

P. del Río-Hortega.

CONDRIOMA Y GRANULACIONES ESPECÍFICAS DE LAS CELULAS NEUROGLÍCAS.— *Boletín de la Sociedad Española de Historia Natural*, enero de 1925.

TRABAJOS DEL LABORATORIO DE HISTOPATOLOGÍA
DE LA JUNTA PARA AMPLIACIÓN DE ESTUDIOS. Núm. 35.

Condrioma y granulaciones específicas
de las células neuróglicas

por

P. del Río-Hortega.

(Láms. III a VII.)

Desde que se conoce, gracias a los estudios de Nageotte, Mawas, Fieandt y Achúcarro, la presencia de inclusiones granulares en el protoplasma de las células neuróglicas y se admite por muchos la significación glandular de la neuroglia, preocupa a los neurólogos todo lo referente a su actividad secretora, a la que ha llegado a asignarse extraordinaria importancia.

La existencia de fenómenos de secreción activa en el protoplasma de las células neuróglicas fué observada primeramente por Nageotte (1910), quien descubrió las mitocondrias propias de los apéndices neuróglicos y siguió su evolución progresiva hasta transformarse en granos de secreción con caracteres idénticos a

los descritos por Altmann en las células glandulares. Entre las granulaciones pequeñísimas, incolorables por la fucsina; las de talla algo mayor, tingibles en rojo intenso por el método de Altmann, y las más voluminosas con centro claro, existirían todos los grados de transición.

Las observaciones de Nageotte fueron efectuadas en la corteza cerebral del conejo y del cavia, principalmente en las expansiones neuróglícas que se implantan en los vasos, y a cuyo alrededor se produce una retracción del tejido que favorece la percepción de las granulaciones. Estas, sin embargo, existirían en todos los apéndices gliales, puesto que, según el sabio francés, muchos, y acaso todos los granos esparcidos por la substancia gris, fuera de las células nerviosas, pertenecen realmente a la neuroglia.

De las interesantes observaciones anotadas, deduce Nageotte que *la neuroglia es una glándula intersticial aneja al sistema nervioso*¹.

Casi al mismo tiempo que Nageotte, Mawas observó que las células endimarias y neuróglícas de los vertebrados mostraban variaciones de cromaticidad nuclear semejantes a las conocidas en los elementos glandulares, y que tanto el protoplasma como las prolongaciones de aquellas células contenían formaciones mitocondriales, granos de secreción e inclusiones lipoides. En las células endimarias situábanse los condriocitos preferentemente en la zona supranuclear; en las células neuróglícas disponíanse los filamentos mitocondriales sin orden alguno en el protoplasma y alrededor del núcleo. Los granos de secreción estarían muy desarrollados en ciertos animales (rana, etc.), existirían en todas las prolongaciones y fibras neuróglícas y serían comparables a las formaciones descritas por Renaut como granos indicadores de neuroglia y a lo llamado *givre de Boll*. En cuanto a las inclusiones, ocuparían las partes protoplásmicas exentas de condrioma, dando las reacciones de la mielina las vesículas y gotillas lipoides.

Todas estas observaciones, casi idénticas a las de Nageotte, condujeron a Mawas a un juicio semejante: la neuroglia sería *una inmensa glándula difundida por todo el sistema nervioso*,

¹ Nageotte, «Phénomènes de sécrétion dans le protoplasme des cellules névroglíques de la substance grise». *Compt. rend. de la Société de Biologie*, t. LXVIII, pág. 168, 1910.

comparable a la que constituyen las células ragiocrinias en el seno del tejido conectivo¹.

Fieandt, en 1911, al estudiar la estructura del tejido neuróglíco, comprueba la presencia de formaciones granulosas dentro del retículo glial de la substancia gris de diferentes animales. Considera a tales granulaciones como plasmosomas o citomicrosomas de tipo especial, a los que denomina *gliosomas* en tanto que se tiñen con el método de la hematoxilina wolfrámica² propuesto por él. Según Fieandt, los citomicrosomas deben ser considerados en parte como mitocondrias. La fina red glial con gránulos existente en la corteza cerebral podría ser considerada como un condriomitoma reticulado³.

¹ Mawas, «Note sur la structure et la signification glandulaire probable des cellules névroglíques du système nerveux central des vertébrés». *Compt. rend. de la Société de Biologie*, t. LXIX, pág. 45, 1910.

² Fieandt, «Eine neue Methode zur Darstellung des gliagewebes nebst Beiträgen zur Kenntnis des Baues und der Anordnung der Neuroglia des Hundhirns». *Arch. für mikrosk. Anatomie*, t. LXXVI, 1910.

³ Esta interpretación concuerda perfectamente con la vieja tesis de los histopatólogos alemanes referente al *syncytium* neuróglíco, que todavía algunos autores de mérito persisten en sostener, apoyándose en los resultados de técnicas imperfectas y desdeñando las bellísimas imágenes que suministra el método áurico de Cajal, y las menos perfectas, pero igualmente demostrativas, que se obtienen con nuestra técnica al carbonato de plata. Los modernos métodos de impregnación metálica, resolviendo cada vez mejor las más intrincadas estructuras, van reduciendo el número de las de tipo *syncytial*.

En cuanto al *syncytium* neuróglíco, si para rechazarlo no bastasen los argumentos morfológicos aportados por Cajal, Achúcarro, etc., podrían buscarse en la histogénesis. La trama neuróglíca no se forma por emigración en masa de corpúsculos anastomosados, sino por dislocación aislada de células endimarias, que, gracias a su independencia, pueden emigrar y alejarse del punto de partida. La emigración de glioblastos unidos por bridas transversales no sería posible, como no lo es tampoco que un corpúsculo conectivo, convertido en macrófago, se movilice sin romper las ligaduras que le asocian a elementos congéneres.

Ahora bien; si el *syncytium* neuróglíco no puede resultar de la persistencia de anastomosis originarias, multiplicadas cada vez más al ramificarse las células, tampoco es posible que se forme por soldadura de los apéndices neuróglícos. Podrá haber encuentros, cruces y contactos cabo con cabo: pero no tan amplias uniones que hagan de todo el tejido glial una trama de tres dimensiones, provista de espesamientos protoplásmicos nucleados.

Los argumentos aportados por numerosos investigadores y nues-

Según Fieandt, los gliosomas, o mitocondrias, se acumulan a menudo alrededor de la esfera de las células neuróglícas, pudiendo mezclarse con ellas, no rara vez, formaciones semejantes a pseudocromosomas o a condriocentos. Estos dispondríanse con frecuencia radialmente en relación con el microcentro ¹.

Los autores mencionados coinciden, pues, en afirmar la existencia de granulaciones neuróglícas, pero sus ideas no aparecen claramente expresadas en cuanto a la diferenciación de condriosomas verdaderos y granulaciones específicas (gliosomas, granos de secreción), ni tampoco en cuanto a su situación respectiva. Las investigaciones de Achúcarro y Cajal, efectuadas con sus técnicas originales, nos ofrecen nuevos datos sobre los gliosomas, con nuevas sugerencias respecto a su significación.

Achúcarro, aplicando al estudio de la neuroglia su método tanoargéntico, confirmó en 1913 la existencia de abundantes granos ovales, redondos o alargados, situados en el protoplasma de la glía cortical, y visibles a veces en preparaciones donde los apéndices neuróglícos no estaban teñidos. Al estudiar Achúcarro la relación de tales granulos con las fibras neuróglícas, señala la oposición aparente entre unos y otras, puesto que los gliosomas abundan en las zonas medias y profundas de la corteza donde existe neuroglia protoplásmica y escasean en la zona marginal y allí donde existe neuroglia fibrosa. Achúcarro deduce, de acuerdo con Fieandt, que las mitocondrias desaparecen en parte con la producción de fibras, sin que esto quiera decir que se empleen en su formación. Por el contrario, Achúcarro atribuye a los gliosomas un papel más elevado.

Aceptando las ideas de Nageotte sobre la secreción neuróglíca, busca Achúcarro una semejanza entre ella y la testicular e imagina que la neuroglia, además de una secreción relacionada con

tra propia reflexión, nos conducen a negar la existencia del *syncytium* neuróglíco tal y como lo imaginaron Held, Fieandt y Hardesty, y como, más modernamente, sostienen Spatz, Metz, Holzer, etc., de la escuela de Spielmeyer. Nuestro juicio no vacila al negar la existencia de *syncytiums* formados a expensas de corpúsculos emigrantes, ni al creer posibles solamente tales estructuras entre elementos que proliferan sin desplazarse.

¹ Fieandt, «Weitere Beiträge zur Frage nach der feineren Struktur des Gliagewebes». *Ziegler's Beiträge zur path. nat. und Aallg. Pathol.*, t. XLI, pág. 247, 1911.

el funcionamiento nervioso, podría tener una secreción interna, vertida en el aparato vascular, que colaboraría a la armonía de las correlaciones químicas del organismo.

De acuerdo con esta hipótesis, los fenómenos de vasodilatación y vasoconstricción que acontecen en los estados emocionales podrían relacionarse con la descarga vascular del producto elaborado por la neuroglia; ciertas alteraciones del tiroides y testículo halladas con frecuencia en enfermedades mentales serían efectos secundarios a las lesiones neuróglícas; las enfermedades funcionales, en fin, sin lesión aparente de las células nerviosas, podrían quizás explicarse por perturbaciones de la secreción neuróglíca ¹.

En los trabajos de Achúcarro queda puntualizado cuanto atañe al carácter endocrino de la glándula neuróglíca, con ingeniosas intuiciones fisiopatológicas que elevan la jerarquía de la trama intersticial de los centros nerviosos, considerada por Ranvier y Weigert como homóloga del tejido conjuntivo y con función meramente pasiva de sostén y relleno ². En adelante, pruébese o no que elabora un producto que actúa sobre las células nerviosas solamente, o cuyos hormones influyen, en correlación con los de otras glándulas, sobre el organismo todo; concédasele un papel trófico o antitóxico, no será ya posible asignar a la neuroglia un oficio asilador o de sostén, aunque lo desempeñe pasivamente.

En su magistral estudio sobre la neuroglia del cerebro humano, publicado en 1914, Cajal describe con absoluta perfección los gliocitos protoplásmicos de la sustancia gris, demostrando la estructura esponjosa de su cuerpo y expansiones, revelada con el método áurico, y señalando la presencia en ellos de esférulas pigmentarias, cuerpos vesiculosos y gliosomas típicos, coloreados éstos con la técnica del formol urano, para la que ofrecen una aptitud extraordinaria.

Los gliosomas alójense, según Cajal, tanto en el soma y proyecciones comunes como en los pies o chupadores perivasculares

¹ Achúcarro, «Notas sobre la estructura y funciones de la neuroglia y en particular de la neuroglia de la corteza cerebral humana». *Trabajos del Lab. de Inv. Biol.*, t. XI, 1914.

Achúcarro, «De l'évolution de la névroglie et spécialement de ses relations avec l'appareil vasculaire». *Trabajos del Lab. de Inv. Biol.*, t. XIII, 1915.

² Las modernas investigaciones tienden a ennoblecer también la función del tejido conectivo.

y en el plexo formado por ellos sobre la adventicia; tienen forma ovoidea o elipsoidal, a veces bacilar, y su talla es variable, pudiendo corresponder los más finos a las granulaciones de Altmann, y los más gruesos al producto de secreción o elaboración celular. Los dibujos excelentes con que Cajal ilustra su descripción prueban la exactitud de sus observaciones, no alcanzada por autores precedentes.

En cuanto a la interpretación morfológica de las granulaciones gliales, Cajal no admite, como Eisath, que representen el material de construcción de fibrillas, sino que se inclina en favor del carácter mitocondrial sostenido por Nageotte, aunque reconoce que entre mitocondrias y gliosomas hay reacciones comunes y divergentes; el método de Achúcarro selecciona exquisitamente las mitocondrias y tiñe también los gliosomas; el formol urano revela solamente los últimos.

Cajal considera todavía inmadura la indagación para toda elaboración teórica, pero cree muy plausible y rica en sugerencias, en el dominio de la patología mental, la hipótesis de Nageotte y Mawas, aprobada y ampliada por Achúcarro ¹.

Inspirándonos en los trabajos de nuestros maestros Cajal y Achúcarro, y deseosos de ampliar sus investigaciones y de probar la exactitud de sus ideas, desde 1916 hemos prestado gran interés al estudio de los gliosomas, efectuándole, en diversas circunstancias, con los métodos del tanino-plata y del formol-urano. Los resultados obtenidos después en coloraciones con carbonato argéntico, puramente confirmativos unas veces, otras veces indiciarios de hiperactividad neuróglia y otras, en fin, probatorios de que también existen granos de secreción en la glía de escasas radiaciones, han sido expuestos en diferentes publicaciones. Nuestras pesquisas han tropezado siempre con dificultades técnicas que hacían estéril todo intento de descubrir evidencias de hiper e hipocactividad secretora en los casos en que deberían existir, de ser cierta la hipótesis gliocrina de Nageotte y Mawas, con las sugerencias de Achúcarro. No poseyendo técnica alguna capaz de revelar *in toto* los gliosomas correspondientes al estado normal, no era posible interpretar las variaciones numéricas apreciables en estados patológicos y en circunstancias experimentales.

¹ Cajal, «Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano». *Trabajos del Lab. de Inv. Biol.*, t. XI, pág. 255, 1914.

En algunas experiencias encaminadas a demostrar si la pilocarpina, fármaco activador de las secreciones, influye sobre la neuroglia, apreciamos engrosamientos del protoplasma glial, mayor aurofilia que de ordinario y abundantísimos gliosomas ¹, sin que nos fuera posible comprobar el aumento de elaboración celular, por faltarnos preparaciones de control en las que apareciese teñido todo el contenido gliosómico normal.

Las dificultades de técnica han restado también eficacia a las experiencias con tiroidina efectuadas por Sacristán ², y han hecho prácticamente estériles los esfuerzos de Valderrama y otros por hallar cambios neuróglia en los animales tratados con productos opoterápicos (tiroidina, adrenalina).

Los gliosomas, clave del problema, eran desconocidos en el tercer tipo ³ de neuroglia (oligodendroglia), que abunda mucho más que los tipos protoplásmico y fibroso y cobra cada día mayor interés.

Al describir la glía de escasas radiaciones ⁴, dimos a conocer la presencia de granulaciones abundantes en los corpúsculos interfasciculares de la médula, cerebelo y cerebro. La oligodendroglia del gato joven encerraba junto al núcleo y en las expansiones numerosos granos de tamaño desigual y forma redondeada, ovoidea, piriforme o bacilar, que recordaban mucho al condrioma ordinario, del que diferían esencialmente porque éste no se tiñe, en iguales condiciones, con el carbonato argéntico.

En la substancia blanca cerebral del niño recién nacido y del conejo de pocos días, la oligodendroglia interfascicular mostraba granulaciones redondeadas de variable talla, pero siempre mucho más gruesas que las anteriores y desigualmente coloreadas, como si estuvieran en disolución; lo que se halla en perfecta armonía con el aspecto que ofrecen los granos de secreción. Lo sorprendente de estas granulaciones era su talla, mayor de la asignada a los gliosomas por todos los autores.

¹ P. del Río-Hortega, «Alteraciones de la neuroglia en la intoxicación por pilocarpina». *Laboratorio*. Barcelona, 1917.

² Sacristán, «Alteraciones de la neuroglia en un conejo hipertiroidizado». *Bol. de la Soc. Esp. de Biol.*, 1916.

³ Evítense confundir esta variedad de neuroglia con el tercer elemento de los centros o microglia.

⁴ P. del Río-Hortega, «La glía de escasas radiaciones (oligodendroglia)». *Bol. de la Real Soc. Esp. de Hist. Nat.*, enero de 1921.

Los gliocitos fibrosos de la capa molecular del cerebro contienen también gliosomas voluminosos; pero sus dimensiones eran superadas por los existentes en la región superficial de la protuberancia, bulbo y médula, y en la zona subependimaria medular de los mamíferos jóvenes (gato, perro y conejo, especialmente).

Las células de estos parajes poseían de uno a diez granos esféricos, de grande y desigual volumen, que llegaba a ser de cuatro a seis micras. Pero estas gruesas granulaciones, propias de animales jóvenes y de lugares donde abundan las fibras meduladas, no mostraban todas las reacciones colorantes de los gliosomas ordinarios, lo que podría atribuirse a diferencias químicas y a la existencia de una especialización secretora en cada tipo de células neuróglícas.

De la lectura de las referencias que preceden, en las que hemos querido presentar con algún detalle el estado actual ¹ del problema gliocrino, dedúcese que todavía falta mucho por conocer respecto a los gliosomas y que todas las conjeturas hechas en el supuesto de la secreción neuróglíca esperan una confirmación que la técnica actual se niega a suministrar.

Como punto de partida urge dilucidar el parentesco del condrioma verdadero y de los granos de secreción, y se necesita buscar el medio de diferenciarlos fácilmente, para evitar la confusión de nombres y conceptos que se observa en todas las publicaciones analizadas. Antes de proseguir la investigación sobre la presunta función neuróglíca, y a fin de poder interpretar los resultados de las experiencias, precisa distinguir lo que es puramente trófico y común a toda clase de células (condrioma) de lo que constituye una elaboración celular específica (granos de secreción).

A fin de reanudar el estudio, largo tiempo interrumpido, de la neuroglía en sus aspectos funcionales, hemos tratado de buscar fórmulas de tinción más asequibles y seguras que las ya utilizadas para la investigación de los gliosomas. Para lograr nuestro propósito hemos recurrido a la tinción con carbonato argéntico, previo el uso de mordientes que favoreciesen su fijación en las estructuras granulares, y al cabo de diversos ensayos nos ha sido posible dar con una técnica fácil para la tinción del condrioma, y especialmente

¹ Ignoramos si existe alguna publicación no analizada referente a granulaciones neuróglícas. Circunstancias especiales nos han privado de consultar la literatura más reciente.

de los gliosomas, que, bien manejada, y quizá con algunas pequeñas modificaciones, es susceptible de gran rendimiento, no sólo si se trata de colorear las granulaciones gliales en un momento cualquiera y con fines puramente morfológicos, sino también si se desea conocer las oscilaciones del contenido granular, y en último término de la secreción, en circunstancias fisiológicas o experimentales.

Los mordientes que hemos ensayado, y que son más susceptibles de suministrar resultados estimables en las tinciones con carbonato argéntico ¹, son: ácido tánico; alumbre de potasa, alumbre de amoníaco, alumbre de cromo y alumbre de hierro; sulfato de cobre, acetato de cobre, nitrato de urano, acetato de urano, cromato neutro de potasa, bicromato potásico, sulfato de níquel, etc.

Todos estos cuerpos son capaces de suministrar resultados aprovechables cuando se aplican al estudio de diferentes estructuras, no sólo de los centros nerviosos, sino también de los diversos tejidos; pero solamente algunos permiten obtener buenas coloraciones del condrioma y granos de secreción, gliosomas entre ellos. Quizás cuando hayamos estudiado detalladamente las apetencias particulares de dichos reactivos, y una vez perfeccionada la técnica de cada uno, demos una descripción de sus aplicaciones y resultados útiles, entendiendo por tales los que aventajen a los que dan los métodos conocidos, por su mayor electividad, constancia, facilidad y rapidez de ejecución.

TÉCNICA

La técnica seguida por nosotros para la tinción del condrioma y granos de secreción consiste esencialmente en fijar las piezas en formol ² o formol-bromuro, adicionado de un mordiente, siguiendo después alguna de las técnicas del carbonato argéntico.

¹ Desde que dimos a conocer en 1919 el empleo histológico del carbonato argéntico, venimos insistiendo sobre la posibilidad de sustituir este reactivo, con peores resultados, por la plata de Bielschowsky diluida, siguiendo las reglas generales primeramente publicadas o las especiales para casos diversos; huelga, pues, decir que también es aplicable a la tinción de los gránulos celulares, previo el uso de mordientes y siguiendo nuestra técnica.

² En nuestra práctica usamos casi exclusivamente el formol al 10 por 100, que constituye un excelente fijador citológico, contra lo que suponen muchos autores; pero consideramos posible el empleo de otros fijadores más acreditados (Flemming, Bouin, etc.), que quizás en algún

Fijador-mordiente.—De los reactivos antedichos, el de mejores resultados para la tinción del condrioma y granos de secreción es el alumbre férrico-amónico, adicionado al formol o formol-bromuro, a condición de que se le deje obrar el tiempo necesario para que penetre bien en los tejidos y éstos se endurezcan.

Siendo lenta su penetración (un milímetro, aproximadamente, cada día), se precisa que las piezas sean muy delgadas, aunque su extensión superficial sea de uno a dos centímetros.

El tiempo de actuación del fijador-mordiente depende de la temperatura: a 25-35°, dos a tres días; a 10-20°, cuatro a ocho días. La fijación puede prolongarse una o dos semanas en verano, y hasta cuatro semanas en invierno, sin que por ello merme la colorabilidad de los gliosomas.

La fórmula de fijador que hasta ahora nos ha parecido más conveniente se compone de:

Formalina comercial.....	10 cm. ³
Agua.....	90 cm. ³
Alumbre de hierro puro.....	6 a 8 gs.

(fíltrese).

En cuanto a los otros cuerpos mordientes, la proporción en que deben emplearse es aproximadamente la misma para los alumbres, algo menor para las sales de cobre y cromo y menor aun para el nitrato de urano, que obra bastante bien en solución al 1 ó 2 por 100. La excesiva concentración de algunos mordientes dificulta mucho la práctica de cortes finos, por la rigidez y friabilidad que adquieren los tejidos.

Impregnación colorante.—Para la tinción del condrioma y granulaciones específicas de la neuroglia, seguimos casi exactamente la técnica del carbonato de plata, de la que pueden emplearse, al menos, tres variantes: la coloración en frío, la coloración en caliente, y la doble impregnación argéntica.

a) *Tinción en frío.*—Es la generalmente practicada para la demostración del condrioma, aunque también suministra excelentes coloraciones gliosómicas. Puede aplicarse igualmente al estudio del contenido granular de diferentes células glandulares.

caso puedan ser ventajosos. Una de las mejores cualidades de la fórmula de carbonato argéntico por nosotros ideada es, justamente, la posibilidad de su empleo previo el uso de diversos fijadores, con lo que es posible lograr efectos casi inagotables.

1.º Fijar las piezas, de dos a tres milímetros de espesor, en la solución de formol-alumbre de hierro, de dos a ocho días.

2.º Seccionar por congelación, procurando no congelar en exceso para que los cortes, excesivamente friables, no se fragmenten. Las secciones deben tener unas 10 micras de espesor.

3.º Lavar por dos veces en agua abundante. El primer lavado puede hacerse en agua con cinco o seis gotas de amoníaco, que extiende y flexibiliza a los cortes.

4.º Impregnar en licor de carbonato argéntico (fórmula ordinaria), durante uno a cinco minutos, en relación con la temperatura del laboratorio.

5.º Lavar en agua destilada durante quince a treinta segundos, cuidando no agitar demasiado a los cortes.

La importancia de este lavado es considerable, puesto que a él se debe, en efecto, una parte de la selectividad del método. Si se efectúa convenientemente, tíñese el condrioma¹. Si no se efectúa, y los cortes pasan directamente de la plata al reductor, solamente aparecen coloreadas las granulaciones más voluminosas y energicamente impregnadas: los gliosomas.

6.º Reducir en formalina al 1 por 200. Para observar el condrioma conviene que los cortes adquieran color grisáceo en el reductor. Los gliosomas destacan mejor en los cortes que adquieren tinte rojizo.

7.º Virado en cloruro de oro al 1 por 600, reforzando ligeramente la coloración por calentamiento suave o dejando los cortes quince minutos en el baño áurico a la temperatura ordinaria.

8.º Fijación en hiposulfito de sosa al 5 por 100.

Mediante esta técnica es fácil obtener en el gato y el conejo (animales solamente explorados) una coloración aceptable o completa del condrioma de las células neuróglícas. Con frecuencia se muestran también teñidos los condriosomas de las células nerviosas².

¹ El agua actúa como diferenciador, disolviendo la plata que impregna difusamente al tejido y cuya reducción ulterior impediría percibir los condriosomas celulares.

² Los finísimos condriomitos y mitocondrias que encierran las células nerviosas en su cuerpo y expansiones son siempre de difícil tinción. El método de Achúcarro y alguna de nuestras variantes nos han suministrado imágenes excelentes de dicho condrioma en células, por lo general, de gran talla. Mediante las técnicas a), b) y c), hemos obtenido

b) *Tinción en caliente.*—Es aplicable principalmente a la tinción de gliosomas, ofreciendo la ventajosa propiedad de mostrar a la vez el cuerpo y expansiones neuróglícas, coloreadas con la intensidad suficiente para no estorbar la percepción de las granulaciones.

- 1.º Fijación, dos a ocho días ¹.
- 2.º Obtención de cortes de diez micras, por congelación.
- 3.º Lavado dos o tres veces en agua abundante, adicionándola seis a ocho gotas de amoníaco.
- 4.º Nuevo lavado, en agua destilada.
- 5.º Coloración en carbonato argéntico piridinado, calentando a unos 45-50° hasta que los cortes toman un color tabaco claro ².
- 6.º Lavado de uno a tres minutos en agua destilada ³.
- 7.º Reducción en formalina al 10 por 100.
- 8.º Virado áurico, quince minutos en frío; puede reforzarse el teñido, calentando después suavemente.
- 9.º Fijación en hiposulfito de sosa.

Esta técnica suministra tinciones, al parecer completas, de las granulaciones específicas en los diferentes tipos de neuroglia y del condrioma en todos los elementos nerviosos y neuróglícos, pudiendo hacerse destacar con preferencia unas u otras granulaciones con sólo variar la concentración del reductor; el formol al 10 ó 5 por 100, revela preferentemente gliosomas; el formol al 1 por 100 muestra también el condrioma de los gliocitos, y en parte de las células nerviosas; el formol al 1 por 400 suministra espléndidas coloraciones del condrioma en los somas neuronales y en los axo-

coloraciones muy delicadas, tanto en grandes como en pequeños corpúsculos nerviosos. En los gruesos axones del bulbo y de la médula no es difícil observar los condriocitos y mitocondrias que ocupan los intersticios del haz neurofibrilar.

¹ En piezas fijadas varios meses en formol-bromuro, se obtiene la tinción de gliosomas con esta técnica, a condición de poner los cortes venticuatro horas en alumbre de hierro.

² Llénese de licor argéntico un vasito de 10 cm³, añádase piridina, tres gotas; introdúzcase los cortes; tápese con un vidrio de reloj, con la cara convexa hacia abajo; póngase en la llama sobre un cartón de amianto; caliéntese hasta que al coger el vasito *casí quemé* y agítese, de vez en cuando, mientras se efectúa la tinción.

³ Extráigase rápidamente a los cortes del baño colorante; déjeselos reposar en una placa de Petri, durante uno a tres minutos, y trasládeselos después, uno por uno y previa ligera agitación, al baño reductor.

nes gruesos. Para obtener una imagen más demostrativa de los gliosomas propios de la oligodendroglia es a veces conveniente diluir un poco el licor argéntico y añadirle, además de la piridina (cuyo papel es impedir la formación de precipitados), unas veinte gotas de alcohol de 95°.

c) *Doble impregnación.*—Hay ocasiones en que la tinción de los gliosomas se obtiene difícilmente siguiendo la técnica a), ora por acción imperfecta del fijador mordiente, ora por existir en los tejidos algún cuerpo que dificulta las reacciones colorantes. En estos casos puede ser útil la doble impregnación argéntica.

Cuando interesa especialmente revelar el condrioma y granulaciones específicas de las células endimarias, es conveniente practicar también la doble impregnación, previa fijación en mordiente bromurado:

Formol.....	10 cm ³
Agua.....	90 cm ³
Bromuro amónico.....	2 gs.
Alumbre de hierro.....	6 a 8 gs.,

que debe actuar por espacio de tres a cuatro días.

- 1.º Fijación en formol-alumbre o formol-alumbre-bromuro.
- 2.º Obtención de cortes finos, por congelación.
- 3.º Lavado, dos veces, en agua con varias gotas de amoníaco.
- 4.º Lavado en agua destilada.
- 5.º Inmersión durante diez a quince minutos en nitrato de plata al 2 por 100, que puede calentarse ligeramente algunos minutos.
- 6.º Lavado rápido.
- 7.º Impregnación en carbonato argéntico durante un minuto.
- 8.º Lavado rapidísimo en agua destilada.
- 9.º Reducción en formol al 1 por 100.
- 10.º Virado en frío, con ligero refuerzo al calor de la coloración.
- 11.º Fijación en hiposulfito.

La fijación durante dos a tres días en

Nitrato de urano.....	1 a 2 g.
Formol.....	10 cm ³
Agua.....	90 cm ³

suele dar resultados muy estimables en la tinción de los gliosomas, demostrándolos a veces espléndidamente teñidos en las prepara-

ciones efectuadas siguiendo preferentemente las técnicas *a)* y *c)*. Los gliosomas de la glía protoplásmica cerebral, así como los de la oligodendroglia, se manifiestan con toda su abundancia. Los resultados mejores corresponden a la oligodendroglia interfascicular, de la que nuestras mejores preparaciones están obtenidas previa fijación formoluránica¹. La neuroglia protoplásmica y fibrosa se tiñe a veces bastante completamente, aunque con una palidez muy conveniente para la observación de los gliosomas.

La doble impregnación de los cortes fijados en formol-urano mejora algo los resultados de la tinción en las granulaciones de ciertos corpúsculos, como las células de Bergmann.

La fijación en formol-bromuro con 6 a 8 gs. por 100 de sulfato de hierro, siguiendo las técnicas *a)* y *c)*, con lavado eventual de los cortes en alcohol de 95°, antes de la reducción formólica, da tinciones del condrioma nervioso y neuróglia, así como de los infundíbulos y aparato filamentosos de Nemiloff de los tubos nerviosos medulados.

El cromato neutro de potasa, empleado en condiciones semejantes a los otros fijadores, proporciona tinciones, a veces muy completas y delicadas, de la neuroglia protoplásmica y fibrosa; pero los gliosomas sólo destacan bien en los corpúsculos más pálidamente coloreados. El protoplasma de las células nerviosas tiende a teñirse con bastante intensidad y limpieza, mostrando a menudo sus condriosomas muy netos. En la doble impregnación, los resultados se modifican poco.

En cuanto a los resultados del bicromato potásico, tanino, sulfato de cobre y acetato de cobre, no son estimables junto a los que se obtienen con los demás mordientes. Los alumbres de cromo, de potasa y de amonio tampoco aventajan en nada al alumbre de hierro².

¹ Esta fijación permite estudiar en el bulbo y médula los brazaletes de Cajal-Nageotte y los infundíbulos de los tubos medulados.

² El sulfato de níquel, poco propicio para la tinción de gliosomas, mejora los resultados del método áurico de Cajal para la neuroglia y permite obtener con carbonato argéntico (técnica *c)* modificada) excelentes tinciones de la glía protoplásmica cortical. La fórmula fijadora se compone de formol bromurado de Cajal con 6 a 10 por 100 de sulfato de níquel. Puede actuar varios días.

CONDRIOMA Y GRANULACIONES ESPECÍFICAS

Los cortes coloreados con cualquiera de las técnicas precedentes ofrecen, después del virado áurico, una coloración gris violácea bastante agradable. Mirados a débil aumento, muestran un punteado casi general, en el que apenas puede distinguirse lo correspondiente a las células neuróglia, que, por su pálida tinción, sólo son perceptibles en los buenos preparados con objetivos fuertes. Las coloraciones mal logradas en cuanto a gliosomas exhiben con frecuencia impregnaciones, más o menos completas, de la neuroglia en sus tres variedades. Las expansiones de la microglia no se colorean.

En las observaciones hechas con objetivo de inmersión, es fácil reconocer que las granulaciones teñidas corresponden al soma y apéndices neuróglia, y, con frecuencia, a las células nerviosas.

Unas veces existen en las células neuróglia corpúsculos alargados (condriocontos), finos gránulos (mitocondrias) y granulaciones redondeadas más voluminosas y oscuras (gliosomas)¹, como acontece en las tinciones con cualquiera de las técnicas cuando la reducción de los cortes impregnados por la plata se efectúa, previo lavado, en formalina del 1 por 100 al 1 por 400; otras veces solamente son reconocibles las granulaciones gruesas, identificables con los gliosomas y correspondientes a los granos de secreción de las células glandulares, lo que ocurre cuando los cortes, sin lavar o poco lavados, son reducidos, respectivamente, en formol al 1 por 100 ó al 5 10 por 100.

Esta variedad de aspectos permite establecer diferencias notorias entre los condriosomas verdaderos y las granulaciones específicas de la neuroglia y separar lo que es identificable con el condrioma ordinario que, más o menos desarrollado, existe en todas las células, y cuya función parece ser endocelular y de orden trófico, de lo que tiene el carácter de una elaboración celular de orden secretor, destinada a actuar fuera de los corpúsculos neuróglia.

Cierto es que con frecuencia se manifiestan a la vez teñidas en una misma célula ambas categorías de granulaciones, lo que in-

¹ La palabra gliosomas (Fieandt), aplicada hasta hora a toda clase de granulaciones neuróglia, merece ser conservada, por su eufonía, para designar a los granos de secreción o granulaciones específicas solamente.

dica, al menos, igualdad de apetencias por la plata; pero el hecho de que en ocasiones, y casi a voluntad, pueda obtenerse la coloración exclusiva de los gliosomas verdaderos denota diferencias químicas interesantes.

A este respecto, tienen gran interés los resultados obtenidos por Cajal y Achúcarro con sus respectivos métodos al formol urano y al tanino plata. Juzgando por las ilustraciones que aparecen en los trabajos de nuestros maestros, éstos sólo lograron revelar netamente los verdaderos gliosomas, redondos, ovoideos o ligeramente bacilares; pero no el condrioma genuino, cuyos elementos dominantes, casi siempre condriocontos, a veces larguísimos, son incolorables siguiendo las técnicas mencionadas, al menos de manera ostensible.

Resultados iguales hemos obtenido nosotros con la fórmula para la tinción de la neuroglia con carbonato argéntico, aplicada, principalmente, a material humano. Con ella se colorean, a veces muy selectivamente, los auténticos gliosomas redondos u ovoideos y de dimensiones varias, que aparecen incluidos en el soma glial o como adheridos a sus expansiones ¹.

Esta tinción de los gliosomas tiene el mayor interés, por cuanto en las condiciones en que se obtiene no suele colorearse el condrioma de las células neuróglicas ni de otra clase de células. Tampoco el carbonato argéntico tiñe de una manera general a los granos de secreción de los corpúsculos glandulares, aunque es capaz de colorearlos en el riñón, suprarrenal, etc. Estos dos hechos significan: a) que los condriosomas vulgares y los gliosomas específicos reaccionan de diferente manera, aunque a veces coincidan; b) que los gliosomas, como producto de elaboración celular, tienen diferencias de colorabilidad con respecto a la mayor parte de los granos de secreción.

Sin que hayamos de entrar ahora a discutir el parentesco existente entre granulaciones de Altmann, granos de secreción y mitocondrias, añadiremos que tanto la colorabilidad como la incolorabilidad de unas u otras, en determinadas condiciones, tiene un valor relativo, si se trata de basar en ella la homología del contenido granular de las diferentes especies celulares, puesto que es

¹ Para obtener la coloración de gliosomas con fijación en formol-bromuro, basta seguir la técnica para neuroglia, diluyendo bastante la solución de carbonato argéntico y adicionándole un chorrito de alcohol.

muy probable que éste tenga reacciones generales idénticas en todas las células y reacciones especiales, para cada una de ellas, que sólo llegarán a descubrirse con técnicas más perfeccionadas que las actuales.

El caso de la neuroglia debe estudiarse por separado, teniendo en cuenta que se trata de un tejido con reacciones propias y características (la mejor de todas es la del oro sublimado de Cajal), que prueban la composición especial de su protoplasma, que seguramente influye sobre la colorabilidad de las granulaciones en él encerradas.

Lo que nos interesa sobre todo manifestar es que entre los gliosomas y el condrioma hay diferencias que deben ser tenidas en cuenta por los investigadores que traten de explorar las actividades neuróglicas siguiendo experimentalmente las oscilaciones del contenido granular. El condrioma existe en toda clase de células, y sus variaciones se sujetan al trofismo celular. Las granulaciones específicas son propias de elementos funcionalmente diferenciados, y cambian ostensiblemente con la actividad y el reposo celular.

He aquí ahora los aspectos observados por nosotros en el contenido granular de las células endimarias y neuróglicas.

Células endimarias.— El condrioma de las células endimarias muestra diferentes aspectos en los animales recién nacidos y en los adultos. Visto en su conjunto el gliopitelio endimario que recubre los ventrículos cerebrales, acueducto de Sylvio y conducto medular de un perro de pocos días, se presenta constituido por células más o menos alargadas, según que correspondan a las partes angulosas o a las superficies planas, cuyo núcleo, incoloro o poco teñido, apenas se discierne, y cuyo protoplasma aparece recorrido en toda su extensión, y a lo largo de la expansión glial profunda, por condriocontos alargados y flexuosos, que se entrelazan por encima y por debajo del núcleo, y a los que se unen escasas mitocondrias. La débil tinción del protoplasma amorfo y el gran número de condriosomas que le recorren impiden determinar exactamente los que corresponden a cada célula, aunque se reconozca inmediatamente que todas ellas los contienen en abundancia.

El límite inferior del epitelio endimario, siempre borroso (puesto que el epéndimo no es una capa celular superpuesta al tejido nervioso, sino que forma parte de éste gracias a la larguísima raíz glial que en él penetra), lo es más cuando existen varios pla-

nos de núcleos y cuando aparece teñido todo el condrioma, ya que en algunas regiones las raíces neuróglícas se entrelazan formando un verdadero plexo inextricable. Hay ocasiones, sin embargo, en que esto no acontece y en que la raíz celular es casi rectilínea y penetra resueltamente en la trama nerviosa, recorriéndola largas distancias. Tal se observa, por ejemplo, en la cara externa de los ventrículos laterales y en algunos otros territorios.

La figura 1 reproduce el epéndimo correspondiente al ventrículo lateral (ángulo superior) del perro de tres días. Los corpúsculos pluriestratificados, en proliferación activa y en pleno dislocamiento y emigración, muestran gran riqueza de condriocontos muy largos con extremos abultados, y algunos más cortos en forma de maza o de halterio. Estos condriosomas siguen la dirección del cuerpo celular, ocupando la zona supranuclear, donde a veces forman haces, los costados del núcleo y la expansión radicular cuya dirección señalan perfectamente.

En la figura 2 cópiase una porción de la cara interna del ventrículo lateral del perro joven, con el objeto de mostrar la abundancia de filamentos existente en toda la extensión de las células ependimarias, desde la parte interna, donde los condriocontos forman haces de base superficial frecuentemente cónica, a las expansiones externas que forman plexo con las inmediatas. En los corpúsculos neuróglícos subependimarios abundan también los condriosomas, que se encorvan con frecuencia para contornear al núcleo o marchan, más o menos flexuosos, por las expansiones celulares.

La figura 3 es copia de la capa celular que reviste al acueducto de Sylvio en el perro recién nacido. En esta región, a la presencia de condriocontos típicos se une la de granulaciones esféricas, cuyo volumen es muy variable y puede llegar a 4-6 micras. Aunque en la zona supranuclear existen algunos gránulos redondos, los más abundantes y voluminosos se sitúan por debajo del núcleo, cerca de la raíz neuróglíca. Trátase de granulaciones de secreción con sus caracteres típicos.

Finalmente, en la figura 4 mostramos, como último ejemplo de epitelio ependimario, el del conejo adulto. Los condriocontos aparecen escasos en las células, y, en cambio, abundan las granulaciones redondeadas, algunas bastante gruesas, ocupando con preferencia la zona supranuclear, cuyos caracteres corresponden a los de las granulaciones específicas.

Las observaciones anotadas, y otras cuya relación detallada

alargaría innecesariamente estas notas, demuestran que en los animales jóvenes existe en el epitelio ependimario un condrioma extraordinariamente rico, formado por escasas mitocondrias y abundantes condriocontos; que en ciertas regiones hay granos voluminosos, con todo el carácter de granulaciones de secreción, y que en el epéndimo de los animales adultos, los condriocontos escasean y, en cambio, abundan las granulaciones redondeadas de tipo gliosómico.

En estas notas, simple enumeración de observaciones, no queremos hacer deducciones prematuras sobre la significación de los hechos referidos. Basta señalar el predominio del condrioma en los animales recién nacidos y de los granos de secreción en los adultos. En próximas investigaciones trataremos de esclarecer algunos hechos dudosos que nos impiden emitir una opinión definitiva.

Células neuróglícas.—En el aspecto que ofrecen las células neuróglícas en los animales recién nacidos y jóvenes y el que se observa en los mamíferos adultos (hombre inclusive), desde nuestro actual punto de vista, hay una serie de modalidades que interesa mucho estudiar, y que sólo en muy pequeña parte podemos describir.

Conociendo la existencia de diversos tipos de neuroglia (protoplásmico, fibroso, de escasas radiaciones, perivascular de Andriessen, etc.), que verosímilmente corresponden a especializaciones funcionales diferentes, se comprende la dificultad de englobar a todos ellos en una sola descripción. Por otra parte, el carácter previo de este trabajo, cuyo objeto es presentar una técnica con sus primeros resultados, nos disculpa de analizar en detalle lo que tienen de común y de especial el condrioma y gliosomas de cada variedad neuróglíca. Por esto, nos limitaremos a mostrar algunas observaciones referentes a los principales tipos gliales, recogidas tanto en animales jóvenes como adultos.

Las células protoplásmicas de la corteza cerebral, donde Nagotze, Mawas, Achúcarro y Cajal localizaron la máxima actividad elaboradora, muéstranse, de acuerdo con esta idea, completamente llenas de granulaciones y filamentos. Tal cantidad de ellos se sorprende, que podría creerse al protoplasma exclusivamente formado por condriosomas si las coloraciones efectuadas con otros métodos no demostraran la existencia de un delicado retículo esponjoso, aparato de Golgi, centrosoma y pigmento.

La proporción relativa de condriocontos, mitocondrias y granulaciones específicas en las células protoplásmicas corticales varía

cen a un tipo descrito por nosotros con la oligodendroglia (pero que tiene caracteres propios para hacer de él un estudio separado), que se encuentra en ciertas regiones superficiales de la protuberancia, bulbo y médula, y en la zona medular vecina del epéndimo, y se distingue por encerrar escasos, pero extraordinariamente gruesos (hasta seis micras), gliosomas redondos u ovoideos. Trátase de elementos activamente elaboradores, cuya significación cerca de los grandes tubos medulados puede entreverse, pero no demostrarse.

He ahí resumidas nuestras observaciones, que nos impiden formar juicio decisivo sobre los más importantes extremos, sin riesgo de incurrir en error.

Está probada por los resultados de diversas técnicas la existencia en las células neuróglicas, de todos los tipos, de un condrioma muy desarrollado y de granos específicos de orden secretor (gliosomas), pero se ignora el parentesco que entre ellos existe. Se sabe que hay momentos en que es difícilísimo diferenciar al condrioma de los gliosomas y casos en que la distinción no ofrece duda alguna; que tienen ciertas reacciones comunes y ciertas predilecciones cromáticas, merced a las cuales es posible obtener tinciones selectivas de los gliosomas, que permitirán efectuar su estudio fisiológico, y que en los diferentes tipos neuróglicos existen variaciones cuantitativas y cualitativas del condrioma y gliosomas en relación con la edad, estado de nutrición, momento funcional, etc.

Admitida la existencia de una secreción neuróglica, de acuerdo con las ideas sustentadas por sabios prestigiosos, nos interrogamos acerca de su papel: ¿interviene en la mielinización durante el desarrollo? ¿subviene a las necesidades tróficas de las células nerviosas? ¿vierte en la sangre el producto que elabora para que actúe sobre el organismo en correlación hormonal con las glándulas endocrinas? ¿desempeña las altas funciones sospechadas por Achúcarro? Estos son los problemas que urge resolver experimentalmente, y frente a los cuales nos limitamos a aportar una técnica que juzgamos útil. Mas si fuera preciso que definiéramos nuestras ideas actuales sobre la significación funcional de la neuroglia, diríamos: los gliocitos contienen un condrioma granular y filamentoso destinado a su propio trofismo y a la elaboración de un producto destinado a obrar fuera de ellos, que verosímilmente es aprovechado por las células nerviosas en su nutrición y funciones normales.

Madrid, septiembre de 1924.

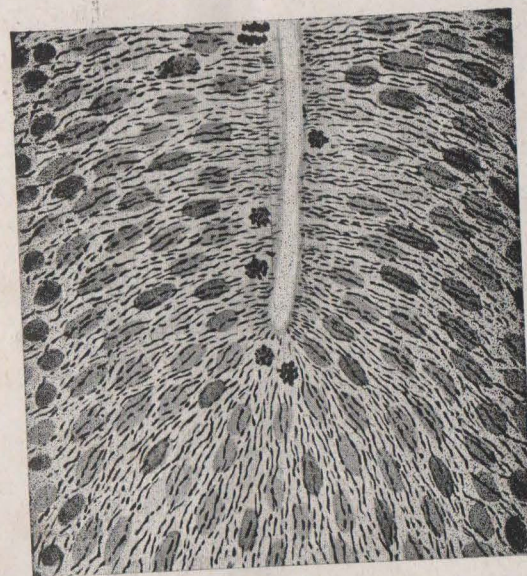


Fig. 1.

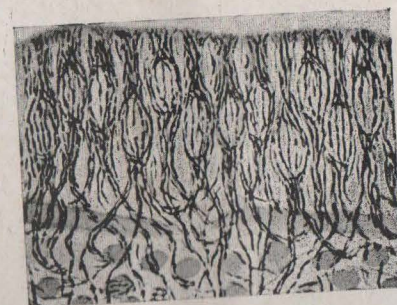


Fig. 2.

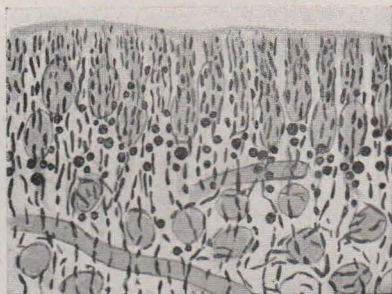


Fig. 3.

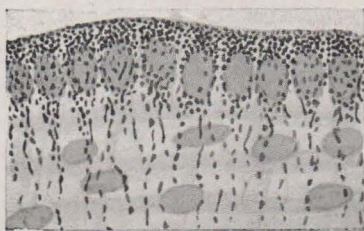


Fig. 4.

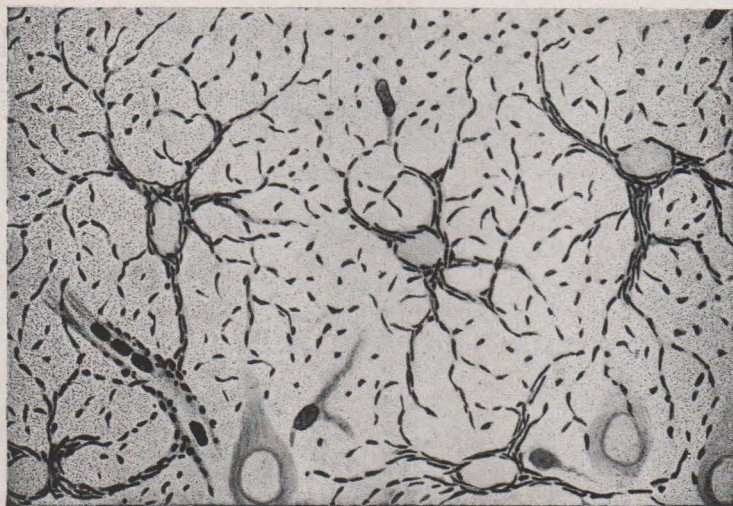


Fig. 5.

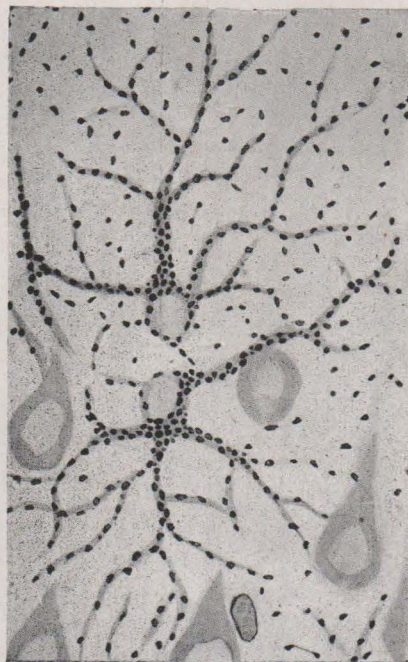


Fig. 6.

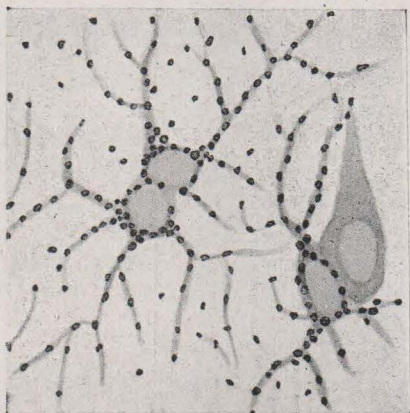


Fig. 7.

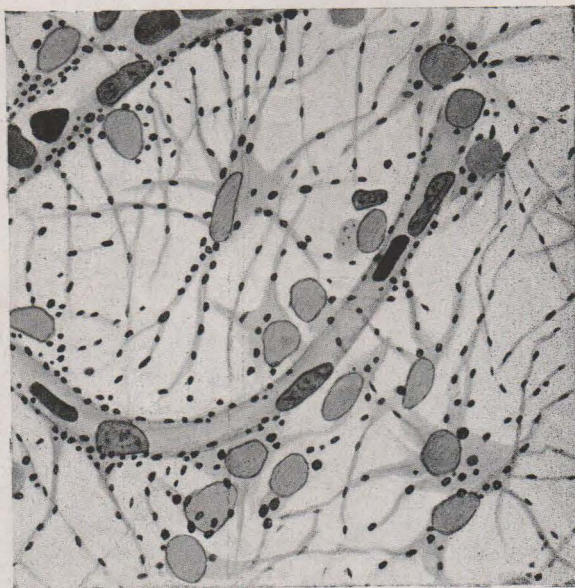


Fig. 8.

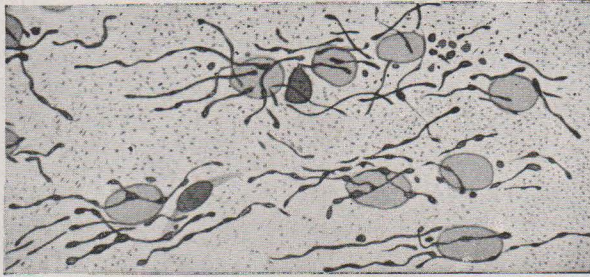


Fig. 9.

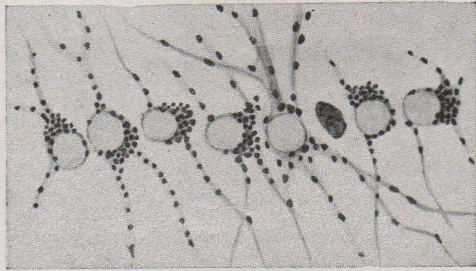


Fig. 10.

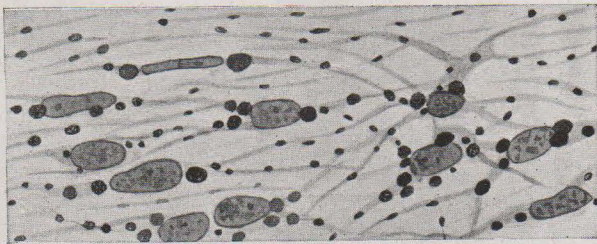


Fig. 11.