

A 120 AÑOS DEL METODO DE GOLGI

José R. Alvarado Mendoza.
Centro de Microscopia Electrónica, Apdo. 167. Universidad de Los Andes, Mérida 5101- A Venezuela.

Resumen

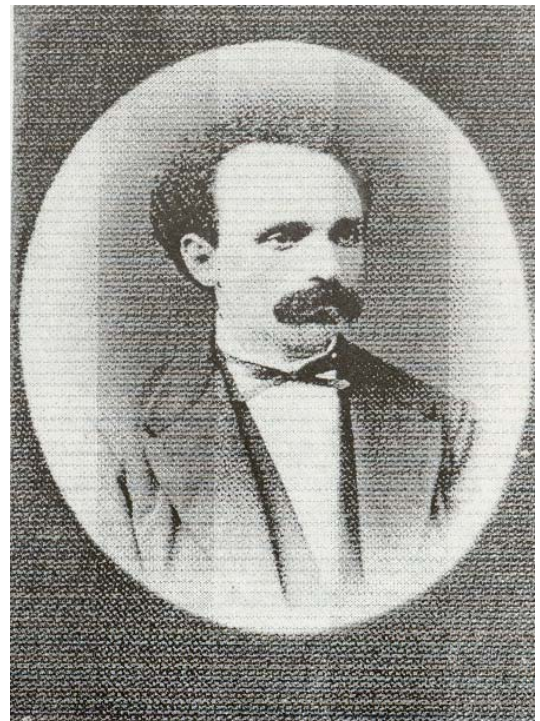
Camillo Golgi ideó uno de los métodos de impregnación de células nerviosas, que aún mantiene un sitio de honor dentro del campo de la descripción morfofuncional del sistema nervioso. Este método permite la impregnación selectiva de las células nerviosas y sus prolongaciones con la reacción del nitrato de plata y el dicromato de potasio o de sodio. Camillo Golgi nació en Corteno, Italia, en 1843. Estudió medicina en la Universidad de Pavía, fue catedrático, rector y senador. Desde su época de estudiante sintió gran atracción por el área de la histología, en donde fue formado por Eusebio Oehl. En 1898 describió por primera vez el aparato de Golgi y murió a la edad de 83 años en 1926. Luis Simarro le enseñó la técnica de Golgi a Santiago Ramón y Cajal, con el cual realizó grandes aportes al mundo científico contemporáneo. Esta técnica ha sufrido muchas modificaciones, realizadas por el mismo Golgi y por otros neurocientíficos, para adaptarla a las exigencias del investigador moderno, y todavía es una pieza de gran utilidad para los nuevos estudios enfocados a la descripción anatomofuncional del sistema nervioso.

INTRODUCCIÓN

El 9 de Julio de 1843, en la localidad de Corteno, al norte de Italia, vio las primeras luces Camillo Golgi, quien sin duda alguna, revolucionaría más tarde el mundo de la morfología celular del sistema nervioso, con la introducción del método de impregnación cromoargéntica.

Camillo Golgi unió los bordes del gran abismo, existente entre lo desconocido y misterioso, en esa gran masa de delicada sustancia, como lo era el sistema nervioso, en una verdad visual, descriptiva y objetiva, como lo es la estructura y morfología de aquellos «gránulos» con prolongaciones y ramificadas divisiones a manera de árboles, a los cuales más tarde, se le atribuirían virtudes, no sólo en cuanto a sus formas características, sino porque unidas entre sí, constituían un verdadero circuito interconectado, mediante estructuras, a las que más tarde Sherrington denominaría SINAPSIS (Williams y Warwick, 1986).

Este instrumento de evidenciación de las células nerviosas y gliales, dio una gran oportunidad a los grandes neurocientíficos de la época, tales como Santiago Ramón y Cajal, Louis Ranvier, Charcot, y muchos otros interesados en esta fascinante vertiente investigativa, para hacer descripciones enjundiosas sobre la constitución de diferentes regiones del sistema nervioso, y sus grupos exclusivos de células, que sólo variarían en algunos pocos aspectos de su morfología y en el número poblacional de éstas, permitiendo así, establecer comparaciones determinantes, desde los seres más primitivos hasta el hombre. Todo esto dio fundamento a las primeras



Camillo Golgi (1843-1926)

investigaciones y especulaciones acerca de las funciones y el papel que desempeñarían las diferentes estructuras del sistema nervioso en la vida cotidiana del animal vivo.

No se sabe a ciencia cierta cuándo y cómo fue ideado el método de tinción cromoargéntica, si fue consecuencia de una

metodología o búsqueda preconcebida por parte de Camillo Golgi, o un descubrimiento fortuito, como lo califican algunos de sus detractores (Palacios, 1983), pero lo que sí se sabe es que esta arma ideada, para dilucidar lo que estaba allí y no se podía observar, ha sufrido modificaciones a través de los tiempos, fundamentalmente en cuanto a los elementos usados y a la manera de aplicación de las técnicas histológicas, que han sido necesario adaptar, por parte de aquellos neuroinvestigadores que han tenido la convicción de sus excelentes resultados, sea porque buscaban agilizar el procedimiento, el cual originalmente necesitaba semanas y hasta meses para poder observar el material procesado o porque necesitaron nuevas aplicaciones en tejidos en los cuales nunca se había empleado (Braitenberg, 1973; Strausfeld, 1973).

La gran contribución de Camillo Golgi, como mencionábamos, además de sus trabajos descriptivos, fue el método de impregnación cromoargéntica para evidenciar las células nerviosas y sus prolongaciones, el cual describiremos de esta manera: consistía básicamente en una prolongada inmersión de los trozos de cerebro, previamente endurecidos con bicromato de potasio o de amonio, en una solución de nitrato de plata de 0.5% a 1%. Esta técnica permite una «tinción» precisa y selectiva de la silueta de los elementos nerviosos de la sustancia gris.

Golgi comenzó a investigar en la sustancia gris cerebral, cerebelosa y la de los lóbulos olfatorios a partir del año 1873, y publicó numerosos artículos y observaciones recogidas en el libro **Sulla fina anatomía degli organi centrali del sistema nervoso** (López, 1985), editado en 1886. Además, en base a sus observaciones formuló una serie de hipótesis, entre las cuales destaca la relativa a la existencia de una red difusa de axones de extraordinaria finura, en los centros grises del sistema nervioso (Golgi, 1903; López, 1985; Palacios, 1985), lo que produjo numerosas controversias entre las tantas personalidades ligadas al mundo de la neuroinvestigación de ese momento.

BREVE RESEÑA HISTORICA

Para iniciar esta reseña comenzaremos de seguido a describir la versión original del método, tal como lo describió el propio Camillo Golgi (Romeis, 1928).

METODO LENTO:

«Ponéanse pequeños fragmentos de órganos en líquido de Müller o en solución de bicromato potásico al 3%, cuya concentración se aumenta hasta el 5%, el fijador con las piezas

se mantendrán en la oscuridad. Al cabo de 4-6 semanas haremos la primera prueba con el material, sacando un trocito de éste, enjugándolo 24 horas en este mismo líquido. Si no encontramos todavía señales de impregnación en cortes que haremos con la navaja en este trocito, repetiremos la prueba al cabo de 8 días, y así sucesivamente».

METODO RAPIDO:

«Comenzaremos por poner trocitos de material lo más fresco posible en una mezcla de 8 partes de solución de bicromato potásico al 2.5% y una parte de solución de ácido ósmico al 1%, la cual conservaremos en la oscuridad. A partir del tercer día, hasta el séptimo, tomaremos diariamente algunos trocitos, los enjugaremos con papel filtro y los sumergiremos en una solución de nitrato de plata al 0.5-1%, la cual tomará enseguida color amarillo y será renovada inmediatamente. Al cabo de 24 horas lavaremos las piezas con alcohol al 40%. Entre los trocitos examinados hallaremos seguramente algunos en que la impregnación se ha efectuado con éxito».

Al realizar esta revisión histórica acerca del método de Golgi, no se puede olvidar a aquellos personajes que de una u otra forma han centrado el resultado de sus investigaciones y trabajos, en la aplicación del método de impregnación cromoargéntica. Uno de estos investigadores, al cual tenemos que hacer obligatoria referencia, es al incansable médico aragonés Santiago Ramón y Cajal (1852-1934), el cual tomó como instrumento fundamental y fiable, el tesoro incalculable legado por Golgi.

Cajal aprendió el método de Golgi de manos del gran neuropsiquiatra español Luis Simarro en 1887, quien introdujo en España los métodos y descubrimientos del sabio italiano.

Luis Simarro, neuropsiquiatra y figura importante de la época, incidió en una manera determinante en la vida de Cajal, al mostrarle y enseñarle las virtudes y particularidades del método de impregnación de Golgi. Simarro, indudablemente no tuvo perseverancia, virtud de los modestos, como lo señala uno de los biógrafos de Cajal, José M. López Piñero (López, 1985), cualidad que supo aprovechar Cajal para construir su obra científica.

El método de tinción que Simarro ponía en las manos de Cajal, fue acogido con tanto ahínco por el célebre investigador, que constituyó el instrumento técnico fundamental, para la observación y descripción de las células nerviosas, tanto así, que le realizó una modificación en el año 1888 a la que

denominó, «**Proceder de la doble impregnación**», que consistía básicamente en someter las preparaciones histológicas, una vez extraídas de la solución de nitrato de plata, a un nuevo baño bicroómico y a otra impregnación argéntica, lo que le permitió obtener tinciones muy claras y casi constantes, incluso en estructuras muy complejas, como la retina.

Cajal, en una gira que realizó por varios países de Europa, hizo una estadía en Italia, y visitó algunos laboratorios en Turín, Génova y Pavía, en esta última no pudo conocer a Golgi, quien se encontraba en Roma, cumpliendo obligaciones como senador. Esto lo afirma Cajal en su libro Recuerdos (López, 1985), donde rememora: «contrariéme mucho la ausencia del maestro (refiriéndose a Golgi), doy seguro que, de haber podido mostrarle mis preparaciones y rendirle al mismo tiempo mis sentimientos de admiración, hubiérase evitado, para lo futuro, polémicas y equívocos enfadosos», recordándose de un enfrentamiento, en el cual Golgi le hizo una reclamación, referente a la prioridad del hallazgo de las fibras colaterales en la médula espinal.

Este hecho se hizo público en las páginas de la revista de la Sociedad Anatómica Alemana, Anatomischer Anzeiger, el cual produjo numerosos comentarios en el mundo científico europeo.

En octubre de 1906 fue galardonado Cajal, junto con Camillo



Golgi con el premio Nóbel de Fisiología y Medicina, por el Real Instituto Carolingeo de Estocolmo. Allí Cajal conoció personalmente a Golgi, y pese a los enfrentamientos anteriores demostró gran admiración hacia el gran histólogo italiano.

Santiago Ramón y Cajal (1852 – 1934)

PROCEDER RÁPIDO DE GOLGI, MODIFICADO POR SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL:

A continuación daremos a conocer el proceder rápido y lento del método de impregnación cromoargéntica de Golgi, practicado por Santiago Ramón y Cajal (Ramón y Tello, 1966):

1. «Induración de trozos pequeños (1/3 de centímetro cuadrado a lo más), durante uno a tres días, en:

Bicromato de potasa al 3%	2Occ.
Acido ósmico al 1%	6cc.

2. Lavado rápido (dos o cuatro segundos) en agua destilada.

3. Inmersión por treinta horas en solución de nitrato de plata, cristalizada, al 75%.

4. Induración por media hora en alcohol de 40%.

5. Montaje superficial en un bloque de parafina, o entre dos trozos de médula de saúco, para efectuar las secciones microtómicas, que deberán ser espesas.

6. Lavado de los cortes, que deben recogerse en alcohol absoluto, que se mudará seis u ocho veces durante media hora.

7. Aclaramiento por dos a cinco minutos en esencia de clavo.

8. Traslación rápida al portaobjetos, donde se irrigará con xilol (por algunos segundos) para quitar la esencia de clavo.

9. Lubricación de los cortes con resina damar disuelta en xilol.

10. Deseccación subsiguiente de los cortes al descubierto, a fin de que el barniz se endurezca hasta lo hondo del tejido y las células queden como incrustadas en cristal. La lenta desecación en barniz, así como un montaje a la manera ordinaria, estropean la coloración.

Este método de coloración produce excelentes preparados en la médula embrionaria, cerebro y cerebelo de todos los mamíferos, en la retina, bulbo olfatorio, terminaciones nerviosas periféricas, gran simpático adulto, conductos glandulares, etc.,. Tiñe de negro las células y particularmente los cilindroejes.

Cuando después de la impregnación con nitrato de plata el preparado nos mostrase poca o ninguna reacción, volverán a someterse las piezas (recién sacadas del nitrato) a los mismos baños, a saber: solución osmiocrómica, por veinticuatro horas, y nitrato de plata, por treinta y seis. Esta modificación, que nosotros hemos llamado de Doble Impregnación, es mucho más constante que el modus operandi ordinario, y nos ha permitido (así como a Retzius, van Gehuchten, C. sala, P. Ramón, Lenhossék, Athias, etc.) colorar fibras y células nerviosas que resisten a los otros modos de empleos de la reacción negra».

PROCEDER LENTO Y SEMI-LENTO PROPUESTO POR SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL:

«En vez de la mezcla osmiocrómica, cabe indurar primero durante treinta o más días en líquido de Müller, y luego, ensayar la acción del nitrato de plata. Esta variante es más incierta que el proceder rápido antes descrito.

Algo mejores resultados suministra la induración previa, durante dos o cuatro días, en líquido de Müller o en bicromato al 3%, seguida de inmersión, por tres a cinco días, en la referida mezcla osmiocrómica. El número de células impregnada es más considerable (proceder semilento).

Como en cada impregnación suelen colorarse solamente algunas especies de fibras y células, todo estudio formal hecho con este método se fundará en el examen de muchísimos cortes y de numerosas impregnaciones del mismo órgano, porque las células ausentes en un preparado suelen mostrarse en otros. Debe, por tanto, el observador integrar en una noción total de estructura los resultados parciales logrados mediante el examen de muchos buenos preparados».

PROCEDIMIENTO PARA EL METODO DE GOLGI PROPUESTO POR W. COX.

W. Cox entre 1890 y 1891, introduce el uso de una nueva modificación del método de impregnación cromoargéntica de Golgi, la cual estaba compuesta por una mezcla de dicromato de potasio y cloruro de mercurio, a la cual se le agregaba moderadamente cromato de potasio, para incrementar la reacción ácida de la solución.

Esta modificación estuvo basada en la introducción del mercurio por el propio Camillo Golgi en el año 1879, unos pocos años después de haber ideado el método original de impregnación cromoargéntica, en 1873.

El fundamento estaba basado, en los depósitos de mercurio o probablemente de complejos oxidados de mercurio metálico, en la célula nerviosa, lo cual trajo tan buenos resultados, que Santiago Ramón y Cajal en 1909 y Lorente de No en 1934, obtuvieron mejores impregnaciones de neuronas del área del hipocampo con esta modificación que con el método de Golgi original.

Los pasos a seguir en el método de Golgi-Cox son los siguientes (Ramón, 1970):

- 1.- «Piezas de tejido nervioso fresco son colocadas por espacio de un mes, en una solución de dicromato de potasio y bicloruro de mercurio como ingredientes básicos.
- 2.- El tejido es seccionado en un microtomo.
- 3.- Las secciones son tratadas en solución alcalina de hidróxido de litio.
- 4.- Los cortes son montados para ser examinados en el microscopio».

Tanto Golgi (1879), como Cajal (1933), hicieron énfasis en la importancia de la temperatura durante el período de impregnación, acordando que el rango óptimo oscilaba entre 20°C y 26°C, y que con temperaturas inferiores a 15°C podrían haber dificultades para obtener buenos resultados.

Otra recomendación para obtener buenos preparados con la modificación de Cox, es el emplear tejido nervioso de animales jóvenes (conejo, gato, perro, etc,..) de veinte días hasta dos meses. Estos animales se pueden sacrificar con éter o pentobarbital sódico.

«La reacción es muy inconstante e incompleta en mamíferos recién nacidos, porque la sustancia gris tiende a reblandecerse», esta aseveración la hizo Santiago Ramón y Cajal (Ramón y Tello, 1966), quien fue uno de los grandes usuarios del método de impregnación de Golgi.

VARIACIONES DEL METODO DE GOLGI PARA INVESTIGADORES POBRES.

No podemos finalizar sin mencionar la modificación realizada por el Profesor Ernesto Palacios Prú, en la Universidad de Los Andes Mérida-Venezuela, a finales de los años sesenta. Él realizó una modificación del método de tinción cromoargéntica a la cual denominó en una publicación en Acta Científica en 1970; «Two Useful Variations of the Golgi Silver Chromate Method» (Palacios, 1970), y que consistía básicamente en la introducción de una mezcla fijadora de dicromato de sodio, ácido acético, formalina y la supresión del tetraóxido de osmio. Según Palacios Prú, esta mezcla

proporcionaría una buena fijación, con lo cual esperaba dar al tejido una suficiente dureza para que así se facilitaran los cortes en el microtomo, sin una previa inclusión. Además, se mostraba una de las virtudes más importante de la variación propuesta, como era la de acortar de una manera significativa, el tiempo de fijación y de impregnación, además de reducir los costos del procedimiento al eliminar el osmio.

A continuación describiremos detalladamente las dos variaciones del método de Golgi, realizadas por Palacios Prú (Palacios, 1970):

A.- PRIMERA VARIACIÓN:

La fijación se realiza con dicromato de sodio al 2%, 50 ml; formalina, 10 ml; ácido acético glacial, 5 ml. Esta mezcla fijadora puede ser preparada en dos soluciones diferentes: disolviendo un gramo de dicromato de sodio en 50 ml de agua destilada y separadamente, la mezcla de formol-acético. Estas se deben mezclar justo antes de usar.

El tiempo de fijación varía dependiendo del tamaño de los fragmentos y del tejido nervioso usado. Para fragmentos de tejido encefálico que no pasen de 0.5 cm³, con 16 horas es suficiente, mientras que 12 horas es recomendable para fragmentos de 3 mm³. Fijar por más de 48 horas no es recomendable.

Después se lavan los fragmentos de tejido con agua destilada por 30 minutos. Se deben dejar los fragmentos en nitrato de plata al 1.5%, por 8 horas cuando sean pequeños y no más de 4 días cuando sean grandes, a temperatura ambiente. Si se desea evitar exceso de reacción cromoaigéntica, se puede bajar la concentración del nitrato de plata de 1.5% a 1%, en este caso los fragmentos deben permanecer un tiempo mayor en la solución de nitrato de plata.

B.- SEGUNDA VARIACION:

La fijación se realiza con dicromato de sodio al 2%, 50 ml; formalina, 10 ml; ácido acético glacial, 5 ml; piridina, 1ml.

La adición de piridina produce una mejor reacción cromoaigéntica que subsecuentemente incrementa la cantidad de fibras nerviosas teñidas, tal como las fibras paralelas y musgosas de la corteza cerebelosa.

Los fragmentos son seccionados, sin ser incluidos, con un microtomo de celoidina, después de ser adheridos en la superficie de un bloque de parafina fundido con una espátula caliente, como se hace usualmente en el método de Golgi. El seccionamiento es facilitado por la dureza obtenida en la mezcla fijadora.

Palacios Prú, como usuario, conocedor e indagador sobre este método, particularmente, al comienzo de su carrera científica, tuvo la inquietud, al igual que los antiguos personajes conocedores de este elemento de ayuda fundamental en la descripción y estudio del tejido nervioso, de modificar una metodología que habiendo sufrido cambios en etapas anteriores, todavía no cubría las expectativas, para adaptarse al vuelco que había dado la ciencia casi un siglo después, por ello diseñó una tercera variación aplicable al tejido nervioso embrionario y a cultivos de tejido nervioso.

C.- TERCERA VARIACIÓN

En el año 1973 se realizó en Italia el **Golgi Centennial Symposium**, como un homenaje al sabio italiano, por parte de los mejores neuroinvestigadores del momento, los cuales presentaron numerosos trabajos de investigación en el tan competitivo campo de las neurociencias.

En dicho symposium, los doctores Ernesto Palacios Prú, Beatrice Garber y Luis M. H. Larramendi, presentaron otra modalidad en la aplicación del método de tinción cromoaigéntica con el trabajo titulado: **The «Razione Nera»: A tool for the Analysis of Neuronal Aggregates Reconstituted In Vitro from Dissociated Embryonic Brain Cells** (Palacios, Garber y Larramendi, 1975). En dicho trabajo se reporta la técnica y el producto de los resultados obtenidos de los análisis estructurales de agregados celulares desarrollados «in vitro», con una nueva modificación del método de Golgi tomando como base las dos variaciones que fueron mencionadas anteriormente.

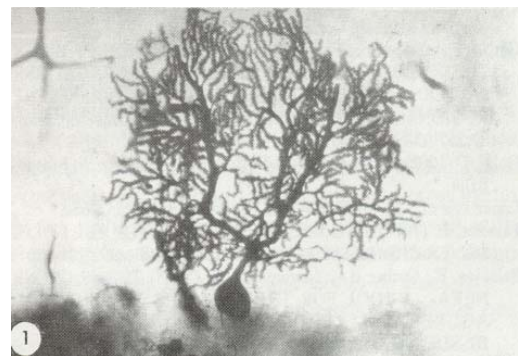


Imagen de la célula de Purkinje en la corteza cerebelosa de ratón adulto joven. Nótese la impregnación casi completa de la célula. Aumento x 175

A continuación paso a describir la nueva modificación:

Los agregados celulares de cerebro de pollo de 0.1 a 1 mm de diámetro, son cultivados en medio líquido y en constante

rotación de acuerdo con el proceso reportado por Garber y Moscona (Garber y Moscona, 1972). Los agregados son centrifugados a baja velocidad, 2000 rpm, por 15 minutos, hasta obtener un precipitado. Después descartando el sobrenadante, 10 ml de la siguiente mezcla crómica son agregados al tubo que contiene el precipitado: 2 ml de glutaraldehído al 50%, 3 ml de formaldehído al 37%, 1 ml de ácido acético glacial, y 44 ml de dicromato de sodio al 2%. Esta solución se deja, sin mover, en contacto con el precipitado localizado en el fondo del tubo, de 16 a 26 horas, hasta obtener una completa cromación. Este precipitado debe ser lavado suavemente con agua destilada e inmerso en concentraciones crecientes de nitrato de plata (0.5%, 0.75% y 1%) por periodos cortos de tiempo. Finalmente el precipitado es dejado en nitrato de plata al 1.5% de 16 a 26 horas.

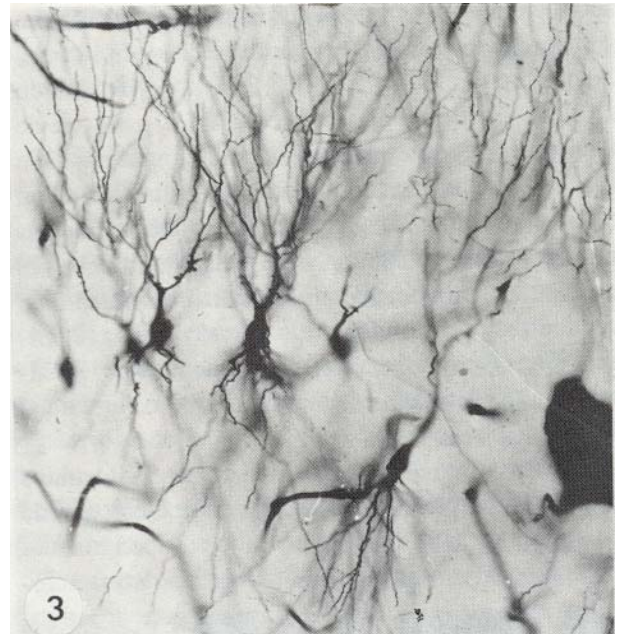
Las secciones de agregados pueden ser obtenidos pegando el precipitado a la superficie derretida de un bloque de parafina o incluyendo en Epon blando. En ambos casos, secciones de 100~ pueden ser cortados con una cuchilla de acero, en un



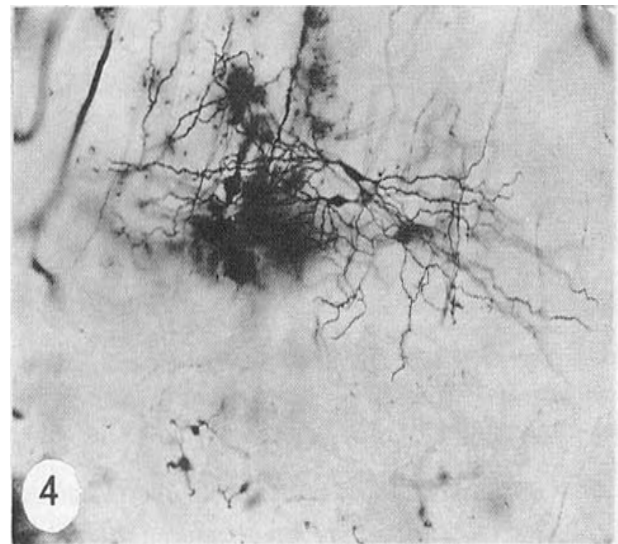
Imagen a mayor aumento de la neurona anterior en la cual se observa 1(1) fineza de la impregnación al aparecer un gran número de espinas dendríticas. Aumento x 525.

microtomo de deslizamiento. Infiltraciones regulares en parafina o celoidina no es recomendable. Las preparaciones obtenidas con este procedimiento del cromato de plata tienen un fondo claro que contrasta con la silueta de las células impregnadas que aparecen claramente delineadas (Palacios, Garber y Larramendi, 1975).

Con esta novedosa utilización del método de Golgi se revelaban nuevos aspectos de la organización celular del tejido cerebral reconstruido en frascos y cultivado a partir de suspensiones de células embrionarias disociadas de cerebro.



En esta fotografía se aprecia la fineza de la impregnación de las ramas dendríticas de las células estrelladas profundas de la corteza cerebelosa de ratón joven. Aumento x 112.



Neuronas bifenachadas del hipocampo. Obsérvese la gran cantidad de dendritas en ambos extremos que aparecen impregnadas. Aumento x 140.

Esto constituía un nuevo paso en la aplicación del método de impregnación cromoargéntica, que permitía observar la diferenciación morfológica individual de la célula nerviosa, desde los estadios más tempranos de su formación hasta la completa diferenciación, de esta manera se podían hacer

análisis y valoraciones experimentales observando la formación del tejido nervioso en el laboratorio, lo que tenía una alta significación para el conocimiento de la neurogénesis.

COMENTARIO FINAL

Como un comentario adicional debemos hacer énfasis en la gran importancia que ha tenido el método de impregnación cromoargéntica a través de toda su evolución, tomando en cuenta que aún en nuestros tiempos es una de las herramientas más fiables usada en el estudio del sistema nervioso. En la actualidad, numerosos investigadores persisten en la utilización del método de Golgi para realizar nuevos estudios comparativos, enfocados a la comprensión de diferentes áreas del sistema nervioso, convencidos de que más adelante puedan seguir obteniendo frutos en la búsqueda incesante de la verdad científica, siempre oculta, a pesar de estar a las puertas del siglo XXI.

AGRACIEMENTOS

El autor agradece la gentileza del Dr. E. Palacios Prú por su atenta guía y apoyo en la realización del presente trabajo de investigación, así como también a la Lic. Z. Peña y al técnico O. Goliath por la corrección y transcripción computarizada, respectivamente, del manuscrito.

REFERENCIAS

Braitenberg, V.(1973) GOLGI METHODS. Encyclopedia of Microscopy and Microtechnique. R Gray (ed),pp 229-232 Van Nostrand Reinhold Company, New York.

Garber, B. y Moscona A. (1972) RECONSTRUCTION OF BRAIN TISSUE FROM CELL SUSPENSIONS.
1. AGGRAGATIONS PATTERNS OF CELLS DISSOCIATED FROM DIFFERENT REGIONS OF THE

DEVELOPING BRAIN. Develop. Biol. 27: 217-234

Golgi, C (1903) OPERA OMNIA VOL 1. Ed. Ulrico Hoepli, Milano, Italia.

López Piñero, J. M. (1985) CAJAL. Salvat Editores, Barcelona.

Palacios, E. (1970) TWO USEFUL VARIATIONS OF THE GOLGI SILVER-CHROMATE METHOD. Acta Científica. 21: 105-106

Palacios, E., Garber B. y Larramendi, L. (1975) THE «RAZIONE NERA»: A TOOL FOR THE ANALYSIS OF NEURONAL AGGREGATES RECONSTITUTED IN VITRO FROM DISSOCIATED EMBRYONIC CELLS. In M. Santini (ed): «Golgi Centennial Symposium: Perspectives in Neurobiology». New York: Raven Press, PP 593-601

Palacios, E (1983) EL METODO DE GOLGI Y LO INIMAGINABLE. Revista C y T, Conicit. 1 (1): 47-53

Ramón y Cajal. S. y Tello y Muñoz, J. F. (1966) ELEMENTOS DE HISTOLOGIA NORMAL Y TÉCNICA MICROGRAFICA. Duodécima Edición, pp 642-644 Editora Nacional, México, D.F.

Ramón, E. (1970) THE GOLGI-COX TECHNIQUE. Contemporary Research Methods in Neuroanatomy. W. Nauta y S.O. Ebbesson (ed), pp 32-55 By Springer-Verlag, New York Inc.

Romeis, B. (1928) GUÍA FORMULARIO DE TECNICA HISTOLOGICA. 11ª Edición, pp 411-414

Strausfeld, N.J. (1973) GOLGI METHOD, INVERTEBRATE APPLICATIONS. Encyclopedia of Microscopy and Microtechnique. P. Gray (ed), Pp 225-228 Van Nostrand Reinhold Company, New York.

Williams, P. L. y Warwick R. (1986) GRAY ANATOMIA. TOMO II. Trigésima sexta Edición, pp 912-918 Salvat Editores, Barcelona.