéntica es Bielschowsky, debido a que entregó una mejor morfología de los cuerpos neuronales, presentando mayor nitidez de los

contornos celulares, permitiendo así la distinción de cada elemento tisular, además gracias a la ausencia de precipitados se pudo obtener una mejor visualización, también debe considerarse que su aplicación implica un menor tiempo en comparación a las demás técnicas, realizándose en aproximadamente 2 horas, pudiendo estandarizarse de manera más rápida.

Palabras clave: Técnicas argentícas, estandarización.

4. Introducción y estado del arte

Se denomina impregnación a toda coloración especial en la que se utilizan sales metálicas para generar precipitados en ciertas estructuras tisulares (1), de esta manera toman una coloración marrón que les permite resaltar del fondo. La base de estas técnicas es la fijación con sales dicrómicas y exposición a sales metálicas que van a formar este precipitado en las neuronas y glía (2).

Las técnicas de impregnación con plata, llamadas impregnaciones argentícas, son muy importantes para el estudio del sistema nervioso, pero al igual que ocurre con otras tinciones histológicas, estas se consideran empíricas (3) por su antigüedad. Estas técnicas son altamente sensibles y específicas para el estudio de la morfología de las células neurales (4, 5, 6), sin embargo, en el siglo XX disminuyeron su uso debido a la aparición de nuevas tecnologías más específicas, tales como la Inmunohistoquímica (7).

De relevancia para este estudio son la técnica de impregnación argentíca de Golgi, la técnica de Río Hortega, la técnica de Bielschowsky.

La técnica de Golgi Clásico fue desarrollada por el premio Nobel de Medicina y pionero en el estudio del sistema nervioso, Camilo Golgi. Esta técnica

permite observar tanto el cuerpo celular como sus prolongaciones axónicas y dendríticas, además del neuropilo que lo rodea. Este método se fundamenta en la formación de depósitos opacos intracelulares de cromato argéntico, producto de la reacción entre el dicromato de potasio y el nitrato de plata (9).

La técnica de Río Hortega, desarrollada por el autor del mismo nombre, en 1918 al descubrir un nuevo método de impregnación argéntica basado en el uso del carbonato de plata amoniacal para observar la microglia, el tercer elemento del sistema nervioso, nombrado por Ramón y Cajal (10), que eventualmente le permitiría descubrir el enigmático origen y función de estas células. Río Hortega intentó mediante diversas modificaciones lograr este método, cuyo fundamento químico se trata de una reacción de doble descomposición. Este método además cuenta con la ventaja de permitir la repetición de las impregnaciones con el fin de reforzar la tinción (10).

La técnica de Bielschowsky es un método ampliamente utilizado para demostrar diversos procesos neuronales incluyendo dendritas, axones y neurofibrillas (11). Se utiliza en secciones incluidas en parafina para identificar anomalías en procesos neuríticos en una variedad de procesos neurodegenerativos (12).

La importancia de las técnicas de impregnación argéntica radica en que proporcionan información histopatológica de enfermedades neurodegenerativas, lo que permite indagar en los mecanismos involucrados en el desarrollo de estas patologías. Las versiones modernas de las técnicas contribuyen sustancialmente a la obtención de datos provenientes del análisis morfológico detallado del material de autopsia, tales como alteraciones dendríticas, degeneración neurofibrilar, placas neuríticas, proliferación de células microgliales y alteraciones de los capilares cerebrales (13), en diversas regiones cerebrales, especialmente la corteza cerebral. Por esta razón, el uso

de estas técnicas para el estudio y diagnóstico histopatológico post mortem de pacientes es considerado el gold estándar (14).

Las impregnaciones argénticas se han ido modificando y mejorando progresivamente en las últimas décadas. Estas técnicas entregan excelentes resultados morfológicos, sin embargo, no hay procedimientos simples para implementarlas en la rutina, pues la mayoría de ellas requieren de numerosos y complejos pasos para su ejecución, razón por la cuál se ha reducido su uso.

5. Presentación del problema de investigación

5.1. Planteamiento del problema

Las técnicas argénticas son el gold standard para el estudio y diagnóstico final de pacientes que cursan con enfermedades con afectación de la histoarquitectura cerebral, siendo la principal la técnica de Golgi, un método complejo y de larga duración, que requiere de reactivos difíciles de adquirir y personal experto para su realización. Por esta razón, casi no se realiza manualmente, pues la mayoría de los laboratorios utilizan kits comerciales, que lamentablemente son de alto valor, por lo que acceder a ellos limita el uso de este tipo de métodos.

Por lo anterior, surge la necesidad de estandarizar manualmente la técnica de Golgi, así como las técnicas de Bielschowsky y de Río Hortega, para disponer de protocolos confiables y reproducibles que permitan profundizar en el estudio morfológico de la neuronas y glías de corteza cerebral, el hipocampo y el cerebelo en condiciones normales y patológicas, especialmente neurodegenerativas, sin depender de un kit comercial. Este estudio nos permitirá determinar cuál de éstas técnicas es la más apropiada para el estudio específico de cada estructura y tipo celular, y de esta manera implementarlas

en el Laboratorio de Neuroendocrinología de la Escuela de Tecnología Médica de la Universidad de Valparaíso, con dicho fin.

5.2. Pregunta de investigación

¿Cuál/cuáles son las técnicas de impregnación argéntica más apropiadas para la caracterización morfológica de las neuronas y glía de la corteza cerebral de ratones silvestres?

5.3. Relevancia

Las enfermedades neurodegenerativas afectan a millones de personas en todo el mundo, y se estima que su prevalencia siga en aumento en las próximas décadas (15). En la actualidad, la mayoría de estas enfermedades no poseen tratamientos efectivos, pues sólo se cuenta con medicamentos para aliviar el dolor, mejorar los síntomas y aumentar la movilidad. Por esta razón, la estandarización en forma manual de las técnicas argénticas que permiten el estudio morfológico de estas patologías, es fundamental para contribuir al campo de la neurología y acercarnos a la comprensión de sus mecanismos, así como al diagnóstico final de pacientes fallecidos.

6. Objetivos

6.1. General

Determinar la(s) técnica(s) argéntica(s) más apropiada(s) para el estudio morfológico de neuronas y glías de la corteza cerebral de ratones silvestres.

6.2. Específicos

1. Implementar las técnicas argénticas de Golgi Clásico, Río Hortega y Bielschowsky.
2. Comparar técnicamente la marcación de las técnicas argénticas de Golgi Clásico, Río Hortega y Bielschowsky, en neuronas y glías en corteza cerebral de ratones silvestres.

7. Metodología:

7.1. Tipo de estudio

Estudio analítico experimental, que busca responder por qué sucede cierto fenómeno mediante operaciones del investigador para descubrir, demostrar y comprobar estas observaciones.

7.2. Población

Ratones silvestres cepa C57BL/6 del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

7.3. Muestra

7.3.1. Definición

Se utilizó una muestra de 5 ratones silvestres cepa C57BL/6 del Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

7.3.2. Tipo de muestreo

Se realizó muestreo no probabilístico por conveniencia, en donde se quiere estudiar corteza de animales WT.

7.3.3. Tamaño muestral

El tamaño muestral se definió en función de los análisis que se realizarán y considerando los criterios de las normas ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments), del Centro Nacional para el Reemplazo, Refinamiento y Reducción de Animales en Experimentación (16).

Para este estudio, se utilizó la calculadora WebPower para calcular el tamaño de la muestra. Se consideró un análisis de varianza con medidas repetidas y el número de neuronas, dado que no hay información de los otros parámetros a nivel del cerebelo en la literatura. Se calculó un tamaño del efecto (f) de 1, y 3 mediciones por individuo, con un alfa de 0.05 y potencia de 0.8, dando un resultado de 6 ratones WT, machos y hembras.

7.3.4. Criterios de elegibilidad

Criterios de inclusión

- Ratones silvestres cepa C57BL/6 de 3 meses de edad, machos y hembras
- Animales con un peso aproximado de 40 gr
- Animales de apariencia y comportamiento normal

Criterios de exclusión

- Animales con aspecto poco saludable, ya sea física o conductualmente

7.4. Variables de investigación

- Localización de la tinción: variable cualitativa nominal. Corresponde al compartimiento tisular o celular en donde se observa la tinción, que puede corresponder a extracelular o intracelular. Dentro de esta última, se puede encontrar además las subclasificaciones: de membrana, citoplasmático, perinuclear, nuclear y nucleolar.
- Distribución de la tinción: Variable cualitativa ordinal. Corresponde a la disposición de la coloración dentro del compartimiento celular o tisular, pudiendo ser homogéneo, medianamente homogéneo o heterogéneo.
- Intensidad de la tinción: Variable cuantitativa continua. Corresponde a la intensidad de la tinción en el tejido y/o células.
- Nitidez de los contornos celulares: Variable cualitativa ordinal. Corresponde al nivel de definición con que se observan los contornos celulares, pudiendo corresponder a difuso, medianamente difuso y nítido. Definiéndose difusos cuando los contornos celulares se observan difuminados o borrosos y no es posible identificarlos con precisión; medianamente difusos es cuando los contornos celulares se observan con claridad, sin embargo, no son netos; y nítido cuando los contornos celulares se observan bien definidos y bordes netos, permitiendo fácilmente su identificación.
- Presencia de precipitados: Variable cualitativa dicotómica. Corresponde a la presencia o ausencia de depósitos indeseados en el tejido, producto de la reacción histoquímica de la tinción.

- Tiempo de la técnica: Variable cualitativa ordinal. Corresponde al tiempo que requiere la técnica para su estandarización. Se define tiempo corto cuando la técnica puede ser realizada en menos de 24 horas, por tiempo medio se refiere a una técnica que puede ser realizada en un intervalo de 24 a 48 horas, y tiempo largo se define como una técnica que requiere de un tiempo mayor a 48 horas para su realización.
- Número de pasos: Variable cualitativa ordinal. Corresponde a la cantidad de pasos para estandarizar las técnicas. Consideraremos como bajo a un número de pasos entre 1 y 5, medio para un intervalo de pasos entre 5 y 10, y alto para técnicas con un número de pasos mayor a 10.

A continuación se presenta la tabla que se utilizó para analizar técnicamente las impregnaciones argénticas. Se compararon las variables cualitativas, siendo la de mayor puntaje considerada ideal.

Por otro lado, la variable “localización de la tinción”, se describió en el texto y fue analizada, tomando en consideración si su patrón de marcaje corresponde o no al esperado y reportado en la literatura.

Variable/Puntuación	1	2	3	Total
1. Distribución de la tinción	Heterogéneo	Medianamente homogéneo	Homogéneo	
2. Intensidad de la tinción	Baja	Media	Alta	
3. Nitidez de los contornos celulares	Difuso	Medianamente difuso	Nítido	
4. Precipitados	Presencia	-	Ausencia	

5. Tiempo de la técnica	Largo	Medio	Corto	
6. Número de pasos	Alto	Medio	Bajo	

Tabla 1. Criterios a utilizar para otorgar una puntuación a cada técnica en relación a cada uno de los parámetros estudiados.

7.5. Fuentes y métodos de recolección de datos

Obtención de las muestras

Los ratones se obtuvieron del Bioterio Institucional de la Facultad de Medicina, en donde el personal se encargó de su cuidado, siguiendo las pautas de supervisión, aprobadas por el CICUAL-UV.

Eutanasia

En una primera etapa y previo a los experimentos, los animales seleccionados fueron trasladados desde el Bioterio Institucional de la Facultad de Medicina hacia el Laboratorio de Neuroendocrinología, aclimatados en oscuridad durante una hora.

Luego, cada animal fue posicionado en la cámara de anestesia, con un flujo de 0.3-0.5 L/min de isoflurano al 2.5% en oxígeno durante 3-5 minutos. Tras confirmar que el animal respira con normalidad y está completamente anestesiado (corroborando mediante la pérdida del *toe-pinch reflex*) se prosigue.

En caso de que el animal no se fijó por perfusión, se procedió directamente a su eutanasia mediante decapitación utilizando una tijera.

Se obtuvieron muestras de diferentes órganos para estudios futuros. Los restos de tejidos animales no utilizados son mantenidos en refrigeración (-20° C) hasta su posterior retiro por una empresa externa.

Procesamiento de los tejidos

Una vez sacrificado el animal, se extrajo el cerebro para su posterior procesamiento.

El primer paso correspondió a la fijación por inmersión, la cual consiste en sumergir el tejido en una solución fijadora para conservar la estructura y detener los procesos autolíticos. Se utilizaron 5 cerebros para la realización de las tres técnicas, en donde un hemisferio fue utilizado para la técnica de Río Hortega y Bielschowsky, mientras que en el otro hemisferio se realizó la técnica de Golgi Clásico. El tipo de fijación escogido dependió de cada técnica argéntica.

A continuación se detallarán los protocolos, a partir de los cuales se trabajó para lograr su estandarización e implementación en el laboratorio.

Método de Golgi Clásico

Esta técnica se basa en la visualización de somas neuronales y prolongaciones nerviosas. El protocolo consistió en una fijación por inmersión con formalina-dicromato de potasio al 3,5% por 24 horas y un baño en solución de nitrato de plata al 2% de 24 a 36 horas. Después, se congeló el tejido en un medio resinoso, y se cortó a 75 μm en criostato. Finalmente, se deshidrató en alcoholes, se aclaró con xilol y cubrió con un medio de montaje hidrofóbico.

Método de Río Hortega modificado

Esta técnica se basa en el reconocimiento de microglia. Inicialmente se fijaron las piezas frescas en una solución de formol-bromuro de amonio por 1 a 3 días. Posteriormente se incluyó en parafina y se realizaron cortes en micrótopo a 20 μm . Los cortes fueron desparafinados e hidratados en agua destilada. Seguidamente se colocaron los cortes en una solución de ácido clorhídrico al 3% por una hora y media, luego se realizaron dos lavados en

agua destilada y se colocaron los cortes en una solución de carbonato de sodio al 5% por 2 horas a temperatura ambiente (TA). Posteriormente se colocaron en una solución de carbonato de plata por un minuto y seguidamente sin lavar se realizaron dos baños en formalina al 2%, luego se lavó en agua destilada dos veces y se colocó en una solución de cloruro de oro al 0.2% por un minuto, seguidamente se lavó en agua destilada y se realizó un baño en la solución de tiosulfato de sodio al 5% por 1 minuto. Finalmente se deshidrató en alcoholes, se aclaró en xiloles y se montó en un medio de montaje hidrofóbico.

Método de Bielschowsky

Esta técnica se basa en el reconocimiento de neurofibrillas, dendritas y prolongaciones nerviosas. Se inició con una fijación por inmersión en formalina al 10%, luego las placas se llevaron a desparafinar e hidratar, y se sometieron a un baño de nitrato de plata al 20% durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se lavaron en agua destilada y se realizaron dos reducciones en formalina al 10% por 10 segundos cada una, después se sometieron a una solución de plata amoniacal que posee alcohol anhidro, por 30 segundos, se realizó un lavado en agua destilada, se aplicó un baño de cloruro de oro al 0,2% por 5 minutos, se lavó en agua destilada y posteriormente se expuso 5 minutos en tiosulfato de sodio al 5%. Finalmente, se lavaron en agua corriente y contrastaron con tinción nuclear a elección, por último se deshidrataron en alcoholes, se aclararon en xilol y se cubrieron en un medio de montaje hidrofóbico.

Obtención de microfotografías

Se obtuvieron microfotografías representativas con el microscopio Olympus CX43 y cámara Moticam 4000. Las regiones cerebrales fotografiadas corresponden a corteza, a aumentos de 10x, 20x y 40x, dependiendo de la

estructura que se quiera analizar. El número de fotografías dependerá de la zona analizada.

7.6. Plan de análisis estadístico

Para el análisis de las microfotografías, se utilizará el software ImageJ. Para el análisis de datos, las variables cuantitativas se expresarán mediante su promedio y desviación estándar, utilizando un gráfico de barras de error para una mejor visualización. La comparación entre las cepas de ratones, se realizará a través de la prueba de T-student para grupos independientes, mientras que la comparación de las regiones cerebrales se realizará mediante un análisis de varianza con medidas repetidas y la prueba de Holm, utilizando un nivel de confianza del 95%.

7.7. Consideraciones éticas

Este proyecto de investigación y todas las actividades llevadas a cabo en su ejecución estarán de acuerdo a los Principios básicos de la Bioética, especialmente las 3R. La aplicación de las 3Rs durante este proyecto, se basará en 1) Reemplazo: En este estudio no es posible utilizar modelos computacionales, cultivos celulares, plantas o animales menos sintientes, siendo necesario utilizar ratones silvestres. 2) Reducción: En este estudio se utilizará la menor cantidad de animales necesaria para obtener un tamaño muestral estadísticamente significativo, utilizando el mismo animal para la realización de diversos ensayos; y 3) Refinamiento: Se procurará mantener a los animales en las mejores condiciones posibles, velando por su bienestar en todo momento.

Durante todo el proyecto el equipo de trabajo mantuvo una conducta ética y de integridad científica, procurando ejercer las buenas prácticas a lo largo de la investigación, tal como lo plantea el Código Europeo de Conducta para la Integridad en la Investigación de All European Academies (17).

Además se encuentra aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Valparaíso (CICUAL UV), acta de aprobación BEA193-23. Este requisito surge de la naturaleza del estudio experimental. Además, se certifica la aplicación de las medidas de bioseguridad correspondientes (acta de aprobación BS05-23) y manejos esperados para una investigación de este ámbito (anexo 4 y 5).

8. Resultados

8.1. Estandarización de las técnicas argénticas

8.1.1. Técnica de Bielschowsky

Se realizó la estandarización de la técnica de Bielschowsky, para el reconocimiento de somas neuronales, dendritas y prolongaciones nerviosas. Se realizaron 5 ensayos distintos, para probar variaciones en temperatura, tiempo de incubación y mecanismos de oxidación. En base a estos experimentos, se logró establecer el siguiente protocolo: los cortes fueron desparafinados e hidratados hasta el agua destilada. Luego, se realizó una incubación en una solución de nitrato de plata al 20% por 30 minutos a 37°C. Posteriormente se realizaron 2 baños en formaldehído al 10% por 10 segundos cada uno. Después, se llevó a cabo un baño en solución de plata por 30 segundos, para luego realizar 2 baños en formaldehído al 10% por 1 minuto cada uno. A continuación se hizo un baño en cloruro de oro al 0.2% por 5 minutos y un lavado en tiosulfato de sodio al 5% por 5 minutos. Por último, se lavó en agua corriente, se realizó un contraste nuclear, se deshidrató en alcoholes, se aclaró en xilol y se cubrió con un medio de montaje hidrofóbico.

Con este protocolo se lograron observar buenos resultados, ya que, entrega una buena visualización morfológica de las prolongaciones nerviosas (Figura 1), no genera un deterioro en el tejido, y gracias al uso de calor se pudo acortar los tiempos de incubación.

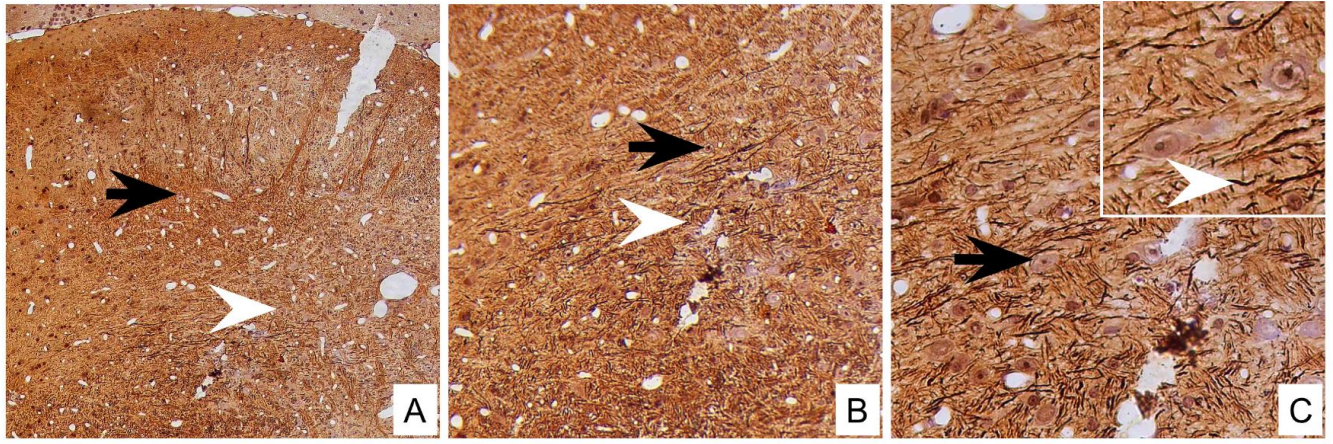


Figura 1. Prolongaciones nerviosas de la corteza cerebral, con la técnica de Bielschowsky. Se observan cortes de corteza cerebral a 10 μm en un aumento de 10x, 20x y 40x, donde se aprecian somas neuronales (flecha negra) y prolongaciones nerviosas (punta de flecha blanca) en un fondo amarillo. Note en C la presencia de somas neuronales y prolongaciones nerviosas (inset). La barra representa 100 μm .

8.1.2. Técnica de Golgi Clásico

Se realizó una estandarización de la técnica de Golgi Clásico, para el reconocimiento de somas neuronales y prolongaciones nerviosas. Se realizaron dos ensayos, en donde se utilizó dos tipos de fijación: En el primer ensayo se realizó una perfusión de un ratón WT con una mezcla de fijador de formalina al 10% y dicromato de potasio 3.5%, y posteriormente se dejó fijando por inmersión por 24 horas en esta misma solución fijadora. En el segundo ensayo se realizó una fijación por inmersión en la solución de formalina al 10% y dicromato de potasio por 24 horas.

En base a estos ensayos, se logró establecer el siguiente protocolo: Se inició con una post-fijación en un baño en solución de nitrato de plata al 2% por 24 horas, luego se congeló el tejido en un medio resinoso y se cortó a 70 y 80 μm en criostato.

Finalmente se deshidrató en alcoholes, se aclaró en xiloles y se cubrió con un medio de montaje hidrofóbico.

A pesar de que ambos ensayos otorgaron buenos resultados en cuanto a la visualización de prolongaciones nerviosas y de somas neuronales, el último es el elegido, ya que mejoró la calidad de los cortes.

Con esta técnica se identifican los somas neuronales, sus prolongaciones nerviosas y las espinas dendríticas, además de múltiples vasos sanguíneos en el tejido (Figura 2). Todos estos elementos morfológicos se encuentran en una tonalidad marrón oscuro a negro, sobre un fondo dorado pálido.

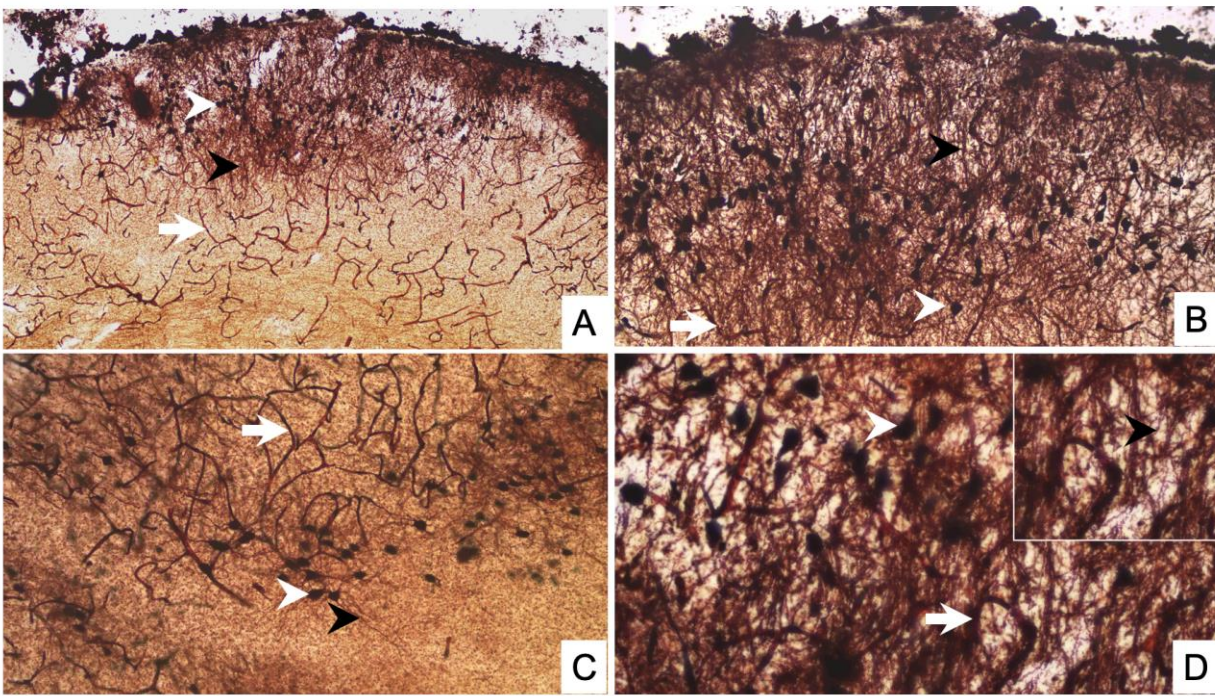


Figura 2. Corteza cerebral con la técnica de Golgi Clásico. Se observan cortes de corteza cerebral de 80 μm con μm aumento de 10x (A) y de 20x (B) y de 70 μm aumento de 20x (C) y de 40x (D), donde se aprecian somas neuronales (punta de flecha blanca), prolongaciones nerviosas (punta de flecha negra), y vasos sanguíneos (flecha blanca) en un fondo gris/amarillo. Note en D la presencia de múltiples somas neuronales y un entramado de prolongaciones dendríticas (inset). La barra corresponde a 100 μm .

8.1.3. Técnica de Río Hortega

Se realizó una estandarización de la técnica de Río Hortega, para el reconocimiento de microglia. Se realizaron seis ensayos, en donde se realizó un paso anterior a la tinción con ácido clorhídrico al 3% y un paso posterior con tiosulfato de sodio al 5%, también se estandarizaron distintas concentraciones de formalina que iban desde el 0.2% al 10%, siendo más efectiva la formalina al 2% y 5%, ya que permitió una mejor reducción de la plata en el tejido.

En base a estos ensayos, se logró estandarizar el siguiente protocolo: Se inició con una desparafinación de los cortes hasta el paso de la hidratación, luego se dejaron en una solución de ácido clorhídrico al 3% por una hora y media, luego se realizaron 2 lavados en agua destilada y se dejó en una solución de carbonato de sodio al 5% por 2 horas a TA, luego se realizó un baño de carbonato de plata por 2 minutos y seguidamente sin lavar se realizaron 2 baños de formalina al 2%, luego se llevaron a cabo 2 lavados en agua destilada, posteriormente se dejó en la solución de cloruro de oro 0,2% durante 1 minuto y luego se lavó en agua destilada, para reducir el precipitado se realizó un baño en solución de tiosulfato de sodio al 5% y un posterior lavado en agua destilada. Finalmente se deshidrató en alcoholes, se aclaró en xiloles y se cubrió con un medio de montaje hidrofóbico.

Con esta técnica se puede identificar microglia y somas neuronales. Todos estos elementos morfológicos se encuentran en una tonalidad negra sobre un fondo grisáceo (Figura 3).

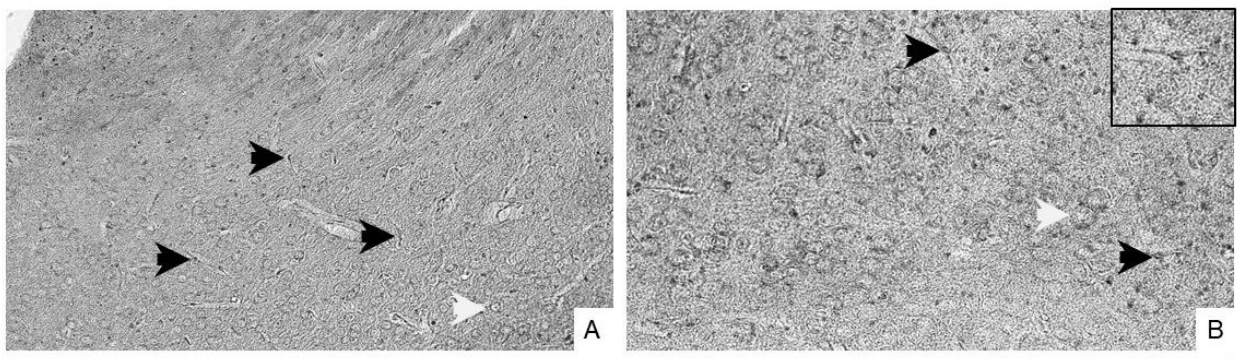


Figura 3. Corteza cerebral con la técnica de Río Hortega. Se observan cortes de 20 μm de corteza cerebral a 20x (A) y 40x (B). Note en un tono grisáceo somas neuronales (flecha blanca) y células gliales (flecha negra), sobre un fondo gris. Note en B la presencia de somas neuronales y células gliales (inset). La barra representa 100 μm .

8.2. Comparación técnica de la marcación de las técnicas argentícas

Se comparó la marcación de cada una de las técnicas en la corteza cerebral de ratones WT, para determinar cuál de ellas entrega mejores resultados y es más factible de implementar, los que se resumen en la Tabla 2.

Variable/Puntuación	Técnica de Golgi Clásico	Técnica de Río Hortega	Técnica de Bielschowsky
Distribución de la tinción	1	3	3
Intensidad de la tinción	3	1	2
Nitidez de los contornos celulares	2	1	3
Precipitados	1	1	3
Tiempo de la técnica	1	2	3
Número de pasos	3	1	1
TOTAL	11	9	15

Tabla 2. Comparación entre técnicas argentícas para identificación de neuronas y glía en corteza cerebral de ratones silvestres.

En relación a la distribución de la marcación, la técnica de Golgi Clásico mostró una distribución heterogénea en la corteza cerebral, ya que no tiñó completamente todos los cuerpos neuronales y la impregnación no abarcó toda la extensión del tejido,

mientras que las técnicas de Río Hortega y de Bielschowsky presentaron una distribución homogénea en todas las muestras analizadas.

En cuanto a la intensidad de la tinción, la técnica de Golgi Clásico mostró una intensidad alta, el gran contraste entre las neuronas y el neuropilo permite distinguirlas claramente, mientras que la técnica de Río Hortega presentó una intensidad baja, debido a que la coloración de la tinción era bastante tenue y se asimila a la tinción de fondo. Por último, la técnica de Bielschowsky se visualizó una intensidad media, ya que si bien, se podían distinguir las prolongaciones nerviosas, estas no tenían un gran contraste con el fondo.

Con respecto a la nitidez de los contornos celulares, tanto la técnica de Golgi Clásico como la de Río Hortega exhibieron contornos difusos, no permitiendo delimitar cada elemento celular con claridad, mientras que la técnica de Bielschowsky presentó contornos celulares nítidos, ya que las prolongaciones axónicas se caracterizaron por un borde neto, que las distinguía tanto de otros elementos celulares como entre ellas mismas.

Acerca de la presencia o ausencia de precipitados en la preparación, la técnica de Golgi Clásico sí presentó precipitados, sobre todo en la periferia del tejido, al igual que la técnica de Río Hortega, que presentó un precipitado de manera uniforme por toda la muestra. Por el contrario, la técnica de Bielschowsky se observó limpia, sin presencia de precipitados.

En lo que concierne al tiempo requerido para la realización de la técnica, luego de la fijación de los tejidos, Golgi Clásico requirió tiempos de larga duración, alrededor de 24 horas. Por su parte, la técnica de Río Hortega supuso tiempos de mediana

duración, cercano a las 4 horas, mientras que la técnica de Bielschowsky necesitó tiempos de corta duración, cercano a las 2 horas.

Con referencia al número de pasos requeridos para la realización de la técnica, desde la obtención de los cortes, Golgi Clásico precisó de un bajo número de pasos (5 pasos). Por su parte, la técnica de Río Hortega exigió un alto número de pasos (13 pasos), similar a la técnica de Bielschowsky (12 pasos).

Con respecto a la localización de la tinción, para la técnica de Golgi Clásico se reporta en la literatura una imagen tridimensional de la neurona, en donde se logra observar impregnación en el cuerpo neuronal, dendritas y axones. Sin embargo, con la técnica realizada en este trabajo, no se logró conseguir el aspecto esperado, más bien, se logró impregnación parcial de las estructuras antes mencionadas. Esta impregnación se limitó a los bordes de los tejidos, es decir, no logró penetrar toda la extensión de la muestra.

En cuanto a la técnica de Río Hortega, la literatura describe la impregnación del cuerpo glial y sus prolongaciones, sin embargo la impregnación tanto del cuerpo glial, como de las prolongaciones sólo fue lograda en un número reducido de células, lo cual se puede deber a que se utilizaron animales sin patologías, que no presentan numerosas microglías.

Por último, acerca de la tinción en la técnica de Bielschowsky, la literatura describe impregnación en somas, prolongaciones y estructuras patológicas como placas seniles y ovillos neurofibrilares (en el caso de la enfermedad de Alzheimer). Tras la realización de la técnica se observó impregnación de somas y prolongaciones en casi la totalidad de las muestras, como era de esperarse. No hubo marcación de estructuras patológicas debido a que no fueron utilizados tejidos de animales enfermos.

Tomando en cuenta estos resultados de corteza cerebral, podemos decir que la técnica que entrega mejores resultados, y por tanto es más viable de implementar en el laboratorio es la técnica de Bielschowsky. En primer lugar, la distribución de la tinción se mostró en toda la extensión de las muestras, lo que permite poder evaluar las características morfológicas en cada lugar deseado. La intensidad de la tinción permitió una visualización sin inconvenientes. Por otra parte, la gran nitidez de los contornos celulares y la escasa presencia de precipitados permitió reconocer cada estructura tisular con facilidad. A pesar de requerir muchos pasos para su realización, esta técnica puede ser llevada a cabo en tan solo 2 horas, una característica deseada en laboratorios.

Por último, otra ventaja de gran importancia es la posibilidad de realizar la técnica en tejidos fijados en formaldehído e incluidos en parafina, es decir, sin salirse del procesamiento de tejidos ya estandarizado.

9. Plan de trabajo

Carta Gantt	II Semestre 2023																			
	Agosto				Septiembre				Octubre				Noviembre				Diciembre			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Contacto con profesor guía																				
Entrenamiento de laboratorio																				
Escritura del proyecto																				
Introducción																				
Planteamiento del problema																				
Pregunta de investigación																				
Hipótesis																				
Relevancia																				
Objetivos																				
Variables																				
Metodología																				
Fuentes y recolección de datos																				
Consideraciones éticas																				
Plan de análisis estadístico																				
Entrega de manuscrito																				

Carta Gantt	I Semestre 2024																	
	Abril				Mayo				Junio				Julio				Agosto	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
Sacrificio de animales																		
Procesamiento de tejidos																		
a) Fijación por inmersión																		
c) Inclusión y corte																		
Estandarización de técnicas																		
Experimentos																		
1. Golgi clásico																		
2. Bielschowsky																		
4. Río-Hortega																		
Análisis de resultados																		
Obtención de microfotografías																		
Análisis de microfotografías																		

Carta Gantt	II Semestre 2024					
	Mes	1	2	3	4	5
Escritura del manuscrito						

10. Bibliografía

1. Burck H-C. Técnica Histológica. Manual para realizar preparaciones histológicas en el laboratorio. Madrid: Editorial Paz Montalvo; 1969.
2. José Ramón Alonso. LOS MÉTODOS DE GOLGI. 1º edición. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca; 1994.
3. Samuel, E. P. (1953). The mechanism of silver staining. Journal of Anatomy, 87(Pt 3), 278–287.

4. Campbell, S.K., R.C. Switzer and T.U Martin. Alzheimer's plaques and tangles: A controlled and enhanced silver staining method. Univ. of TN, Dept. Pathology & Medical Biology, Knoxville, TN 37920. Society for Neuroscience Abstracts 13:189.9, 1987.
5. Gallyas F, Wolff JR. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry Metal-Catalyzed Oxidation Renders Silver Intensification Selective. Applications for the Histochemistry of Diaminobenzidine and Neurofibrillary Changes'. Vol. 34. 1986.
6. Gallyas F. Silver staining of Alzheimer's neurofibrillary changes by means of physical development. Acta Morphol Acad Sci Hung. 1971;19(1):1-8. PMID: 4107507.
7. Rivas Manzano, P., Tonatiuh Chavira Ramírez, C., & Ortiz Hernández, R. (2014). Adaptation of Lombart's Silver Impregnation Technique for Demonstration of Nerve Fibers in Any Tissue in Paraffin Sections. Int. J. Morphol, 32(3), 973–980.
8. José Ramón Alonso. LOS MÉTODOS DE GOLGI. 1º edición. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca; 1994.
9. Davenport, H. (1930) Staining nerve fibers in mounted sections with alcoholic silver nitrate solution, Arch. Neurol. Psychiatry, 24: 690-695.
10. Sánchez González, M. R. (2017). Estudio de las técnicas de impregnación argéntica de Pío del Río Hortega: actualidad y vigencia de las mismas [Universidad de Salamanca]. <https://doi.org/10.14201/gredos.137149>.
11. Tolivia, D., & Tolivia, J. (1991). A new rapid silver impregnation for neuronal bodies on methacrylate sections. Journal of Neuroscience Methods, 36(2–3), 139–143. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(91\)90039-3](https://doi.org/10.1016/0165-0270(91)90039-3).

12. Ketring JL, Davis JJ, Feedback DL, Leech RW, Brumback RA. Modification of the silver impregnation technique of Bielschowsky for use in glycol methacrylate-embedded brain tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 1989 Feb;113(2):196-8. PMID: 2464979.
13. Sánchez González, M. R. (2017). Estudio de las técnicas de impregnación argéntica de Pío del Río Hortega: actualidad y vigencia de las mismas [Universidad de Salamanca]. <https://doi.org/10.14201/gredos.137149>.
14. Gallyas G, Hsu M, Buzsaki G. Four modified silver methods for thick sections of formaldehyde-fixed mammalian central nervous tissue: 'Dark' neurons, perikarya of all neurons, microglial cells and capillaries. *J Neurosci Methods.* 1993;50:159–164.
15. MedlinePlus en español [Internet]. Bethesda (MD): Biblioteca Nacional de Medicina (EE.UU.) [actualizado 8 feb. 2022]. Enfermedades Neurodegenerativas; [consulta 27 jun. 2024]; [aprox. 4 p.]. Disponible en <https://medlineplus.gov/spanish/degenerativenervediseases.html>
16. Drummond GB, Paterson DJ, McGrath JC. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. Vol. 95, *Experimental Physiology*. Blackwell Publishing Ltd; 2010. p. 842–4.
17. Susana Irlles. Código Europeo de Conducta para la Integridad en la Investigación [Internet]. Berlín: ALLEA- All European Academies; 2018. Available from: www.allea.org

11. Anexos

Anexo 1: Protocolos de desparafinación e deshidratación.

Abreviaciones

- H2Oc: Agua corriente
- H2Od: Agua destilada
- ' : minuto
- " : segundo

1.- Desparafinación e hidratación

Reactivo	Tiempo
Xilol I	5'
Xilol II	5'
Xilol III	10'
Alcohol 100° I	1'
Alcohol 100° II	1'
Alcohol 95° I	1'
Alcohol 95° II	1'
Alcohol 70°	1'
Agua destilada	1'

2.- Deshidratación y montaje

Reactivo	Tiempo
Alcohol 70°	1'
Alcohol 95° I	1'
Alcohol 95° II	1'
Alcohol 100° I	1'
Alcohol 100° II	1'
Alcohol 100° III	1'
Xilol I	2'
Xilol II	2'
Xilol III	3'
Montar	

Anexo 2: Protocolo de la técnica de Bielschowsky

1. Desparafinar e hidratar hasta el agua destilada
2. Incubar en solución de nitrato de plata al 20% por 30' a 37°C
3. Lavar en agua destilada

4. Realizar dos baños de formol al 10% por 10''
5. Realizar un baño en solución de plata por 30'' (preparación con alcohol 100).
6. Realizar dos baños de formol al 10% por 1' cada uno (controlar al microscopio).
7. Lavar en agua destilada.
8. Realizar un baño de cloruro de oro al 0.2% por 5'
9. Lavar en agua destilada.
10. Exponer en tiosulfato de sodio al 5% por 5'
11. Lavar en agua corriente
12. Realizar un contraste con tinción nuclear
13. Deshidratar, aclarar y montar.

Anexo 3: Protocolo de la técnica de Golgi Clásico

1. Fijación de piezas frescas por inmersión en solución formol-bicromato de potasio al 3.5% durante 24-36 hrs.
2. Baño en solución de nitrato de plata al 2% por 24 hrs en oscuridad.
3. Congelación del tejido en un medio resinoso y cortes de 75 μ m en criostato.
4. Deshidratación en alcoholes de 96% y 100%, aclarar en xiloles y montar en un medio hidrofóbico.

Anexo 4: Protocolo de la técnica de Río Hortega

1. Desparafinar e hidratar en agua destilada.
2. Solución HCl 3% por 1 hora y media.
3. Realizar 2 lavados en agua destilada.
4. Solución carbonato de sodio 5% 2 horas a TA.
5. Solución carbonato de plata por 1 minuto.
6. Sin lavar, hacer 2 baños de formalina 2%.
7. Lavar 2 veces en agua destilada.

8. Solución de cloruro de oro por 1 minuto.
9. Lavar en agua destilada.
10. Solución de tiosulfato de sodio por 1 minuto.
11. Deshidratar, aclarar y montar.

Anexo 4: Acta de aprobación del CICUAL-UV.

ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA CÓDIGO: BEA193-23

El **Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Universidad de Valparaíso (CICUAL-UV)**, con fecha **27 de abril de 2023** declara haber evaluado el siguiente protocolo experimental:

INVESTIGADOR RESPONSABLE	:	Dra. Daniela López Espíndola
TÍTULO DEL PROYECTO	:	Rol de las hormonas tiroideas en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad de Alzheimer y sus potenciales implicancias terapéuticas.
FINANCIAMIENTO	:	FONDECYT DE INICIACIÓN 2023
CÓDIGO DEL PROYECTO	:	N°11230727
PROTOCOLO EXPERIMENTAL	:	BEA193-23

Para su evaluación, el Comité revisó los antecedentes presentados en el formulario **CICUAL-F-01-FORMULARIO DE SOLICITUD DE APROBACIÓN PARA INVESTIGACIÓN EN ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN** y que se señalan en las páginas anexas a esta acta. En la valoración bioética, el Comité consideró procedentes los aspectos indicados en el formulario y estima que no hay objeciones para el uso de animales propuesto en este proyecto. Por lo anterior, **el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio aprueba este protocolo experimental por la duración total del proyecto a contar de la fecha de aprobación.**

El **Investigador Responsable** se debe asegurar que todas las personas involucradas en el protocolo e individualizadas en el formulario de solicitud se hayan capacitado en la realización de los procedimientos indicados en éste. Además, debe considerar lo siguiente:

- Si requiere cambiar cualquier aspecto de este estudio, como objetivos, personal, patrocinadores, procedimientos, entre otros, deberá enviar una **SOLICITUD DE ENMIENDA (CICUAL-F-05-FORMULARIO)** al correo cicual@uv.cl. Los cambios solicitados no se deben iniciar hasta que el CICUAL-UV no haya aprobado la enmienda.
- Al inicio del último año del proyecto, el Investigador Responsable deberá enviar una **SOLICITUD DE SEGUIMIENTO (CICUAL-F-03-FORMULARIO)** al correo cicual@uv.cl. Sin perjuicio de lo anterior, CICUAL-UV podrá solicitar seguimiento a su proyecto en cualquier momento del mismo.
- El último trimestre del proyecto, el Investigador Responsable deberá enviar una **SOLICITUD DE CIERRE (CICUAL-F-11-FORMULARIO)** al correo cicual@uv.cl. Una vez emitida el acta de cierre, el Investigador Responsable no podrá utilizar más animales asociados al proyecto de investigación.
- Es deber del Investigador Responsable, mantener actualizados los registros de procedimientos realizados con animales. Estos serán revisados por el CICUAL-UV en las actividades de seguimiento del protocolo aprobado.
- El no cumplimiento de este protocolo puede significar que el proyecto no obtenga el cierre oficial por parte de CICUAL-UV, imposibilitando al Investigador Responsable a postular y adjudicar otro fondo de financiamiento para investigación.




Dr. Ramón Sotomayor Zárate
Instituto De Fisiología
Facultad De Ciencias
Universidad Valparaíso
Presidente CICUAL-UV

**CERTIFICADO DE BIOSEGURIDAD
BS05-23**

El Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso, declara que, evaluó el protocolo experimental del Proyecto Fondecyt de Iniciación 11230727, financiado por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID), titulado "**ROLE OF THYROID HORMONES IN THE PATHOPHYSIOLOGICAL MECHANISMS OF ALZHEIMER'S DISEASE AND ITS POTENTIAL THERAPEUTIC IMPLICATIONS**", presentado por la investigadora responsable Daniela López Espíndola, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

- I. Para su evaluación el Comité de Bioseguridad revisó los antecedentes presentado por el interesado en relación a los riesgos y medidas preventivas de las actividades planteadas en el proyecto referido, aquellas actividades se realizarán en los-Laboratorios de Ciencias Morfológicas, Investigaciones Biomédicas, Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas, Laboratorio de Sinaptopatías, de la Escuela de Medicina, Edificio Bruno Gunther, Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.
- II. En la evaluación de Bioseguridad del proyecto, el Comité consideró apropiados el control de riesgos, las medidas preventivas, la gestión de residuos y el resguardo de la comunidad y del medio ambiente.
- III. Por lo anterior, el Comité de Bioseguridad de la Universidad de Valparaíso certifica que este protocolo experimental contempla las medidas de Bioseguridad definidas en el Reglamento de Higiene y Seguridad de la UV y en el Manual de Bioseguridad de CONICYT.
- IV. Se extiende este certificado para ser presentado a la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID).



ANGELA HERRERA PAREDES
PRESIDENTA
COMITÉ BIOSEGURIDAD
UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO



VALPARAÍSO, marzo de 2023.