

neuroglia no son otra cosa que células epiteliales emigradas de su yacimiento originario (superficie interna de los centros nerviosos), y transformadas en corpúsculos estrellados por atrofia de sus prolongaciones central y periférica, y por la producción de apéndices secundarios, finos y numerosos. Durante un cierto tiempo, las células epiteliales dislocadas ó retraídas hacia la periferia, conservan todavía su prolongación radial ó externa in-

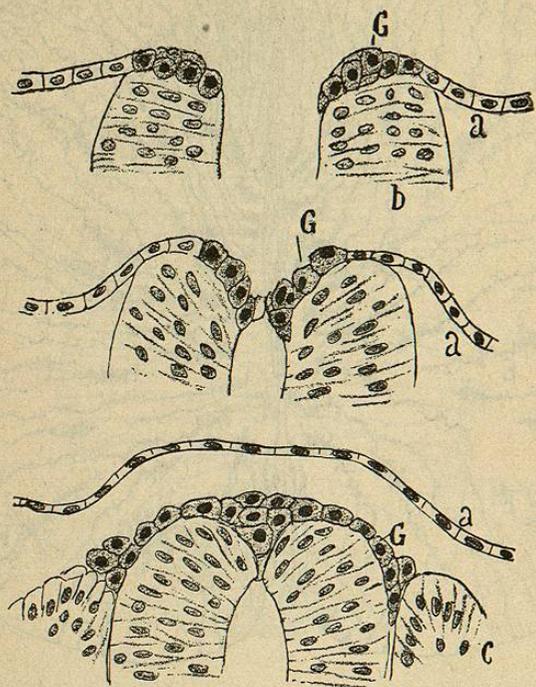


Fig. 203.—Diversas fases de la emigración de los gérmenes de los ganglios raquídeos.—G, gérmenes ganglionares; a, ectodermo; b, trozo del canal medular.

serta en la pia-madre (fig. 202, E) y cierta orientación convergente al epéndimo; mas en el estado adulto, casi todas las células han perdido estos caracteres, mostrándose pequeñas, resueltamente estrelladas y á veces provistas de tal cual apéndice grueso que se fija en el endotelio de los capilares sanguíneos (fig. 202, G).

En la médula adulta de los batracios (Cl. Sala, Lenhossék) y en la de los reptiles (Cajal, Retzius), se revela como disposición constante un estado de transición entre la neuroglia puramente epitelial de los embriones y la neuroglia de los mamíferos adultos; toda vez que se encuentran células epiteliales en curso de emigración que conservan la morfología primitiva y se terminan todavía, mediante apéndices radiados, en la *pia-mater*.

Desarrollo de los ganglios raquídeos.—Las investigaciones de His han puesto de manifiesto que los gérmenes de los ganglios raquídeos son células epiteliales emigradas del ectodermo, de los lados del surco primitivo. En la fig. 203, tomada de Lenhossék, mostramos las fases sucesivas de esta emigración; se ve en ella que los gérmenes gangliónicos habitan primero el borde posterior del canal, júntanse después en la línea media, formando una masa central, y corriéndose después, una vez cerrado dicho canal, hacia afuera, engendran unos acúmulos gangliónicos, que cada vez ocuparán una posición más anterior. Tales elementos adquieren, desde luego, una figura bipolar, de cuyas dos expansiones, la externa se dirige á la médula, y la interna hacia la periferia (fig. 204, E). Esta disposición bipolar originaria, revelada por His en los mamíferos, fué confirmada también por nosotros en los embriones de ave y de reptil, y por Lenhossék, Retzius, Cl. Sala, etc., en los de batracio y pez. En algunos peces, la fase de bipolaridad es permanente y se la halla en el estado adulto; pero en los batracios, reptiles, aves y mamíferos, la bipolaridad se transforma en monopolaridad. En el embrión humano, por ejemplo (fig. 205, B), se ve que las dos expansiones, situadas al principio en los polos de la célula ganglionar, se dirigen progresivamente á un lado de ésta; luego el protoplasma, de donde dichas prolongaciones arrancan, se estira en pedículo; el cuerpo celular parece huir hacia la periferia, y, en fin, el corpúsculo adquiere una configuración francamente monopolar.

Por lo demás, la bipolaridad originaria ha sido también demostrada por nosotros para los granos del cerebelo. Aquí la transformación monopolar ocurre como en los ganglios raquídeos; sólo que, cuando el pedículo nervioso que sustenta ambas fibras está completamente formado, la evolución se completa

por la aparición en torno del cuerpo celular de varios apéndices protoplásmicos. Las fases por que atraviesa el grano cerebeloso son: 1.^a, fase indiferente ó célula germinal (fig. 206, *a*); 2.^a, fase ó célula bipolar horizontal, situada en una zona exterior á la capa molecular embrionaria (*d*); 3.^a, fase de bipolaridad vertical, durante la cual el cuerpo desciende á través de la capa mo-

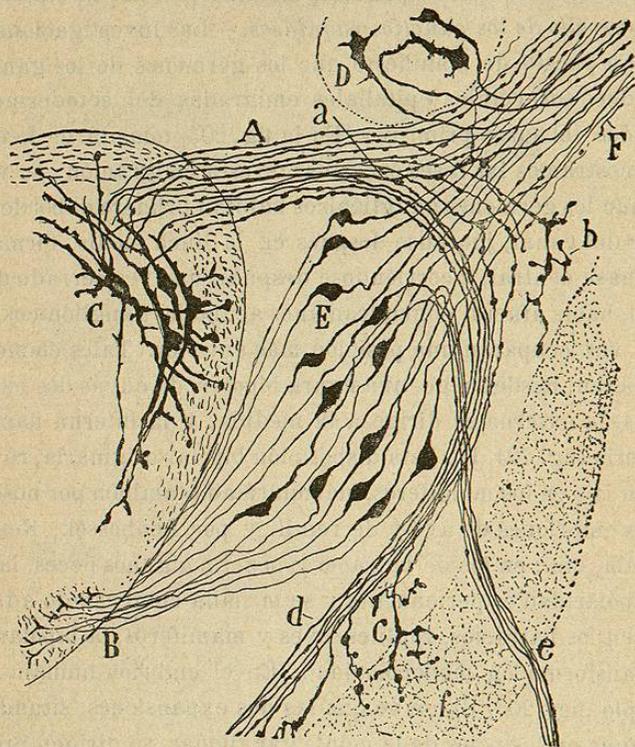


Fig. 204. — Corte de un ganglio raquídeo de embrión de pollo del quinto día de incubación. — C, médula espinal; E, ganglio raquídeo; A, raíz anterior; D, ganglio simpático; F, par raquídeo; *a*, *b*, fibras radiculares anteriores; *e*, ramo nervioso sensitivo; *d*, nervio motor.

lecular (*g*); 4.^a, fase de grano embrionario, en la cual la célula ha llegado ya á la zona de los granos (*i*, *j*). Este singular modo evolutivo ha sido confirmado por Lugaro, Retzius, Calleja, Athias y Terrazas.

Desarrollo de los ganglios simpáticos. — Las células de estos

ganglios proceden verosimilmente del ectodermo y exhiben originariamente, como ha mostrado Retzius, una figura en pera (fase de neuroblasto). Las expansiones protoplásmicas nacen mucho después que el cilindro-eje. En la fig. 197, que representa el ganglio cervical superior de un feto de ratón, se ven todavía células simpáticas casi exentas de expansiones, es decir, en estado de neuroblasto (fig. 197, D).

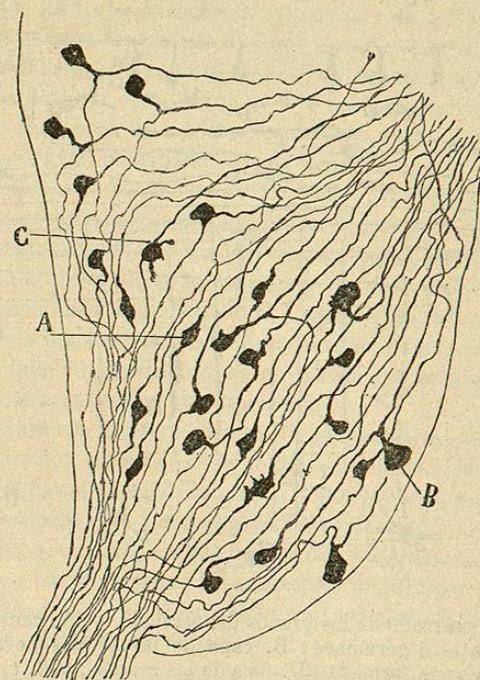


Fig. 205. — Fases de transición de la monopolaridad á la bipolaridad en un ganglio raquídeo del feto humano.

Formación de los tubos nerviosos. — Cada cilindro-eje crece y se estira á lo largo de los nervios ó de los sistemas de substancia blanca, y camina hacia la célula nerviosa ó extranerviosa, sobre la que debe extender su arborización terminal; y este fenómeno de crecimiento se verifica con admirable precisión, sin equivocaciones y revueltas, sin que se dé el percance de que una fibra muscular reciba dos tubos nerviosos distintos, ó que un cor-

púsculo glandular ó contráctil quede privado de arborización nerviosa terminal (fig. 204, b, c).

En un principio, los nervios encierran solamente cilindros-ejes desnudos, asociados por células neuróglícas, y cubiertos, de trecho en trecho, como las fibras de Remak, por corpúsculos alargados y nucleados. Estos corpúsculos peri-axiales representan una especie de células mesodérmicas, destinadas á proteger la fibra nerviosa, y á segregar quizá en torno de ésta la mem-

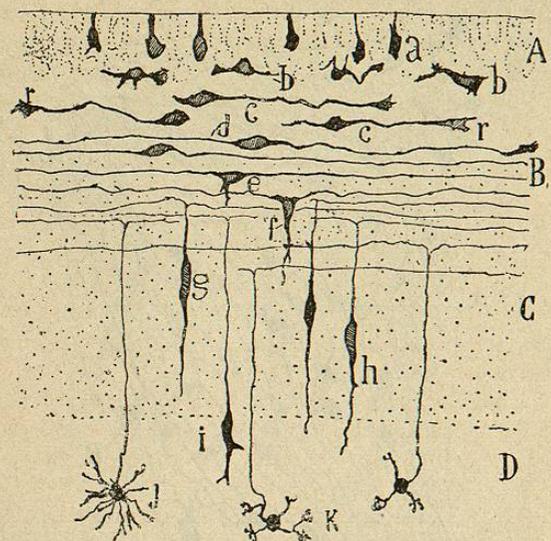


Fig. 206. — Desarrollo de los granos del cerebelo. — A, capa de las células indiferentes ó gérmenes; B, capa de las células horizontales; C, capa molecular ya formada; D, capa de los granos; a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, fases que recorre un grano en su evolución hasta llegar á la forma y posición de K que representa el corpúsculo adulto.

brana de Schwann y la cubierta de mielina. En las fibras de Remak, las células peri-axiales conservan indefinidamente su tipo embrionario, es decir, que ni segregan las gotas medulares, ni elaboran vaina de Schwann.

Preparación del tejido nervioso.—a) *Cordones nerviosos.*—Los tubos nerviosos medulares, así como las fibras de Remak, pueden demostrarse en los nervios, tanto por el método de disociación como por el de los cortes.

La disociación.—Cabe realizarse en fresco con ayuda de las agujas, ope-

rando rápidamente para que la preparación no se seque ni la mielina coagule. Pone de manifiesto este procedimiento las estrangulaciones de Ranvier, las cisuras de Schmidt ó de Lantermann y los núcleos de la vaina de Schwann. Pero los resultados serán mucho más demostrativos si la disociación se ejecuta en nerviecitos (el ciático de la rana, por ejemplo), fijados á favor de una maceración de seis á doce horas en el ácido ósmico (1 por 100). Para conservar estas preparaciones sin que la mielina se retraiga y arrugue al montarlas en glicerina, será conveniente fijarlas, antes de la disociación, con el alcohol absoluto.

El método de los cortes es también utilísimo, y se aplica de un modo especial á los nervios fijados por el ácido ósmico. Las secciones transversales, que deben ser muy finas (3 á 5 μ de espesor), mostrarán claramente la capa medular, el cilindro-eje y la vaina de Mauthner. Dicho se está que para lograr tan finos cortes, es de todo punto indispensable un buen microtomo y la inclusión previa en la parafina.

La demostración de las estrías de Fromann, así como del cemento de soldadura, exige la impregnación argéntica. A este fin, se disociará rápidamente un nervio vivo (el ciático de la rana, por ejemplo), y antes que la preparación se deseeque, se la lubricará durante dos ó tres minutos con una solución de nitrato de plata al 1 por 300. La reducción argéntica se obtendrá á la luz solar bajo una gota de agua. Estas preparaciones no se conservan bien en glicerina ni en el bálsamo, á consecuencia de las impregnaciones secundarias que sobrevienen.

Para las cisuras de Lantermann, conviene especialmente el método de Boberi: maceración por seis á doce horas de un nervio vivo en una mezcla, á partes iguales, de ácido ósmico al 1 por 100 y de nitrato de plata en igual proporción. Una vez realizada la disociación y expuesto el preparado á la luz, aparecerán negras las cisuras de Lantermann y los discos de soldadura, y pardos ó grises los segmentos mielínicos.

b) *Centros nerviosos.*—También caben aquí los dos métodos fundamentales de disociación y de los cortes.

Disociación.—Puede realizarse en vivo en las células de los ganglios espinales de los peces (raya y torpedo, por ejemplo), donde el tejido conectivo es blando y como gelatinoso. Pero casi siempre será ventajoso hacer preceder la disociación mecánica de una inyección intersticial de ácido ósmico, que fijará los elementos y permitirá, después de actuar el alcohol y picrocarminato, conservar la preparación en glicerina. Este método es también aplicable á los ganglios espinales de los mamíferos; pero aquí es más difícil obtener células aisladas sin menoscabo de sus expansiones nerviosas. Con todo, tales dificultades se aminoran mucho practicando la disociación, como aconseja Ranvier, en animales jóvenes (conejo de uno á dos meses, por ejemplo).

En la médula y cerebro, la disociación sólo se podrá conseguir de un modo satisfactorio, utilizando el procedimiento siguiente: sumérganse

pequeños trozos de substancia gris medular de buey en bicromato de potasa al 1 por 300 ó 500. Al cabo de tres ó cuatro días de maceración, se reducen aquéllos á pequeños grumos mediante las agujas, y se les agita fuertemente en un tubo cerrado que contenga una solución de picrocarminato. En los *detritus* que en el fondo del tubo se depositan, se hallarán hermosas células nerviosas y neuróglícas perfectamente aisladas. El procedimiento al alcohol al tercio de Ranvier, presta también con este fin buenos servicios.

Método de los cortes.— Es sin disputa el más importante, y se le combina siempre con procedimientos de coloración selectiva, entre los cuales conviene especialmente el de Nissl, el de Weigert-Pal para la mielina, el de Weigert para la neuroglia, los de Golgi y Cox para las expansiones de las células nerviosas, etc.

El preliminar obligado de todo procedimiento de teñido, exceptuando el de Nissl, es la induración en bicromato potásico.

He aquí cómo debemos proceder: Comiéznase por sumergir trozos de centro nervioso en una solución de bicromato al 3 por 100; la solución será abundante con relación á las piezas, y se renovará cada dos ó tres días en el transcurso de veinte ó treinta. En invierno será preciso elevar la dosis de bicromato, y prolongar el tiempo de maceración hasta treinta ó cuarenta días; en verano bastan veinte ó veinticinco. Una vez sacadas las piezas de esta solución, se lavarán en agua destilada para arrastrar el exceso de bicromato y se sumergirán tres ó cuatro días en alcohol fuerte, que se renovará dos ó tres veces, hasta conseguir una completa deshidratación.

Nada más fácil ahora que ejecutar cortes finos (hasta de una centésima) con microtomo. Estos cortes se lavan en agua destilada y se coloran con diferentes tintes, y por último se montan en bálsamo por los procedimientos corrientes.

En vez del bicromato solo, que nosotros usamos de preferencia, puede emplearse el líquido de Müller, y si se pretende una rápida induración, el líquido de Ehrliky. El formol al 10 por 100, mezclado al bicromato al 3 por 100, actuando durante ocho ó diez días, endurece también perfectamente.

Coloración de los cortes con picro-carminato.— Los cortes, sumamente finos, y procedentes de piezas induradas en bicromato, permanecerán de seis á doce horas en una solución al 1 por 100 de picrocarminato de Ranvier (véase la pág. 85). Después de un rápido lavado en agua, se deshidratarán en alcohol absoluto y se montarán en bálsamo. Los cilindros-ejes quedarán rojos, rosadas ó anaranjadas las células nerviosas, y totalmente incolora la mielina.

Análogos resultados se logran con la hematoxilina ó con la nigrosina. Todos estos agentes permiten seguir bien á través de los centros los axones gruesos cubiertos de mielina (que son los únicos que atraen el

color); pero no las fibras finas ni las porciones delgadas de las expansiones protoplásmicas. Por tal motivo, los métodos de coloración con carmín ó con hematoxilina, sólo se aplican al estudio de la topografía de los focos grises y de los haces voluminosos de substancia blanca.

Método de Nissl.— Tiene por objeto la demostración de los grumos cromáticos del protoplasma nervioso, y exige la induración exclusiva en alcohol ó en sublimado. He aquí el *modus operandi* simplificado:

1.º Trozos pequeños de centros nerviosos frescos, se endurecen por cuatro á ocho días en alcohol de 40º ó absoluto. Inclusión en celoidina.

2.º Los cortes que deben ser finos, se coloran por diez ó más minutos en una solución saturada ó muy concentrada de fuchina básica (Nissl), de azul de metileno β , ó de tionina (Lenhossék).

3.º Lavado de los cortes en alcohol de 40º, hasta que tomen un matiz azul claro (tionina) ó rosa (fuchina). También puede emplearse una mezcla de alcohol y de aceite de anilina (aceite, 10; alcohol de 96º, 90). Nosotros utilizamos exclusivamente el alcohol de 40º.

4.º Aclaramiento de los cortes en xilol, esencia de bergamota ó bencina.

5.º Traslación de los cortes al porta-objetos, donde se extenderán y se enjugarán (sin secarlos) con una hoja de papel secante. Montaje en damar ó bálsamo disueltos en xilol.

Utilizando como materia tintórea la tionina, los grumos cromáticos aparecerán de azul violado intenso, los nucleolos de azul oscuro, y la substancia blanca de azul pálido, casi incolora. A veces, al nivel de la mielina, la tionina colora en rojo heliotropo un precipitado laminar ó reticulado, acaso algún principio albuminoide coagulado.

Nissl da un procedimiento más complicado que el que acabamos de exponer; pero el *modus operandi* transcrito, además de sencillo, es segurísimo y proporciona espléndidas coloraciones.

Held añade una coloración de fondo al método de Nissl de la manera siguiente:

1.º Induración en alcohol ó inclusión en parafina.

2.º Los cortes finísimos, desparafinados y adheridos al porta-objetos, mediante el alcohol, se coloran en el siguiente líquido, que debe calentarse algo:

Eritrosina	1 gramo.
Agua destilada.....	150 —
Acido acético	2 gotas.

3.º Lavado en agua y coloración subsiguiente por algunos minutos en un líquido compuesto de una parte de solución de acetona al 1 por 20 y otra de solución concentrada de azul de metileno β .

Durante el teñido, el color debe mantenerse caliente hasta que desaparezca el olor de la acetona.

4.° Decoloración y deshidratación en alcohol, xilol y resina d'Amarr ó bálsamo.

Los grumos cromáticos quedan azules; el espongioplasma rosa; rojos el núcleo y membrana de éste; azul el nucleolo y violadas ciertas granu- laciones finas, esféricas, descritas por Altmann en el protoplasma ner- vioso.

Un buen método de coloración doble de las células nerviosas es el de Romanowski, del que hemos hablado en la técnica. Los grumos cromá- ticos quedan azules y las expansiones celulares y axones rosáceos.

Para teñir la mielina, debe aplicarse el método clásico llamado *de Weigert-Pal*, ya descrito en la técnica general (pág. 88). También podrá ser útil en ciertos casos el siguiente de Azoulay.

Método de Azoulay. — 1.° Cortes finos de piezas induradas en líquido de Müller, se recogen y lavan cuidadosamente en agua para arrastrar el alcohol.

2.° Inmersión por cinco á diez minutos en ácido ósmico al 1 por 500.

3.° Lavado rápido en agua.

4.° Inmersión, por cinco minutos, en solución de tanino al 5 ó 10 por 100.

Convendrá, durante la coloración, calentar este líquido hasta que apa- rezcan vapores.

5.° Lavado en agua abundante.

6.° Coloración de fondo con el carmín ó la eosina.

7.° Deshidratación y montaje en bálsamo.

Los tubos nerviosos exhiben color negro azulado, y las células se mues- tran incoloras ó morenas.

Método de Marchi. — Aunque sólo se aplica este método al estudio de las degeneraciones de las fibras nerviosas meduladas, su eficacia para el conocimiento de la Anatomía normal de la médula y cerebro, le hacen a creador á un lugar preferente en la técnica de la histología.

1.° Trozos de médula, bulbo, cerebro, etc., procedentes de animales en quienes, catorce ó veinte días antes de la muerte, se practicaron abla- ciones de substancia gris, separación de raíces nerviosas, sección de cor- dones de substancia blanca, etc., se induran por ocho días en líquido de Müller.

2.° Dichos trozos, que no deben ser muy espesos, se sumergen en una mezcla, á partes iguales, de líquido de Müller y de ácido ósmico al 1 por 100. Aquí permanecerán de seis á diez días.

3.° Lavado, por veinticuatro horas, en agua corriente para descartar por completo el ácido ósmico.

4.° Induración en alcohol, inclusión en celoidina y ejecución de cortes que, sin teñido alguno, se deshidratarán y montarán en bálsamo ó resina d'Amarr.

Los cortes mostrarán de color gris pálido las fibras meduladas norma-

les, y salpicadas de gotas negras de grasa aquellas otras que, por haber sido separadas de sus células de origen (mediante los traumatismos rea- lizados experimentalmente), han caído en degeneración grasienta. De este modo será posible seguir, á través de una serie de cortes, toda la lon- gitud de una vía nerviosa degenerada, estableciéndose sus conexiones.

La coloración de las finas expansiones, tanto protoplásmicas como nerviosas, de las células de la substancia gris, exige el empleo ya de las impregnaciones metálicas de Golgi, ya del método de Ehrlich al azul de metileno (azul BX).

Estos métodos han sido expuestos ya en las páginas 90 y 92. Aquí aña- diremos solamente algunos consejos para el mejor empleo de los mismos.

Método de Golgi. — Este método, es decir, el llamado *rápido* (indura- ción preliminar por tres ó cuatro días en la mezcla osmio-bicrómica), sólo da buenos resultados en embriones y animales recién nacidos ó de pocos días. Los objetos de estudio sobre que deberán ejercitarse prime- ramente los que se propongan dominar este importante recurso analítico serán: la médula del embrión de pollo desde el octavo día de la incuba- ción; la médula de ratón y de gato recién nacidos; el asta de Ammon del conejo común de quince á veinte días, la corteza cerebral y cerebelo- sa del conejo, rata ó gatos de quince días. Cuando se hayan obtenido buenas preparaciones en tales objetos, se pasará á los más difíciles, ta- les como la retina y el gran simpático adultos, las terminaciones nervio- sas periféricas, los plexos intestinales, etc.

En los objetos difíciles, y siempre que la primera tentativa de impreg- nación no haya coloreado sino escasas fibras nerviosas, se recurrirá á la doble impregnación. Muchos la emplean exclusivamente para todos los casos.

Como en cada impregnación suelen colorearse solamente algunas espe- cies de fibras y células, todo estudio formal hecho con este método se fundará en el examen de muchísimos cortes y de numerosas impregna- ciones del mismo órgano; porque las células ausentes de 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.

Método de Ehrlich. — En este método, el azul de metileno se hace lle- gar á las partes nerviosas, ora por inyección en las arterias del animal recién sacrificado, ora mediante lubricación directa reiterada de los ór- ganos puestos al descubierto (pág. 89).

En general, siempre que sea posible, se utilizará el procedimiento de inyección, porque altera menos los tejidos que la lubricación directa, y da fondos totalmente incoloros ó muy poco teñidos. Para orientar al principiante, vamos á exponer aquí dos ejemplos:

Supongamos que nos proponemos colorear con el azul los plexos nervio- sos del intestino delgado. Desde luego se escogerá un animal pequeño que