

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Anatomía e Histología Humanas



**VNiVERSIDAD
D SALAMANCA**

**ESTUDIO DE LAS TÉCNICAS DE IMPREGNACIÓN ARGÉNTICA DE PÍO DEL
RÍO HORTEGA. ACTUALIDAD Y VIGENCIA DE LAS MISMAS**

TESIS DOCTORAL

M^a Rosa Sánchez González

2017

A mis padres

A Chan

A mis hijos

*Quien más observa, más ve;
pero solo mira con reiteración y sin fatiga
el que hace de la ciencia histológica
un juego divertido;
un recreo para los ojos y para el espíritu.*

Arte y artificio de la Ciencia Histológica
Pío del Río Horteiga (1882-1945)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Francisco Collía director de esta tesis, su gran sabiduría, su eterna paciencia, su tiempo, su dedicación, su motivación y su buen criterio. Gracias por su generosidad al brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia científica en un clima de confianza y amistad, sin los cuales no hubiera sido posible elaborar este trabajo. Ha sido un privilegio poder contar con su guía y ayuda. Muchas gracias D. Paco.

Al Dr. Ortiz codirector de tesis, quiero agradecer su gran aportación en la realización de este trabajo. Así como al Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca por su colaboración, sin la cual no hubiera sido posible elaborar este proyecto. Muchas gracias.

Un especial y grato recuerdo para la Dra. Benito (Lorena), codirectora de este trabajo, por ayudarme a resolver mis dudas. Por sus consejos, por su cariño, por su ánimo y motivación constantes, por su extraordinario sentido del humor. Gracias por escucharme. Gracias por todos los buenos momentos.

Quiero mostrar mi agradecimiento al Prof. Dr. D. Eliseo Carrascal Marino en particular y a todos los profesores de la Unidad de Histología del Departamento de Anatomía e Histología Humanas en general, por el gran apoyo recibido, por poner a mi disposición todo lo necesario para la realización de este trabajo. Por todos los buenos ratos que hemos pasado juntos. Muchas gracias compañeros.

A la Dra. Belén Peláez y al Dr. José Luis Lanciego por su ayuda desinteresada proporcionándome importante material relevante para este trabajo. Muchas gracias.

Mención especial para Javier, mi maestro en el aprendizaje de la Técnica Histológica. Por su colaboración en la obtención del material de laboratorio necesario para la confección de este trabajo. Por transmitirme todo su conocimiento de los métodos y pequeños trucos de la Técnica Histológica. Muchas gracias compañero.

A Marta por estar siempre dispuesta a echar una mano en cualquier cosa. Muchas gracias Marta.

Vaya también mi agradecimiento para Angustias Pérez por su disposición para facilitarme amablemente cuanto fue necesario para la realización de este proyecto. Muchas gracias Guti.

A mis padres por darme la vida, por mostrarme el camino correcto. Por hacer que estudiara. Por todos los sacrificios que hicieron por mí a lo largo de su vida. A ti papá, que hace tiempo que ya no estás, ¡Cuánto te hubiera gustado ver esto! ¡Cuánto me hubiera gustado enseñártelo! Muchas gracias.

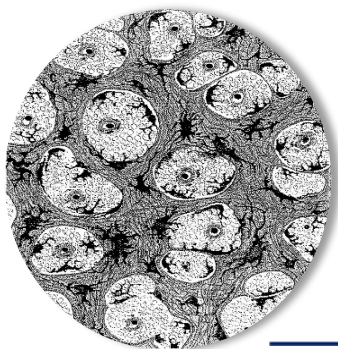
Este proyecto no fue fácil, pero me ayudaste hasta donde tu alcance lo permitía. Muchas gracias Chan.

A mis hijos, por llenar mi vida de grandes momentos y dichas. Por su comprensión y apoyo incondicional cuando las fuerzas flaquean. Sois el motor de mi vida. Muchas gracias Aida, muchas gracias Darío.

Con los hermanos hay que compartir, nosotros hemos compartido cosas muy importantes; padres, juegos, alegrías, tristezas, tiempo. He disfrutado con vuestros proyectos, con vuestros éxitos. Ahora quiero y debo compartir con vosotros este trabajo. Quien tiene un hermano tiene un tesoro, yo tengo dos tesoros. Muchas gracias Jose, muchas gracias Ángel Alberto.

A toda mi familia en general y a mis dos sobrinitas, Vega y Henar en particular por la alegría que me transmiten cuando estoy con ellas, por sus risas. Un especial recuerdo para mi tío José, Obispo Emérito de Sigüenza-Guadalajara, por darme siempre una segunda oportunidad.

A todos cuantos hicieron posible este trabajo, mi más generoso y profundo agradecimiento.



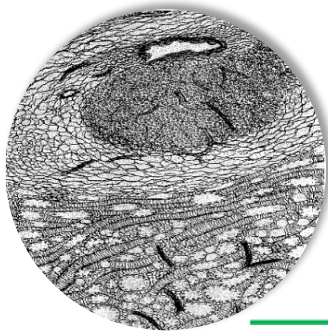
íNDiCE

íNDICE

i.	JVSTiFICACIÓN Y OBJEtiVOS.....	1
ii.	iNTRoDVCCiÓN.....	5
2.1.	EVOLUCIÓN DE LAS TÉCNICAS ARGÉNTICAS.....	5
2.1.1.	<i>Golgi</i>	7
2.1.2.	<i>Cajal</i>	9
2.1.3.	<i>Bielschowsky</i>	12
2.1.4.	<i>Achúcarro</i>	12
2.2.	EL MÉTODO DEL CARBONATO DE PLATA.....	14
2.2.1.	<i>Fundamento de la impregnación argéntica</i>	15
2.2.1.1.	Impregnación argéntica en dos tiempos.....	16
2.2.1.2.	Impregnación argéntica en un tiempo.....	16
2.2.1.3.	Argentafinidad.....	17
2.2.1.4.	Argirofilia.....	17
2.2.2.	<i>Desarrollo del método del carbonato de plata</i>	18
2.2.2.1.	Fijación.....	18
2.2.2.2.	Corte por congelación.....	18
2.2.2.3.	Impregnación.....	19
2.2.2.4.	Reducción.....	20
2.2.2.5.	Virofijación.....	20
2.2.3.	<i>Modificación de la electividad del carbonato de plata</i>	21
2.2.3.1.	Sensibilización.....	21
2.2.3.2.	Etanol.....	22
2.2.3.3.	Piridina.....	22
2.2.3.4.	Amoníaco.....	23
2.2.3.5.	Repetición de las impregnaciones.....	23
2.2.4.	<i>Aplicaciones del carbonato de plata</i>	24
2.3.	VIDA Y OBRA DE PÍO DEL RÍO HORTEGA.....	26
2.4.	TUMORES DEL SNC.....	36
2.4.1.	<i>Clasificación histórica</i>	37
2.4.2.	<i>Clasificación de Pío del Río Horteiga</i>	38
iii.	MATERiAL, MÉTODo Y RESVLTADoS.....	42
3.1.	PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DEL CARBONATO DE PLATA.....	42
3.1.1.	<i>Reactivos necesarios:</i>	42
3.1.2.	<i>Preparación del carbonato de plata:</i>	44
3.2.	ORiGEN Y PROCESADo DE MUESTRAS.....	45
3.2.1.	<i>Técnica fotográfica y procesado de la imagen.</i>	48
3.3.	TÉCNICAS DE CARBONATO DE PLATA. DESCRIPCIÓN.....	49
3.3.1.	<i>Técnica I. Coloración nuclear</i>	49
3.3.1.1.	Técnica I A. Fijación normal.....	49
3.3.1.2.	Técnica I B. Fijación acelerada.....	50
3.3.1.3.	Técnica I C. Fijación excesiva.....	50
3.3.2.	<i>Resultados</i>	50
3.3.3.	<i>Técnica II. Coloración núcleo-plasmática</i>	55
3.3.3.1.	Técnica II A.....	55

3.3.3.2.	Técnica II B.....	56
3.3.4.	<i>Resultados</i>	56
3.3.5.	<i>Técnica III. Tinción general</i>	59
3.3.5.1.	Técnica III A.....	60
3.3.6.	<i>Resultados</i>	60
3.3.6.1.	Técnica III B, C, y D. Para astrocitos protoplásmicos y fibrosos	64
3.3.7.	<i>Resultados</i>	64
3.3.8.	<i>Técnica IV. Coloración de la glía perivascular</i>	64
3.3.9.	<i>Técnica V y sus variantes</i>	65
3.3.10.	<i>Técnica VI y sus variantes. Coloración de los elementos del sistema retículo-endotelial</i>	65
3.3.11.	<i>Resultados</i>	65
3.3.12.	<i>Técnica VII y sus variantes. Para células nerviosas</i>	69
3.3.12.1.	Técnica VII A	69
3.3.12.2.	Técnica VII B	70
3.3.13.	<i>Resultados</i>	71
3.3.14.	<i>Técnica VIII. Coloración protoplásmica general. Panóptica</i>	72
3.3.15.	<i>Resultados</i>	73
3.3.16.	<i>Técnica IX. Para schwannomas</i>	77
3.3.17.	<i>Técnica X y sus variantes. Coloración de la neuroglía ganglionar</i>	77
3.3.18.	<i>Técnica XI. Para glioblastos neoplásicos</i>	77
3.3.18.1.	Técnica XI A. Para glioblastos, astroblastos y astrocitos neoplásicos.	78
3.3.19.	<i>Resultados</i>	79
3.3.20.	<i>Técnica XII y sus variantes. Coloración de la glándula pineal</i>	81
3.3.21.	<i>Técnica XIII. Para el retículo sincitial del timo</i>	81
3.4.	RETICULINA.....	82
3.4.1.	<i>Técnica de reticulina por el método de del Río Hortega</i>	82
3.4.2.	<i>Tinción de reticulina por el método de Gomori</i>	84
3.4.2.1.	Inclusión en parafina	84
3.4.2.2.	Desbastado, corte y rehidratación de la muestra.....	85
3.4.2.3.	Protocolo de tinción	86
3.4.3.	<i>Resultados</i>	88
3.5.	MICROGLÍA	93
3.5.1.	<i>Microglía por el método de del Río Hortega</i>	93
3.5.1.1.	Origen y procesado de muestras.....	94
3.5.2.	<i>Técnica histoquímica con lectinas para microglía</i>	96
3.5.2.1.	Origen y procesado de muestras.....	96
3.5.2.2.	Histoquímica para <i>Lycopersicum esculentum</i> (LEA)	97
3.5.2.2.1	Tinción de contraste	98
3.5.3.	<i>Técnica inmunohistoquímica para microglía Iba-1</i>	99
3.5.3.1.	Origen y procesado de muestras.....	99
3.5.3.1.1	Preparación de la solución de TBS	100
3.5.3.1.2	Preparación de la solución de TBST	100
3.5.3.2.	Protocolo inmunohistoquímico	101
3.5.3.3.	Técnica fotográfica y procesado de imagen	102
3.5.4.	<i>Resultados</i>	102
3.6.	ASTROGLÍA.....	106
3.6.1.	<i>Técnica inmunohistoquímica para astrocitos. PGFA</i>	106
3.6.1.1.	Origen y procesado de las muestras.....	106
3.6.2.	<i>Resultados</i>	107

3.7.	OLIGODENDROGLÍA.....	110
3.7.1.	<i>Golgi-Hortega</i>	110
3.7.1.1.	Origen y procesado de muestras.....	110
3.7.2.	<i>Resultados</i>	112
3.8.	TUMORES	115
3.8.1.	<i>Técnica VIII. Coloración protoplásmica general. Panóptica</i>	115
3.8.1.1.	Origen y procesado de muestras.....	115
3.8.2.	<i>Técnica inmunohistoquímica en tumores humanos</i>	116
3.8.2.1.	Origen y procesado de muestras.....	117
3.8.3.	<i>Resultados</i>	118
iv.	DISCVSIÓN	131
v.	CONCLVSIONES	143
vi.	LISTA DE ABREVIATVRAS.....	145
vii.	LISTA DE REACTIVOS	148
viii.	ANEXO	151
ix.	BIBLIOGRAFÍA	156



*i. JUSTIFICACIÓN Y
OBJETIVOS*

i. JVSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La fascinación por la estructura y función cerebral data de hace miles de años, su conocimiento ha dependido, al menos en parte, de las herramientas con las que se ha contado para desarrollar y amplificar sus sentidos. El ser humano ha recorrido un largo camino para desarrollar esas técnicas, y aún le falta mucho más. Parte de este avance radica en la solución de los problemas que estas mismas técnicas plantean y en conocer sus limitaciones. Conocer las técnicas, aunque sea de manera superficial, puede ayudar a valorar su utilidad y, no menos importante, ser consciente de sus limitaciones.

La observación es el primer paso del método científico, es importante para el estudio de las ciencias en general y de la Histología en particular, ya que nos ayuda a describir las estructuras que forman parte de un todo, incluyendo los componentes microscópicos. Por este motivo, el descubrimiento más importante para el desarrollo de la Histología fue el microscopio, que desde tiempos de Malpighi (1628-1694), Leeuwenhoek (1632-1723), Hooke (1635-1703), por citar algunos, se viene utilizando en el estudio de estructuras celulares y tisulares para el posterior estudio de órganos y sistemas (1-5).

El desarrollo de la Histología como ciencia ha requerido de los avances tecnológicos de cada época, así como del interés de los investigadores por conocer el porqué de las cosas y dar una explicación materialista de la conformación corporal. La Histología difiere de otras disciplinas científicas en que es una ciencia visual (6). Esta particularidad hace que, cuando nos asomamos al microscopio, veamos un paisaje en el que los elementos celulares y tisulares se disponen configurando una infinita variedad de cuadros pictóricos no exentos de gran belleza (7, 8).

La utilidad de las técnicas de tinción se basa en la capacidad de los colorantes para poner de manifiesto los elementos tisulares, al unirse selectivamente y con diversos grados de afinidad a unas u otras estructuras. Gracias a dichas técnicas lo invisible se convierte en visible. Se obtienen mezclas cromáticas variadas según el órgano, tejido o célula en cuestión, incluso un mismo tejido observado con diferentes métodos tintoriales nos proporciona imágenes dispares, no solo en cuanto a colorido se refiere sino también en cuanto a la morfología de los elementos que la componen (6). Pero la imagen histológica coloreada no deja de ser pura quimera, ya que las células, en general, carecen de color (9).

Las crecientes dificultades que para la resolución de los problemas histológicos ofrecían los métodos clásicos, fundados principalmente en la asociación policrómica de carmín, hematoxilina y distintas anilinas, obligó a los estudiosos del tema a desarrollar nuevas técnicas y a crear fórmulas originales más propicias para la investigación.

Entre los nuevos métodos de coloración figuraban, el de Cajal (1852-1934) al oro sublimado (10, 11) (para la astrogλία), el procedimiento creado por Robertson (12) para demostrar la mesogλία, basado en el empleo del cloruro de platino. En cuanto a la aplicación de las sales de plata figuran, las técnicas de Cajal (13, 14), Bielschowsky (15) y Achúcarro (16), con sus numerosas variaciones, y el método del carbonato argéntico de Pío del Río Hortega (17).

En un principio la técnica del carbonato de plata se mostró eficaz para el estudio de casi todos los tejidos y órganos en estado normal y patológico y, en especial, para la neuroglía, microglía, oligodendroglía y tejido conectivo. Sucesivas variaciones la hicieron útil para el estudio de las formas celulares y de muchas estructuras citoplásmicas granulosas y fibrilares. Todo ello proporcionó una profunda repercusión en la Técnica Histológica.

Sin embargo, a mediados del Siglo XX, de manera natural las técnicas argénticas empezaron a caer en desuso a la par del surgimiento de nuevas tecnologías de marcaje celular muy específicas (18). El número de trabajos que empleaban las impregnaciones argénticas se fue haciendo cada vez más escaso, debido a la aparición de métodos novedosos como la microscopia electrónica o el marcaje inmunohistoquímico, que dieron un nuevo enfoque al estudio del tejido nervioso. Se las etiquetó de caprichosas y de difícil manejo, por la facilidad con que la plata precipita, y al requerirse manos expertas para realizarlas fueron abandonándose poco a poco.

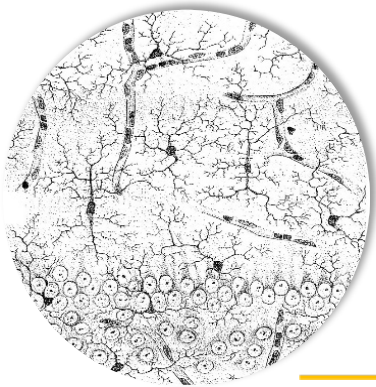
La atracción por la investigación y el conocimiento científico, los deseos de aprender los entresijos del cuerpo humano en general y del tejido nervioso y sus células en particular, unido al hecho de trabajar en el Laboratorio de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, nos ha llevado a plantearnos el estudio de las técnicas de impregnación argéntica de Pío del Río Hortega y demostrar que a pesar de su difícil realización, podemos obtener con ellas muy buenos y semejantes resultados a los obtenidos con otras técnicas de más fácil manejo.

Por todo lo expuesto anteriormente, para la elaboración de este trabajo nos hemos propuesto los siguientes objetivos principales:

1. Estudiar la eficacia y vigencia de las impregnaciones argénticas diseñadas por el Dr. del Río Hortega en el estudio de distintos tipos de tejidos, tanto normales como patológicos.
2. Estudio comparativo entre las técnicas de impregnación argéntica y las técnicas actuales, fundamentalmente inmunohistoquímicas, utilizadas para la demostración de tipos celulares en el estudio de los tejidos en general y del sistema nervioso en particular.
3. Revisión del impacto, que sobre la teoría celular y la Histología, tuvieron en su día y tienen actualmente las técnicas histológicas.

Además de estos objetivos consideramos conveniente la realización y consecución de otras metas si no tan importantes, igualmente necesarias en este tipo de trabajo como son:

1. Aplicar técnicas de impregnación argéntica y de coloración desarrollando habilidades y destrezas que permitan el uso adecuado de los materiales y el equipo técnico con la finalidad de optimizar, en la medida de lo posible, los resultados obtenidos.
2. Contribuir a fortalecer el desarrollo de la investigación científica a través del método experimental, así como a aumentar nuestros conocimientos de la técnica histológica.



ii. iNTRoDVCCiÓN

ii. iNTRoDVCCIóN

2.1. Evolución de las técnicas argénticas

La química de los colorantes contribuyó al avance de áreas científicas muy diversas, entre ellas la Histología. El histólogo utiliza una serie de colorantes para obtener imágenes de la morfología celular y tisular mediante microscopía. El estudio microscópico de los componentes y reacciones químicas que caracterizan los tejidos biológicos constituye la histoquímica, y se basa, en la utilización de colorantes muy específicos (19).

Paul Ehrlich (1854-1915, Premio Nobel de Medicina en 1908) realizó su investigación de doctorado sobre la teoría y práctica de la tinción histológica. Una de sus mayores innovaciones consistió en el uso de diferentes colorantes, como por ejemplo el azul de metileno o el indofenol para la tinción selectiva de distintos tipos de células (19-22).

Para el estudio del tejido nervioso se han ido diseñando técnicas, cada vez más complejas, las cuales han ido aportado poco a poco importantes descubrimientos tanto de su estructura, como de sus células.

La tinción del tejido nervioso era un problema difícil, debido, entre otras razones, a la elevada concentración de lípidos que impedía el uso de los colorantes polares habituales (19). Por entonces solo el carmín y la hematoxilina podían emplearse, aunque con muy pobres y totalmente insatisfactorios resultados, pues solamente se podía visualizar con ellas el cuerpo protoplasmático de las células nerviosas con sus núcleos, y muy poco del arranque o trayecto inicial de los apéndices dendríticos y nerviosos (23).

Inicialmente se utilizaron principalmente dos técnicas para la investigación del tejido nervioso. La primera de ellas consistía en la fijación, incrustación y corte del tejido, seguido por la tinción de las secciones con hematoxilina o carmín. Este procedimiento era adecuado para estudiar la estructura de otros tejidos, pero resultó ser deficiente para investigar el tejido nervioso, puesto que las imágenes que revelaba de las células nerviosas estaban incompletas (24). El tejido nervioso contiene una gran cantidad de lípidos, que no se unen a los colorantes de anilina polar utilizados para la Histología general. Los procesos celulares de los nervios son

delicados y están fuertemente empaquetados, lo que hizo que la resolución de las estructuras nerviosas fuera muy difícil para las microtécnicas que por aquel entonces se utilizaban (25). En las células nerviosas pequeñas, el núcleo aparecía rodeado por un estrecho borde de citoplasma (24), y en las grandes además del núcleo y el citoplasma solo mostraba los segmentos iniciales de las dendritas.

El segundo procedimiento consistía en la inmersión de bloques de tejido nervioso en soluciones de dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) o de ácido crómico (H_2CrO_4), que fijaban y endurecían el material (25). A continuación se procedía al aislamiento de manera mecánica de células nerviosas individuales, mediante agujas, bajo control microscópico (24, 26). Esta técnica tenía el mérito de revelar la mayor parte de la célula nerviosa, pero solo era aplicable a células nerviosas más grandes, y nunca permitió el aislamiento completo, ya que los segmentos terminales finos de los procesos dendríticos se rompían irremediablemente.

Es en la última década del siglo XIX y principios del XX cuando la Escuela Histológica Española alcanza su máximo esplendor. Y lo hace no solo por el entusiasmo de sus profesores y miembros de la misma que trabajan en las diferentes universidades, sino también debido a que es fácil y barata la dedicación a la nueva ciencia y descubrir a través del microscopio un mundo maravilloso totalmente desconocido (23).

Como escribe Cajal (1852-1934) *La Histología es ciencia modesta y barata. Adquirido el microscopio, el gasto se reduce a reponer algunos reactivos poco dispendiosos, y a adquirir, de vez en cuando, algunos trozos de material biológico, como por ejemplo una rana, una salamandra o un conejo* (27).

La Escuela Histológica Española tuvo desde el principio una guía escrita, como referencia para todos sus miembros, en la cual quedó reflejada la manera de expresar la ciencia histológica y el *modus faciendi* para descubrir la estructura de los tejidos vivos (23). Los primeros laboratorios que comenzaron a hacer cortes histológicos para observarlos al microscopio se ubicaban en la Facultad de Medicina de Granada con Aureliano Maestre de San Juan (1828-1890), cuando todavía era catedrático de Anatomía. Maestre organiza un laboratorio de aplicación a la ciencia histológica en el año 1860, denominado *Gabinete Histopatológico*, donde realiza las demostraciones microscópicas prácticas con la ayuda de un microscopio Nachet y un reducido material auxiliar para confeccionar preparaciones histológicas de los principales tejidos.

Pero el comienzo de lo que caracterizará la línea directriz de la Escuela Histológica Española, lo aporta Cajal hacia el año 1886, cuando siendo catedrático de Anatomía en Valencia (23) se da cuenta de que debe investigar sobre la estructura del sistema nervioso, explorándolo sistemáticamente con técnicas de anatomía microscópica.

2.1.1. Golgi

En 1873 Golgi (1843-1926) descubrió la *reazione nera* (reacción negra), como él la denominó. Este método se fundamenta en la formación de depósitos opacos intracelulares de dicromato argéntico ($\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), producto de la reacción entre el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y el nitrato de plata (AgNO_3) y consistía simplemente en la inmersión de la pieza a estudiar en una solución de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, que tras un tiempo de induración se trataba con soluciones de AgNO_3 (28). Esto supuso un gran avance para la investigación de la estructura cerebral. El resultado final consistía en la silueta de la célula nerviosa que aparece en toda su complejidad morfológica (cuerpo celular, dendritas y axón), con todas sus ramificaciones que podrían ser seguidas y analizadas a distancia del cuerpo neuronal. La gran ventaja de esta técnica es que, por razones que todavía se desconocen, el precipitado de $\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se deposita al azar solo en algunas células (normalmente entre el 1 y el 5%) (29), esta selectividad que a primera vista parecía ser un defecto, es una de las grandes ventajas de la tinción de Golgi. De hecho, para seguir el curso de una de las innumerables ramificaciones dendríticas, es necesario preparar secciones muy gruesas. Si la técnica hubiera impregnado todas las células nerviosas presentes en una sección, habría sido imposible seguir uno de esos procesos nerviosos individuales entre todos los demás. Por esta razón, Santiago Ramón y Cajal describió la tinción de Golgi como una microdisección (24) de algunas de las innumerables neuronas que componen el sistema nervioso central (SNC).

En la época en que Golgi descubrió su método, también eran ya conocidas las tinciones con AgNO_3 . En los años siguientes al descubrimiento de su método original de impregnación, Golgi introdujo modificaciones importantes. Una de ellas fue la adición de tetróxido de osmio (OsO_4) al $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (30), técnica más conocida como el método de Golgi rápido (31, 32). Otra variante fue la utilización de cloruro de mercurio (HgCl_2) en lugar de AgNO_3 para obtener la impregnación con mercurio metálico. A esta segunda variante, en 1891 Cox agregó el uso de cromato potásico (K_2CrO_4) después del tratamiento inicial con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ y HgCl_2 . Este procedimiento es conocido como el método de Golgi-Cox (Fig. 1)(33).

Con su método, Golgi llevó a cabo diversos estudios sobre la estructura histológica del sistema nervioso (cerebelo, bulbo olfatorio y médula espinal), la mayoría de los cuales publicó en revistas científicas italianas de poca circulación en otros países europeos (24, 29). No obstante, por la información hallada en diferentes referencias, es evidente que la técnica era conocida por varios de los científicos destacados de la época, tales como Kölliker (34, 35), Retzius (36), Ranvier y Simarro (37).

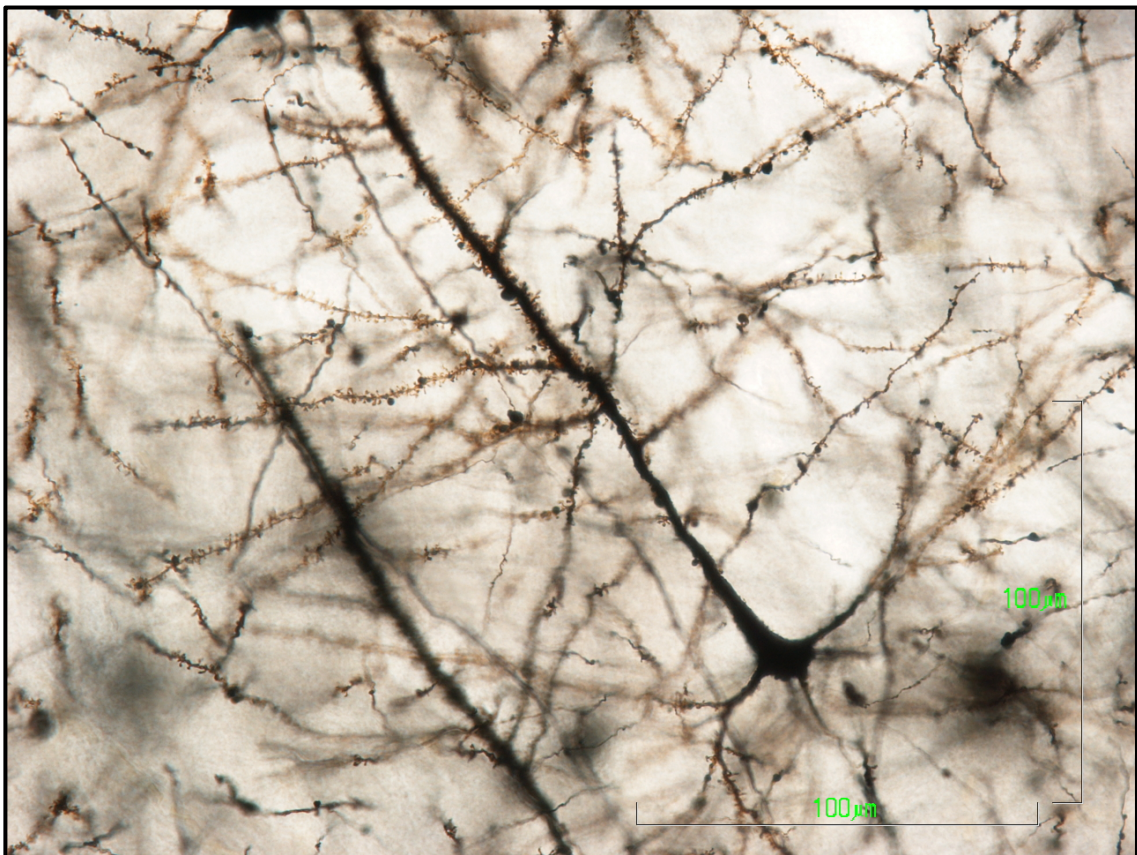


Fig.-1. Técnica de impregnación argéntica según el método de Golgi-Cox. Obsérvese la claridad con que aparecen teñidas las espinas dendríticas. Neurona piramidal en corteza cerebral de mono. 40x.

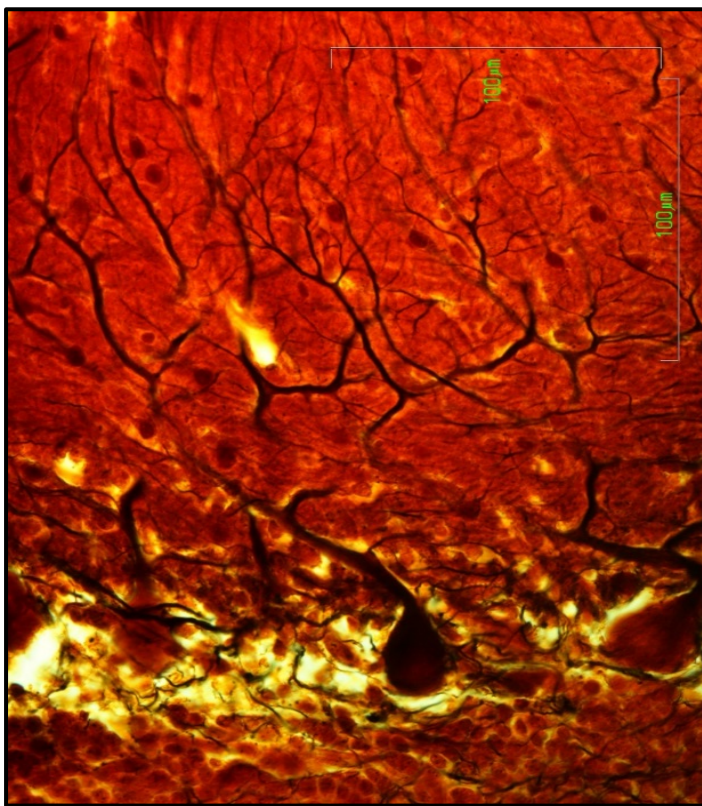
2.1.2. Cajal

En una visita a Simarro (1851-1921) en 1887, Cajal conoció la técnica de Golgi (35, 37-40), se entusiasmó con ella y le introdujo modificaciones que mejoraron enormemente la calidad de las imágenes de las preparaciones neurohistológicas (41). La principal de ellas fue el proceder de doble impregnación, es decir, la repetición de cada una de las etapas de inmersión del tejido en las soluciones utilizadas. También influyó que hubiera trabajado con cortes más gruesos para facilitar la observación tridimensional de todos los componentes neuronales.

Otro motivo de su éxito fue el haber utilizado material embrionario y de animales jóvenes, en lugar de comenzar directamente con los adultos (generalmente de cerebros humanos), como se acostumbraba en ese tiempo, pues la menor cantidad de mielina existente en el cerebro de animales jóvenes facilita la impregnación (34, 35, 38, 40). El descubrimiento de las espinas dendríticas realizado por Cajal en 1888 (42) con el método de Golgi constituye quizás uno de los mejores ejemplos de la influencia de los estudios de Cajal en la actualidad, y muestra que su genialidad consistió en ser un gran observador e intérprete de las imágenes microscópicas. Cuando analizaba una preparación histológica veía de forma clara detalles que muchos otros, que disponían de los mismos microscopios y de las mismas preparaciones, eran incapaces de interpretar (43).

Durante cierto tiempo, algunos autores de gran prestigio, como Kölliker, o incluso el propio Golgi, consideraban que las espinas eran artefactos producidos por el método de Golgi, como una cristalización en forma de agujas sobre la superficie de las neuronas y, por tanto, en sus dibujos las dendritas aparecían lisas, sin espinas. Este escepticismo también se debía a que en aquel tiempo las espinas dendríticas sólo se habían visualizado con este método. Sin embargo, Cajal propuso que las espinas dendríticas servían para conectar los axones con las dendritas y que representaban un aspecto morfológico fundamental que *conviene conocer porque acaso andando el tiempo alcancen trascendencia fisiológica* (44, 45). Como para Cajal las espinas dendríticas eran elementos clave en la estructura y función de las neuronas, utilizó otros métodos de tinción, principalmente el del azul de metileno de Ehrlich (28), para demostrar que las espinas no eran artefactos, sino disposiciones anatómicas reales (44). El estudio de las espinas dendríticas constituye una de las líneas principales de investigación actuales porque a) representan el principal sitio postsináptico en donde se establecen las sinapsis excitadoras, b) son elementos clave en la plasticidad del cerebro, y c) sus alteraciones constituyen el correlato anatomopatológico más consistente en diversos tipos de deficiencias mentales (7).

En 1903 idea el método del AgNO_3 reducido (Fig. 2), a partir de un método desarrollado y publicado en 1900 por Luis Simarro Lacabra (28), que permite estudiar la disposición interna de las neurofibrillas en las células nerviosas (46), los delicados filamentos de proteínas intracelulares dentro de axones y dendritas, y visualizar el cuerpo neuronal con sus prolongaciones fibrilares y su textura interna, lo que posibilitaba conocer detalles de la red neurofibrilar. Con este método de tinción, Cajal demostró que las neurofibrillas no constituyen un sistema fijo sino un armazón contráctil y transformable, bajo situaciones fisiológicas y patológicas (47). Con el AgNO_3 reducido, Cajal contribuyó de manera significativa al estudio de



la anatomía patológica, mediante investigaciones experimentales sobre la degeneración y regeneración del sistema nervioso, iniciadas entre 1905 y 1906, en el cenit de su prestigio científico. Inició estos trabajos estudiando, la degeneración y regeneración de los nervios periféricos (47). Utilizó piridina y pirogalol para controlar la tasa y la cantidad de depósitos de plata (25).

Fig.-2. Microfotografía de cerebelo de rata en la que se pueden apreciar neuronas de Purkinje. AgNO_3 reducido de Cajal. 4

En 1912 desarrolla el método de fijación del formol urano, cuya base era una solución de nitrato de uranio ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$) y formol (48) para la demostración del aparato reticular de Golgi en neuronas retinianas y otras células del sistema nervioso.

En 1913 desarrolla y utiliza el método, que ha creado, del oro sublimado (sublimado fue el término que se utilizó en aquel entonces para denominar a las soluciones de HgCl_2) para la impregnación selectiva de la astrogía (49), que permitió la demostración de astrocitos (Fig. 3). No está claro cómo llegó a desarrollar este método que combina cloruro de oro III (AuCl_3) y HgCl_2 . Puede haber evolucionado a partir de su experiencia con tonificación de oro, un proceso

introducido por Ranvier mucho antes. Este método permitía identificar los dos tipos de células neurogliales de la corteza cerebral, especialmente, los astrocitos protoplásmicos rebeldes a la tinción con otros métodos (47) y describir detalles como los pies chupadores de las células de la astrogía en la sustancia blanca de cerebros humanos.

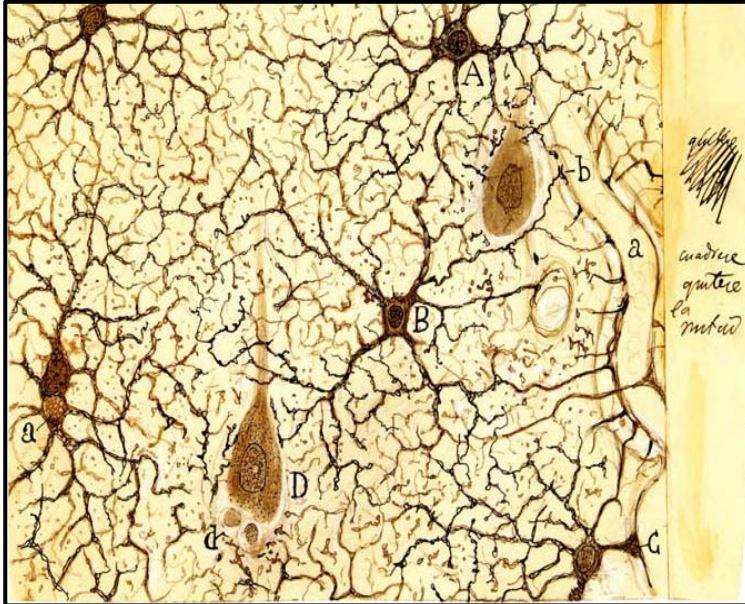


Fig.-3. Dibujo de astrocitos de Cajal (50). Trozo de un corte de la sustancia gris del cerebro de un hombre adulto. Coloración por el AuCl₃. A tipo neuróglico grande; B, tipo neuróglico más pequeño; C, pie inserto en un capilar; D, pirámide cerebral; a, capilar sanguíneo; b, pequeños pedículos perivasculares; d, células satélites no neuróglicas.

En definitiva, una de las virtudes fundamentales de las técnicas de Cajal fue su versatilidad y capacidad para introducir pequeñas pero significativas modificaciones en los reactivos de impregnación, fijadores o condiciones ambientales en las que se desarrolla la reacción (28).

El tremendo trabajo de Golgi y Cajal no sólo estimuló el uso del método de Golgi, sino también el desarrollo de otros métodos de impregnación argéntica.

2.1.3. Bielschowsky

Paralelamente a Cajal, Max Bielschowsky (1869-1940) desarrolló una técnica (15) en la que las piezas eran sumergidas sucesivamente, en un baño de AgNO_3 y en una solución amoniacal de óxido de plata. Esta técnica revelaba dendritas, axones y neurofibrillas y era aplicable especialmente al encéfalo humano y a sus lesiones anatomopatológicas. Este método es más reproducible que el método de Golgi y es aplicable al tejido fijado en formalina y embebido en parafina, pero al contrario que el método de Golgi tiñe todos los axones. El procedimiento de Bielschowsky es el responsable de los métodos modernos y de que Alzheimer pudiera describir en 1906 las características específicas de los ovillos neurofibrilares (51). Aunque se han hecho muchas modificaciones (52), los principios permanecen intactos. La primera etapa consiste en una impregnación inicial con AgNO_3 (a veces llamada sensibilización), que forma micronúcleos de plata metálica en el tejido. La segunda etapa consiste en convertir los micronúcleos en gránulos de plata metálicos visibles usando una solución de plata amoniacal como fuente de los átomos metálicos (53). Se han realizado modificaciones en la primera etapa que afectan a la especificidad de la tinción para diferentes tipos de células. Las modificaciones de la segunda etapa afectan a la velocidad de formación de gránulos de plata. La segunda etapa del procedimiento es paralela a los procedimientos de desarrollo fotográfico. La vinculación del conocimiento de la técnica fotográfica influyó en las decisiones de los investigadores en lo concerniente al desarrollo de la técnica micrográfica basada en la impregnación argéntica.

2.1.4. Achúcarro

Con el método del tanino (los taninos son ésteres de ácidos fenólicos y glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$), que abundan en muchas plantas, de sabor amargo y cuya fórmula general es $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_{11}$) y la plata amoniacal (16) (método tano-argéntico) (54) Nicolás Achúcarro (1880-1918) logró magníficos resultados en la coloración de la neuroglía (55) y en especial de la reticulina (16). La técnica consistía en la inmersión de las piezas en una solución de tanino que era ligeramente calentada, y posteriormente en un baño en la solución de plata amoniacal de Bielschowsky, con la que se obtenían mejores resultados (28), y con algunas modificaciones consiguió que la tinción mostrara las lesiones anatómico-patológicas de las células neuróglicas (48, 56-58). En el campo de las ciencias morfológicas uno de sus estudios de marcado relieve ha sido la descripción de las conexiones de la neuroglía de tipo fibroso con la pared de los capilares (59) mediante unos apéndices que se denominaron *trompas de Achúcarro* en honor de su descubridor y que hoy desgraciadamente todos llamamos pies chupadores (60). Pero ni esta, ni las técnicas anteriores,

permitían, sin embargo, el estudio del denominado *tercer elemento* (61), un tipo celular vislumbrado por Cajal, junto a neuronas y astrocitos, pero no definido en su constitución citológica. Achúcarro había realizado los experimentos necesarios para diferenciar la neuroglía de la neurona en calidad de célula independiente dentro del sistema nervioso, pero no tuvo tiempo para desentrañar su estructura completa, su génesis y su funcionalidad (48), pues murió a los 37 años a causa de la enfermedad de Hodgkin, que el mismo se diagnosticó leyendo un texto de patología médica, (62) al reconocer la descripción de sus propios síntomas.

Fue su discípulo del Río Hortega el que tomó el relevo de sus investigaciones (60), hasta descubrir el método del carbonato de plata amoniacal y desentrañar la incógnita del denominado por Cajal *tercer elemento*.

2.2. El método del carbonato de plata

En 1918 del Río Hortega descubre un nuevo método de impregnación argéntica que se obtiene agregando carbonato de sodio (Na_2CO_3) en solución, a una solución de AgNO_3 (17), para formar nitrato de sodio (NaNO_3) y carbonato de plata ($\text{Ag}_2\text{CO}_3 \downarrow$).

Químicamente se trata de una reacción de doble descomposición o intercambio del Na_2CO_3 y el AgNO_3 en NaNO_3 y Ag_2CO_3 , según el esquema: $\text{AB} + \text{XY} \rightarrow \text{AY} + \text{XB}$.

El nuevo compuesto es un precipitado de color amarillo claro, que se disuelve añadiendo H_3N gota a gota en cantidad suficiente (c.s.). El H_3N forma un complejo con el catión Ag^+ y el precipitado desaparece por completo, volviéndose totalmente transparente. También puede emplearse la piridina para disolver el precipitado, pero sin ventajas aparentes (63). La solución se completa con un volumen determinado de agua destilada, según se quiera obtener una u otra concentración.

Inicialmente, se obtuvo añadiendo a la solución de AgNO_3 una solución saturada de carbonato de litio (Li_2CO_3) (17, 64), que más tarde, Río Hortega, recomendó solo para la coloración de la neuroglía protoplásmica y de las fibras nerviosas, *debido a que el uso de este reactivo proporciona imágenes groseras*, que explica por el exceso de carbonato de litio (65).

El método del carbonato argéntico se basa principalmente en la fijación en formol para la mayoría de los tejidos o formol bromuro para la glía, cortes por congelación, lavado abundante en agua destilada e impregnación en carbonato de plata amoniacal a 45-50°C, reducción en formol, virado complementario en oro y fijación en hiposulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (tiosulfato) (17). A partir de estas premisas, Río Hortega introduce variaciones o reactivos que le permitieron observar la mayoría de los tejidos de la economía, pero sin duda, la aportación más importante del método del carbonato de plata fue el descubrimiento de la microglía y de la oligodendroglía, como veremos más adelante.

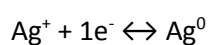
2.2.1. Fundamento de la impregnación argéntica

En Histología se denomina impregnación a toda coloración especial en la que se utilizan sales metálicas para originar precipitados en las estructuras tisulares, por tanto, no son en sí coloraciones en sentido estricto (66). El objetivo es precipitar plata metálica a partir de sus sales para conseguir que se deposite sobre los tejidos. El fundamento de la impregnación argéntica es similar al de la fotografía en blanco y negro, en esta los rollos van impregnados por bromuro de plata (AgBr) muy sensible a la luz y que por acción de esta, precipita parcialmente formando plata metálica. Al añadir pirogalol o hidroquinona, la sal no precipitada libera gran cantidad de partículas de plata que se asocian con las liberadas anteriormente, que actúan como núcleos de precipitación. Finalmente se añaden sales sódicas (tiosulfato) que forman complejos con la plata no reducida, estabilizando la imagen revelada e impidiendo la formación de nuevas imágenes (67). En los tejidos ocurre algo parecido.

Las células del tejido nervioso poseen numerosas estructuras citoplasmáticas electronegativas, que atraen por mecanismos electrostáticos a los iones de plata de la solución impregnadora cargados positivamente, por lo que las técnicas de impregnación argéntica pueden utilizarse como método para reconocer esas estructuras. El metal en solución salina se deposita en los elementos tisulares o celulares y forma un compuesto *metal-orgánico* para sensibilizar el tejido y luego la plata reemplaza ese metal. El resultado final es una imagen completa de la célula por ennegrecimiento de toda su superficie (66).

La sal argéntica más utilizada es el AgNO₃ porque tiene la propiedad de ser muy soluble en agua. El AgNO₃ en solución forma ion Ag⁺, o iones complejos tales como diamina de plata ([Ag(NH₃)₂]⁺NO₃⁻) (AgNO₃ amoniacal), que se forma por la adición de hidróxido de amonio (NH₄OH) a la solución de AgNO₃ (18, 68).

Su fundamento químico es que las sales de plata en solución son reducidas y se depositan sobre las estructuras celulares en forma de plata metálica (Ag). El catión Ag⁺ presente en la solución es reducido (Ag⁰) a plata metálica mediante transferencia de electrones (e⁻) desde las estructuras tisulares, según la siguiente semirreacción de reducción (69):



En el momento que la plata es reducida los constituyentes tisulares son oxidados (reacción redox), es decir que es necesario que exista una diferencia de potencial redox de la biomolécula que se quiere demostrar (69).

2.2.1.1. Impregnación argéntica en dos tiempos

La impregnación argéntica puede realizarse en dos tiempos mediante reacciones sucesivas para obtener plata metálica a partir de AgNO_3 (66). El método del carbonato argéntico sería un método de impregnación argéntica en dos tiempos, que utiliza Na_2CO_3 en lugar de NaOH (Bielschowsky) para precipitar el AgNO_3 , para posteriormente disolver el precipitado con H_3N y obtener carbonato de plata (muy inestable) (70), que se reduce al añadir formol, el cual capta oxígeno hasta precipitar la plata, dando como productos de reacción plata metálica y otros productos. Esta plata metálica es la que se deposita en los tejidos en forma molecular muy estable (67).

2.2.1.2. Impregnación argéntica en un tiempo

La impregnación argéntica en un tiempo consiste en la reducción directa y severa de la sal de plata a plata metálica a través de la acción de un agente reductor potente, que suele ser pirogalol o hidroquinona (Cajal) (66). Es una técnica más lenta que la impregnación argéntica en dos tiempos, porque el AgNO_3 es más estable que el carbonato de plata.

La reducción es debida en parte a la acción propia del tejido y a la de las sustancias reductoras como el formol, o a agentes físicos externos como la luz. Los grupos reductores son las proteínas (aminas libres, purinas, como la adenina y guanina), lipoproteínas (mielina), glicoproteínas, proteoglicanos (condroitín sulfatos y heparina), los filamentos intermedios como la proteína glial fibrilar ácida (PGFA), los neurofilamentos, queratina, y vimentina (71). La plata reducida por acción del formol da color pardo a negro a las estructuras de las células que fijan el catión Ag^+ .

2.2.1.3. *Argentafinidad*

Reducir significa convertir el catión Ag^+ en plata metálica. La propiedad que tienen algunos tejidos de reducir la plata en solución amoniacal a plata metálica, sin intervención de agentes reductores externos se llama argentafinidad (72). Esta propiedad es característica de determinadas granulaciones citoplasmáticas presentes en células cutáneas como los melanocitos, que secretan melanina, y en ciertas células de secreción endocrina presentes en el tubo digestivo y que reciben el nombre de células argentafines (73). La reducción de la plata amoniacal a plata metálica depende esencialmente del contenido en sus gránulos de secreción, por lo cual la imagen que aparece tras la impregnación es una imagen granular citoplasmática. El mecanismo que desencadena esta reacción no se conoce con exactitud, pero se cree que depende de la presencia de 5-hidroxitriptamina (5TH), que es convertida en tetrahydro-4-carbolina por el formol (67). Las células argentafines reducen el Ag^+ a Ag^0 después de fijarse con formol.

2.2.1.4. *Argirofilia*

La propiedad de los tejidos de atrapar los cationes existentes en una solución mediante reducción externa recibe el nombre de argirofilia. La plata metálica en forma de finos precipitados, tiene especial apetencia por depositarse en estructuras fibrilares finas y por superficies celulares dotadas de delgadas prolongaciones, tales como células de glía, neuronas, fibras reticulares del tejido conjuntivo, etc., en este tipo de reacciones, el tejido no interviene activamente en el mecanismo de liberación de la plata metálica a partir de su sal soluble. No todos los tejidos tienen idéntica apetencia por la plata, en ello influyen la carga eléctrica, la textura de las células (rugosidad superficial, presencia de prolongaciones o vellosidades, etc.). Por tanto, las células que son argirófilas reducen el catión Ag^+ a plata metálica después de ser expuestas a un agente reductor externo como la luz o el formol (73). A esta reacción se le llama argirofilia (18). La reducción de catión Ag^+ a plata metálica, la hacen los componentes tisulares y el formol en las reacciones argirófilas.

En las técnicas argénticas para tejido nervioso se usan distintos fijadores y mordientes que modifican el estado físico del tejido al coagular las proteínas y facilitar la permeabilidad y absorción por el citoplasma. Los fijadores son, entre otros, el formol, el etanol ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$), el tetróxido de osmio (OsO_4), piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$), los hipnóticos como el hidrato de cloral y el veronal introducidos por Cajal por su afinidad neurótropa. Cada uno le confiere a los constituyentes

celulares una particular apetencia por las sales de plata que puede incrementarse agregando un mordiente solo o asociado al fijador. Los mordientes más usados son la piridina, el bromuro de amonio (NH_4Br), el $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, el Na_2CO_3 , el carbonato de potasio (K_2CO_3), o el sulfato de sodio (Na_2SO_4) en solución alcohólica, y el formol que además es el fijador para tejido nervioso normal y tumoral y que además se comporta como reductor exógeno.

2.2.2. Desarrollo del método del carbonato de plata

El desarrollo de la técnica del carbonato de plata, sigue en líneas generales el utilizado tanto para las técnicas histológicas de rutina (73), como para los métodos de impregnación argéntica, sin embargo, y como es el caso que nos ocupa, vamos a describir las peculiaridades inherentes al método, para un correcto desarrollo de la técnica. El esquema es el siguiente:

2.2.2.1. Fijación

Como en el resto de coloraciones o impregnaciones, el tejido debe estar previamente fijado. El formol es un excelente fijador citológico que actúa sin perturbar las formas y estructuras celulares (53, 63, 66). La mayor parte de los fijadores permiten obtener buenas tinciones histológicas con carbonato argéntico, pero las impregnaciones del citoplasma de muchos tipos celulares se resienten con el empleo de fijadores no formólicos (66). Por esto, el fijador general para el método del carbonato de plata es formol al 10% (63). Para el tejido nervioso existen dos fijadores de elección que son el formol al 10% y formol bromuro de amonio (Cajal). Mediante el formol puede hacerse el estudio de las estructuras neuronales; mediante el formol-bromuro el de las células y fibras neuróglícas y la microglía, y con ambos los procesos patológicos degenerativos, inflamatorios y neoplásicos. La adición al formol o formol bromuro de nitrato de urea, piridina, H_3N e hipnóticos puede convenir a veces para las impregnaciones neuróglícas.

2.2.2.2. Corte por congelación

La mayor parte de los tejidos pueden seccionarse por congelación, método siempre preferible al de las inclusiones, tanto para las técnicas de coloración generales, como para la del carbonato de plata; pero si aquellos son de poca consistencia, puede efectuarse la inclusión en gelatina que permite realizar toda clase de tinciones histológicas, y muchas citológicas, con

carbonato de plata. La inclusión en parafina puede utilizarse para la coloración del tejido conectivo, pero sin ventajas sobre la gelatina (63).

2.2.2.3. *Impregnación*

La concentración del carbonato de plata varía según el objeto perseguido. Para la coloración histológica general, efectuada en caliente, es preferible utilizar la más débil; para la tinción nuclear y núcleo-plasmática, efectuada en frío, es más ventajosa la solución media; para las coloraciones específicas de micro y oligodendroglía, así como para la neuroglía fibrilar, suele ser de mayor eficacia la solución fuerte. A mayor concentración de la plata y a más elevada temperatura corresponde mayor rapidez, pero no mayor selectividad de la impregnación, en la que influyen, diversas circunstancias y además perdería finura. En general, se emplea AgNO_3 , en solución al 2% con algunas gotas de piridina para las dobles y triples impregnaciones (63). La impregnación en AgNO_3 al 10%, no ofrece mayores ventajas. Como mordiente debe actuar un mínimo de 15 minutos a 45-50° C y un máximo en frío de 48 horas. Por tanto, el método del carbonato de plata amoniacal ofrece la posibilidad de realizar la impregnación argéntica en frío, en caliente, y mediante dobles y triples impregnaciones de la siguiente manera:

En frío: Los cortes permanecen en el líquido argéntico hasta que empiezan a tomar color. El tiempo es variable y puede oscilar desde algunos segundos a 30 minutos o más. La tinción se efectúa en el reductor (formol).

En caliente: En este caso ocurre lo contrario, la tinción de los cortes se realiza en el baño argéntico, el reductor actúa reforzándola y dando relieve a las estructuras que selectivamente se han impregnado.

Doble impregnación: En la doble impregnación los cortes se sumergen primero en AgNO_3 , que actúa como mordiente, para conseguir que el carbonato se fije en determinadas estructuras.

Triple impregnación: Los cortes se sumergen en AgNO_3 , que actúa como mordiente, posteriormente entre el carbonato y el reductor hay un paso intermedio en AgNO_3 , Ag_2CO_3 o EtOH, con lo que se consigue realzar ciertas formas celulares.

2.2.2.4. Reducción

El formol es el reductor más adecuado de las soluciones argentícas amoniacaes. Sus efectos, sin embargo, están sujetos a variaciones relacionadas con su acidez y concentración. La acidez del formol se puede corregir con la adición de CaCO_3 a saturación (20, 53, 63, 66). Las diluciones neutras o ligeramente alcalinas reducen con mayor energía que las ácidas, pero pueden dar imágenes groseras y con precipitados. Las diluciones ácidas dan tinciones más pálidas y con menos contraste de las estructuras. La obtención de bellas coloraciones está supeditada a la reducción y, en especial, a la finura de las micelas argentícas coloidales. Es sumamente importante graduar la reducción mediante diluciones del formol o mediante lavados abundantes en agua destilada (adicionada o no de piridina o H_3N), en EtOH o en AgNO_3 piridinado, previos a la reducción, a fin de despojar a los cortes del exceso de carbonato que dificulta o quita electividad a la reducción. En un principio Río Hortega utilizaba formol al 20% neutralizado con creta (CaCO_3), sin embargo en la reducción no es absolutamente necesario y posteriormente se utilizó en concentraciones entre el 1-10% no neutralizado (63).

2.2.2.5. Virofijación

Opcionalmente se puede realizar el virado con cloruro de oro (AuCl_3). Con esto lo que se consigue es cambiar el color que resulta del proceso de reducción de la plata (color café, marrón o negra y el fondo dorado) al ser sustituida por depósitos de oro metálico, que son de color púrpura. El oro metálico se deposita en partículas más pequeñas y es mucho más estable que la plata metálica, y los cortes tratados con esta solución muestran un mejor contraste, claridad y nitidez de las estructuras y además se conservan mejor con el paso del tiempo (18), sin embargo este paso no es imprescindible. En el método del carbonato de plata (63), en general, se efectúa el virado de los cortes con solución de AuCl_3 al 1 por 600 cuando interesa destacar las estructuras granulares y fibrilares, a condición de que estén teñidas con suficiente intensidad. Por el contrario, en las coloraciones citoplásmicas débiles es perjudicial el virado en oro que hace desaparecer el color amarillo o rebaja en exceso el tono parduzco. Por último el $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ fija la reacción La fijación solo es necesaria después del virado.

fijador. El formol bromuro de amonio es el mordiente de elección para las coloraciones micro y oligodendrogiales en material fijado corto tiempo, y consiste en una hiperbromuración en caliente, antes de proceder al corte por congelación.

2.2.3.2. *Etanol*

El EtOH proporciona, en general, a ciertas estructuras mayor apetencia por la plata. Muchos tipos de células con citoplasma refractario a la impregnación, aparecen con precisión cuando se adiciona EtOH al líquido argéntico. Se pueden añadir 20 o 30 gotas de EtOH al AgNO₃, al carbonato de plata o a ambas soluciones, tanto si se usan en frío como en caliente. La adición previa de algunas gotas de piridina evita la ligera turbidez del líquido que puede producirse. El carbonato argéntico que baña a los cortes precipita en el alcohol, pero no el que ya está incorporado a la estructura, que se conserva; lo que permite mantener en él los cortes varios minutos sin que se pierda poder reductor. A veces conviene emplear EtOH más diluido, (60-80%) que evite la precipitación del carbonato, lo que se consigue también añadiendo al EtOH de 96% una gota de H₃N o dos de piridina. Pero en este caso actúa como diferenciador.

Otra manera de conseguir buenos resultados es el lavado de los cortes en EtOH de 96%, durante dos o tres minutos, previo al baño argéntico y a la reducción formólica. Este es el fundamento de la tinción núcleo-plasmática y de la mielina, cuya coloración es siempre favorecida por el EtOH (63). A veces, es útil lavar los cortes primeramente en EtOH rebajado o piridinado y después puro, y aun calentarlo algunos minutos.

La sustitución por acetona (con o sin H₃N o piridina) o por las mezclas de acetona-EtOH o EtOH-éter no ofrece ventajas.

2.2.3.3. *Piridina*

La piridina se combina con la plata liberada por el carbonato argéntico actuando como fijador y mordiente, lo que evita la precipitación rápida de la plata sobre los tejidos y la formación de espejo (75). Mediante la acción del calor a 56-60°C acelera el depósito de plata soluble, mientras que el frío a temperatura ambiente lo demora 24 a 48 horas.

Puede actuar como preparador de las tinciones, manteniendo los cortes en piridina pura o sus mezclas con agua y H₃N antes de la impregnación metálica. Los tejidos se ablandan, pierden sustancias solubles y quedan aptos para la mejor tinción del citoplasma. Los elementos del sistema retículo-endotelial son los más favorecidos por la acción de la piridina, pero también las estructuras nerviosa y neuróglia, sobre todo los astrocitos de tipo fibroso. Cuando se desee teñir astrocitos de tipo protoplasmático es preferible suprimirla.

Como modificador de la electividad de la tinción añadiendo de cuatro a seis gotas a las soluciones de nitrato y carbonato argénticos, a fin de favorecer la impregnación y evitar la formación de velo metálico cuando se calienta al segundo. La impregnación selectiva del tejido conectivo, de las epiteliofibrillas y de la neuroglía fibrilar puede lograrse añadiendo al baño argéntico 15 a 30 gotas de piridina.

Como diferenciador en las tinciones específicas para conectivo, añadiendo una o dos gotas al agua en el que hayan de lavarse los cortes antes de la reducción.

2.2.3.4. Amoníaco

El H₃N disolvente habitual del carbonato argéntico, en exceso perjudica a las tinciones, retardándolas. Constituye sin embargo, un recurso muy útil, para lavar y desplegar los cortes como preliminar de la coloración, mediante la mezcla de EtOH y H₃N (10 cm³ y 30 gotas, respectivamente). Actuando en caliente, es un buen preparador de las tinciones neurofibrilares, porque hace desaparecer en gran parte a la mielina (74).

Es útil para la sensibilización de las tinciones citoplásmicas, ya sea puro o diluido en agua, favoreciendo en muchos casos las tinciones neuróglia. En la diferenciación del tejido conectivo fibrilar, mediante el lavado en agua o EtOH con una gota de H₃N antes de la reducción, favorece la demostración de las más finas tramas conectivas (63).

2.2.3.5. Repetición de las impregnaciones

El método del carbonato argéntico tiene la ventaja de poder repetir las impregnaciones. Cuando después de seguir una técnica cualquiera que sea y controlar la coloración al microscopio, se aprecie que los citoplasmas o las estructuras citoplásmicas visibles se hallan

débilmente teñidos, es posible reforzar la impregnación repitiendo con rapidez todas o las últimas operaciones realizadas, según el siguiente esquema:

- ✓ Lavado rápido en agua destilada para eliminar parte del formol.
- ✓ Paso al carbonato de plata usado en la tinción, 15 a 30 segundos.
- ✓ Paso a formol al 1% o a alguno de los modificadores de la reducción (EtOH-piridina, AgNO₃-piridina, etc.) durante algunos segundos.

Si todavía quedasen pálidas las estructuras deseadas podrá repetirse aún la técnica, pero, en este caso, efectuando un previo lavado de los cortes en agua amoniacal y después destilada.

2.2.4. Aplicaciones del carbonato de plata

Según lo expuesto, las variaciones que ofrece el método del carbonato de plata son casi infinitas. Con un corto número de reactivos, combinados del modo adecuado, pueden realizarse múltiples técnicas y utilizarlas según queramos poner de manifiesto unas u otras estructuras celulares. En el siguiente esquema se sintetizan algunas de las posibles variaciones que podemos emplear en el desarrollo de la técnica:

- ✓ Empleo de preparadores y mordientes.
- ✓ Empleo de soluciones argentícas de diversa concentración.
- ✓ Adición de EtOH o piridina, en cantidad variable, al baño argéntico.
- ✓ Impregnación en frío o en caliente.
- ✓ Reducción, sin previo lavado, en formol al 1%, con o sin agitación.
- ✓ Reducción, previo lavado, en formol del 0,25 al 10%.
- ✓ Lavados diferenciadores antes de la reducción.
- ✓ No efectuar reducción formólica en los cortes teñidos.
- ✓ Doble impregnación en nitrato-carbonato o viceversa.
- ✓ Doble impregnación carbonato-alcohol-carbonato.
- ✓ Triple impregnación nitrato-carbonato-nitrato.
- ✓ Triple impregnación carbonato-nitrato-carbonato.

Mediante estas combinaciones y/o modificaciones, se obtienen buenos resultados en lo que respecta a las siguientes técnicas:

- ❖ Tinción nuclear selectiva para el estudio de la cromatina y del nucléolo.
- ❖ Tinción núcleo-plasmática para el conocimiento general de las formas celulares y de la arquitectura tisular.
- ❖ Tinción histológica general aplicable a toda clase de órganos y tejidos, tanto normales como patológicos.
- ❖ Tinción citoplásmica electiva para completar el estudio de la citomorfología.
- ❖ Tinción de las estructuras citoplasmáticas.
- ❖ Tinción especial de fibras nerviosas, glía fibrilar, mielina, etc.
- ❖ Tinción de las tramas conectivas de los tejidos y órganos, tanto normales como patológicos.

2.3. Vida y obra de Pío del Río Hortega

No queremos terminar este capítulo introductorio sin hacer alusión a la vida y obra del descubridor del método del carbonato argéntico, pues con su invención y aplicación a los diferentes tipos de tejidos celulares tanto normales como patológicos, aportó numerosos e importantes conocimientos a la Histología.

Para conocer su figura histórica y su obra científica es preciso tener en cuenta lo que comentó en 1942: *Tuve cuatro auténticos maestros. El primero, mi padre, que me enseñó a conducirme rectamente; otro D. Leopoldo López García, que me adiestró en los principios de la Histología. El tercero, Nicolás Achúcarro, que fue mi iniciador en las investigaciones neurológica. Y el cuarto, Santiago Ramón y Cajal, quien me enseñó a ser perseverante y a no renunciar a nada* (76).

Pío del Río-Hortega nació el 5 de mayo de 1882 en Portillo, pueblo de la provincia de Valladolid, en el seno de una familia de acomodados labradores. Realizó los estudios primarios en su pueblo natal y posteriormente en la capital cursó los estudios de bachiller. Desde 1899 hasta 1905 realizó la carrera de Medicina en la Universidad de Valladolid, obteniendo la licenciatura ese mismo año. Previamente en marzo de 1903 D. Leopoldo López García le había nombrado ayudante honorario de sus cátedras (Histología e Histoquímica Normales y Anatomía Patológica) y de su laboratorio (77). En la Facultad de Medicina de Madrid presentó su tesis doctoral titulada Etiología y anatomía patológica de los tumores del encéfalo, que obtuvo con la calificación de sobresaliente.

Sus primeros trabajos fruto de su Tesis Doctoral, que desarrolló, basándose en unas quince observaciones macro y microscópicas recogidas en su época de estudiante y que documentó en la Biblioteca del Ateneo y, sobre todo, en la del gran oculista vallisoletano D. Emilio Alvarado (78), comienzan a ser publicados en la revista local *La Clínica Castellana* en el año 1911 (79) y 1912 (80), cuando era profesor auxiliar de D. Leopoldo López García, en la Facultad de Medicina de Valladolid.

Su ansia de conocer a Cajal y Su Escuela le llevó en 1912 a viajar a Madrid (77). Se presentó a Tello en la Facultad de Medicina de San Carlos y conoció a Cajal que le dejó asistir a su laboratorio, sin embargo la relación con Tello era fría y decepcionante, por lo que decidió

presentarse a Achúcarro en el laboratorio de Histopatología del Sistema Nervioso creado por la Junta para la Ampliación de Estudios (JAE) en el Museo de Historia Natural. Achúcarro le recibió con total cordialidad ofreciéndole un puesto en el laboratorio. Así fue, probablemente como del Río Hortega empezó a familiarizarse con el método de tanino y plata amoniaca de Achúcarro, quien denodadamente investigaba para aclarar el origen y el significado de dos formaciones celulares que vagan por la glía y que recibían el nombre de células en bastoncillo y cuerpos granulo-adiposos. Por su parte, Cajal, en 1913, había descrito la presencia de unas células con pocas ramificaciones y que solo se tiñen con el método del formol-urano (81); estas células son el *tercer elemento* de los centros nerviosos, siendo las neuronas el primer elemento y la neuroglía astrocitaria y protoplasmática el segundo.

Más adelante viaja a París donde permanecerá durante ocho meses al lado de Maurice Letulle y Louis Auguste Prenant, perfeccionando sus conocimientos en Histología Normal y Patológica. Después se traslada a Berlín al Instituto Koch para adquirir práctica en técnicas bacteriológicas y de cancerología experimental, en especial trasplante de tumores en serie de ratones (82). Pero tuvo que regresar precipitadamente a España como consecuencia del comienzo de la I Guerra Mundial. A su vuelta a Madrid se encuentra con una grata sorpresa; el laboratorio de Achúcarro se había trasladado al Museo Antropológico donde se hallaba el Laboratorio de Investigaciones Biológicas de Cajal. Ambos laboratorios mantenían su independencia, pero el hecho de tener cerca a Cajal satisfacía con creces sus aspiraciones. Al lado de Achúcarro reanuda su trabajo consiguiendo una asignación económica, que posteriormente descubriría que procede del sueldo de este (83).

En un principio la actividad investigadora de del Río Hortega no tenía un fin concreto, se dedicaba a la exploración de múltiples tejidos, *pasando de una cosa a otra sin perseguir nada concreto y con la esperanza de encontrar algún detalle inédito (78)*.

En 1913 publicó sendos trabajos sobre la estructura del ovario (84) y del tejido muscular liso (85) que fueron realizados mediante aplicaciones del método del formol-urano de Cajal. Estos trabajos se publicaron también en francés (86, 87).

Por aquel entonces, Cajal acababa de crear su método del oro sublimado para la impregnación de la neuroglía lo que lleva a ambos laboratorios a ampliar sus investigaciones en torno a la arquitectura de la glía. Aprendió el nuevo método y lo convirtió en instrumento

habitual de su trabajo (82), lo que le permitió asistir a las conversaciones de Achúcarro con Cajal (77).

Sin embargo la obra de del Río Hortega tiene como punto de partida las enseñanzas y los métodos técnicos ideados por Achúcarro, a los que añadió nuevas mejoras, pero la obra de del Río Hortega es original porque aporta técnicas de microscopía y hallazgos científicos de primera magnitud en el conocimiento de las estructuras celulares del sistema nervioso (76).

Perfeccionó el método del tanino y plata ideados por su maestro que modificó hasta conseguir cuatro variantes distintas (76). En las publicaciones que realizó en 1914 a la vuelta de París y Berlín aplicó el método de Achúcarro del tanino y la plata amoniacal y en alguna de ellas el formol-urano, los métodos de Bielschowsky, Nissl, etc.(82).

En 1915 solo publicó un trabajo, pero la intensa dedicación a partir de ese año en el laboratorio de Achúcarro (era el único que se dedicaba exclusivamente a la investigación) le llevó a publicar en 1916 nueve trabajos, que corresponden a la transición entre su período de formación y su etapa de investigador original (82). Todos los realizó con las variantes del método de Achúcarro y estaban orientados a cuestiones neurohistológicas.

Con la primera variante de la técnica de Achúcarro, consiguió superar la heterogeneidad de los resultados, introduciendo reglas fijas que permitían la coloración constante del núcleo, el centrosoma de las neuronas y células neuróglas, las mitocondrias, las epiteliomiofibrillas, miofibrillas y otras formaciones. Consistía fundamentalmente en suprimir la reducción formólica en los cortes impregnados con plata amoniacal y en reforzar la tinción con AuCl₃ (88, 89) y la aplicó de manera sistemática a los centros nerviosos del niño, adulto y anciano normales, así como en enfermedades como la corea, la parálisis general, la meningitis y diversos tumores cerebrales (82).

Ortiz Picón afirma que del Río Hortega en este trabajo *ha sido el primer observador, quizá el único, que ha discernido con el microscopio óptico la verdadera configuración y recíproca disposición de los centriolos del centrosoma, al señalar que al lado de un centriolo baciliforme hay otro puntiforme (90).*

La segunda y tercera variantes tuvieron como finalidad la tinción del conjuntivo reticular (91, 92) y de las fibras colágenas, para lo cual, aconsejado por el propio Achúcarro, recurrió al

tanino en solución alcohólica, fijando con precisión su concentración y los tiempos de las distintas fases de la técnica. Con ellas realizó principalmente un trabajo en el que describió las diferentes formaciones conectivas que existen en los invertebrados entre los intersticios de las células epiteliales (82).

Más tarde dio a conocer una cuarta variante destinada a la coloración de la neuroglía protoplasmática, que utilizaba una solución de tanino y NH₄Br en agua destilada, una solución argéntica amoniacal diluida y reducción en formol previamente tratado con creta (93).

En 1917 descubrió su método del carbonato de plata amoniacal, de modo casual como sucede con los grandes hallazgos de la ciencia. Tras introducir las variantes de la técnica de Achúcarro, retomando la técnica original propuesta en 1903 por Bielschowsky, al óxido de plata amoniacal para la demostración de las neurofibrillas, desarrolló la técnica del carbonato de plata, estableciéndose así un paralelismo con las modificaciones que siete años antes había realizado sobre el óxido de plata Nicolás Achúcarro (82). La neuroglía se teñía con más selección y facilidad que con ningún otro método de investigación conocido hasta entonces (94). Del Río Hortega comprueba cómo le permite desvelar la realidad del *tercer elemento* de Cajal, que en el estudio de este último aparecía carente de prolongaciones. La persistencia de sus investigaciones le llevan a encontrar sutiles prolongaciones en las células del *tercer elemento*; no existían pues los corpúsculos apolares (54).

A primeros de 1918 comienza a vislumbrar el sentido de las células en bastoncillo (*Stabchenzellen*) y de los cuerpos granulo-adiposos de Achúcarro (77) y publica su método de impregnación argéntica (95). Una vez seguro de los resultados obtenidos, del Río Hortega duda en publicar sus hallazgos por temor a una réplica negativa de Cajal, sin embargo teme que un investigador extranjero pueda anticipársele, pues sus métodos ya han sido publicados. Por fin se decide aconsejado por algunos, no sin antes enseñárselos al maestro, la respuesta de Cajal fue inmediata: *Yo creo que hace usted afirmaciones demasiado atrevidas que van a ser motivo de grandes discrepancias. Prepárese a discutir* (78). Las relaciones con los miembros del laboratorio de Cajal no solo no mejoraron, si no que van de mal en peor. Mientras, continúa buscando variaciones a su método para encontrar el significado morfológico y funcional de lo que más tarde denominaría oligodendroglía.

Al poco tiempo, cierto incidente provocó que Cajal escribiera a del Río Hortega la famosa carta, en la cual le dice que no vuelva a poner los pies en el laboratorio, y como consecuencia,

su traslado a la Residencia de Estudiantes acompañado de varios de sus colaboradores, iniciando de nuevo sus investigaciones. Al parecer, el traslado del laboratorio de Histopatología al pabellón de la Residencia de Estudiantes (denominado *El Transatlántico*) supuso un buen cambio tanto a nivel personal, como profesional, pues como el mismo cuenta: *Como premio, con aquellas temperaturas de cero a doce grados las coloraciones marchaban bien y me daban motivos de alegría* (78).

Este método tuvo una profunda repercusión en los temas histológicos e histopatológicos que por aquel entonces se estudiaban. El método del carbonato argéntico proporcionó a del Río Hortega un gran número de nuevas adquisiciones histológicas, entre otras, un nuevo filón en Neurohistología Normal y Patológica, con la discriminación de la naturaleza, morfología, distribución y significación funcional del llamado por Cajal *tercer elemento* y que del Río Hortega pasó a desdoblarse en microglía (94) y oligodendroglía.

Dio a conocer su método en la revista de Cajal, en la sección de *Notas Técnicas*, con el título *Noticia de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglía y del tejido conjuntivo* (17), en ella ya hizo un examen de sus ventajas para la tinción de la neuroglía protoplasmática y fibrosa, las estructuras neuróglícas patológicas y los tejidos conectivo y muscular. Utilizó Li_2CO_3 porque ofrecía mayores ventajas que el Na_2CO_3 o el K_2CO_3 , sin embargo no fue capaz de discernir el motivo.

En una comunicación en el Boletín de la Sociedad Española de Biología (64) volvió a exponer el método, en la que ofrecía detalles aún más precisos del método, tarea a la que dedicaría gran parte de sus investigaciones a lo largo de los años siguientes. De esta forma, introdujo algunos reactivos como *preparadores de los cortes* antes de la coloración argéntica, ideó la denominada doble impregnación para la tinción rápida de las neurofibrillas y fibras nerviosas y diseñó modificaciones destinadas a la visualización de estructuras específicas, como el condrioma y los gliosomas, el conectivo reticular, las epiteliofibrillas, la microglía y otros elementos del sistema macrofágico (65, 74, 96-99).

Las ventajas que representaba el nuevo método fueron aprovechadas inmediatamente por del Río Hortega y en noviembre de 1918 publicó una comunicación titulada *Sobre la verdadera significación de las células neuróglícas llamadas ameboides* (100) demostrando que frente a lo que había supuesto Alzheimer y otros, la neuroglía astrocitaria no participaba en los procesos fagocitarios presentes en las inflamaciones y lesiones destructivas de la sustancia

nerviosa y que no procedían de ella las *células en bastoncito*, las *desescombradoras* y los corpúsculos granulo-adiposos. Del Río Hortega comprueba cómo el nuevo método le permite desvelar la realidad del *tercer elemento* de los centros nerviosos. Estas células en el estudio clásico de Cajal sobre la neuroglía aparecían carentes de prolongaciones y por ello apolares.

El *tercer elemento* es una variedad de glía con formas y funciones peculiares, una nueva forma celular en los centros nerviosos, una nueva célula. Del Río Hortega inicia una demostración de la microglía en las diferentes especies de mamíferos, confirmando su presencia en todas las que analiza, pero observa dificultades de tinción variables de unas especies a otras, siendo el sistema nervioso del conejo el más proclive a permitir impregnaciones y demostraciones más precisas de la microglía (101). Puso de manifiesto su difusión por todo el sistema nervioso, abundando más en la sustancia gris. Afirmó que la microglía está especialmente capacitada para fagocitar los productos de desintegración del tejido nervioso, según se deduce de su comportamiento en los casos patológicos. Mostró que cuando en estos últimos se pone en movimiento y entra en actividad fagocitaria, modifica su forma poco a poco y se transforma en células en bastoncito y cuerpos granulo-adiposos. Demuestra su origen mesodérmico y las características morfológicas y funcionales que la separan de la neuroglía, que es de procedencia ectodérmica, así como de las neuronas (102-105).

Poco a poco su fama científica mundial se acrecienta, de tal modo y manera que Bailey y Cushing, del Peter Bent Brigham Hospital de Boston, comienzan a interesarse por sus trabajos. Así mismo, sus técnicas y trabajos son introducidos en los laboratorios alemanes y austriacos. Se reforman y amplían las dependencias del laboratorio de la Residencia de Estudiantes (77) y en 1923 los investigadores alemanes Metz y Spatz introducen el término células de Hortega (*Hortegasche zellen*) para designar a la microglía (106). También acude al Laboratorio de la Residencia de Estudiantes el neurocirujano Wilder Graves Penfield para aprender los métodos del oro-sublimado y del carbonato argéntico. A su vez del Río Hortega recibe ofertas económicas para trabajar como neuropatólogo en el extranjero (78). Viaja a Latinoamérica para impartir un curso práctico de los métodos histológicos y ciclos de conferencias por varios países (107).

En 1921 presenta un trabajo titulado *Estudios sobre la neuroglía. La glía de escasas radiaciones (oligodendroglía)* (108) (el nombre de oligodendrocito proviene del griego *oligos* que significa pocos, y de *dendron* que significa árbol) también denominada glía interfascicular, dotada de escasas prolongaciones poco divididas, que no presenta relaciones íntimas con los vasos, pero sí con las neuronas, a las que siguen y rodean con sus prolongaciones. El problema

de los llamados elementos adendríticos, por tanto, del Río Hortega lo solucionó con el descubrimiento de la oligodendroglía, que fue el segundo de sus grandes hallazgos y para algunos autores el más bello e importante (90). Describió los tipos más sencillos de oligodendrocitos como pequeñas células de silueta redondeada, que difieren tanto de la microglía, como de la neuroglía conocida. Anotó que aparecía diseminada por todo el tejido nervioso, pero en mayor cantidad en la sustancia blanca, pero que todavía no era posible describir sus caracteres texturales (108). La dificultad residía en que todavía no había solucionado satisfactoriamente el problema de su tinción, que era insegura e incompleta, no solamente con los métodos del oro sublimado y del formol-urano de Cajal y los de hematoxilina de Nissl y Alzheimer, sino también con el mismo carbonato argéntico (82).

Del Río Hortega tuvo la idea de homologar los oligodendrocitos a la célula de Schwann (109), fundamentándolo en las características de abundancia y situación de vecindad. Cautivado por las graciosas formas de los oligodendrocitos, del Río Hortega trabajó con tesón para encontrar la solución al problema de la tinción. Este análisis duró cinco años, pues era preciso encontrar una nueva técnica que revelase certera y fácilmente todos los tipos de oligodendroglía, ya que los ensayos con el carbonato de plata no daban los resultados esperados. Utilizó el método de Golgi, debido a cierta similitud morfológica de algunos tipos de neurocitos, descritos por Ramón y Cajal con el método de Golgi, con la adoptada por los oligodendrocitos (95). Después de muchas probaturas con la mezcla formol-*dicrómica*, añadiendo sustancias hipnóticas, usadas en aquel tiempo por la Escuela de Cajal, llegó a una fórmula que le proporcionó excelentes coloraciones de todas las variedades de oligodendrocitos, con sus largas prolongaciones, pero no se cambió la denominación de los mismos, ya que estaba aceptada internacionalmente. La técnica, fundamentalmente, consistía en la fijación del tejido en una solución de $K_2Cr_2O_7$ e $C_2H_3Cl_3O_2$ en formalina, seguida de su impregnación con $AgNO_3$ (110), creando el conocido como método de Golgi-Hortega. Son muchos los científicos que han considerado este trabajo como el mejor trabajo científico de del Río Hortega (83, 90).

Las investigaciones de del Río Hortega sobre la glándula pineal y los blastomas nerviosos, constituyen el complemento de su magnífica obra sobre la neuroglía. Utilizando una variante de su método, pudo impregnar todas las modalidades de pinealocitos y demostró de una manera concluyente que solo existe un tipo celular en los lóbulos, al lado de la neuroglía fibrosa que modela el almacén, el cual exhibe una serie de prolongaciones protoplásmicas, en ocasiones de aspecto tuberoso, que terminan en un ensanchamiento en forma de maza (111-113).

En 1928 es nombrado jefe del Laboratorio de Histopatología del Instituto Nacional de Oncología “Príncipe de Asturias” lo que significó un profundo cambio en su trayectoria científica. Aunque continuó al frente del Laboratorio de la Residencia de Estudiantes, su línea neurohistológica quedó interrumpida siendo sustituida por los estudios cancerológicos.

Años más tarde y como consecuencia de la Guerra Civil Española, tiene que exiliarse en París y posteriormente decide viajar a Oxford donde es contratado como neuropatólogo del Departamento de Cirugía del Nuffield Institute, en la Radcliffe Infirmary. En febrero de 1939 en el Sheldonian Theatre de Oxford, del Río Hortega es investido Doctor Honoris Causa en Ciencias por la Universidad de Oxford (77), cuarenta y cuatro años después de que lo fuera Cajal en la misma Universidad (82). En junio es elegido Miembro Honorario del Senior Common Room del Trinity College de Oxford con una carta sobre normas y privilegios de que dispone por pertenecer a tan distinguido Cuerpo.

A partir de 1928, durante su época de Director del Instituto Nacional del Cáncer, estudió con su método del carbonato de plata, numerosos neoplasmas del SNC y periférico (SNP) y publicó varias monografías, profusamente ilustradas y bien documentadas con los hallazgos conseguidos (114-117). También aprovechó su método del carbonato de plata, en alguna de sus variantes para describir una serie de tumores meníngeos, que llamó meningoexotelomas (118), generados a partir del revestimiento celular externo de la leptomeninge. La obra de del Río Hortega sobre la histopatología de los tumores del sistema nervioso es importante, pero comparada con las investigaciones y descubrimiento de la microglía y de la oligodendroglía, supone un valor secundario en su obra científica, pues era genuinamente un histólogo, lo que hace que este tipo de investigaciones estén desconectadas de la patología clínica. Falta en su obra la correlación entre tipo histológico y curso evolutivo (90).

Por tercera vez en su vida una contienda bélica trastoca sus trabajos. En el verano de 1940 recibe una invitación para dar un curso de Histología e Histopatología del Sistema Nervioso, amparado por la Institución Cultural Española de Buenos Aires. El 3 de agosto acompañado de Nicolás Gómez del Moral, parte hacia Argentina (77). Allí se incorpora a trabajar en el Laboratorio de Histología Patológica del Hospital Oftalmológico de Santa Lucía invitado por el Dr. Balado, pero una diferencia de criterios en la investigación y el carácter terco y caprichoso de ambos sabios hace que la situación resulte insostenible, lo que provoca el abandono del Hospital por parte de D. Pío (83). Es nombrado Director del Laboratorio de Investigaciones Histológicas e Histopatológicas y crea la revista *Archivos de Histología Normal y Patológica*,

donde publica varios artículos sobre sus investigaciones de la neuroglía de los ganglios simpáticos (119) y sensitivos (120) iniciando una profunda investigación sobre las llamadas células satélites de las neuronas ganglionares. Demuestra con sus trabajos como aquellas presentan una disposición espiroidea que envuelve el cuerpo y las prolongaciones de las neuronas de los ganglios sensitivos y vegetativos y su carácter neuróglico, así como la descripción de las formas de transición entre estos gliocitos gangliónicos y las células de Schwann. Otros trabajos de esa época los dedicó al estudio de diferentes tumores del sistema nervioso (121-123), a nuevos estudios sobre los meningoexoteliomas y los oligodendrogliomas y detalles sobre los tumores del nervio y quiasma ópticos (124), desarrollando la labor que había comenzado en Oxford. Una parte de su trabajo en Argentina estuvo dedicada a la sistematización de su obra, a la que pertenece la revisión inacabada de su método del carbonato de plata (63, 101, 125, 126) y a su aplicación al estudio de la neuroglía fibrosa en las gliosis (127). Creó los conceptos de *angiogliona* y *neurogliona* (128) como unidades elementales de la glía, realizó una clasificación de las alteraciones celulares del sistema nervioso (129, 130) y una nomenclatura y clasificación de sus tumores (82).

A lo largo de su carrera científica publicó, además, muchos trabajos sobre la constitución de los diferentes órganos, como la constitución reticular del bazo (131), la fibrinogénesis en el hígado (132), de los cuerpos de Negri (133), del cartílago, etc. Otros que versaban sobre las células de Paneth (134), banda de cierre en los epitelios (135), células del apéndice vermiforme (136), etc.

Sobre las técnicas; todas excepto una nota sobre un nuevo método para la coloración del espiroquete de la sífilis (137) y otro sobre la impregnación férrica (138), son aportaciones que se basaron en la utilización del carbonato de plata.

Todo ello supuso la publicación de unos 130 trabajos originales, dentro de los cuales se incluyen varias comunicaciones, prólogos, ponencias a congresos, conferencias, etc. Algunos de estos trabajos fueron publicados en inglés y francés.

En definitiva, la obra científica de del Río Hortega constituye un brillante capítulo de La Escuela Histológica Española de principios del siglo XX. Supo ser maestro de sus discípulos a los que nunca regateó su tiempo (23). Tomaba como propios los trabajos de sus colaboradores e inculcaba en el novel investigador esperanza y entusiasmo cuando surgían dificultades (76).

En los trabajos de del Río Hortega merece especial atención la parte iconográfica, no olvidemos, que estuvo matriculado durante tres cursos académicos entre 1896 y 1900, en la asignatura *Dibujo de Figura* en la Escuela de Bellas Artes de Valladolid, y que consiguió un accésit de primer grado y algún premio (77), de modo que ilustra sus trabajos con infinidad de bellos e irreprochables dibujos y microfotografías. Se deleita en la apreciación del detalle, sin perder de vista lo panorámico. Prueba de ello es el valor que daba a la parte iconográfica: *Las publicaciones histológicas han de ser eminentemente objetivas. No basta hacer descripciones verbales; es preciso mostrar lo que se haya visto para que su interpretación adquiera un valor auténtico. Si por apasionamiento, prejuicio o ignorancia, que todo es posible, no acierta el autor a interpretar la significación verdadera de un hecho, su representación gráfica suministra al lector un medio para que efectúe su interpretación correcta. Por otra parte, si el idioma en que se expresan las ideas puede ser de comprensión difícil, el de las microfotografías y dibujos es asequible a todos. De aquí, que para difundir y divulgar los hechos de observación no haya lenguaje más expresivo, ni argumento más convincente que el de los hechos mismos o sus representaciones gráficas* (94).

Murió en 1945 en Buenos Aires, a la edad de 63 años (77) a consecuencia de un proceso tumoral maligno que el mismo se diagnosticó (82), al igual que su maestro Achúcarro.

2.4. Tumores del SNC

Aunque la literatura sobre el tema es bastante extensa, la clasificación de los tumores cerebrales no es más compleja que para otros órganos, el problema reside en la estructura del tejido nervioso, pues hay células de muy diversa estirpe, con muy diversas funciones (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células de Schwann, sanguíneas, etc.). Cada una de estas células da origen a diferentes tipos de neoplasias, por lo que la clasificación más que difícil es compleja (139).

El estudio de la oncología del tejido nervioso se inició con Bailey y Cushing (140) que designaron a los tumores cerebrales con el término gliomas y realizaron la primera clasificación de estos tumores, agrupándolos en catorce tipos, basándose en el tipo y *edad* histológica de la célula, relacionando por ejemplo, al llamado espongiblasto con el *espongiblastoma* o al astrocito con el *astrocitoma*; esta pues constituyó una clasificación con base histogénica, atribuyendo a determinado tipo de tumor, una fase del desarrollo embriológico. Una de las características especiales constituye el mantenimiento de una correlación anatomoclínica.

La aportación de Pío del Río Hortega a la neuropatología oncológica la inició en su época de Director del Instituto Nacional del Cáncer (118) Este aporte fue la base sobre la cual varios neuropatólogos iniciaron sus trabajos de investigación. Entre ellos destaca la figura de Dorothy Rusell (141) quien describe la microgliomatosis y posteriormente, publica su trabajo *Pathology of tumour of the nervous system* (142) que constituye una de las mayores fuentes de conocimiento acerca de las neoplasias del SNC.

Scherer en Alemania (143) plantea la diferenciación como origen de la malignidad de los astrocitomas y describe el glioblastoma secundario, tomando como punto de partida el comportamiento biológico de la lesión (144). Kernohan (145) afirma que los gliomas derivan de la transformación de células adultas y que pueden clasificarse según su malignidad. Propone una estratificación tumoral más simple, subclasificando las lesiones dependiendo de las alteraciones histológicas halladas, además de la anulación del glioblastoma como entidad independiente, para constituirlo en una forma de máxima malignidad de los astrocitomas (146).

Zülch, introdujo la separación entre los astrocitomas del cerebro y del cerebelo y elaboró una clasificación actualizada de los tumores del SNC, aceptada por la OMS en 1979 (147). En las

sucesivas publicaciones destaca el profundo análisis de la patología general de los gliomas y la correlación anatomoclínica, iniciándose con la colaboración de Kautzky el primer paso hacia la relación con la neurorradiología (148).

Cabe destacar además, a Escalona Zapata, discípulo de del Río Hortega. Escalona estudió una enorme cantidad de tumores aplicando los métodos argénticos de del Río Hortega y centró su interés científico en los astrocitos no tumorales incluidos en el seno de los tumores gliales. También dedicó atención especial a la estructura de los oligodendrogliomas, sobre los que cabe destacar su trabajo *Uncommon oligodendrogliomas* (149) en el que describe las variantes de citoplasma denso y eosinófilo que, poco tiempo después, fueron caracterizadas como oligodendrogliomas transicionales gliofibrilares, o *minigemistocitomas* (150, 151)

2.4.1. Clasificación histórica

Han sido muchas las clasificaciones de los tumores del sistema nervioso que se han propuesto a lo largo de los años. Cruveilhier fue el primero en clasificarlos, según sus hallazgos macroscópicos y los dividió en tumores grasos, óseos, carnosos, quísticos y melanosos, entre otros (152). Pero no fue hasta que Virchow describió la neuroglía, que se empezaron a mirar las lesiones del SNC desde un punto de vista microscópico (153-155). Fue el primero en usar el término glioma y estableció la diferencia entre los gliomas y los sarcomas dependiendo del grado de destrucción del parénquima cerebral. También hizo descripción de los tumores de la duramadre y los llamó psammomas porque estos contenían estructuras laminadas y calcificadas o cuerpos psamomatosos. Estos estudios se vieron apoyados con Bennett y Gogdle por sus hallazgos de gliomas en sus trabajos de autopsia quienes además, informan por primera vez de la operación de un glioma en 1884 (156).

Con las técnicas de tinción perfeccionadas por Ramón y Cajal, Bailey y Cushing (140), publicaron su clasificación de los gliomas describiendo la estrecha relación entre el tejido nervioso normal y el neoplásico y realizando una clasificación con enfoque histogénico.

Kernohan y Ringertz (145) en 1950 introdujeron sistemas clasificatorios para los gliomas, enfocados a criterios citológicos de cuatro grados en orden ascendente de acuerdo a la malignidad, sin embargo, no consideraban de manera particular algunas variantes neoplásicas, cuyo comportamiento biológico era diferente (157).

En 1979 la Organización Mundial de la Salud (OMS) publica la primera *Clasificación de Tumores del Sistema Nervioso Central* con la colaboración de Zülch (147, 158) que se simplificó en cuatro variables para aplicar el grado de malignidad de las lesiones neoplásicas astrocitarias, basada en la presencia de cambios morfológicos como atipia nuclear, mitosis, proliferación endotelial, necrosis, partiendo del grado I en ausencia de las mismas, hasta llegar al grado IV con la presencia de tres o cuatro criterios (159, 160).

En el año 2007 la OMS, con estudios de perfiles génicos y con la utilización de inmunomarcación para índices de proliferación celular, tales como el MIB-1 o Ki67, publica la última clasificación para tumores del SNC (161), en la que se realizó una nueva revisión introduciendo algunas entidades nuevas que encasillan neoplasias anteriormente denominadas inclasificables (162-164).

2.4.2. *Clasificación de Pío del Río Hortega*

Pío del Río-Hortega realizó una gran labor científica, desarrollando sus estudios sobre la anatomía patológica de los tumores cerebrales a partir de su nombramiento como Director del Instituto Nacional del Cáncer. Posteriormente, fue coeditor con Penfield del tratado *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* y escribió los capítulos sobre la glándula pineal (165) y la microglía (166). En 1933 presentó un extenso trabajo sobre la *Anatomía microscópica de los tumores del sistema nervioso central y periférico* en el Congreso Internacional de Lucha Científica y Social contra el Cáncer, que se celebró en Madrid y finalmente, en Buenos Aires, publicó su monografía sobre *Nomenclatura y clasificación de los tumores del sistema nervioso central y periférico* (116).

El método del carbonato de plata, fue el instrumento del que se sirvió del Río Hortega para desarrollar el gran aporte que hizo a la oncología del sistema nervioso. Algunos de estos trabajos y también su método, sirvieron de base a otros investigadores y aunque hoy día ya no esté vigente, consideramos adecuado exponer un breve resumen de la clasificación histológica que de ellos realizó (167).

Tumores de los órganos anexos al cerebro

A: Los que derivan de los repliegues coroideos, forman, generalmente, tumores de tamaño y configuración variables, que crecen por expansión en los ventrículos, unidos a los

plexos y apoyados en la superficie endotelial cuando son de tipo histológico benigno. Si son malignos pueden infiltrarse en el tejido nervioso siguiendo las vainas vasculares, propagarse difusamente a las meninges y producir metástasis medulares.

B: Los que se desarrollan en el espesor de la glándula pineal, constituyendo una ampliación atípica de su parénquima que determina un aumento del volumen del órgano y de evaginaciones homólogas del diencefalo originadas durante el desarrollo embrionario.

Tumores del parénquima nervioso

Los tumores que se desarrollan en el interior de los órganos encéfalo-medulares y en el aparato visual. Son los tumores propios del tejido nervioso y están constituidos por elementos derivados del epitelio neural, que se presentan bajo multitud de formas embrionarias, de transición y adultas. Son los tumores propiamente parenquimatosos, representados por neurocitos y gliocitos. El grupo comprende tumores de estirpe neuróglia como el glioblastoma, oligodendrocitoma, astrocitoma, astroblastoma, astrocitoma o el gliopitelioma y nerviosa como el neuroblastoma y el neurocitoma. La microglía como elemento mesodérmico es incapaz de formar tumores. No existen, pues, mesogliomas.

Tumores de estirpe simpática

Los tumores que radican en el *gran simpático* (167), que evolucionan en sentido propiamente nervioso y presentan estructuras más o menos aproximadas a las formaciones simpáticas ganglionares en sus diversas fases de desarrollo y con predominio de elementos indiferenciados o diferenciados. Son el simpatogonioma, simpatoblastoma, simpatocitoma.

Tumores de los nervios

Los tumores engendrados en las raíces nerviosas y en los nervios periféricos a expensas de células intersticiales o de células parenquimatosas, *De admitirse el carácter neuróglia de las células de Schwann, estos blastomas serían gliomas periféricos. De comprobarse, que tales tumores se originan a expensas de elementos peri o endoneúricos de estirpe mesodérmica, serían fibroblastomas* (167). Estarían en este grupo los gliomas del nervio óptico, neurinomas, neuromatosis visceral, neurofibromas, neuroma plexiforme y fasciculado.

Tumores de las cubiertas encéfalo-medulares

Los tumores originados en las cubiertas menígeas por proliferación de sus células propias o por neoformaciones vasculares. Admitida la equivalencia de la leptomeninge y del perineuro, los tumores de ambas formaciones deben ser teóricamente homólogos y ofrecer estructuras más o menos semejantes. Dentro de este grupo estarían el exotelioma, angioma y sarcoma.

Tumores hipofisarios

Los tumores que proceden de hiperplasias del parénquima glandular de la hipófisis y de gérmenes epidérmicos dislocados e invaginaciones parahipofisarias de la bolsa de Rathke. De estos tumores corresponden solamente a blastomas del sistema nervioso los de la región infundibular y lóbulo posterior de la hipófisis (167). Río Hortega cita a adenomas y epitelomas.



*iii. MATERIAL, MÉTODO
Y RESULTADOS*

iii. MATERIAL, MÉTODO Y RESULTADOS

Dada la naturaleza del presente trabajo, la realización de las técnicas hizo necesario utilizar una amplia variedad de animales de distintas especies, intentando ajustarse en la medida de lo posible a las sugerencias originales de del Río Hortega (65, 168, 169). Por tanto, en la redacción de este apartado se va a emplear una sistemática consistente en la enumeración del animal empleado acompañada de la técnica de que se trate para la demostración tanto de tipos celulares como de estructuras tisulares.

Del Río Hortega realizó numerosas contribuciones a la técnica histológica en general (98, 170) y la neurohistológica en particular (108, 171), pero sin duda el hallazgo clave sobre el que bascula la mayor parte de sus aportaciones, es el carbonato de plata (63, 101, 125, 126), por tanto parece lógico empezar este apartado describiendo la preparación de este reactivo y sus tres variedades fundamentales.

3.1. Protocolo para la obtención del carbonato de plata

3.1.1. Reactivos necesarios:

Nitrato de plata (AgNO_3) al 10%, carbonato de sodio (Na_2CO_3) al 5%, amoníaco (H_3N) en cantidad suficiente (c.s.) para disolver el precipitado, evitando el exceso y agua destilada (Fig. 4).

Nitrato de plata al 10%.

- ✓ 10 g de AgNO_3 .
- ✓ 100 mL de agua destilada.

En un vaso de precipitado de vidrio escrupulosamente limpio y tarado previamente, se pesan 10 g de AgNO_3 que se disuelven en agua destilada, se trasvasan a un matraz aforado de 100 mL y se enrasa con agua destilada.

Carbonato de sodio al 5%.

- ✓ 5 g de Na₂CO₃.
- ✓ 100 mL de agua destilada.

En un vaso de precipitado de vidrio escrupulosamente limpio y tarado previamente, se pesan 5 g de Na₂CO₃ que se disuelven en agua destilada, se trasvasan a un matraz aforado de 100 mL, y se enrasa con agua destilada.

Carbonato de plata solución débil D

- | | |
|--|--------|
| 1. AgNO ₃ al 10% | 25 mL |
| 2. Na ₂ CO ₃ al 5% | 75 mL |
| 3. H ₃ N | c.s. |
| 4. Agua destilada | 275 mL |

Carbonato de plata solución media M.

- | | |
|--|--------|
| 1. AgNO ₃ al 10% | 25 mL |
| 2. Na ₂ CO ₃ al 5% | 75 mL |
| 3. H ₃ N | c.s. |
| 4. Agua destilada | 100 mL |

Carbonato de plata solución fuerte F.

- | | |
|--|-------|
| 1. AgNO ₃ al 10% | 25 mL |
| 2. Na ₂ CO ₃ al 5% | 75 mL |
| 3. H ₃ N | c.s. |
| 4. Agua destilada | 25 mL |

Las soluciones tanto de nitrato como de carbonato de plata, se pasarán a un frasco de vidrio topacio y se guardarán en la oscuridad hasta su utilización para preservarlas de la luz, siendo preferible su preparación inmediatamente antes del uso.

3.1.2. Preparación del carbonato de plata:

En la preparación y obtención del carbonato de plata se utilizó única y exclusivamente material de vidrio.

En dos probetas escrupulosamente limpias y aclaradas al menos dos veces con agua destilada, se miden exactamente los mL de AgNO_3 al 10% y de Na_2CO_3 al 5% que nos indique la concentración que queremos preparar; es decir, débil (D), media (M) o fuerte (F).

Trasvasamos a un matraz Erlenmeyer, también escrupulosamente limpio y pasado dos veces por agua destilada primeramente, el volumen de AgNO_3 al 10% y luego el de Na_2CO_3 al 5%.

Se forma un precipitado lechoso de color amarillento (Fig. 5) que iremos disolviendo añadiendo H_3N gota a gota (Fig. 6) y sin dejar de agitar manualmente (Fig. 7) (quedará totalmente transparente) evitando el exceso de H_3N (no debe oler).

Una vez logrado esto se añaden los mL de agua destilada que nos indique la concentración deseada (D, M o F) y que previamente han sido medidos en una probeta en las mismas condiciones que las anteriores.



Fig.-4. Reactivos necesarios para preparar la solución de carbonato de plata amoniacal.



Fig.-5. . Precipitado que se forma al añadir Na_2CO_3 a la solución de AgNO_3



Fig.-6. Adición de H_3N gota a gota para disolver el precipitado que se ha formado.



Fig.-7. Viraje y aclaramiento del líquido argéntico.

3.2. Origen y procesado de muestras

Para la realización de las diferentes técnicas se utilizaron órganos y tejidos de varias especies animales según la disponibilidad o según fueran apropiadas para una u otra técnica, pues para la mayoría de ellas es suficiente con fragmentos de tejido que nos proporcionaron, diferentes Institutos, Departamentos y/o Servicios Universitarios, sobrantes de otros proyectos.

De todas las muestras se realizaron bloques de entre 3 y 5 mm de grosor.

Para la fijación de la mayoría de las muestras, a excepción de la microglía y oligodendroglía, se utilizó formol neutro, que se obtuvo añadiendo al formol comercial carbonato de calcio (CaCO_3) (53) a saturación durante unas dos semanas. Esto evita en cierto

modo la variable acidez del formol (66), perjudicial para la obtención de buenos resultados. En el momento de prepararlo se filtró con doble papel de filtro.

Los bloques fijados en formol neutro o salino al 10%, se pasaron antes de cortarlos por agua destilada abundante durante 10-20 minutos para eliminar los restos de formol y se cortaron con un microtomo de congelación marca Microm® HM 400 (Fig.- 8) a intervalos de 10-40 μm de grosor dependiendo de la técnica a realizar.

En algunas ocasiones resultó muy difícil obtener cortes por congelación directamente, por lo que se procedió a la inmersión del bloque en cuestión en agua destilada saturada de azúcar común con unos granos de timol, para evitar la formación de moho, durante al menos una semana. Pasado ese tiempo se procedió directamente a cortarlo de nuevo.

Al igual que para la preparación y obtención del carbonato de plata, para la realización de las diferentes técnicas se utilizó únicamente material de vidrio escrupulosamente limpio y pasado varias veces por agua destilada.

Para la mayoría de las técnicas, del Río Horteiga propone en los últimos pasos un virado en AuCl_3 al 1x500 (0,2%) y posterior fijación en $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al 5% (63), obligatoria si se realiza el virado, pero este es opcional; pues se basa en el cambio de color que resulta del proceso de reducción de la plata (color café, marrón o negra y el fondo dorado), al ser sustituidos los depósitos de plata por depósitos de oro metálico, que son de color púrpura al tratar el tejido con AuCl_3 . El oro metálico se deposita en partículas más pequeñas y es mucho más estable que la plata metálica, y los cortes tratados con esta solución muestran un mejor contraste, claridad y nitidez de las estructuras, que los que no han sido tratados con esta solución (18). Nosotros estos pasos no los hemos realizado porque resultaba bastante dispendiosa la obtención de AuCl_3 .



Fig.-8. Microtomo de congelación. La circulación de una corriente de anhídrido carbónico (CO₂) por el interior del portabloques provoca el enfriamiento del tejido. La cuchilla pivota sobre un eje fijo en cada sección o corte, originando el avance del portabloques mediante un mecanismo de tornillo (67).

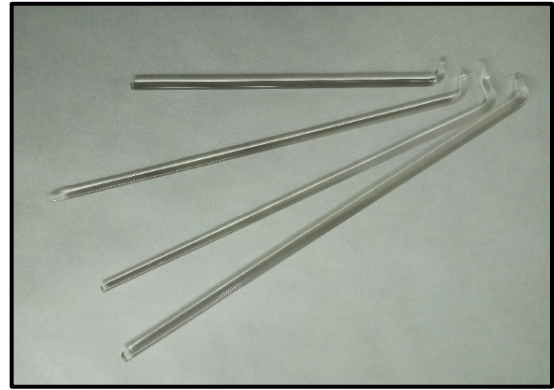


Fig.-9. Varillas de vidrio de diferentes formas y tamaños, elaboradas manualmente a la llama del mechero y utilizadas para trasvasar los cortes de tejido de unos pocillos a otros. La fabricación de estas varillas debe practicarse con sumo cuidado, pues el vidrio caliente tiene el mismo aspecto que el vidrio frío.

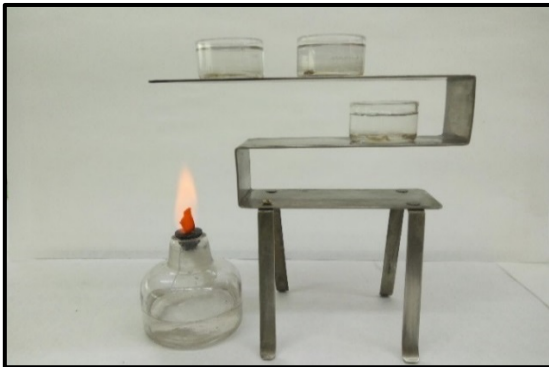


Fig.-10. Difusor de calor. Se utiliza en la impregnación argéntica en caliente para regular la temperatura de los pocillos, la cual varía dependiendo del lugar en el que se encuentren colocados.



Fig.-11. Coloración que toman los cortes una vez procesados. Dos de los pocillos de vidrio utilizados en la realización de las técnicas de carbonato de plata

Una vez realizada la técnica correspondiente se procedió a la deshidratación y montaje de los cortes ya impregnados que fue el mismo para todos, excepción hecha de la realizada para la oligodendroglía, y que pasamos a describir a continuación.

Los cortes se depositaron en una placa de Petri grande con agua destilada, se pasaron con la varilla de vidrio (Fig.- 9) a EtOH absoluto muy brevemente y luego otra vez al agua destilada, así se consiguió que se desplegaran y separaran unos de otros y poderlos recoger mejor para su colocación en portaobjetos, gelatinizados, para favorecer la adherencia de los cortes. Una vez los cortes en el portaobjetos, sobre un papel de filtro doblado varias veces se prensaron para eliminar los restos de agua superficial y para que quedaran bien adheridos.

Todo el proceso de deshidratación y aclaramiento se realizó en gradillas de tal modo y manera que se aplicaron los reactivos a cada corte individualmente, según el procedimiento habitual utilizado en nuestro laboratorio:

1. Pases por concentraciones crecientes de EtOH (70, 80, 90%) de 5 minutos cada uno.
2. Dos pases por EtOH absoluto de 5 minutos cada uno.
3. Cuatro pases por xilol de 5 minutos cada uno.
4. Montaje con DPX.
5. Observación al microscopio y fotografiado de los cortes.

3.2.1. Técnica fotográfica y procesado de la imagen.

Las imágenes microscópicas de las muestras histológicas se captaron utilizando una máquina fotográfica Nikon digital Sight DS-smc acoplada a un microscopio óptico Nikon Eclipse 90i, y digitalizadas directamente por un programa capturador de imágenes MetaMorph Meta Imaging Series 6.1. A continuación se almacenaron en un ordenador personal para proceder a su tratamiento posterior.

El proceso fotográfico para la obtención de microfotografías con microscopio láser confocal, de microglía y astrogía mediante técnicas inmunohistoquímicas con Iba 1 y PGFA, respectivamente, se describe en el apartado correspondiente a estos métodos.

3.3. Técnicas de carbonato de plata. Descripción

3.3.1. Técnica I. Coloración nuclear

Tanto en el material recientemente fijado como en el mantenido en formol durante mucho tiempo es fácil obtener la tinción nuclear con carbonato argéntico.

3.3.1.1. Técnica I A. Fijación normal.

Se consideró que la fijación era normal, porque solo habían pasado entre un mes y dos meses y medio desde la introducción del bloque en el líquido fijador hasta su procesamiento.

Se utilizó para la realización de esta variante hígado y riñón de conejo y cerebro y bulbo de cordero fijados en formol neutro al 10%.

1. Lavado de la pieza en agua destilada abundante durante 10 minutos para eliminar restos de formol.
2. Cortes por congelación de 25 μm .
3. Inmersión en agua destilada, a la que se le añaden unas gotas de H_3N , durante 10 minutos.
4. Lavado rápido en agua destilada.
5. Inmersión en frío de los cortes en solución M de carbonato de plata durante el tiempo necesario para que se realice la impregnación. Si el formol no se ha eliminado completamente, la impregnación será más rápida (63).
6. Reducción en formol al 1% efectuando ligeros movimientos para desplegar los cortes.
7. Paso a agua destilada.
8. Deshidratación y montaje.
9. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

3.3.1.2. Técnica I B. Fijación acelerada

Del Río Hortega proponía este tipo de fijación para biopsias efectuadas durante intervenciones quirúrgicas, no era el caso y por razones obvias esta técnica no se realizó.

Para este tipo de fijación se hierve el tejido en formol al 10 % durante 1 minuto o 2. Otro modo de realizarla es introducir la muestra en formol al 10% a 60°C en el que permanecerá durante 1 hora.

3.3.1.3. Técnica I C. Fijación excesiva

Se consideró que la fijación era excesiva, porque había pasado más de un año desde la introducción del bloque en el líquido fijador hasta su procesamiento.

Se utilizó para la realización de esta variante cerebro de cerdo fijado en formol salino al 4% durante varios años.

1. Lavado de la pieza en agua destilada abundante durante 10 minutos para eliminar restos de formol.
2. Cortes por congelación de 25 µm.
3. Recogida de estas secciones en agua destilada.
4. Inmersión en agua amoniacal durante 5 a 10 minutos.
5. Lavado rápido en agua destilada.
6. Inmersión en formol 1/200 durante 1 minuto aproximadamente.
7. Inmersión de los cortes en solución M de carbonato de plata durante 15 a 20 minutos.
8. Reducción en formol al 1% con ligera agitación.
9. Paso a agua destilada.
10. Deshidratación y montaje.
11. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

3.3.2. Resultados

El tono gris de los cortes denota impregnación insuficiente e indica tinción nuclear granulosa. En las buenas coloraciones los cortes deben tener color grisáceo-amarillento o parduzco que corresponde a núcleos con matices diferentes en la gama del amarillo oscuro al pardo. Puede aparecer el carioplasma sembrado de gránulos coloidales, tanto más visibles

cuanto más incompleta es la reacción, pero si ésta es satisfactoria el aspecto granuloso desaparece, presentándose netamente la masa cromatínica y los nucléolos, El protoplasma de numerosas células, en especial mesodérmicas, puede presentarse teñido débilmente, pero en forma que no basta para observar sino algunos de sus caracteres. El tono amarillo que ofrecen desaparece con el virado en oro, por lo que éste no debe efectuarse cuando se desee conservarle.

La obtención de una imagen conjunta de los elementos histológicos que permita apreciar bien la arquitectura de los tejidos puede conseguirse mediante la introducción de alcohol en la técnica. Éste reactivo posee la propiedad de hacer que el carbonato de plata se incorpore y fije al protoplasma de las células haciéndole visible a la vez que a los núcleos. Sus efectos varían según se emplee antes, durante o después de la impregnación metálica, pero siempre se revelan por el aumento de visibilidad de las formas celulares.

El AgNO_3 tiende también a fijarse en los protoplasmas, pero en forma inaprovechable por su ineficiente reductibilidad con el formol. En cambio, puede servir de base a la impregnación inmediata con carbonato argéntico, cuyas propiedades modifica cuando actúa entre él y el formol.

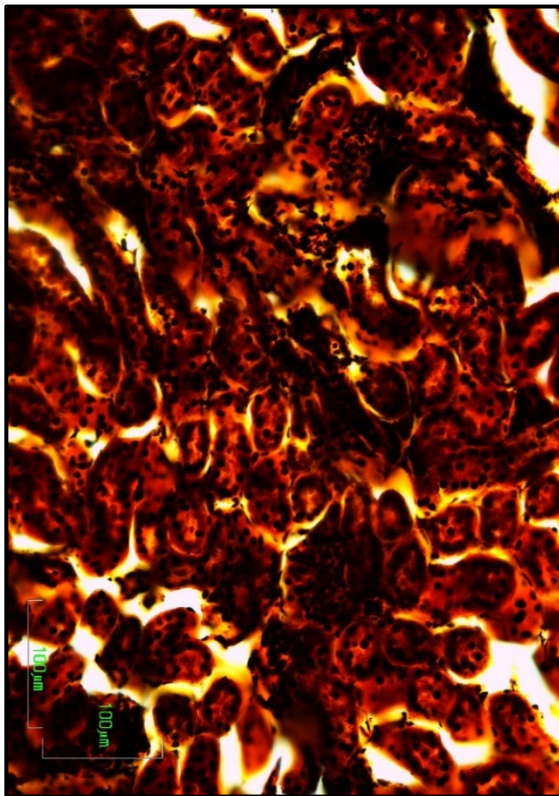


Fig.- 12 (20x)

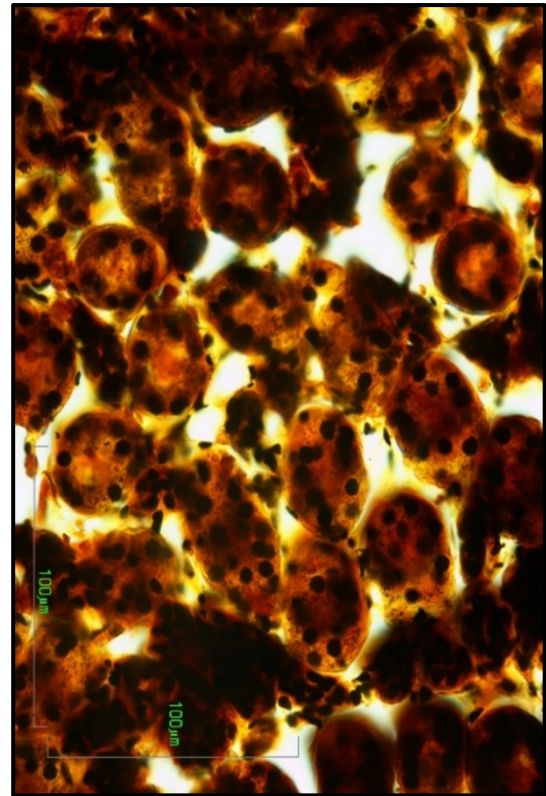


Fig.- 13 (40x)

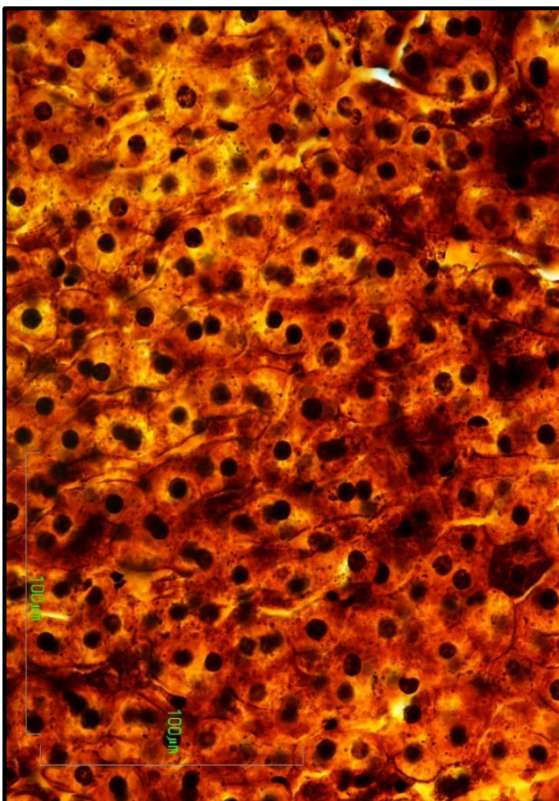


Fig.- 14 (40x)

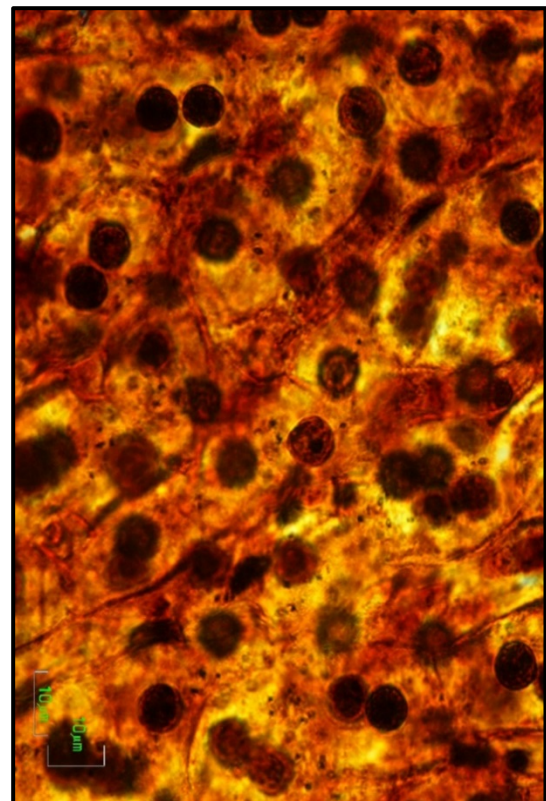


Fig.- 15 (100x)

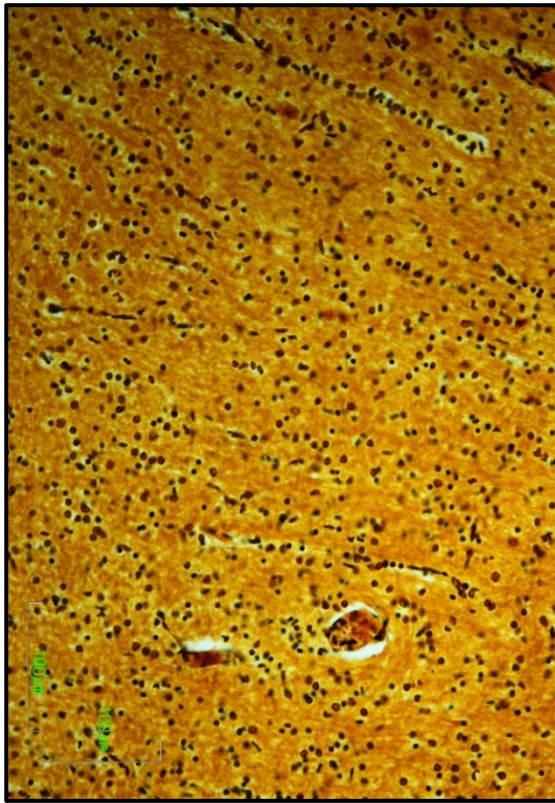


Fig.- 16 (20x)

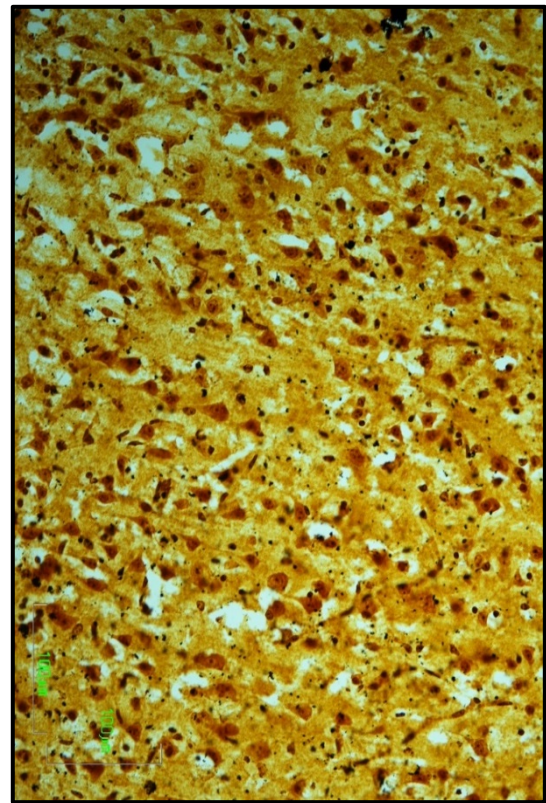


Fig.- 17 (20x)

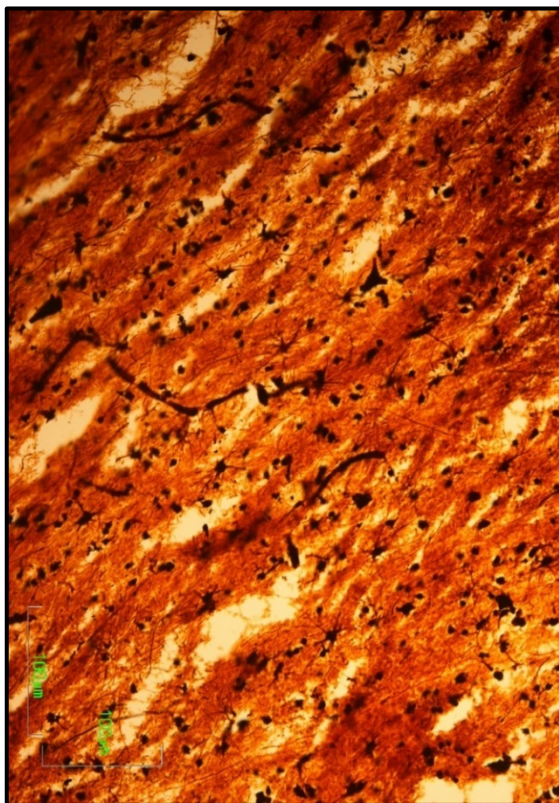


Fig.- 18 (20x)

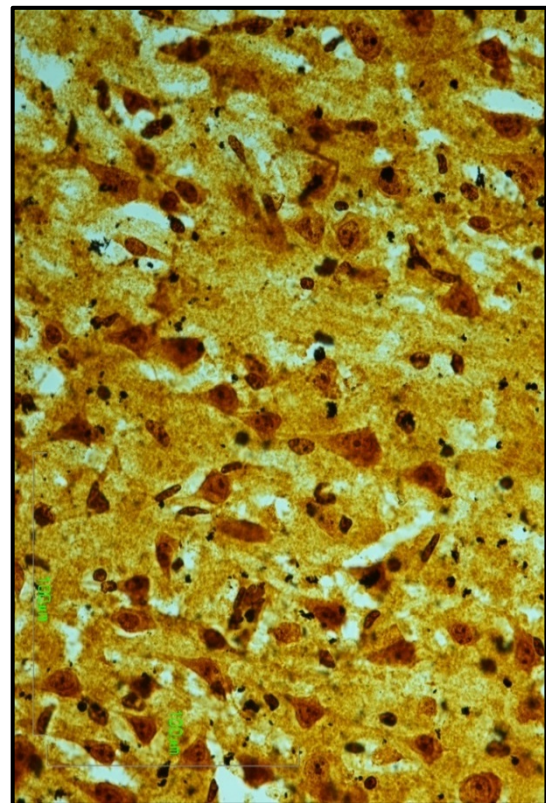


Fig.- 19 (40x)

- Fig.-12. Microfotografía en la que se puede apreciar el detalle de la arquitectura tubular renal. Técnica I A, fijación normal. Riñón de conejo. 20x.
- Fig.-13. Microfotografía a mayor aumento donde se observa la citología de los túbulos renales constituida por células cúbicas, se tiñen los núcleos y en ocasiones granulaciones citoplasmáticas que podrían corresponder al sistema lisosómico. Técnica I A, fijación normal. Riñón de conejo. 40x.
- Fig.-14. Imagen microscópica en la que se observa la distribución en cordones de los hepatocitos con las granulaciones que podrían corresponder al condrioma o al aparato lisosómico. Técnica I A, fijación normal. Hígado de conejo. 40x.
- Fig.-15. Microfotografía que muestra células hepatocitarias a gran aumento donde se observan núcleos, nucléolo y los límites citoplásmicos. Técnica I A, fijación normal. Hígado de conejo. 100x.
- Fig.-16. Microfotografía de sustancia blanca en la que observamos gran cantidad de células gliales y núcleos correspondientes. No es posible distinguir el entramado fibrilar debido a una impregnación débil. Técnica I C, fijación excesiva. Cerebro de cerdo. 20x.
- Fig.-17. Microfotografía a medio aumento de la sustancia gris en la que se aprecia gran número de neuronas, empezando a mostrarse en algunas de ellas el axón y espinas dendríticas. Técnica 1C, fijación excesiva. Cerebro de cerdo. 20x.
- Fig.-18. En esta microfotografía podemos observar la impregnación de las células astrogliales con cierta resolución o nitidez de las prolongaciones celulares. Técnica I C, fijación excesiva. Cerebro de cerdo. 20x.
- Fig.-19. Detalle a mayor aumento en la que observamos con gran nitidez neuronas piramidales de la sustancia gris, con su núcleo y citoplasma bien definidos. Técnica I C, fijación excesiva. Cerebro de cerdo. 40x.

3.3.3. Técnica II. Coloración núcleo-plasmática

Este tipo de coloración requiere que el fijador formólico no actúe excesivo tiempo. Sus mejores efectos se obtienen durante los primeros días de permanencia del material en formol al 10%. Para realizarla es preferible la obtención de cortes sin inclusión, pero ésta puede emplearse si lo requiere la naturaleza del tejido.

El desarrollo de la técnica II se presta a múltiples combinaciones, con las que puede a veces graduarse el efecto perseguido, pero no llega a resolver numerosos problemas que pueden presentarse, siempre dentro de las imágenes de conjunto y sin neta especificidad a favor de una u otra clase de células. Por ello se precisa un paso más en el desarrollo de la técnica haciendo actuar un doble baño de carbonato argéntico.

El segundo baño argéntico, cuya actuación es favorecida por el alcohol, hace visibles los protoplasmas de los elementos de estirpe mesodérmica, especialmente, pero también los de otro origen. Puede acontecer que las formas celulares sean visibles, pero pálidas, en cuyo caso podrá utilizarse la impregnación progresiva que consiste en repetir la técnica.

La técnica II con sus variaciones A y B es aplicable a toda clase de tejidos sean normales o patológicos, y muy especialmente, al estudio de los blastomas.

3.3.3.1. Técnica II A.

Para la realización de esta variante se utilizó corteza cerebral de cordero fijado en formol neutro al 10%.

1. Lavado de la pieza en agua destilada abundante durante 10 minutos para eliminar restos de formol.
2. Cortes por congelación en torno a las 20 μ m.
3. Recogida de los cortes en agua destilada abundante.
4. Inmersión de los cortes en solución M de carbonato de plata durante 10 o 20 minutos aproximadamente. En frío.
5. EtOH de 96% durante 30 o 60 segundos, con ligera agitación para que desprendan el carbonato que los impregna.
6. Formol al 3% con ligera agitación.
7. Paso por agua destilada.

8. Deshidratación y montaje.
9. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

3.3.3.2. Técnica II B

Para la realización de esta variante se utilizó corteza cerebral de cordero fijado en formol neutro al 10%.

1. Lavado de la pieza en agua destilada abundante durante 10 minutos para eliminar restos de formol.
2. Cortes por congelación en torno a 20 μm .
3. Recogida de los cortes en agua destilada adicionada de formol neutro al 10% en el que permanecen 4 o 5 días.
4. Lavado rápido en agua destilada abundante.
5. Inmersión de los cortes en solución M de carbonato de plata durante 10 o 20 minutos aproximadamente, esta vez aplicamos calor suave (entre 25-30°C) para acelerar el proceso de tinción.
6. EtOH de 96% durante 30 o 60 segundos, con ligera agitación para que desprendan el carbonato que los impregna.
7. Traslado de los cortes a nuevo carbonato de plata solución M durante 10 a 50 segundos.
8. Formol al 3% con ligera agitación.
9. Paso por agua destilada.
10. Deshidratación y montaje.
11. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

3.3.4. Resultados

Tejido nervioso. En estado normal se obtienen limpias imágenes nucleares, y poco expresivas del citoplasma de los elementos nerviosos. En el sistema nervioso periférico (ganglios sensitivos y simpáticos, nervios) los resultados son muy estimables porque afectan, no sólo a la demostración de los cuerpos neuronales y sus satélites neurológicos, sino también a las fibras nerviosas. La variante B puede considerarse de utilidad para la tinción de la mielina en los ganglios y nervios. En los centros, aunque visible en las más finas fibras en observación a gran aumento, no ofrece el contraste y la belleza que con otros métodos.

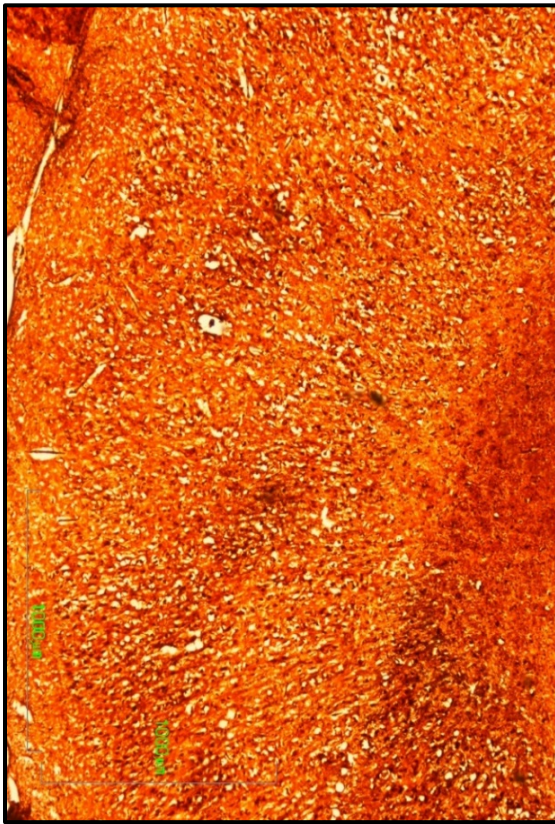


Fig.- 20 (4x)

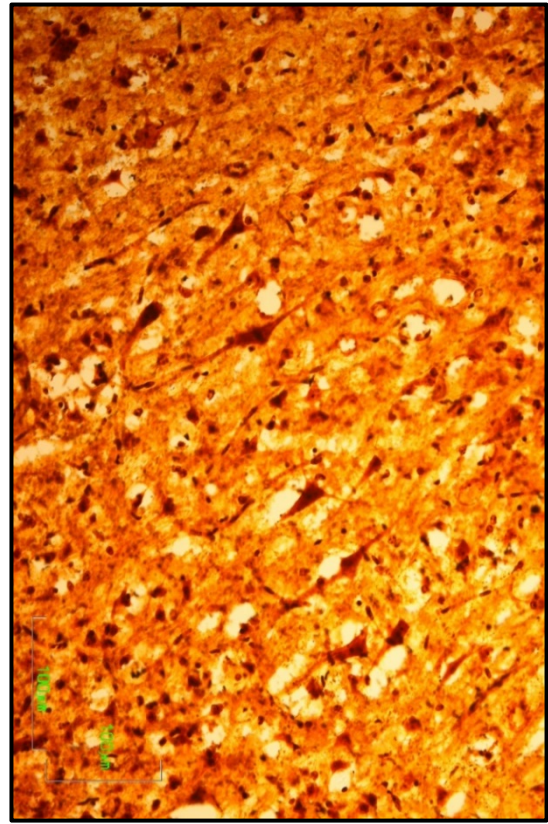


Fig.- 21 (20x)

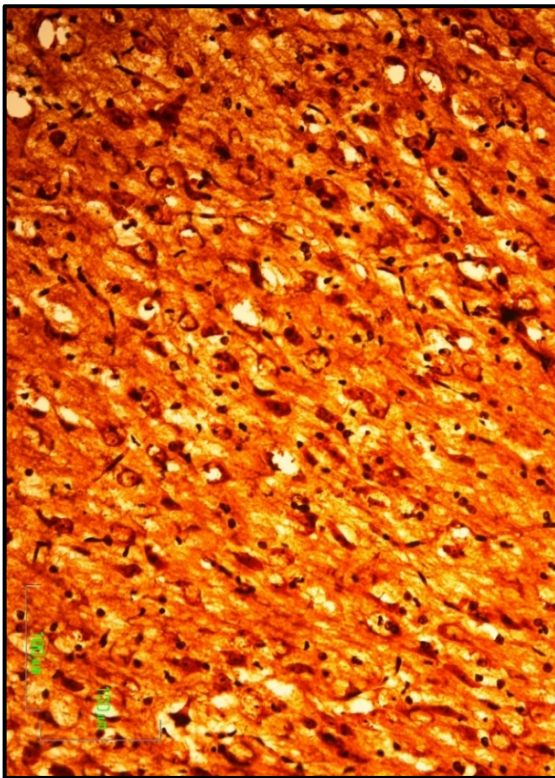


Fig.- 22 (20x)

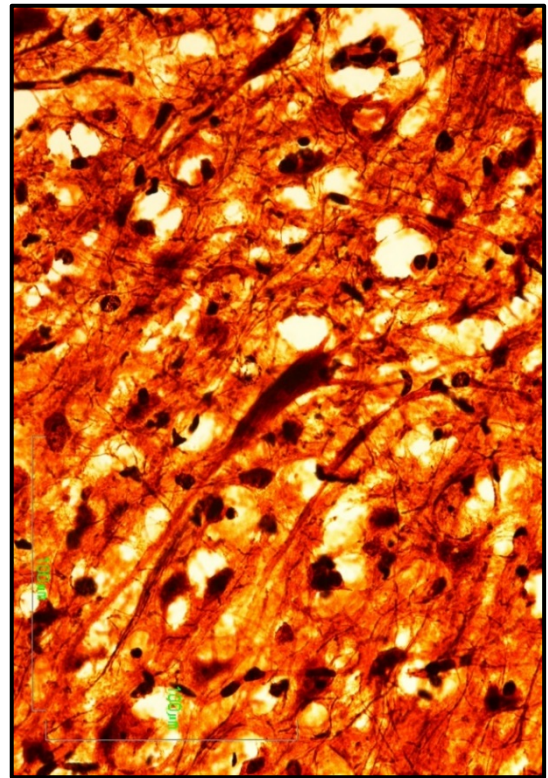


Fig.- 23 (40x)

Fig.-20. Microfotografía panorámica de la sustancia gris (corteza cerebral) que muestra la distribución general de las neuronas. Técnica II B. Cerebro cordero. 4x.

Fig.-21. Detalle a medio aumento de un grupo de neuronas piramidales. Técnica II A. Cerebro de cordero. 20x.

Fig.-22. Microfotografía en la que se muestra el límite entre la sustancia gris y la sustancia blanca que muestra los núcleos de las células gliales y los núcleos y parte del citoplasma de las neuronas. El componente fibrilar se ha teñido muy débilmente. Técnica II B. Cerebro de cordero. 20x.

Fig.-23. Imagen de tinción nucleocitoplásmica donde se observa el citoplasma neuronal y el arranque de las grandes dendritas, así como la impregnación del aparato neurofibrilar. Se observa así mismo la tinción de las fibras nerviosas moderadamente. Técnica II B. Cerebro de cordero. 40x.

3.3.5. Técnica III. Tinción general

Consta de dos apartados fundamentales: impregnación colorante y reducción. La impregnación ha de hacerse despojando a los cortes, previamente, de los vestigios de formol que apesurarían la reacción mermando su eficacia. La tinción ha de ser homogénea y de suficiente intensidad, lo que se consigue agitando de vez en cuando a los cortes mientras se realiza. La reducción es modificable efectuando, o no, un lavado previo y variando las concentraciones del formol.

La reducción formólica es fundamental para la mayor eficacia de la técnica en cuanto a las coloraciones de conjunto y de algunas estructuras especiales, cuales las neuróglías, pero no para la observación de ciertos detalles nucleares y citoplásmicos que, si bien tras la reducción aparecen más oscuros, pierden con ella finura. Los núcleos, especialmente, tienen su técnica más adecuada en la impregnación en caliente con carbonato argéntico, no seguida de reducción formólica.

Para la realización de esta técnica se utilizó corteza cerebral de cordero fijada en formol neutro al 10%.

1. Lavado de la pieza en agua destilada abundante durante 10 minutos para eliminar restos de formol.
2. Cortes por congelación de 10 a 50 μm .
3. Recogida de los cortes en agua destilada adicionada, posteriormente, de 20 gotas de H_3N por 100 mL, durante 10 minutos.
4. Lavado rápido en agua destilada abundante, tres veces, en placa Petri.
5. Inmersión de los cortes en solución D de carbonato de plata adicionado de 4 a 6 gotas de piridina en 10 mL, calentando a 50°C, hasta que los cortes toman un color amarillo tabaco rubio. Agitar el pocillo cada 2 o 3 minutos.
6. Lavado intenso en agua destilada en placa Petri.
7. Reducción en formol al 10% durante 2 o 3 minutos.
8. Paso por agua destilada.
9. Deshidratación y montaje.
10. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

3.3.5.1. Técnica III A

Difiere esencialmente de la anterior, en que en ella no se efectúa la reducción en formol de los cortes teñidos con el carbonato argéntico, y no precisa la eliminación total previa del formol de los cortes, que hace más lenta la tinción.

Para la realización de esta variante se utilizó corteza cerebral de cordero fijado en formol neutro al 10% entre 10 días y 4 o 5 meses.

1. Lavado rápido de la pieza en agua destilada, durante 1 o 2 minutos, para no eliminar completamente los restos de formol, pues favorecen la impregnación.
2. Cortes por congelación de 20 a 25 μm .
3. Recogida de los cortes en agua destilada adicionada, posteriormente, de 20 gotas de H_3N por 100 mL, durante 10 minutos.
4. Dos lavados en agua destilada abundante durante 10 minutos cada uno.
5. Inmersión de los cortes en solución D de carbonato de plata adicionado de piridina (4 a 6 gotas por cada 10 mL) calentando a 45-50°C hasta tinción (color tabaco negro). Agitar el pocillo cada 2 o 3 minutos.
6. Lavado en agua del grifo.
7. Lavado en agua destilada abundante.
8. Deshidratación y montaje.
9. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

3.3.6. Resultados

La impregnación en caliente con reducción formólica, además de teñir los núcleos (como la técnica I) y a veces los citoplasmas (como la técnica II), muestra al parénquima y al estroma si se trata de un órgano normal o patológico y a los elementos principales y secundarios si se trata de un blastoma o de un proceso inflamatorio. Es, por consiguiente, un método de aplicación general del que derivan otros más electivos para neuroglía, fibras nerviosas, reticulina, etc.

En el tejido nervioso, las neuronas muestran teñidos sus cuerpos y el arranque de las más gruesas dendritas, viéndose los grumos de Nissl. Las fibras nerviosas son poco visibles y requieren técnica más electiva. Los astrocitos aparecen solamente cuando la fijación en formol no pasa de uno a tres días.

En el tejido, muy transparente, destacan los núcleos, de los que son visibles tanto los grumos cromáticos como los nucléolos cuyas granulaciones son ostensibles muchas veces. Dentro de las células son perfectamente visibles las granulaciones argentafines de los elementos intestinales, los prepigmentos de las células de Langerhans y las esférulas correspondientes a inclusiones lipoides. En las estructuras musculares es posible obtener bellas imágenes de la estriación miofibrilar. De las estructuras nerviosas pueden ser visibles los centrosomas y grumos de Nissl, a más del pigmento y ciertas inclusiones anómalas. Las estructuras neuróglícas ofrecen imágenes incompletas de gliofibrillas.

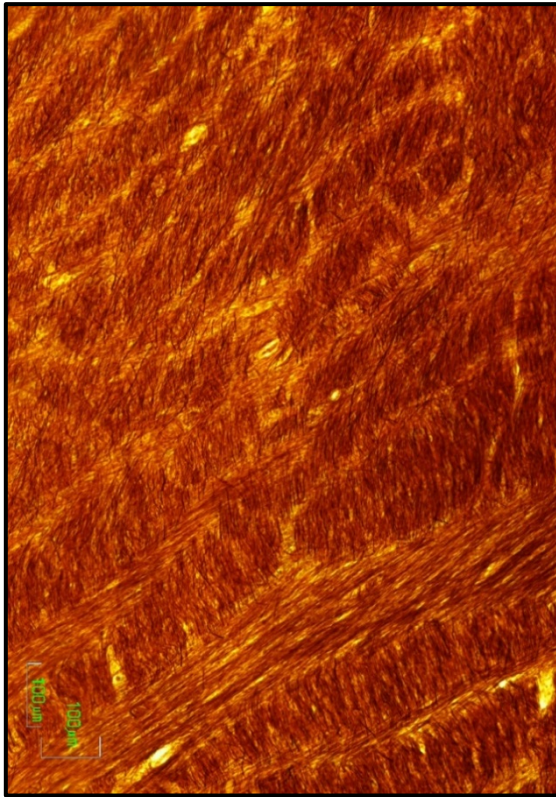


Fig.- 24 (10x)

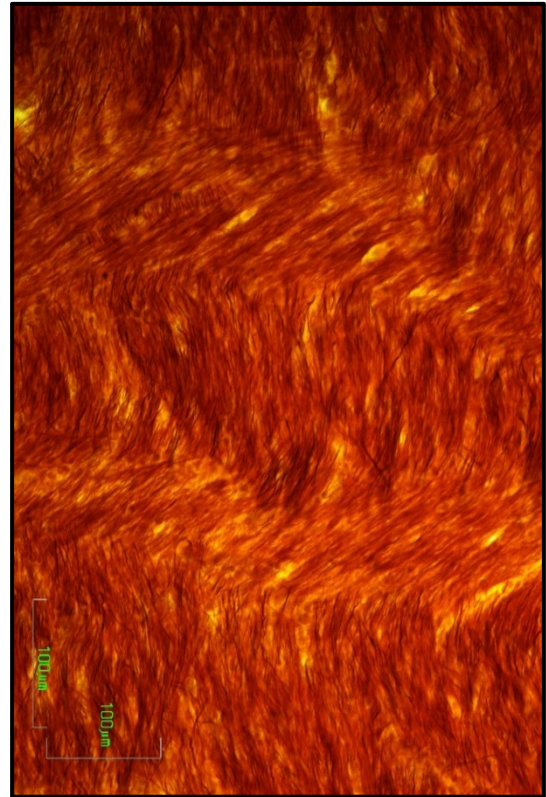


Fig.- 25 (20x)

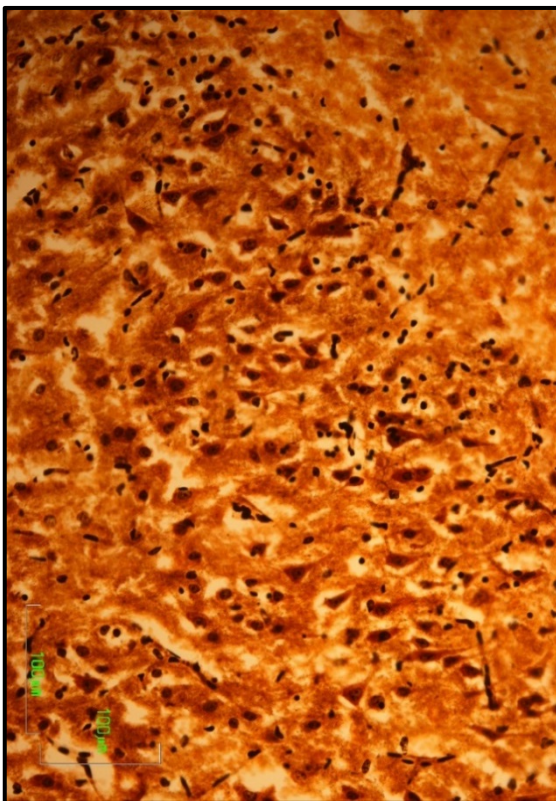


Fig.- 26 (20x)

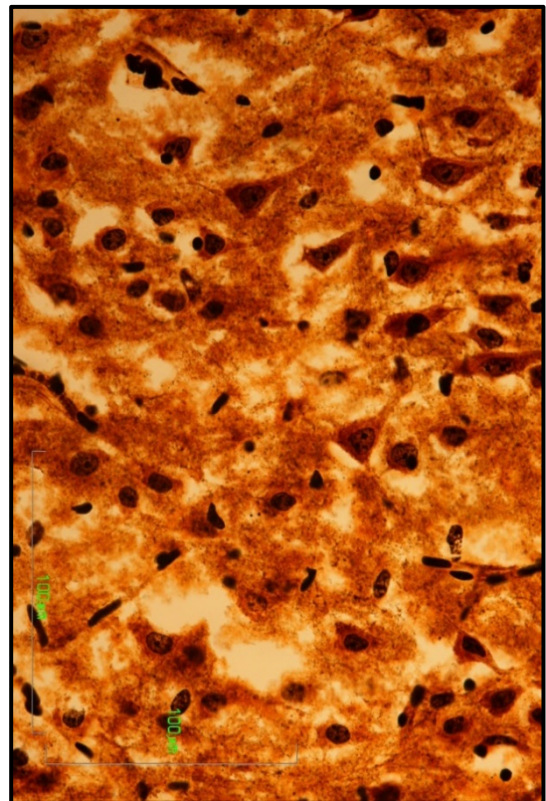


Fig.- 27 (40x)

Fig.-24. Imagen de sustancia blanca donde se observa el entrecruzamiento de los distintos haces de fibras nerviosas. Técnica III A. Cerebro de cordero. 10x.

Fig.-25. Detalle a mayor aumento de los haces de fibras nerviosas que se observan con nitidez, no así el componente celular glial del tejido nervioso. Técnica III A. Cerebro de cordero. 20x.

Fig.-26. Microfotografía panorámica de sustancia gris mostrando la distribución neuronal general, fundamentalmente nucleocitoplásmica. Se observan así mismo los núcleos de las células gliales y de las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Técnica III. Cerebro de cordero. 20x.

Fig.-27. Detalle a gran aumento de las neuronas donde se observan los núcleos, nucléolos y grumos cromatínicos, así como los somas de estas células. También se demuestran con detalle los núcleos de las células gliales, no así las prolongaciones de las mismas. Técnica III. Cerebro de cordero. 40x.

3.3.6.1. *Técnica III B, C, y D. Para astrocitos protoplásmicos y fibrosos*

Difiere esta variante de la técnica III (Tinción general) en que, para ser eficaz, exige la fijación del material en formol-bromuro de amonio, durante más o menos tiempo y en que la tinción se efectúa comúnmente con carbonato argéntico preparado a base de litina (101), aunque no es indispensable. Estas técnicas están destinadas a revelar el protoplasma de las células, es decir la morfología de las diferentes especies y variedades celulares, en ellas la estructura interna queda envuelta por las micelas de la plata coloidal. No las realizamos por que obtuvimos astrocitos con otras técnicas que no exigían la utilización de Li_2CO_3 para la preparación del carbonato argéntico, ni la fijación del material en formol bromuro de amonio, tales como la técnica Panóptica (VIII) que nos proporcionó buenos resultados de los mismos elementos celulares, fundamentalmente en tumores.

3.3.7. *Resultados*

En las buenas coloraciones, todos los astrocitos, tanto protoplásmicos como fibrosos, presentan teñidas sus expansiones mediante la plata reducida, depositada en ellas en forma de micelas imperceptibles. Existe, en general, mayor facilidad para la tinción de los astrocitos fibrosos, tanto los superficiales de las circunvoluciones como los profundos de la sustancia blanca. Los astrocitos protoplásmicos de la corteza y de los núcleos grises cerebrales muestran su estructura laxa y sus ramificaciones. En las partes grises y blancas del cerebelo, protuberancia, bulbo y médula los resultados son similares.

Aunque mediante la técnica descrita es posible mostrar las estructuras granulosas (gliosomas) y fibrilares (gliofibrillas) de los astrocitos, su tinción electiva requiere métodos especiales.

3.3.8. *Técnica IV. Coloración de la glía perivascular*

No hemos realizado la técnica IV descrita por del Río Hortega para la coloración de la glía perivascular, porque tiene características tintoriales semejantes a las de la microglía y oligodendroglía, siendo por consiguiente aplicables a su estudio las mismas técnicas que a estos dos tipos celulares (101).

3.3.9. Técnica V y sus variantes

La técnica V y sus variantes están descritas para oligodendroglía y microglía normal y patológica, las cuales serán descritas en capítulo aparte por la importancia que tuvo el método del carbonato de plata para su demostración y descubrimiento.

3.3.10. Técnica VI y sus variantes. Coloración de los elementos del sistema retículo-endotelial

La técnica VI y sus variantes A, B, C, D y E se describen para los elementos macrofágicos y del sistema retículo endotelial (SRE), afines a la microglía, pero fuera del sistema nervioso, por lo que no sería necesaria la fijación en formol bromuro de amonio. El fijador más indicado en este caso, es el formol neutro al 10%, que debe actuar poco tiempo para obtener buenas coloraciones. Aunque en material fijado durante largo tiempo, es posible todavía obtener resultados estimables mediante la acción sensibilizadora de diversos reactivos, ya enumerados. Al igual que la microglía los elementos del SRE presentan una rápida impregnación por la plata, y se aprecia la paradoja de que la permanencia excesiva de los cortes en la plata es fatal para la impregnación. Por esto se trata siempre de tinciones rápidas.

La técnica VI sólo difiere de la I en la rapidez de la impregnación. El protoplasma de los macrófagos es más ávido por la plata que los núcleos, por lo que es posible obtener en los mismos cortes la tinción macrofágica en 1 o 2 minutos y la histológica general en 10 a 15. En todo material patológico conviene efectuar ambas variaciones.

Nosotros no realizamos esta técnica y sus variantes porque con la técnica I como sugiere del Río Hortega obtuvimos resultados similares tal y como se muestra en las figuras siguientes.

3.3.11. Resultados

Esta técnica es de aplicación general a los elementos macrofágicos de los diferentes tejidos normales y patológicos. En ellos varía la rapidez de la impregnación, la cual, siendo grande siempre, lo es más en los ganglios linfáticos y amígdala, por ejemplo, y en especial en el hígado.

La impregnación argéntica es puramente citoplasmática y se produce en forma de finísimo depósito coloidal sobre los cuerpos celulares y sus expansiones. Si la impregnación es insuficiente (cortes de color grisáceo pálido) los macrófagos aparecen demasiado granuloso,

pero son bien visibles sus formas. Estas destacan menos, por el contrario, cuando la impregnación es excesiva (cortes amarillentos), en cuyo caso son más o menos visibles los núcleos y las inclusiones citoplásmicas.



Fig.- 28 (40x)

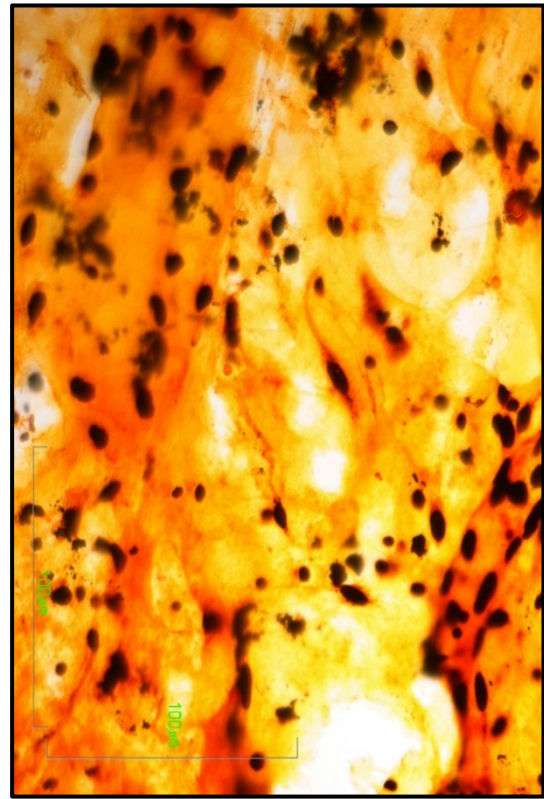


Fig.- 29 (40x)

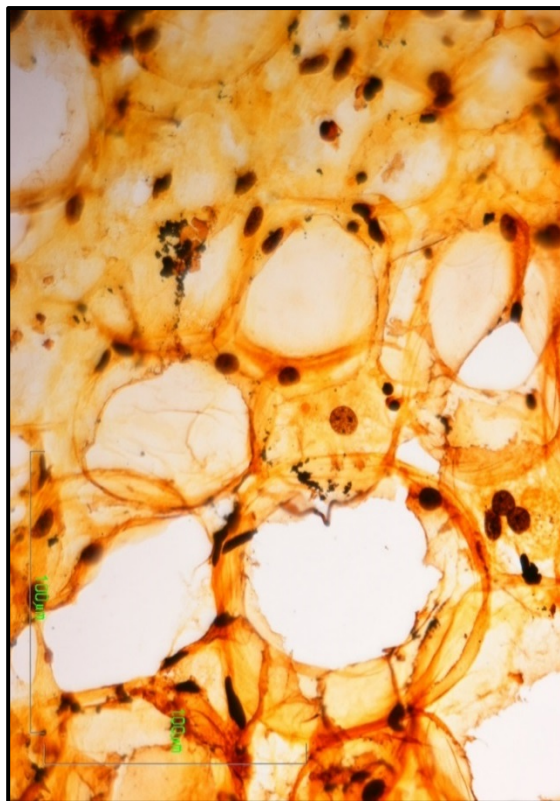


Fig.- 30 (40x)



Fig.- 31 (100x)

Fig.-28. Macrófagos de citoplasma redondeado de aspecto granuloso en un foco inflamatorio renal. Preparación de riñón realizada con la técnica I A. Riñón de conejo. 40x.

Fig.-29. Fibroblastos de núcleo y soma alargados en pelvis renal. Preparación de riñón realizada con la técnica I A. Riñón de conejo. 40x.

Fig.-30. Cromatina nuclear en células del tejido adiposo. Preparación de riñón realizada con la técnica I A. Riñón de conejo. 40x.

Fig.-31. Imagen a gran aumento mostrando diferentes elementos de tejido conectivo como son, citoplasmas vacuolados, granulaciones citoplásmicas (condriosomas), así como la trama cromatínica en un núcleo central. Preparación de riñón realizada con la técnica I A. Riñón de conejo. 100x.

3.3.12. Técnica VII y sus variantes. Para células nerviosas

Se trata de una técnica citoplásmica general en la que se consigue teñir a la vez núcleos y protoplasmas, aunque los primeros no con el contraste que ofrecen con otras variantes. El método del carbonato argéntico es susceptible de mostrar una parte, al menos, de las expansiones dendríticas. La siempre coloración en caliente siguiendo la técnica general, sea en material fijado en formol o en formol bromuro, suele mostrar no sólo los cuerpos celulares sino también sus principales expansiones, pero en el cerebro con mayor dificultad que en el cerebelo.

Con respecto a las fibras nerviosas, bastará aplicar alternativamente, las dos variantes de la técnica VII para obtener demostraciones excelentes, ora de las fibras nerviosas, ora de la mielina que las envuelve.

3.3.12.1. Técnica VII A

Para conseguir una tinción general bastante completa de las prolongaciones celulares es preciso emplear la técnica VII A, que, aunque parece específica de los elementos conectivos tiene especial aplicación para algunos nerviosos. Tal técnica permite la obtención, si se quiere hasta en pocos minutos, de tinciones excelentes de las formas neuronales. Si se trata de los centros, aparecen con ella una buena parte de las fibras nerviosas y los somas neuronales con sus principales expansiones, en especial las cerebelosas.

Para la realización de esta variante y la que sigue se utilizó corteza cerebral de cordero fijado en formol neutro al 10%.

La técnica VII A queda descrita de la siguiente manera:

1. Lavado de la pieza en agua destilada abundante para eliminar restos de formol.
2. Cortes por congelación de 20-25 μm aproximadamente.
3. Recogida de los cortes en agua destilada.
4. Inmersión en piridina de 1 a 5 minutos.
5. AgNO_3 al 2% previamente calentado durante 5 minutos o más.
6. Inmersión de los cortes en solución M de carbonato de plata piridinado (4 gotas por 10 mL aproximadamente) de 2 a 5 minutos.
7. Nueva inmersión en solución M de carbonato de plata sin piridina durante 2 a 3 minutos.
8. Formol neutro al 1% sin piridina.

9. Lavado en agua destilada.
10. Deshidratación y montaje.
11. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

3.3.12.2. Técnica VII B

Se trata realmente de una variante de la técnica VII A, solo difiere de ella en la introducción de algunas modificaciones en los pasos finales. Se puede utilizar para dar menos realce a las partes neuronales y hacer destacar a la mielina.

1. Lavado de la pieza en agua destilada abundante para eliminar restos de formol.
2. Cortes por congelación de 20-25 μm aproximadamente.
3. Recogida de los cortes en agua destilada.
4. Inmersión en piridina de 1 a 5 minutos.
5. AgNO_3 al 2% previamente calentado durante 5 minutos o más.
6. Inmersión de los cortes en solución M de carbonato de plata piridinado (4 gotas por 10 mL aproximadamente) de 2 a 5 minutos.
7. Inmersión en nueva solución M de carbonato de plata sin piridina durante 2 a 3 minutos.
8. EtOH de 96% durante un minuto.
9. Nueva solución M de carbonato de plata sin piridina unos segundos.
10. Formol neutro al 1% sin piridina.
11. Lavado en agua destilada.
12. Deshidratación y montaje.
13. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

3.3.13. Resultados

Mediante las técnicas anotadas es posible ver de las células nerviosas tanto el cuerpo como las principales prolongaciones, a veces con dicotomías. Las imágenes más completas suelen conseguirse en las células de Purkinje y en las de los ganglios simpáticos. Aquellas muestran a veces hasta sus últimas ramificaciones.

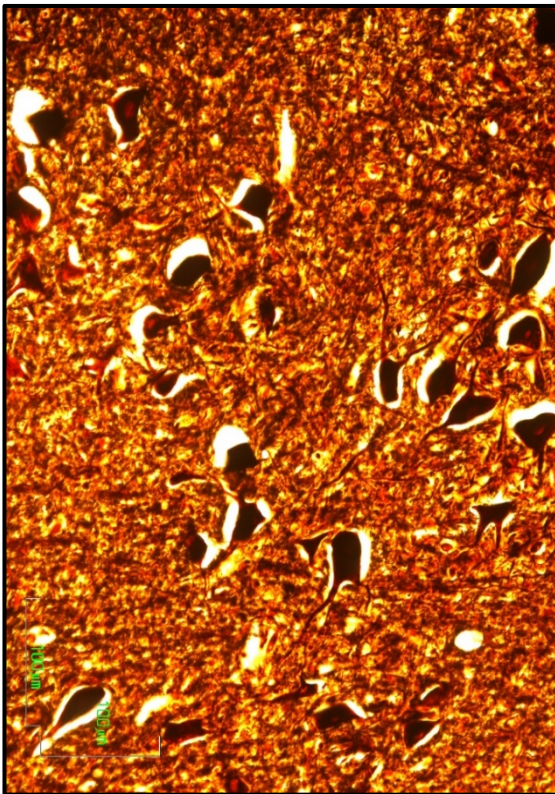


Fig.- 32 (20x)

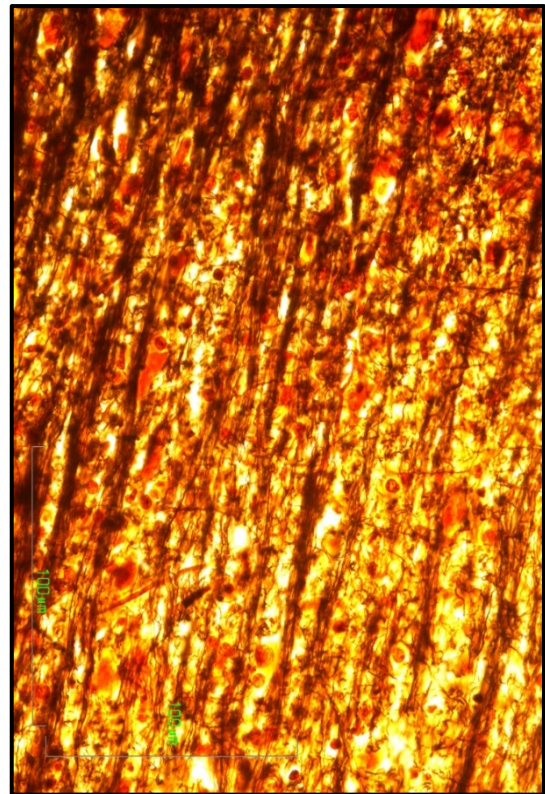


Fig.- 33 (40x)

Fig.-32. Microfotografía de neuronas piramidales sobreimpregnadas en algunas de las cuales podemos apreciar las expansiones dendríticas. Técnica VII A. Cerebro de cordero. 20x.

Fig.-33. Microfotografía donde se aprecia la trama fibrilar de la corteza, a través de la cual se adivinan neuronas piramidales poco impregnadas. Técnica VII A. Cerebro de cordero. 40x.

3.3.14. Técnica VIII. Coloración protoplásmica general. Panóptica

Del Río Hortega denominó así a esta técnica por el gran número de posibilidades que presenta y la excelencia de los resultados obtenidos. Se trata de una técnica de aplicación fácil, como deben ser las de rutina, en la que se ha suprimido todo lo que puede afectar a su constancia. Nos referimos a la variable acidez del formol, que ha sido en gran parte corregida mediante la adición de piridina. Se trata de una técnica progresiva, en la que puede reforzarse la coloración repitiendo dos o más veces sus últimos tiempos. La técnica VIII es aplicable a tejidos normales y patológicos pertenecientes a las tres hojas embrionarias.

Para la realización de esta técnica se utilizó corteza cerebral de cordero y de humano, procedente esta última de autopsias y de tumores cerebrales, fijados en formol neutro al 10%. Los resultados de técnicas referentes a los tumores cerebrales se describirán en otro apartado al final de este capítulo.

1. Cortes por congelación de 20-25 μm aproximadamente.
2. Los cortes obtenidos por congelación se recogieron en una placa Petri grande con agua destilada y se lavaron tres veces, para eliminar los restos de azúcar común, incluso en algunos casos resultó conveniente dejarlos en agua destilada a 4°C hasta el día siguiente.
3. Piridina pura o H_3N como mínimo 30 minutos y en algunos casos hasta 1 o 2 horas.
4. AgNO_3 al 2% sin previo lavado y calentando a 45-50°C hasta que toman color tabaco rubio.
5. Inmersión de las secciones en solución M de carbonato de plata piridinado (5 gotas por 10 mL aproximadamente) un tiempo variable que ha oscilado entre los 10 minutos recomendados por Pío del Río Hortega y 2 horas, en frío.
6. Nueva inmersión en solución M de carbonato de plata sin piridina durante 60 segundos.
7. Formol neutro al 10% con 4 gotas de piridina por cada 10 mL.
8. Lavado en agua destilada abundante.
9. Deshidratación y montaje.
10. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

En la mayoría de las ocasiones se utilizó H_3N , porque aunque la técnica se realizó en campana, la piridina desprende un fuerte olor y como comenta del Río Hortega es indiferente la utilización de uno u otro reactivo. Tampoco existen ventajas estimables en la utilización de soluciones mordientes de AgNO_3 más concentradas del 2%.

3.3.15. Resultados

Revela los caracteres morfológicos de las células mediante una tinción, más o menos intensa, del citoplasma. Este ofrece una coloración amarillenta o amarillo-parduzca, aparece liso o grumoso y presenta sus contornos bien visibles. Las tramas conectivas muestran tono más pálido y las fibras nerviosas color pardo-negruzco.

Las fibras nerviosas destacan bien teñidas, especialmente en órganos como la hipófisis y su tallo, la glándula pineal y los ganglios sensitivos y simpáticos. A diferencia de la técnica II (núcleo-plasmática) que evidencia a los tubos medulados con sus redes de neuroqueratina, la VIII revela a las neuritas. Con ella es posible teñir terminaciones nerviosas sensitivas y motoras, a veces muy nítidamente.

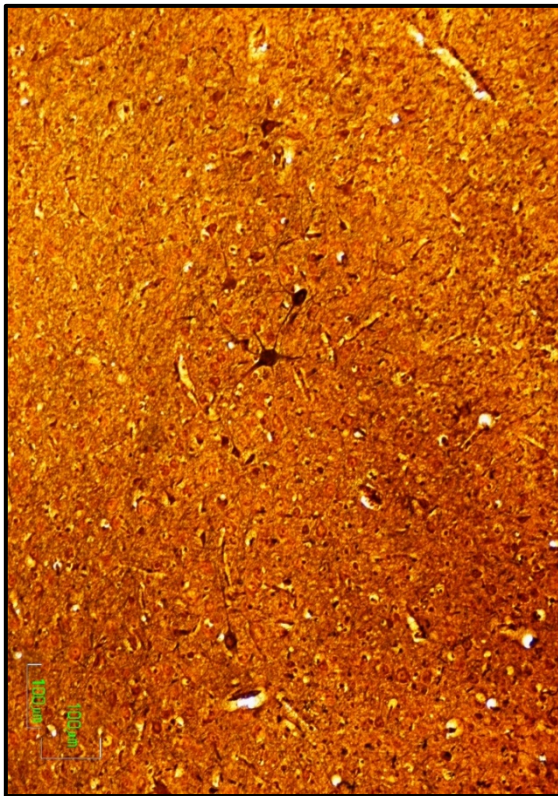


Fig.- 34 (10x)

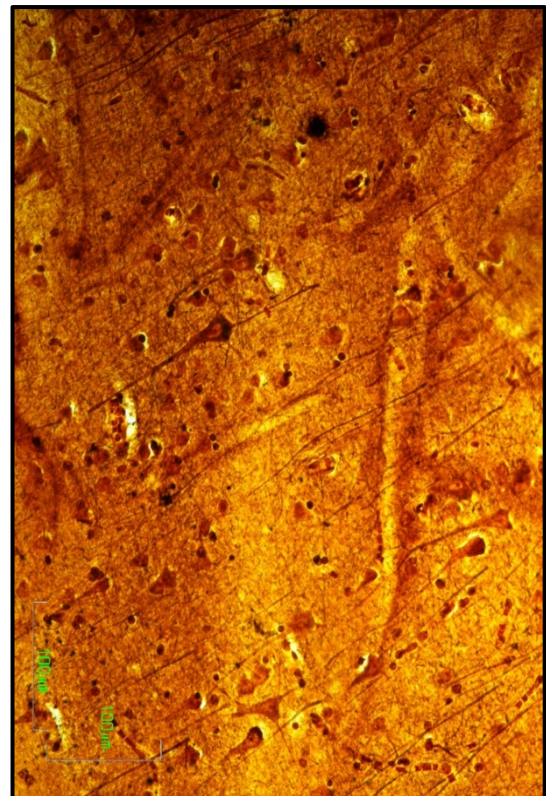


Fig.- 35 (20x)

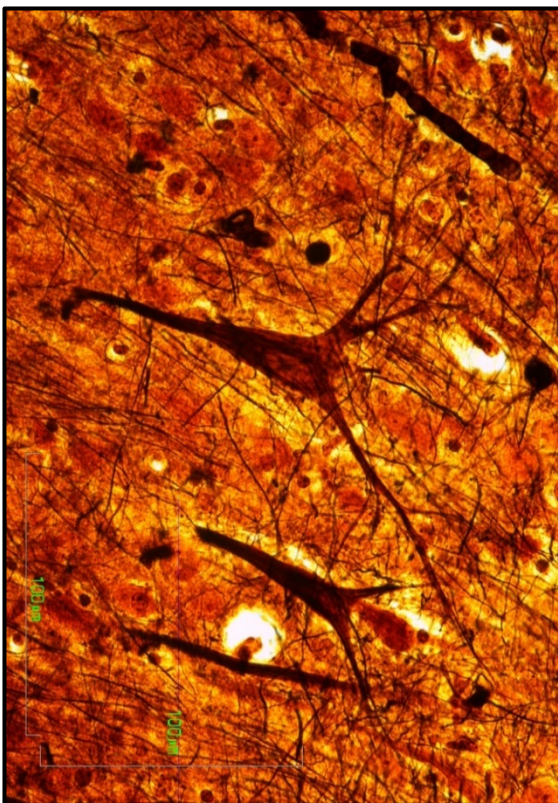


Fig.- 36 (40x)

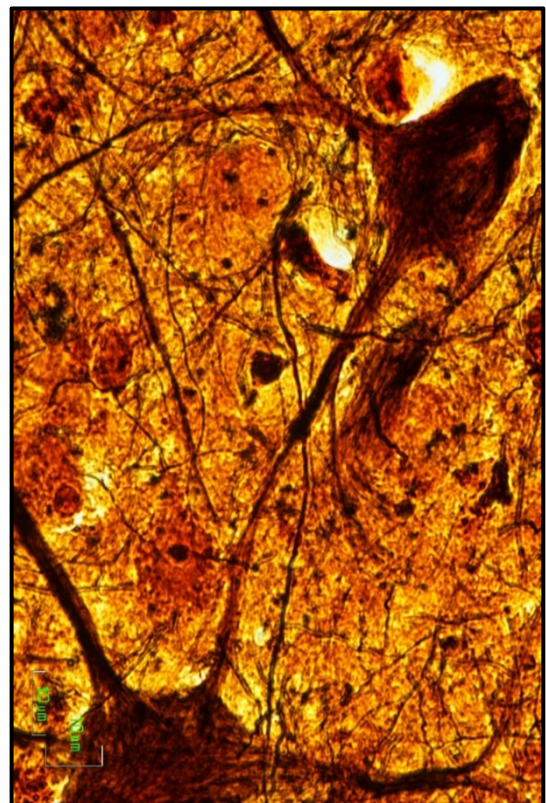


Fig.- 37 (100x)

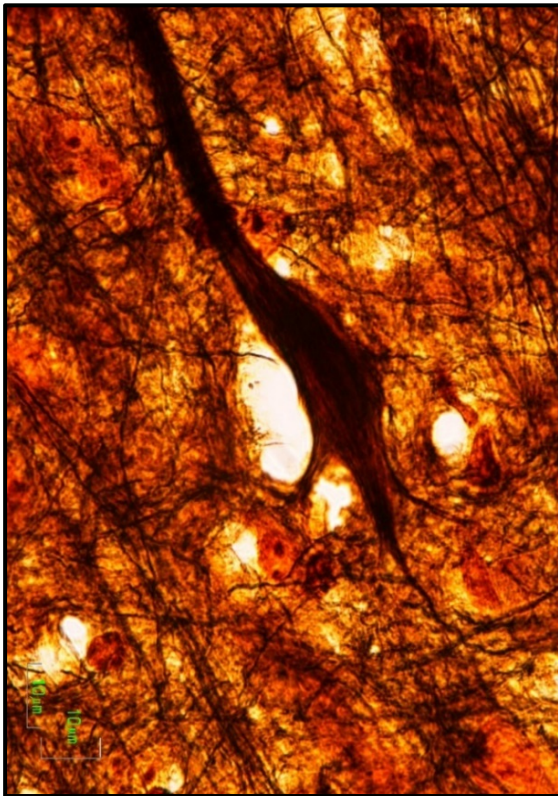


Fig.- 38 (100x)

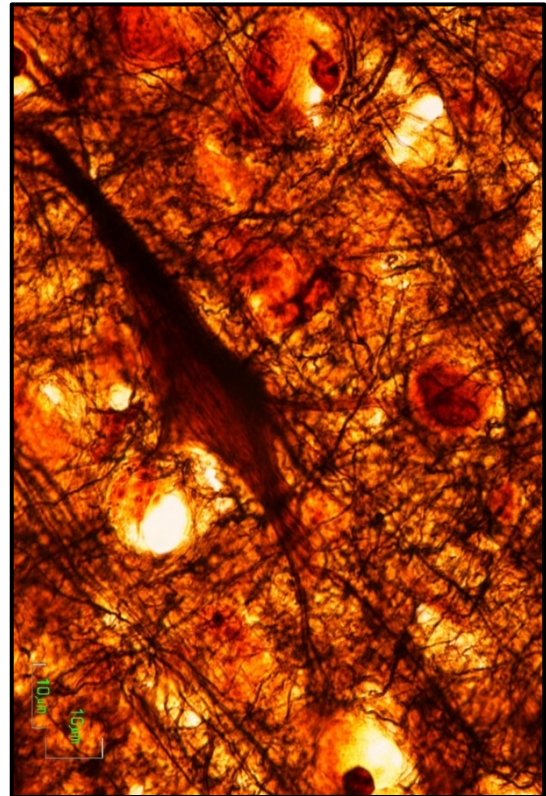


Fig.- 39 (100x)

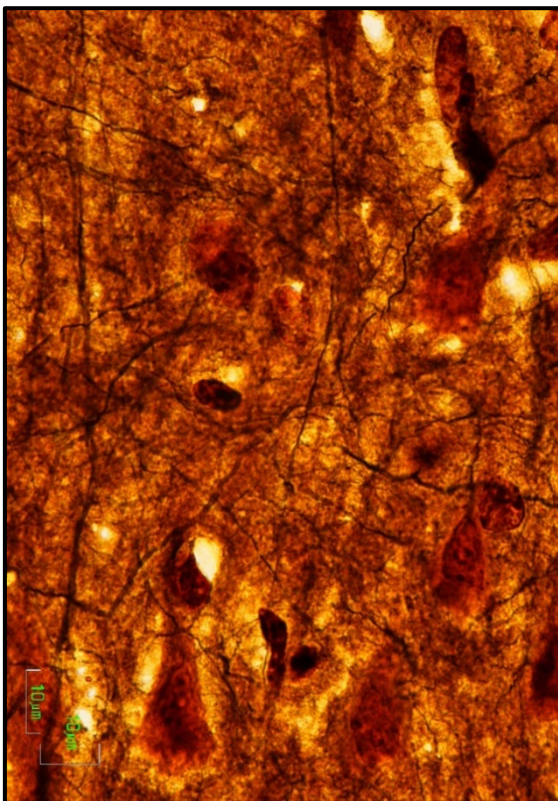


Fig.- 40 (100x)

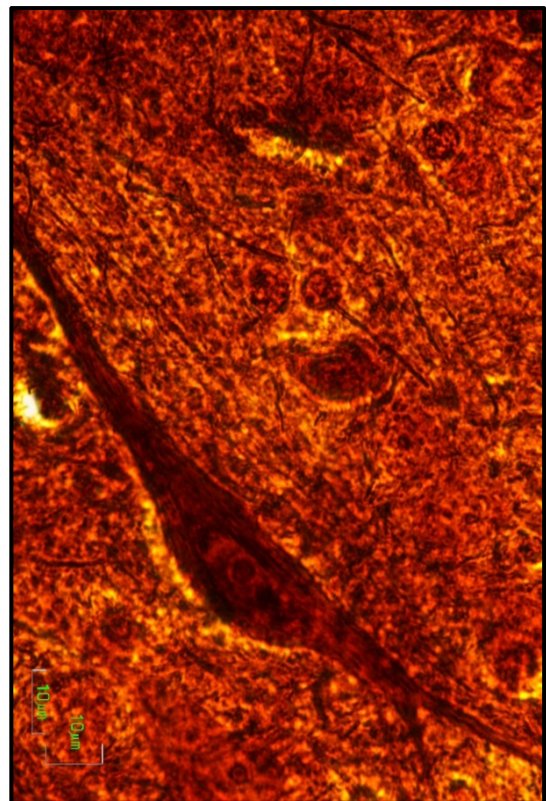


Fig.- 41 (100x)

Fig.-34. Imagen panorámica de la corteza cerebral con algunos elementos neuronales fuertemente impregnados. Técnica VIII. Cerebro de cordero. 10x.

Fig.-35. Microfotografía a medio aumento de un conjunto de células piramidales, observándose con gran nitidez las dendritas apicales de las mismas. Técnica VIII. Cerebro humano. Autopsia. 20x.

Fig.-36. Imagen del soma de dos células piramidales mostrando la arborización dendrítica inicial. Se observa en el neuropilo adyacente una gran abundancia de fibras nerviosas. Técnica VIII. Cerebro de cordero. 40x.

Fig.-37. Fotografía a gran aumento de una neurona multipolar con el aparato neurofibrilar muy desarrollado. Técnica VIII. Cerebro de cordero. 100x.

Fig.-38. Microfotografía a gran aumento de una célula nerviosa donde podemos observar con gran detalle el segmento inicial del axón. Técnica VIII. Corteza cerebral de cordero. 100x.

Fig.-39. Imagen a gran aumento de un soma neuronal donde se observa la red neurofibrilar. Técnica VIII. Corteza cerebral de cordero. 100x.

Fig.-40. Microfotografía a gran aumento que demuestra las fibras nerviosas con gran nitidez. Técnica VIII. Corteza cerebral de cordero. 100x.

Fig.-41. Ilustración a gran aumento donde se observa de forma óptima en el soma neuronal el núcleo, nucléolo y la red neurofibrilar del soma, así como la porción inicial de las dendritas. Técnica VIII. Corteza cerebral de cordero. 100x.

3.3.16. Técnica IX. Para schwannomas

Del Río Hortega describe esta técnica para schwannomas. Se trata de una triple impregnación argéntica de nitrato-carbonato-nitrato, con la que se obtienen tinciones citoplásmicas bastante completas de esa estirpe celular (126). Nosotros no la hemos realizado porque no nos ha sido posible disponer de esos tejidos.

3.3.17. Técnica X y sus variantes. Coloración de la neuroglía ganglionar

La técnica X se basa en la núcleo-plasmática, pero difiere de ella, fundamentalmente, en que se trata de una doble impregnación, en la que el AgNO₃ actúa como mordiente y al alcohol como modificador de la impregnación. Es frecuente que en estas variaciones técnicas se utilicen dos baños sucesivos del mismo reactivo para despojar a los cortes en el primero del reactivo que le precede. Así, el segundo baño de carbonato argéntico priva a los cortes de la piridina existente en el primero que favorece la impregnación pero no la reducción.

El fijador más conveniente para esta técnica es el formol al 10% que debe actuar entre 3 y 10 días. Sin embargo, del Río Hortega comenta que debido a la falta de material suficiente no pudo llegar a precisarla con exactitud (126). Nosotros no la hemos realizado porque no nos ha sido posible disponer de esos tejidos.

3.3.18. Técnica XI. Para glioblastos neoplásicos

Del Río Hortega propone para el estudio de los gliomas algunas de las técnicas ya expuestas, pero principalmente la técnica III B, aplicada con ligeras variaciones para los elementos neoplásicos y la técnica VIII y VIII A pues según comenta: *no existe una técnica exclusiva para el estudio de los gliomas que, para ser completo, requiere no una sino varias que revelen la arquitectura general y los caracteres nucleares, las formas y modos de agrupación de las cédulas y las tramas fibrilares neuróglícas y conectivas* (126). Recomienda el uso del formol bromuro de amonio para la fijación de estos elementos, sin embargo no lo cree imprescindible, proponiendo la fijación en formol al 10% desde 24 horas hasta algunos días, para conseguir en la mayor parte de los casos impregnaciones satisfactorias de los elementos neoplásicos.

A parte de estas técnicas, describe la técnica XI para glioblastos neoplásicos basada en la propiedad del EtOH de favorecer la impregnación argéntica de muchos citoplasmas y que resulta

aplicable a material recientemente fijado, incluso en material mantenido durante largo tiempo en el fijador y que haya sido rejuvenecido mediante el proceso de *sensibilización*, ya descrito (63).

3.3.18.1. Técnica XI A. Para glioblastos, astroblastos y astrocitos neoplásicos.

Se trata de una variante de la técnica XI, en la que se introducen manipulaciones correspondientes a las técnicas VIII y IX.

Para la realización de esta técnica se utilizó cerebro de cerdo fijado en formol salino al 4% durante varios años.

1. Cortes por congelación entre 15 o 20 μm .
2. Mezcla de piridina-H₃N-agua, a partes iguales durante 5 minutos en frío o 10 minutos en caliente, para rejuvenecer el tejido.
3. Calentamiento de los cortes a 45-50°C durante 10 a 15 minutos, en la mezcla AgNO₃-piridina-alcohol.

✓ AgNO ₃ 2%	10 mL.
✓ Piridina	30 gotas.
✓ EtOH absoluto	30 gotas.
4. Calentamiento, hasta tinción no muy intensa, en la mezcla carbonato de plata-piridina-alcohol.

✓ Solución D de carbonato de plata	10 mL.
✓ Piridina	30 gotas.
✓ EtOH absoluto	30 gotas.
5. Paso de los cortes a EtOH de 95% con 1 gota de piridina en 10 mL, durante 15 a 30 segundos.
6. Reducción en formol al 1% sin piridina.
7. Lavado en agua destilada.
8. Deshidratación y montaje.
9. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

3.3.19. Resultados

Esta técnica muestra al delicadísimo protoplasma de los glioblastos coloreado con mediana intensidad pero permite reconocer sus cualidades morfológicas y completar el estudio arquitectónico del tejido viendo las relaciones de los glioblastos con los vasos. Es frecuente que los núcleos se hallen incoloros o muy pálidos en contraste con el oscurecimiento protoplásmico.

Los glioblastos muestran su citoplasma pálido teñido de color amarillo (puede reforzarse siguiendo la técnica habitual de repetir la impregnación-reducción); los astroblastos y astrocitos exhiben tanto su cuerpo como sus expansiones netamente teñidas de un color que varía entre el amarillo y el pardo oscuro, casi negro.

Nosotros sin embargo, hemos empleado esta técnica en cerebro de cerdo fijado en formol durante varios años, en vez de en material tumoral que hemos reservado para la tinción Panóptica. En nuestro material nos ha dado resultado tanto para la demostración de los protoplasmas y dendritas neuronales en la sustancia gris, como para el entramado fibrilar en la sustancia blanca.

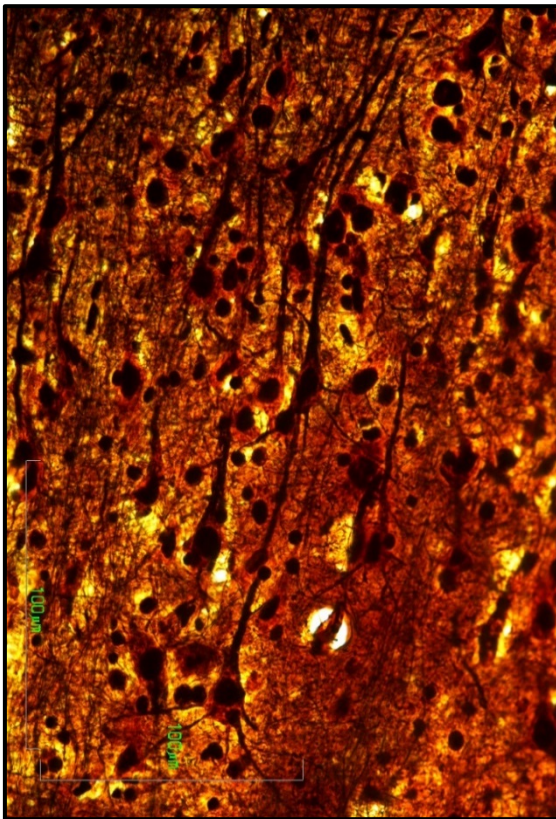


Fig.- 42 (40x)

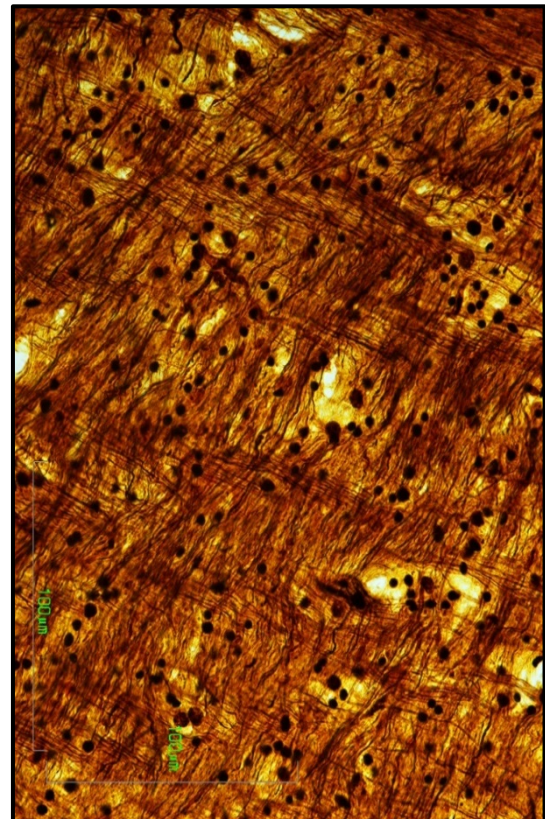


Fig.- 43 (40x)

Fig.-42. Microfotografía de la corteza cerebral mostrando neuronas piramidales con las dendritas apicales y las basales, así como algún segmento inicial axónico. En el neuropilo se observan núcleos desnudos de células gliales y un discreto entramado fibrilar. Técnica XI A. Cerebro de cerdo. 40x.

Fig.-43. Imagen de sustancia blanca donde se observa el entrecruzamiento de los distintos fascículos de las fibras nerviosas y los núcleos desnudos de los diferentes tipos de células gliales. Técnica XI A. Cerebro de cerdo. 40x.

3.3.20. Técnica XII y sus variantes. Coloración de la glándula pineal

Del Río Hortega describe esta técnica y sus variantes para la coloración de las células de la glándula pineal humana y de los grandes mamíferos, así como para neuronas ganglionares. Nosotros no hemos dispuesto de estos órganos. La fijación de este órgano se haría en formol al 10% y no tendría límite de tiempo. Se trata de una doble impregnación argéntica.

3.3.21. Técnica XIII. Para el retículo sincitial del timo

Descrita por del Río Hortega para el retículo sincitial del timo. La fijación, al igual que en la técnica anterior se haría en formol al 10% sin límite de tiempo. No se ha realizado porque no hemos dispuesto de ese órgano.

Hasta aquí se han expuesto algunas de las técnicas generales descritas por del Río Hortega a lo largo de su carrera científica. Pasamos ahora a describir otro tipo de técnicas utilizadas actualmente en Histología, para la demostración de distintos elementos tisulares.

3.4. RETICULINA

Las fibras de reticulina forman verdaderas redes o enrejados compactos que rodean cada célula o grupos celulares de una función común. No se disponen en haces, sino en filamentos entrecruzados que dan lugar a redes perivasculares, se llaman también argirófilas por su marcada tendencia a impregnarse con las sales de plata. Las partículas de plata metálica se depositan en las fibras de reticulina sensibilizadas y son fácilmente observables en los preparados microscópicos (72).

3.4.1. Técnica de reticulina por el método de del Río Hortega

Esta técnica está basada en la doble impregnación en nitrato y carbonato argénticos, con previo tratamiento de los cortes en KMnO_4 , como sensibilizador del tejido conectivo, (se produce una oxidación del tejido con formación de grupos aldehídos (66)) y posterior decoloración con $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$. El KMnO_4 produce una oxidación del tejido con formación de grupos aldehídos, lo que facilita el depósito de la plata metálica a partir de sus sales en esas zonas.

Para la realización de la técnica de reticulina se utilizó riñón, bazo e hígado de conejo y riñón e hígado de cerdo del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, fijados en formol neutro al 10%, que fueron procesados de la siguiente manera:

1. Cortes entre 10 y 40 μm realizados en el microtomo de congelación. Respecto al espesor de los cortes hemos observado que si bien la realización de la técnica es más difícil en los cortes finos los resultados son también mejores. Las secciones son recogidos en una placa de Petri con agua destilada.
2. Tres lavados sucesivos en agua destilada abundante para despojar a los cortes de cualquier vestigio de formol y/o azúcar común.
3. Oxidación en KMnO_4 en concentraciones que oscilaron entre 1/500 y 1/300 durante 5 - 30 minutos.
 - ✓ 0,20-0,33 g de KMnO_4 .
 - ✓ 100 mL de agua destilada.
4. Inmersión de los cortes en $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$ entre el 5 o el 10% hasta decoloración.
 - ✓ 5-10 g de $\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$.
 - ✓ 100 mL de agua destilada.

5. Lavado en agua amoniacal en concentraciones bastantes altas en algunos casos.
 - ✓ 500 mL de agua destilada.
 - ✓ 4-8 mL de H₃N aproximadamente en vez de las 5 gotas que sugería del Río Hortega.

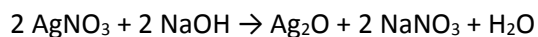
6. Lavado en agua destilada abundante durante 10 minutos.
7. Calentamiento en AgNO₃ entre el 1,5 y el 2% (hemos obtenido buenos resultados tanto con uno como con otro) piridinado (3 gotas por cada 10 mL) durante 15-20 minutos o hasta que los cortes adquieran color tabaco rubio no muy intenso.
 - ✓ 1,5-2 g de AgNO₃.
 - ✓ 100 mL de agua destilada.

8. Calentamiento a 45-50°C en carbonato de plata para reticulina (M) piridinado (3 gotas por cada 10 mL) hasta color tabaco negro (en general poco tiempo).
9. Lavado en agua destilada con 2 gotas de piridina por cada 100 mL.
10. Reducción en formol neutro al 10% en donde toman un color gris parduzco.
 - ✓ 90 mL de agua destilada.
 - ✓ 10 mL de formol neutro

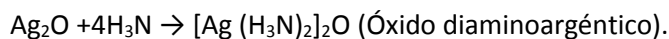
11. Lavado en agua destilada abundante.
12. Deshidratación y montaje.
13. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

3.4.2. Tinción de reticulina por el método de Gomori

Se trata de una técnica de impregnación argéntica en dos tiempos, basado en la propiedad que tienen las sales de plata de transformarse en óxido de plata (Ag₂O) por acción de álcalis fuertes (NaOH, NH₄). La reacción química es la siguiente:



El Ag₂O forma un precipitado negro en la solución alcalina y luego se van añadiendo a la solución gotas de H₃N, que forma aniones complejos por asociación con metales pesados. Estos se comportan como iones independientes solubles en agua:



El óxido diaminoargéntico que se origina se puede reducir con formol, dando lugar a la formación de precipitados de plata, H₃N y ácido fórmico (67).

En la segunda fase (al añadir otra sal argéntica, plata amoniacal, y por un proceso de reducción), se deposita plata metálica del complejo solo en aquellos lugares donde ya existían átomos de plata. Las preparaciones son luego tratadas con formalina, que juega el papel de revelador por extracción del oxígeno del complejo metálico (66).

Para la realización de esta técnica se utilizó riñón de rata procedente del SEA de la Universidad de Salamanca. Una vez fijados los bloques en formol salino tamponado se incluyeron en parafina, paso previo y necesario en la realización de este proceso.

3.4.2.1. Inclusión en parafina

El protocolo para la inclusión en parafina utilizado en nuestro laboratorio queda descrito de la siguiente manera

1. Lavado del bloque en agua destilada. (Se trata de un simple aclarado para eliminar los restos de formol).
2. Se introduce el bloque en un pocillo con EtOH al 70% y se deja hasta el día siguiente.
3. Nuevo EtOH al 70% durante una hora.

4. Pases por EtOH de concentraciones crecientes (80, 90 y 95%) de una hora de duración cada uno. Al ser más lenta la deshidratación la pieza no se retrae tanto y la inclusión es mejor.
5. Dos pases por EtOH absoluto de una hora cada uno.
6. EtOH absoluto/tolueno en proporción 1:1 durante hora y media.
7. Tolueno puro durante dos horas. En esta parte del protocolo (pasos 4 a 6, ambos inclusive) lo que hacemos es extraer el agua y el EtOH (deshidratación y desalcoholización) para que posteriormente se impregne el tejido de parafina y se pueda cortar.
8. Inmersión de la muestra de tejido en un vaso de precipitado de vidrio con parafina líquida durante 24 horas en estufa a 60°C.
9. Colocación de la muestra de tejido en un molde metálico específico, al que se añade parafina líquida y que se cubre, acto seguido, con un *casete de plástico*. Una vez bien frío desmoldamos. Así hemos obtenido el bloque de parafina adecuado a nuestro microtomo.

3.4.2.2. *Desbastado, corte y rehidratación de la muestra*

1. Desbastado del bloque (se puede hacer a 10 µm) una vez bien frío (lo podemos introducir a -18° C durante unos minutos).
2. Cortes de 6-7 µm en el microtomo de parafina (Fig. 44).
3. Desparafinado de los cortes en la estufa durante 3-4 horas.
4. Cuatro pases por xilol de una duración de 5 minutos cada uno, para el aclaramiento de las muestras.
5. Pase por una mezcla de xilol/EtOH absoluto en proporción 1:1 durante 5 minutos.
6. Un pase por EtOH absoluto durante 5 minutos.
7. Rehidratación de los cortes con EtOH de concentraciones decrecientes (90, 80, 70%) durante 5 minutos cada uno.
8. Agua destilada durante 5 minutos.

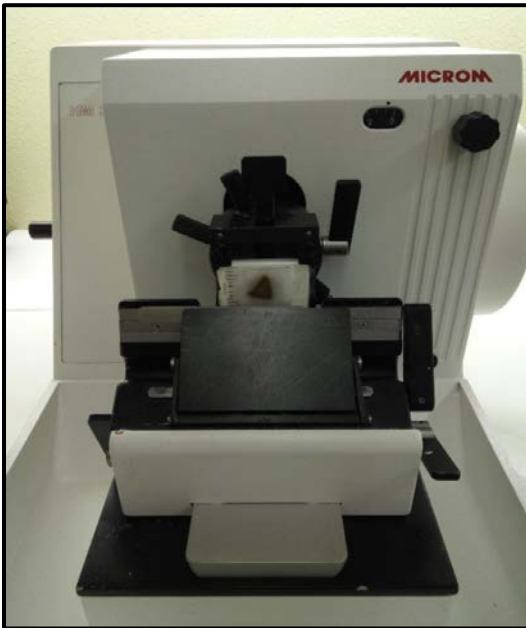


Fig.-44. Microtomo de parafina utilizado en nuestro laboratorio para realizar cortes.

3.4.2.3. Protocolo de tinción

A partir de aquí comienza la realización de la tinción propiamente dicha según el protocolo que describimos a continuación:

1. Oxidación en KMnO_4 al 0,5% durante 1 minuto.
 - ✓ 0,5 g de KMnO_4 .
 - ✓ 100 mL de agua destilada.
2. Lavado con agua del grifo durante 2 minutos.
3. Diferenciación por medio de la solución de metabisulfito potásico ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) al 2% durante 1 minuto.
 - ✓ 2 g de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$.
 - ✓ 100 mL de agua destilada.
4. Lavado en agua del grifo durante 2 minutos.
5. Sensibilización (mordentaje) en sulfato amónico férrico ($(\text{FeSO}_4)_2\text{NH}_4$) al 2% durante 1 minuto.
 - ✓ 2 g de sulfato amónico férrico.
 - ✓ 100 mL de agua destilada.

6. Lavado en agua del grifo durante 2 minutos y luego dos baños en agua destilada de 50 segundos cada uno.
7. Impregnación en la solución argéntica de Gomori durante 1 minuto.
 - ✓ A 10 mL de solución de AgNO₃ al 10% se añaden 2 mL de solución acuosa de hidróxido potásico (KOH) al 10% (disolver 10 g en 100 mL de agua destilada), y añadir H₃N concentrado gota a gota, mientras se agita el recipiente de forma continua hasta que el precipitado que se forma se disuelva totalmente. Añadir otra vez, 4 gotas de solución de AgNO₃ por cada 10 mL de solución de AgNO₃ utilizada, agitando continuamente el recipiente hasta que el precipitado que vaya formándose desaparezca por completo. Diluir con agua destilada hasta doblar el volumen (172). Puede usarse durante 2 días; si se mantiene la solución en un frasco bien tapado y guardado en la oscuridad (53).
8. Lavado rápido en agua destilada, 10 o 20 segundos.
9. Reducción en formol neutro al 20% durante 3 minutos.
 - ✓ 20 mL de formol.
 - ✓ 80 mL de agua destilada.
10. Lavado en agua del grifo durante 3 minutos.
11. Fijación en solución de Na₂S₂O₃ al 2% durante 1 minuto.
 - ✓ 2 g de Na₂S₂O₃
 - ✓ 100 mL de agua destilada.
12. Lavado en agua del grifo durante 2 minutos.
13. Deshidratación y montaje con DPX.
14. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

3.4.3. Resultados

Nuestra experiencia nos ha demostrado que la utilización de KMnO_4 al 1/500 como sugiere del Río Hortega es la idónea para la demostración de las fibras de reticulina, sin embargo, para obtener buenos resultados hemos tenido que aumentar la concentración de H_3N en el agua destilada en el paso cinco. La fina red de reticulina que se muestra en las fotografías de los distintos elementos tisulares, pone de manifiesto la bondad de este método de impregnación. Las finas fibras de reticulina aparecen teñidas en negro y la colágena en color castaño pálido.

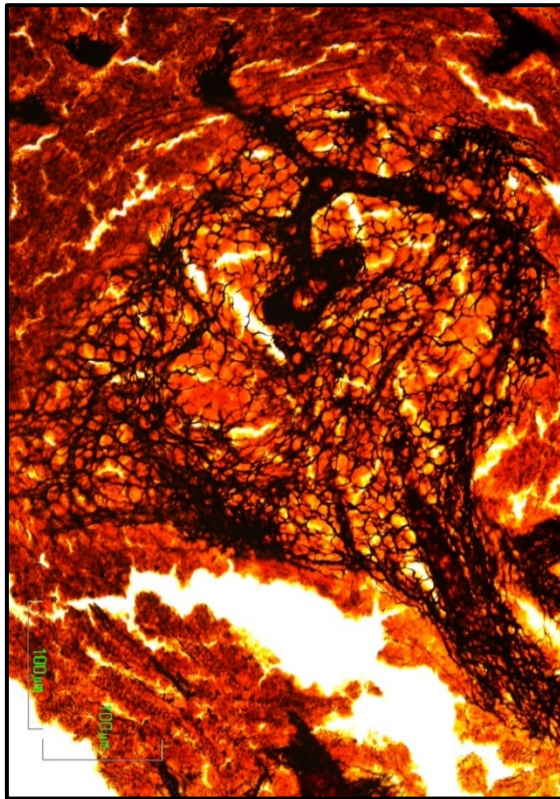


Fig.- 45 (20x)



Fig.- 46 (20x)



Fig.- 47 (40x)

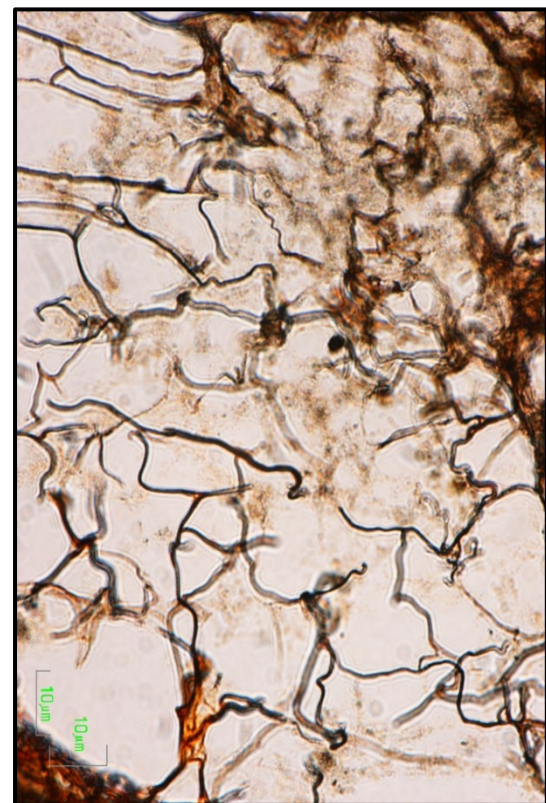


Fig.- 48 (100x)

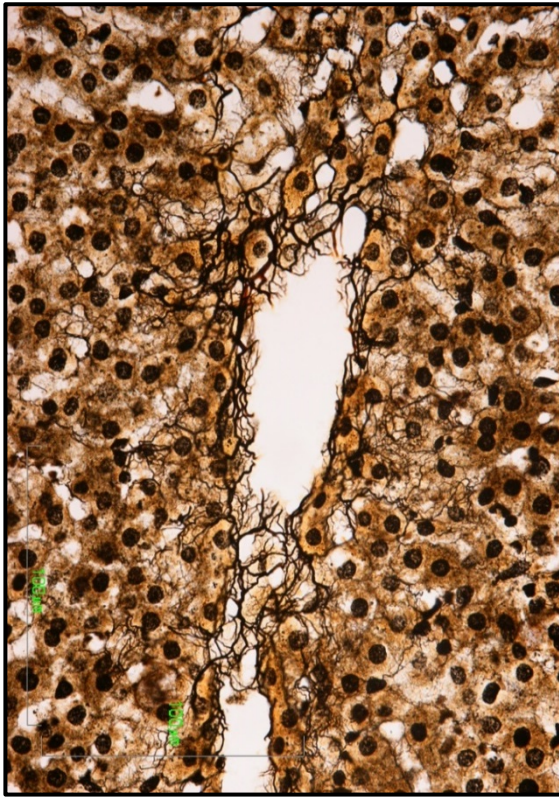


Fig.- 49 (40x)

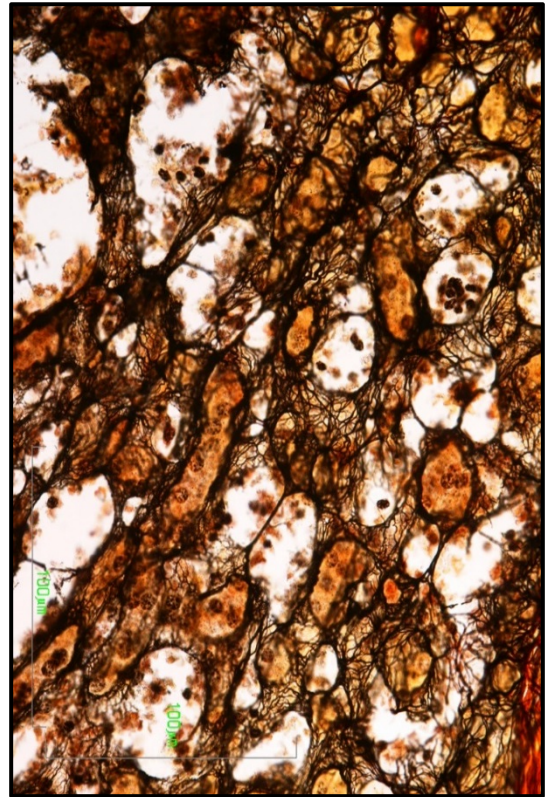


Fig.- 50 (40x)

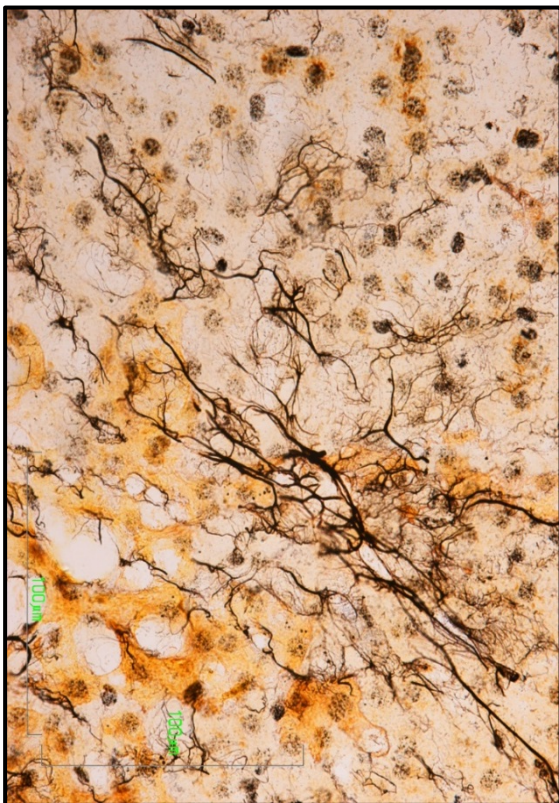


Fig.- 51 (40x)

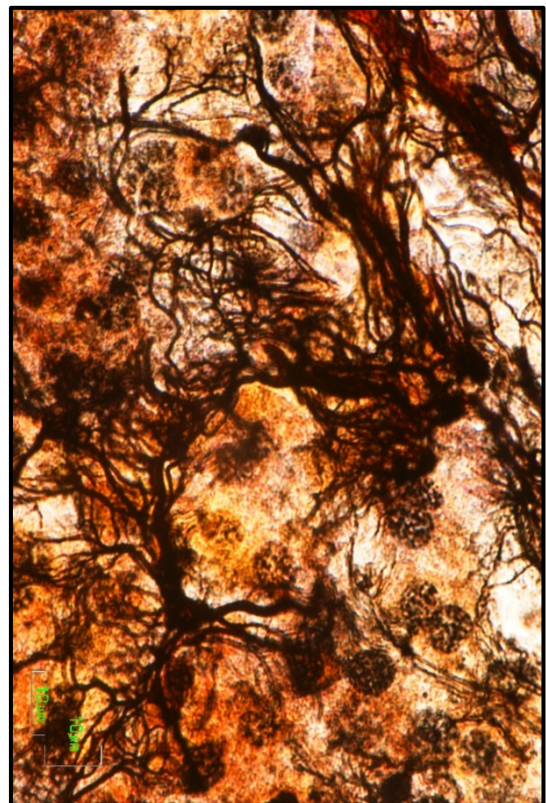


Fig.- 52 (100x)

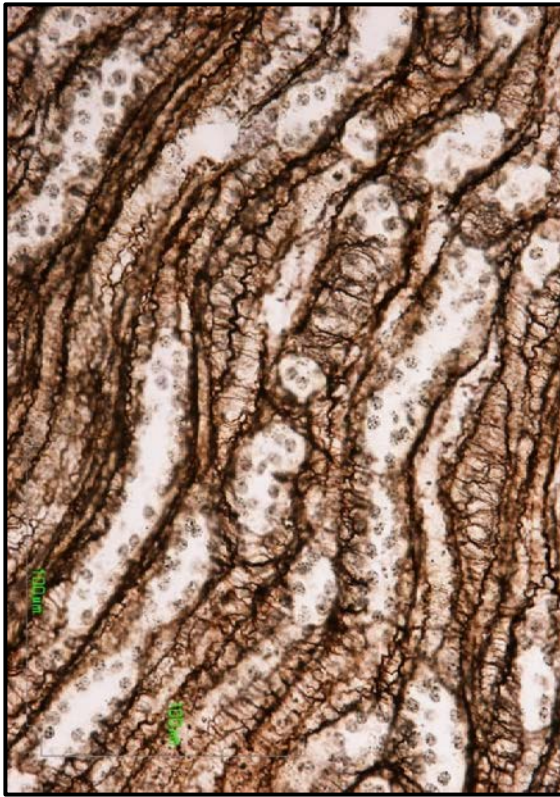


Fig.- 53 (40x)

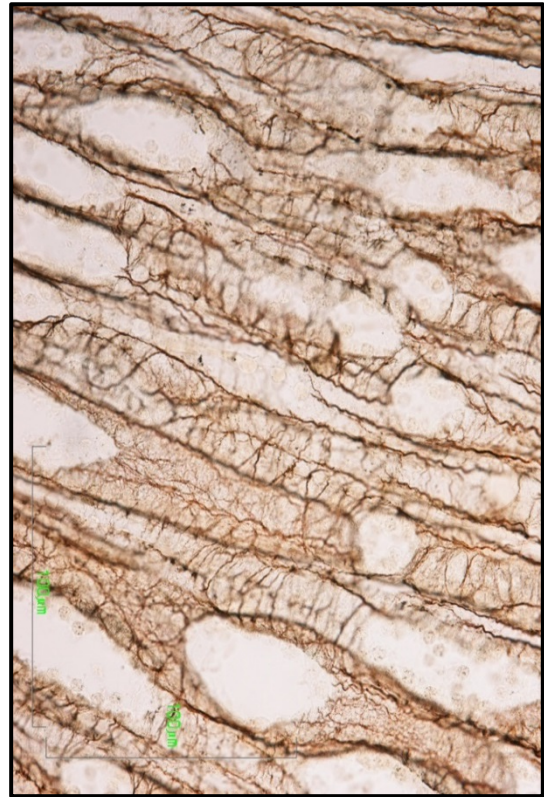


Fig.- 54 (40x)

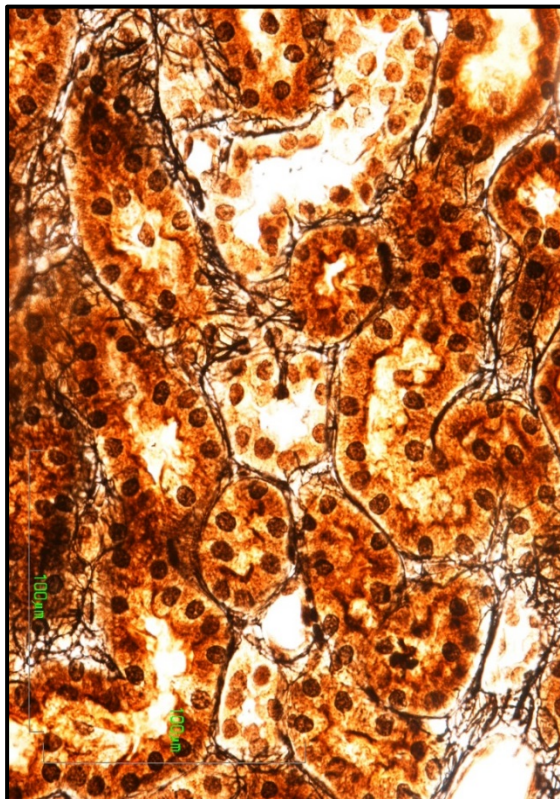


Fig.- 55 (40x)

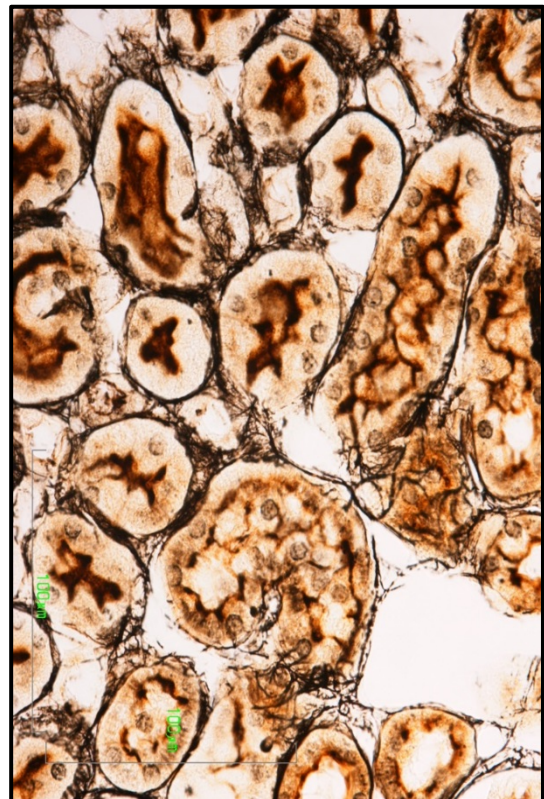


Fig.- 56 (40x)

- Fig.-45. Microfotografía de un folículo linfoide en la que se aprecia la trama de reticulina. Técnica de Pío del Río Hortega. Bazo de conejo. 20x.
- Fig.-46. Microfotografía en la que podemos apreciar la red de reticulina en la pulpa roja. Técnica de Pío del Río Hortega. Bazo de conejo. 20x.
- Fig.-47. Detalle de la anterior mostrando el esqueleto reticular de la pulpa roja, se observan los núcleos de las células sanguíneas alojadas en las cavidades del esqueleto reticular. Técnica de Pío del Río Hortega. Bazo de conejo. 40x.
- Fig.-48. Detalle a gran aumento de la red de reticulina en folículo esplénico sin contaminación celular. Técnica de Pío del Río Hortega. Bazo de conejo. 100x.
- Fig.-49. Detalle de la estructura reticular de una vena centrolobulillar. Técnica de Pío del Río Hortega. Hígado de conejo. 40x.
- Fig.-50. En esta microfotografía se muestra la fina trama reticulínica que rodea los hepatocitos separándolos del endotelio de los capilares sinusoides. Técnica de Pío del Río Hortega. Hígado de cerdo. 40x.
- Fig.-51. Detalle que muestra las fibras de reticulina con escaso contaminante de los núcleos celulares. Técnica de Pío del Río Hortega. Hígado de conejo. 40x.
- Fig.-52. Detalle a gran aumento de la red de reticulina que engloba los cordones hepatocitarios. Técnica de Pío del Río Hortega. Hígado de conejo. 100x.
- Fig.-53. Detalle de la red reticulínica peritubular. Técnica de Pío del Río Hortega. Riñón de conejo. 40x.
- Fig.-54. Detalle de la red reticulínica peritubular en un corte de menor grosor. Obsérvese la continuidad y finura de las fibras de reticulina. Técnica de Pío del Río Hortega. Riñón de conejo. 40x.
- Fig.-55. Detalle de la red peritubular reticulínica. Tinción de Gomori. Riñón de rata. 40x.
- Fig.-56. Otra área con contaminante argirófilo situado en la luz de los túbulos. Tinción de Gomori. Riñón de rata. 40x.

3.5. MICROGLÍA

La situación de la microglía en el seno del parénquima nervioso y su actividad específica le confiere propiedades morfológicas y químicas especiales, que le otorgan características tintoriales específicas. La observación de la microglía tanto normal como patológica, es posible mediante los métodos de impregnación argéntica, pero también mediante otra serie de técnicas que se han ido desarrollando desde que Río Hortega la descubriera, más precisas y selectivas, algunas de las cuales describiremos más adelante.

3.5.1. *Microglía por el método de del Río Hortega*

Río Hortega consiguió mejorar, como ya se ha comentado, las técnicas de Achúcarro y gracias al método del carbonato argéntico pudo descubrir la microglía. La equiparó a los macrófagos y a los elementos del SRE, y observó sus más finas ramificaciones tanto en estado normal como patológico. Desarrolló su método mediante una exhaustiva investigación, aportando datos importantes tanto para el correcto desarrollo de la técnica, como para la obtención de buenos resultados, comprobando por ejemplo, que hay animales más propicios como el hombre, el mono o el conejo y animales refractarios como el *cavia* (cobaya), el perro y el gato (101), que la microglía en estado normal se tiñe más fácilmente que en estado de movilización y actividad y que las células en bastoncito se colorean con gran rapidez y facilidad.

Las células de microglía tienen núcleos pequeños, oscuros y de forma variable y sus protoplasmas expansiones con dicotomías y copiosos apéndices pseudopódicos, a modo de espinas, con contenido lipóide propio de los cuerpos gránulo-adiposos microgliales, por lo que para que su impregnación sea satisfactoria, se precisa el empleo de un fijador (formol-bromuro de amonio) innecesario para la tinción de los elementos afines a ella situados fuera del tejido nervioso (101).

Río Hortega propone dos métodos que apenas varían entre sí para la coloración de la microglía (173). Nosotros nos hemos decantado por el segundo debido a que la impregnación se realiza en frío y a que la concentración del formol utilizado en la reducción es menor.

3.5.1.1. Origen y procesado de muestras

En la realización de esta técnica se utilizó cerebro de conejo de raza Nueva Zelanda por ser fácilmente manipulable y económico, de 12-14 semanas de edad, procedente del SEA de la Universidad de Salamanca, en cuyas instalaciones se mantuvo en condiciones estándar de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad relativa del ambiente entre el 50 y el 55%, ciclos de luz-oscuridad de 12:12h, alimentación con pienso artificial equilibrado y libre disponibilidad de agua.

Para proceder al estudio de la microglía se anestesió el animal (Fig. 57) de unos 4 Kg, con una dosis de ketamina (35 mg/kg)/xilazina (5 mg/kg) por vía intramuscular y en condiciones asépticas. El estado de sedación se determinó como la ausencia de reflejo de retirada en respuesta a un estímulo táctil en la cola y la planta del pie y ausencia de reflejo palpebral al estimular la superficie del ojo. El animal recibió un trato cuidadoso y se procuró evitarle sufrimiento innecesario. Después de rasurar y limpiar la zona con EtOH, se expuso la bóveda craneal mediante una incisión con un bisturí (con hoja del nº 11) estéril en el cuero cabelludo, de aproximadamente 4 cm de longitud, se le practicó un agujero con una broca de 1mm, por el que se introdujo una aguja de 0,5 mm de calibre hasta una profundidad de 0,5 cm, para provocar como sugiere del Río Hortega (173) una lesión cerebral y corroborar la activación de la microglía. Se detuvo la eventual pérdida de sangre con gasas estériles, se desinfectó la zona de la herida con Betadine® y se cerraron el tejido subcutáneo y la piel de la cabeza mediante sutura con Vicril® 2/0. Durante el periodo postoperatorio inmediato el animal se mantuvo controlado, sobre manta calefactora y bajo observación en un área al efecto.



Fig.-57. Conejo utilizado en la realización de la técnica para microglía por el método de Pío del Río Hortega.

En los días sucesivos a la intervención quirúrgica el animal fue sometido a control diario de la herida y del estado general por el personal del SEA y se mantuvo, hasta el momento del sacrificio, en las condiciones habituales de higiene y temperatura el tiempo necesario para la activación de la microglía (3 días).

Al cabo de este tiempo se sacrificó mediante una sobredosis (triple de la dosis de anestesia) de pentobarbital sódico. Se procedió a la apertura de la bóveda craneal para extraer el cerebro, que se talló en bloques de entre 3 y 5 mm de grosor sumergiéndolo en formol bromuro de amonio (Cajal) hasta un periodo máximo de 72 horas.

Formol bromuro de amonio (173)

- | | |
|-----------------------------------|--------|
| ✓ Formol al 10% | 70 mL |
| ✓ NH ₄ Br | 10 g |
| ✓ Agua destilada, hasta completar | 430 mL |

Los bloques ya fijados se procesaron según el protocolo de del Río Hortega descrito a continuación:

1. Calentamiento de los bloques de corteza cerebral y de cerebelo en un pocillo con 40 mL de formol bromuro de amonio al mechero de alcohol durante aproximadamente 10 minutos, hasta una temperatura de unos 50-55°C.
2. Dejar enfriar un momento.
3. Aclarar con abundante agua destilada en placa de Petri.
4. Cortes de 20 µm por congelación, que se recogen en una placa de Petri con agua destilada adicionada con unas gotas de H₃N para que se extiendan bien (74).
5. Aclarado dos veces en agua destilada abundante.
6. Paso a la solución de carbonato argéntico para microglía (D)(101, 173) en el que se mantienen entre 5 y 15 minutos a temperatura ambiente.
7. Reducción en formol entre el 1 y el 0,5% con agitación rápida de los cortes mediante movimientos de rotación inmediatamente después de sumergir cada corte, *pero es más práctico soplar con fuerza sobre el formol dirigiendo la corriente de aire hacia el corte* (101).
8. Paso de los cortes a agua destilada abundante.
9. Deshidratación y montaje según el modo habitual.
10. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

La microglía absorbe y retiene la plata de manera variable según la especie de que se trate por lo que conviene siempre tantear la rapidez de la impregnación, la conveniencia o no de agitar los cortes durante la reducción y la utilidad de un lavado en agua antes de efectuarla.

3.5.2. Técnica histoquímica con lectinas para microglía

Esta técnica se basa en la propiedad que tienen las lectinas de fijarse a algunos grupos de azúcares de las membranas celulares, tanto internas como externa (174, 175). En el SNC las lectinas tienen afinidad específica por las células microgliales (176). En esta técnica se utilizó la lectina obtenida del *Lycopersicum esculentum* (LEA) (tomate) por su afinidad por los residuos del azúcar poly-N-acetyl lactosamina (177).

3.5.2.1. Origen y procesado de muestras

Para estas técnicas se utilizó como animal de experimentación la rata albina de la cepa Sprague-Dawley.

Las ratas se sacrificaron mediante una sobredosis de anestesia y se procedió a extraer el encéfalo y al tallado del mismo, obteniendo bloques de 4 o 5 mm que se sumergieron inmediatamente en la mezcla fijadora apropiada a su procesamiento posterior.

Como fijador se utilizó Bouin-Hollande-sublimado que se preparó del siguiente modo:

- ✓ 2,5 g de acetato neutro de cobre (CH₃COO)₂ Cu
- ✓ 4 g de ácido pícrico (C₆H₃N₃O₇)
- ✓ 100 mL de agua destilada
- ✓ 10 mL de formol comercial.

En el momento del uso, a nueve partes de esta solución se les añade una parte de solución saturada de HgCl₂.

Tras permanecer 72 horas en la solución fijadora, los bloques fueron lavados con varios pases por una solución acuosa saturada de Li₂CO₃ y a continuación incluidos en parafina según el protocolo habitual realizado en el laboratorio.

Para la realización de la histoquímica se obtuvieron cortes seriados de 10 µm de grosor con un microtomo de tipo Minot que fueron montados sobre portaobjetos (2 cortes por portaobjeto) gelatinados.

A continuación los cortes se desparafinaron y rehidrataron de la manera ya descrita, hasta llegar a EtOH del 70% y se procedió como sigue:

1. EtOH de 70% durante 10 minutos.
2. Solución yodo-yodurada (Lugol), durante 30 segundos. Consta de 2 soluciones que una vez mezcladas se van añadiendo a EtOH de 70% hasta que este toma color *coñac* (66).
 - ✓ 2 g de yodo (I₂).
 - ✓ 90 mL de EtOH absoluto.

 - ✓ 3 g de yoduro potásico (KI).
 - ✓ 10 mL de agua destilada.
3. Solución de Na₂S₂O₃ al 5% durante 10 segundos.
 - ✓ 5 g de Na₂S₂O₃
 - ✓ 100 mL de agua destilada.
4. Lavado en agua destilada durante al menos 10 minutos.

3.5.2.2. Histoquímica para *Lycopersicum esculentum* (LEA)

Para proceder a la reacción histoquímica, después de la desparafinación y rehidratación de los cortes, se siguieron los siguientes pasos:

1. Bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 2% en metanol (CH₃-OH), durante 10 minutos.
2. Dos lavados de 10 minutos cada uno con TBS (Tris Buffer Salino) compuesto por:
 - ✓ Tris-HCl 0,05 M.
 - ✓ 0,15 M NaCl ajustado a pH 7.6 con HCl.
3. Un lavado de 10 minutos con TBS preparado del mismo modo que el anterior, al que se le ha añadido Triton X-100 al 1%.
4. Incubación con la lectina biotinizada LEA (Sigma®) a una concentración de 20 µg/mL diluida en TBS durante 24 horas, a temperatura ambiente.

5. Lavado con TBS, tres pases de 15 minutos.
6. Complejo Avidina-Peroxidasa (Sigma[®]; dilución 1:100) en TBS, durante 60 minutos a temperatura ambiente.
7. Lavado con TBS, durante 15 minutos.
8. Desarrollar con 3,3'diaminobenzidina (DAB) (Sigma[®]).
 - ✓ 40 mg de DAB.
 - ✓ 68 mg de imidazole (Sigma[®]) en 100 mL de TBS, durante 5 minutos, a temperatura ambiente.
9. Incubación en la misma solución del apartado anterior, a la que se añaden 50 µL de H₂O₂ al 30%, durante 3 minutos.

3.5.2.2.1 Tinción de contraste

Como tinción de contraste se utilizó la hematoxilina de Weigert. Con esta técnica se tiñen de azul los núcleos celulares. Se realiza del siguiente modo:

1. Tinción con hematoxilina de Weigert, durante 30 segundos.
 - ✓ Mezclar a partes iguales una solución de hematoxilina al 1% en EtOH de 96%
 - ❖ Hematoxilina 1 g
 - ❖ EtOH de 96% 100 mL
 - ✓ Con una solución de *percloruro de hierro* (cloruro de hierro III) (FeCl₃) al 1,16% en HCl concentrado al 1%.
 - ❖ FeCl₃ 1,16 g
 - ❖ HCl concentrado al 1% 100 mL

La mezcla es estable durante una semana.

2. Diferenciación en solución al 1% de HCl concentrado en EtOH de 70%, mediante dos inmersiones.
3. Virado al azul en agua corriente, durante un mínimo de 30 minutos.

Tras finalizar la reacción histoquímica y después de la tinción de contraste, los cortes se lavaron con agua bidestilada, se deshidrataron con alcoholes de gradación creciente, se aclararon en xilol y se montaron con DPX según el procedimiento habitual. A continuación se procedió al estudio y fotografiado de los cortes.

3.5.3. Técnica inmunohistoquímica para microglía Iba-1

La proteína Iba1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule 1*), es una nanoproteína que se expresa de forma específica en la microglía, y es regulada positivamente ante la activación de dichas células. La reacción inmunohistoquímica de la proteína Iba1 se detecta empleando el antisuero policlonal de conejo anti-Iba1. La unión de antígeno y anticuerpo se revela mediante la técnica de Avidina-biotina-peroxidasa (178).

3.5.3.1. Origen y procesamiento de muestras

La especie animal, la fijación, el método para la obtención de la muestra, el proceso de corte y la obtención de microfotografías que se utilizaron en esta y en la técnica de obtención de la astrogía mediante PGFA, es idéntico en ambos casos, por lo que vamos a describirlo a continuación y obviamos volver a hacerlo cuando hablemos de la astrogía.

Para la realización de esta técnica se utilizó como especie animal *Macaca fascicularis* (también conocido como cynomolgous monkey, crab-eating macaque, mono de Java o long-tailed macaque), cedido por el Dr. Lanciego.

Las muestras se obtuvieron mediante fijación por perfusión transcardíaca. Para la perfusión, los animales se anestesiaron con una sobredosis de hidrato de cloral al 10% y se perfundieron por vía transcardíaca. La perfusión comprende primero 500 mL de solución salina Ringer, seguida de 3000 mL de fijador compuesto por:

- ✓ Paraformaldehído al 4%
- ✓ Glutaraldehído al 0.1% en tampón fosfato 0.125 M a pH 7.4

La perfusión se continúa con una solución de crioprotección consistente en:

- ✓ 10% de glicerina
- ✓ 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) en tampón fosfato 0.125 M a pH 7.4

La duración total de la perfusión es de aproximadamente 45 min. Terminada la fijación, se extrae el cerebro del cráneo y se deposita en una solución tamponada de crioprotección compuesta por el 20% de glicerina y el 2% de DMSO.

3.5.3.1.1 Preparación de la solución de TBS

- ✓ Solución madre de Tris (hidroximetil aminometano):
 - ❖ 48,4 g de Tris.
 - ❖ 1000 mL de agua destilada.

- ✓ Solución madre de HCl 1N.
 - ❖ 921,27 mL de agua destilada.
 - ❖ 78,72 mL de HCl de densidad 1,183 g/cm³ y riqueza del 37%

- ✓ Solución de Tris-HCl 0,05 M (TBS) a pH 7.4:
 - ❖ 125 mL de solución de Tris.
 - ❖ 42 mL de HCl 1N.
 - ❖ 29,2 g de NaCl en 800 mL de agua destilada.
 - ❖ Comprobar y ajustar el pH a 7.4
 - ❖ Rellenar con agua destilada hasta un volumen final de 1L.

- ✓ La solución TBS contiene 0,5% de gelatina + 1% de albúmina de suero bovino (BSA).

3.5.3.1.2 Preparación de la solución de TBST

- ✓ Solución de TBST (TBS + Tween 20 (polisorbato o monolaurato de polioxietilen sorbitano)) 0,01M a pH 7.4
 - ❖ 1,2 g de Tris.
 - ❖ 8,8 g de NaCl.
 - ❖ 800 mL de agua destilada.
 - ❖ Comprobar y ajustar el pH a 7.4 con HCl 1 N.
 - ❖ Rellenar con agua destilada hasta un volumen final de 1L.
 - ❖ Añadir 0,5 mL de Tween 20 al 0,05%.

3.5.3.2. Protocolo inmunohistoquímico

1. Se obtienen por congelación series coronales de 40 µm de grosor en un microtomo de deslizamiento. Los cortes así obtenidos (10 series de cortes consecutivos) se depositaron en una solución crioprotectora de glicerina al 20% y DMSO al 2%.
2. Se lavan 3 veces con tampón TBS-Tx 0.05M, pH 7.4 (dos lavados en TBST, un lavado en TBS).
3. Se procede al bloqueo de la peroxidasa endógena durante 30 minutos a temperatura ambiente, en la siguiente solución:
 - ✓ 9,6 ml de metanol
 - ✓ 133 mL de H₂O₂ durante 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Lavar 3 veces con el mismo tampón anterior (dos lavados en TBST, un lavado en TBS).
5. Bloqueo de la solución con Triton X-100 al 0,05% a temperatura ambiente durante 1 hora (puede ser más largo).
6. Anticuerpo primario Iba1 dilución 1:500 en TBS que contiene un 1% de gelatina y un 5% de BSA, a temperatura ambiente durante toda la noche.
7. Triton X-100 al 0,05%.
8. Lavar 3 veces con el mismo tampón anterior (dos lavados en TBST, un lavado en TBS).
9. Anticuerpo secundario fluorescente Alexa Fluor[®] 488-conjugated Donkey anti-rabbit IgG (ref: A-21206; Thermo Scientific[®]), dilución 1:200 en TBS que contiene un 1% de gelatina y un 5% de BSA, dos horas a temperatura ambiente.
10. Triton X-100 al 0,05%.
11. Lavar 3 veces con el mismo tampón anterior (dos lavados en TBST, un lavado en TBS).
12. Solución de Avidina-Biotina-Peroxidasa (ABC) (Vector[®] PK-6100). (Preparar con 30 minutos de antelación), a temperatura ambiente durante hora y media.
13. Lavar 3 veces con el mismo tampón anterior (dos lavados en TBST, un lavado en TBS).
14. Revelado con DAB.
15. Deshidratación con tolueno puro, 2 pases de 5 minutos cada uno.
16. Montaje con DPX.
17. Estudio y fotografiado de los cortes.

3.5.3.3. Técnica fotográfica y procesado de imagen

Las imágenes fueron inspeccionadas en el microscopio confocal Zeiss® 510 META. Con el fin de asegurar la visualización correcta de los elementos marcados y evitar falsos positivos, la emisión procedente del láser de argón a 488 nm fue filtrada a través de un band-pass de 505-530 nm y observada en color verde.

3.5.4. Resultados

Con la técnica de Pío del Río Hortega los cortes presentan un tono parduzco indicativo de buena coloración. La microglía normal (alejada de la zona de la lesión) muestra núcleos oscuros, a menudo envueltos por citoplasma muy teñido cuyas expansiones, gruesas en su origen, se hacen filiformes y se dividen varias veces. La impregnación granulosa indica permanencia insuficiente en el baño de plata o excesivo lavado antes de la reducción.

La microglía activada (cercana a la zona de lesión) se muestra más voluminosa, con menor número de expansiones y con las formas correspondientes a los movimientos *ameboides* y a la carga de productos fagocitados (células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos).

La lectina LEA marca las células microgliales, dentro de las cuales se encuentran cambios referidos al número y a la morfología de las mismas. En cuanto al número se observa un ligero aumento. En cuanto a la forma, adquieren una morfología que se caracteriza por un aumento del tamaño del citoplasma, que se acompaña, solo en algunos casos, de prolongaciones muy cortas, es decir están haciendo su aparición las formas activadas de la microglía, tanto la globular como la *ameboide* o pseudopódica.

En la técnica de fluorescencia se observa la distribución de la microglía en color verde. Las células microgliales ramificadas tienen procesos de proyección radial que son largos, delgados con ramificaciones finas. Las células hipertrofiadas tienen somas grandes y procesos gruesos, cortos y proyectados radialmente con menos ramificaciones.



Fig.- 58 (10x)

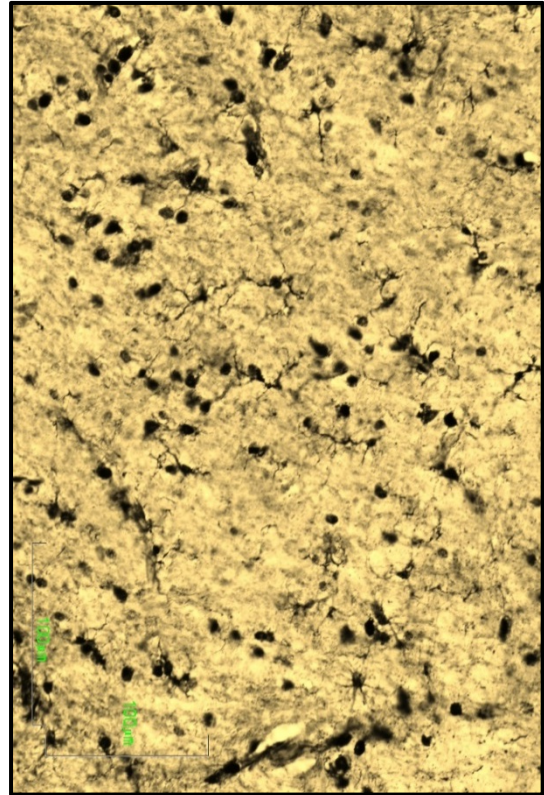


Fig.- 59 (20x)

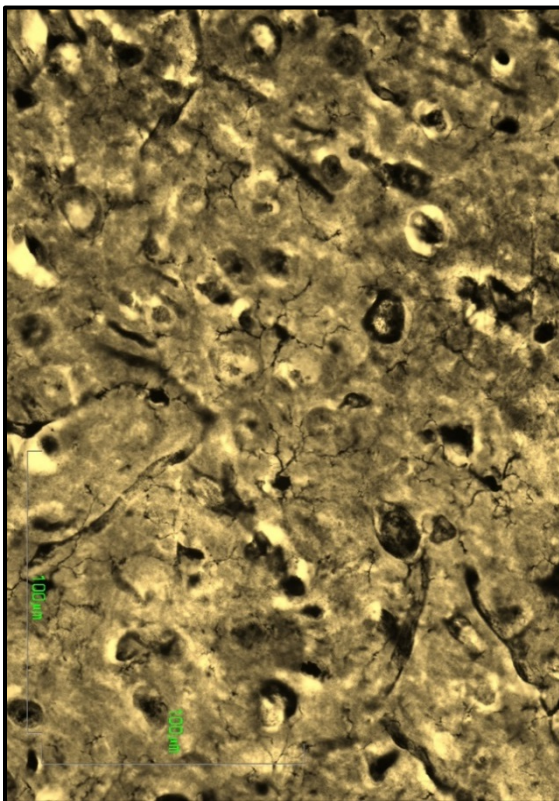


Fig.- 60 (40x)

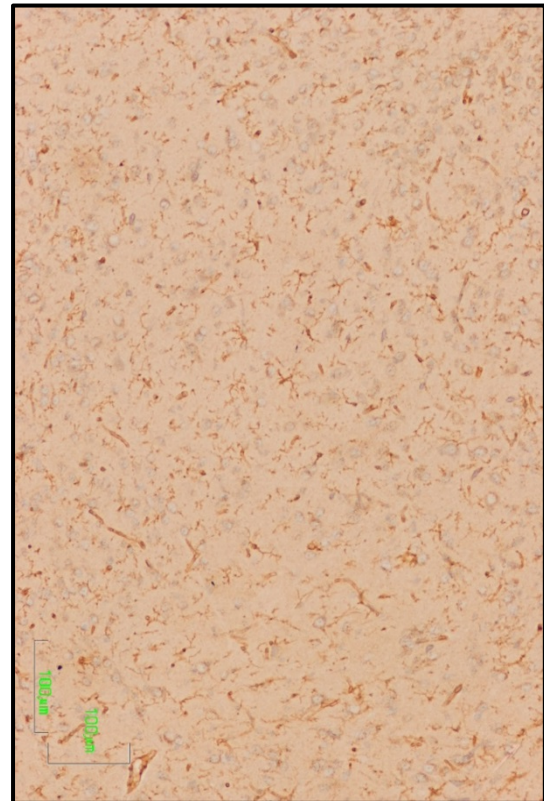


Fig.- 61 (10x)

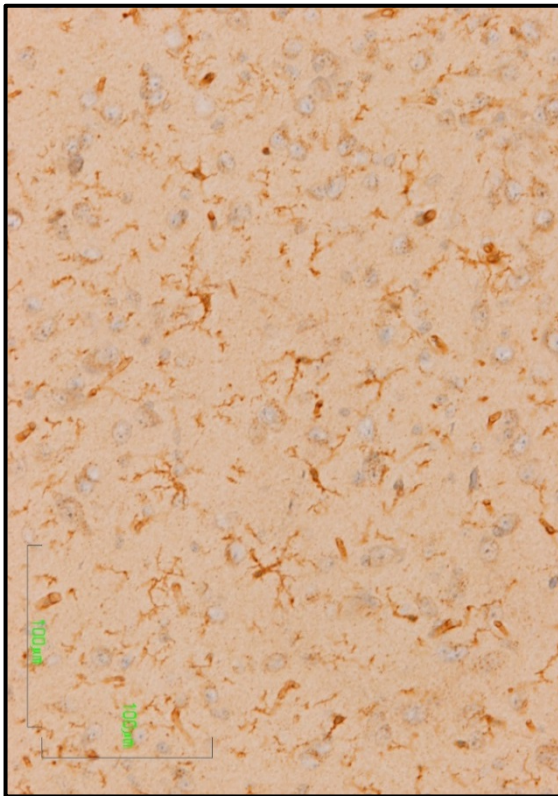


Fig.- 62 (20x)

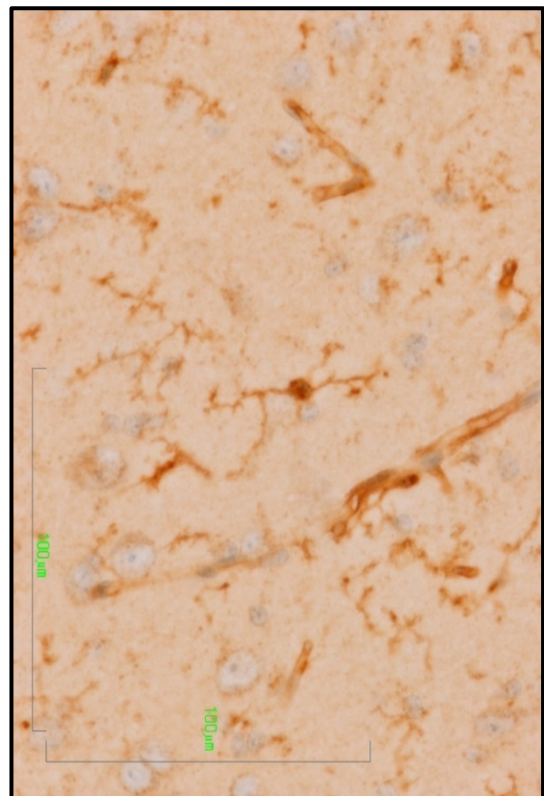


Fig.- 63 (40x)

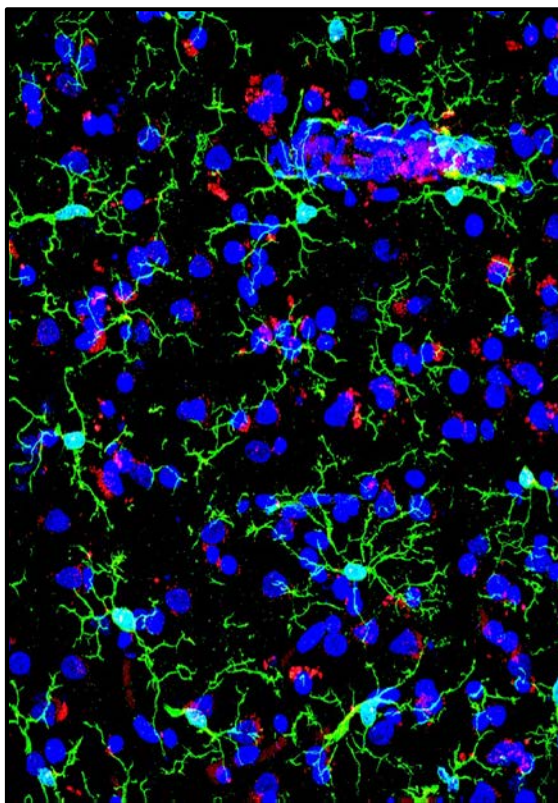


Fig.- 64 (40x)

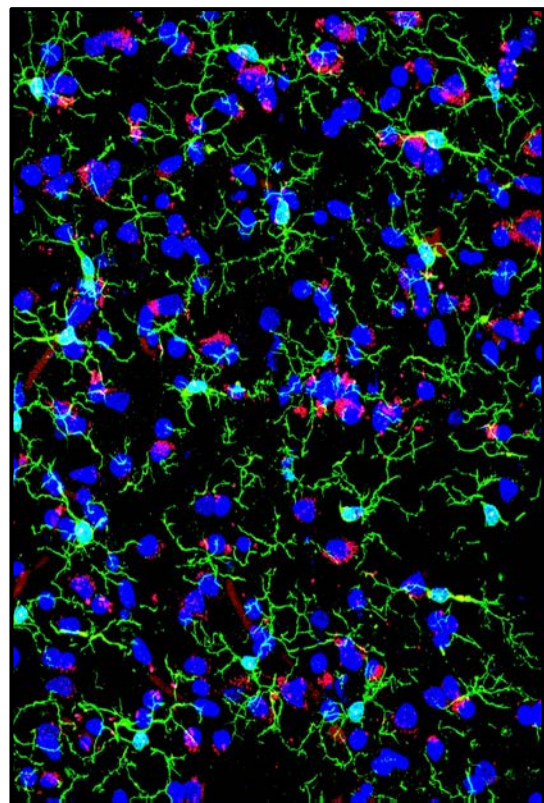


Fig.- 65 (40x)

- Fig.-58. Microfotografía panorámica de células microgliales en corteza cerebral de conejo impregnadas con carbonato de plata. Se observa la distribución espacial en principio aleatoria de estos elementos gliales entre el resto de las células de tejido nervioso. Técnica para microglía de Pío del Río Hortega. Cerebro de conejo. 10x.
- Fig.-59. Microfotografía a mayor aumento que muestra las células microgliales con la distribución tridimensional de sus prolongaciones. Nótese como el resto de los elementos gliales solo presentan impregnado el núcleo y alguna escasa porción del citoplasma. Técnica para microglía de Pío del Río Hortega. Cerebro de conejo. 20x.
- Fig.-60. Detalle a gran aumento de las células microgliales con sus prolongaciones primaria, secundaria, terciaria y espina cuaternaria que espacialmente se encuentran introducidas en los huecos que dejan los otros elementos de la corteza cerebral. Técnica para microglía de Pío del Río Hortega. Cerebro de conejo. 40x.
- Fig.-61. Panorámica de la demostración mediante inmunocitoquímica de la microglía en cerebro de rata. Nótese como las células y sus prolongaciones son reconocibles, aunque con una menor resolución que la que proporciona el carbonato argéntico (fig. 58). Técnica inmunohistoquímica para LEA. Cerebro de rata. 10x.
- Fig.-62. Imagen a mayor aumento de las células microgliales y sus prolongaciones en el neuropilo de la corteza cerebral. Técnica inmunohistoquímica para LEA. Cerebro de rata. 20x.
- Fig.-63. Microfotografía donde se observa en primer plano un microgliocito con sus prolongaciones hasta las espículas cuaternarias, aunque con menor nitidez que con el carbonato de plata. Técnica inmunohistoquímica para LEA. Cerebro de rata. 40x.
- Fig.-64. Reconstrucción tridimensional con microscopio láser confocal a gran aumento donde se observa la distribución de las células microgliales y sus prolongaciones en la corteza cerebral de mono. Técnica inmunohistoquímica con Iba 1. 40x.
- Fig.-65. Microgliocitos a gran aumento con la técnica de láser confocal, donde es posible observar la marcada distribución tridimensional de las prolongaciones citoplásmicas de estas células. Técnica inmunohistoquímica con Iba 1. Cerebro de mono. 40x.

3.6. ASTROGLÍA

Como hemos comentado anteriormente la técnica III B que del Río Hortega describió para astrocitos protoplásmicos y fibrosos no se realizó, pero hemos creído conveniente dada la naturaleza de este trabajo, exponer en este apartado los resultados sobre astrogliá que hemos obtenido con otras técnicas (Técnica I C) no específicas para astrocitos, y una batería de técnicas (inmunocitoquimia para PGFA, láser confocal, Golgi-Hortega).

3.6.1. *Técnica inmunohistoquímica para astrocitos. PGFA*

Las propiedades estructurales del citoesqueleto de los astrocitos se mantienen gracias a la red de filamentos intermedios, de la cual el componente fundamental es la PGFA (GFAP por sus siglas en inglés) (169). La PGFA inducida en daño cerebral y degeneración del SNC y cuya expresión aumenta con la edad, es el marcador clásico para la identificación inmunohistoquímica de astrocitos (170, 179-181).

3.6.1.1. *Origen y procesado de las muestras*

El proceso se describe del siguiente modo:

1. Lavar 3 veces con tampón Tris (dos lavados en TBST, un lavado en TBS).
2. Bloqueo de la peroxidasa endógena en la siguiente solución:
 - ✓ 9,6 mL de metanol.
 - ✓ 133 mL de H₂O₂, durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Lavar 3 veces con el mismo tampón anterior (dos lavados en TBST, un lavado en TBS).
4. Bloqueo de la solución con Triton X-100 al 0,05% a temperatura ambiente durante una hora (puede ser más largo).
5. Anticuerpo primario Rabbit anti-proteína ácida fibrilar glial (GFAP DAKO® ref: Z0334) dilución 1:400 a temperatura ambiente durante toda la noche.
6. Triton X-100 al 0,05%
7. Lavar 3 veces con el mismo tampón anterior (dos lavados en TBST, un lavado en TBS).
8. Anticuerpo secundario fluorescente dilución 1:200 Alexa® 488-conjugated Donkey anti-rabbit IgG (ref: A-21206; Thermo Scientific®), dos horas a temperatura ambiente.
9. Triton X-100 al 0,05%

10. Lavar 3 veces con el mismo tampón anterior (dos lavados en TBST, un lavado en TBS).
11. Solución ABC (Vector[®]PK-6100). (Preparar con 30 minutos de antelación), a temperatura ambiente durante una hora y media.
12. Lavar 3 veces con el mismo tampón anterior (dos lavados en TBST, un lavado en TBS).
13. Desarrollar con DAB.
14. Deshidratación con tolueno puro, 2 pases de 5 minutos cada uno.
15. Montaje con DPX.
16. Estudio y fotografiado de los cortes.

3.6.2. Resultados

Partiendo de la comparación de los resultados obtenidos con la hematoxilina eosina en tumores gliales, observamos, que los proporcionados por la Técnica I C (Fig.- 66) en cerebro de cerdo, la aventajan considerablemente, en ella se pueden observar con gran claridad las expansiones protoplasmáticas astrocitarias. Nótese que son notablemente superiores en cuanto a la morfología y detalle de las prolongaciones de estas células.

Se muestran, además, microfotografías de corteza cerebral de diferentes especies, en las que se aprecian los resultados obtenidos con el método de Golgi-Hortega (donde se observan los *pies chupadores de Achúcarro*), con los de inmunohistoquímica para PGFA en un oligodendroglioma humano, así como los obtenidos mediante inmunohistoquímica de fluorescencia para PGFA en cerebro de mono, en los que también se observan pies perivasculares.

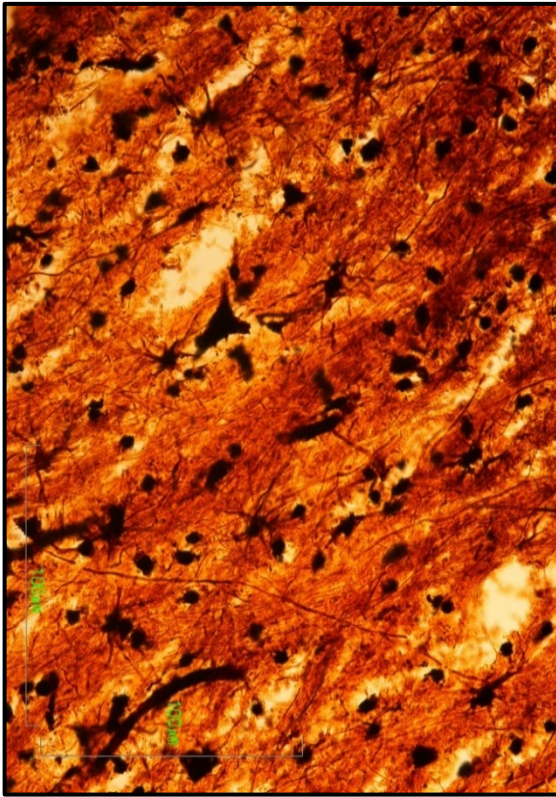


Fig.- 66 (40x)



Fig.- 67 (20x)

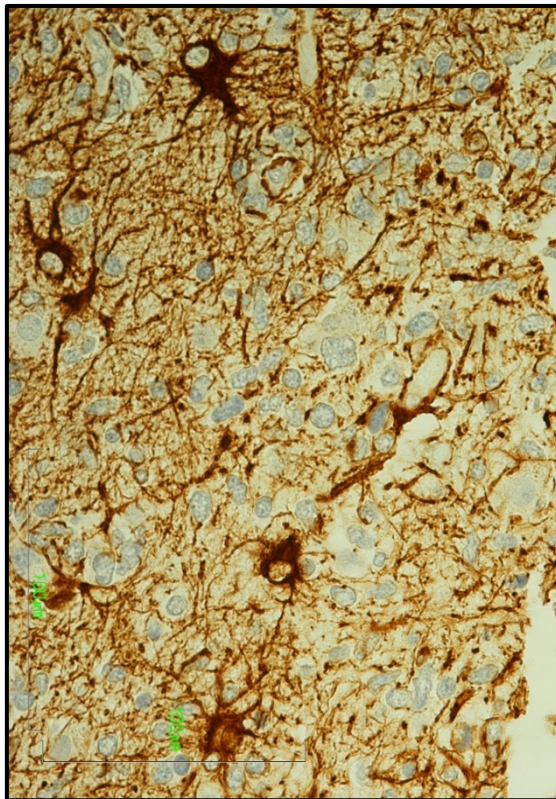


Fig.- 68 (40x)

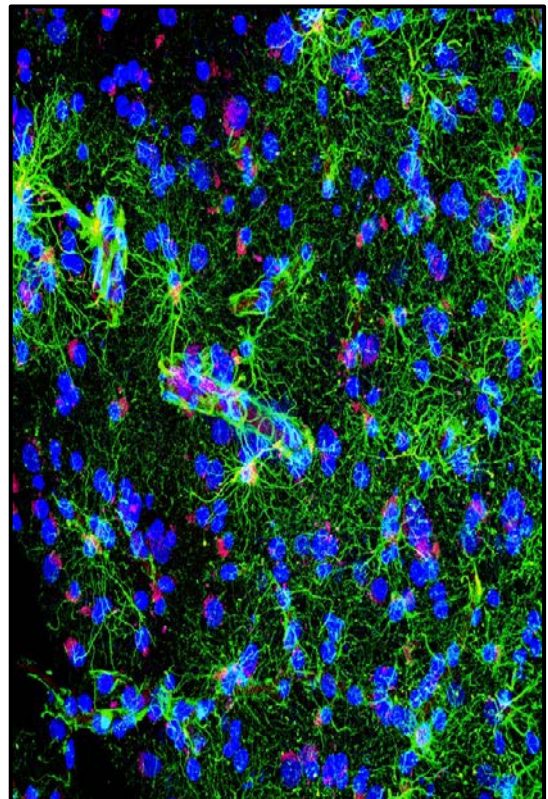


Fig.- 69 (20x)

Fig.-66. Detalle que muestra la impregnación de las prolongaciones astrocitarias en una zona de sustancia blanca. Se observa la característica distribución radial de las prolongaciones astrocitarias así como algún pie perivascular. Astrocitos protoplasmáticos en una preparación de carbonato de plata. Técnica I C. Cerebro de cerdo conservado durante varios años en formol. 40x.

Fig.-67. Imagen con la técnica de Golgi-Hortega de diferentes células astrogliales, variedad fibrosa, con las prolongaciones orientadas según el eje mayor de las fibras, en este caso paralelas al eje mayor de las fibras y de izquierda a derecha. Así mismo se observan varios pies perivascuales en algunos de los cuales se puede seguir la trayectoria desde el soma de la célula glial hasta el capilar donde se apoya. Técnica Golgi Hortega. Cerebro de rata. 20x.

Fig.-68. Inmunocitoquímica para PGFA que muestra varios astrocitos hipertróficos con gran positividad del soma y de las prolongaciones. Además se observan en el neuropilo la trama abundante que forman las prolongaciones de los astrocitos. Técnica inmunohistoquímica con PGFA. Oligodendroglioma. Tumor cerebral humano. 40x.

Fig.-69. Imagen con microscopio láser confocal de la reconstrucción tridimensional de las células astrogliales en corteza cerebral de mono. Además de la distribución radial de las prolongaciones a las que deben su nombre los astrocitos, ilustrada en color verde, se observan numerosas trompas chupadoras en dos vasos presentes en la microfotografía. Técnica inmunohistoquímica para PGFA. Cerebro de mono. 20x.

3.7. OLIGODENDROGLÍA

Para el estudio de la oligodendroglía, Pío del Río Hortega propuso un método de impregnación argéntica de características tintoriales semejantes a las de la microglía, en el que también utilizaba como fijador formol bromuro de amonio. La tinción se mostró eficaz para estudiar la distribución topográfica y relaciones de los oligodendrocitos con otras estructuras celulares. La variación consistía en no agitar los cortes cuando se encontraban en el reductor formólico, debido a una menor apetencia de la oligodendroglía por las sales de plata.

3.7.1. Golgi-Hortega

Sin embargo, el método anterior no le dio buenos resultados para analizar los caracteres morfológicos de los oligodendrocitos. Después de una exhaustiva investigación al respecto, propuso un nuevo método basado en el de Golgi, denominado Golgi-Hortega, con el que logró obtener resultados muy favorables, que le sirvieron de base para publicar su amplio y excelente trabajo sobre la oligodendroglía (110). Este nuevo método es el que nosotros hemos utilizado en este trabajo y que pasamos a describir a continuación.

3.7.1.1. Origen y procesado de muestras

Para la realización de esta técnica se utilizaron seis ratas macho de la especie *Rattus norvegicus*, variedad albina, raza Wistar, de 200 ±30 g de peso, procedentes del SEA de la Universidad de Salamanca, en cuyas instalaciones fueron criadas en las mismas condiciones ambientales que el animal utilizado para la obtención de la microglía.

A cada animal destinado al estudio de la oligodendroglía, se le anestesió con tiopental sódico por vía intraperitoneal (50 mg/Kg de peso). Una vez anestesiado, se le realizó una toracotomía, exponiendo el corazón tras la apertura del pericardio, a continuación se introdujo una cánula a través del ventrículo izquierdo hasta el inicio de la aorta, procediendo a la perfusión a presión controlada de suero fisiológico heparinizado al 0,9%, con el fin de retirar por completo la sangre del animal y lavar el árbol vascular. Cuando dejó de salir líquido hemático, comenzamos la perfusión con la solución fijadora, la cual pasa a través de los vasos sanguíneos fijando el cerebro y todos los tejidos.

La solución fijadora es la siguiente (20, 101, 110):

✓ K ₂ Cr ₂ O ₇	3 g
✓ Hidrato de cloral	2,5 g
✓ Formol al 10%	50 mL

Se disolvió el K₂Cr₂O₇ en 45 mL de agua destilada, se le agregaron 5 mL de formol concentrado y por último se añadió el hidrato de cloral. El fijador se preparó en el momento de su uso, pues se deteriora en 24 horas. Por la misma razón debe renovarse a diario mientras actúa sobre las piezas.

Una vez finalizada la perfusión se expuso la bóveda craneal y se extrajo el cerebro que se talló con una hojilla de afeitar en porciones de 3 o 4 mm de espesor (suelen obtenerse entre 3 o 4) y se procedió como sigue:

1. Estas porciones se sumergieron en frascos de vidrio topacio de boca ancha con la solución fijadora, donde permanecieron a 4°C durante 2, 3 y 4 días respectivamente. Se dispuso de 3 frascos y en cada frasco se introdujeron las porciones de dos cerebros. Mientras se realizaba el proceso de fijación se cambió el líquido fijador todos los días, al principio y al final de la jornada.
2. Terminada la fijación, los fragmentos se pasaron primero por agua destilada y posteriormente por AgNO₃ al 1,5%, en sendas placas de Petri a modo de lavado (se forma un precipitado rojo ladrillo característico), antes de sumergirlos en otros 3 frascos de vidrio topacio de boca ancha con AgNO₃ al 1,5%, donde permanecieron a temperatura ambiente 2, 3 y 4 días respectivamente, renovándose la solución diariamente. No es necesario resguardarlos del abrigo de la luz.
3. Al cabo de ese tiempo, las porciones se lavaron en una placa de Petri con agua destilada y se encastraron en bloques de parafina del siguiente modo:
 - ✓ Los bloques se obtuvieron mediante el depósito previo de parafina líquida en unos moldes especiales como los que se muestran en la fotografía inferior izquierda (Fig.- 70). Para desprender el bloque de una manera sencilla se introdujo todo el conjunto a -18°C durante 15 minutos.

- ✓ Una vez extraído el bloque y ayudándonos de una paletilla, o cualquier otro objeto plano metálico, calentada a la llama se fundió la parte superior del bloque y se encastró la pieza hasta que quedó totalmente recubierta de parafina.
- 4. Se realizaron cortes de entre 40 y 60 μm de grosor con un microtomo de congelación Leitz Wetzlar (Fig.- 71), que se recogieron en EtOH de 95%, donde permanecieron no más de 30 minutos.
- 5. Transcurrido ese tiempo se depositaron en una placa de Petri con aceite de clavo, donde permanecieron entre 2 y 5 minutos, trasladándolos luego a un portaobjetos donde se aclararon varias veces con xilol.
- 6. Posteriormente se cubrieron con una mezcla casi líquida de resina damar y xilol. Se esperó a que se secase la resina y se le dio otra capa y así varias veces hasta que la superficie de los cortes estuvo perfectamente cubierta por este barniz. Los cortes deben resguardarse de la luz y del polvo.
- 7. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

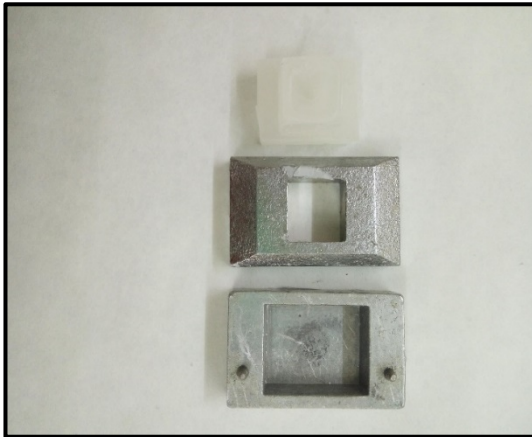


Fig.-70. Moldes metálicos en los que se introduce la parafina líquida para preparar los bloques donde posteriormente se incrustarán las piezas de tejido.

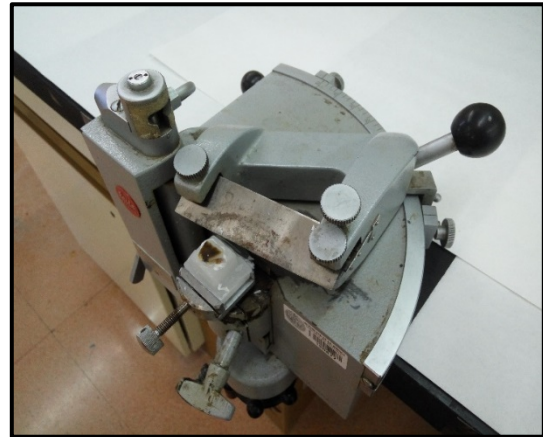


Fig.-71. Microtomo de congelación Leitz Wetzlar, utilizado en nuestro laboratorio para efectuar cortes gruesos y procesarlos por el método Golgi-Hortega.

3.7.2. Resultados

Se obtuvieron preparaciones en la que se observan los oligodendrocitos, impregnados en color marrón oscuro, siendo visibles sus expansiones sobre un fondo amarillo.



Fig.- 72 (20x)

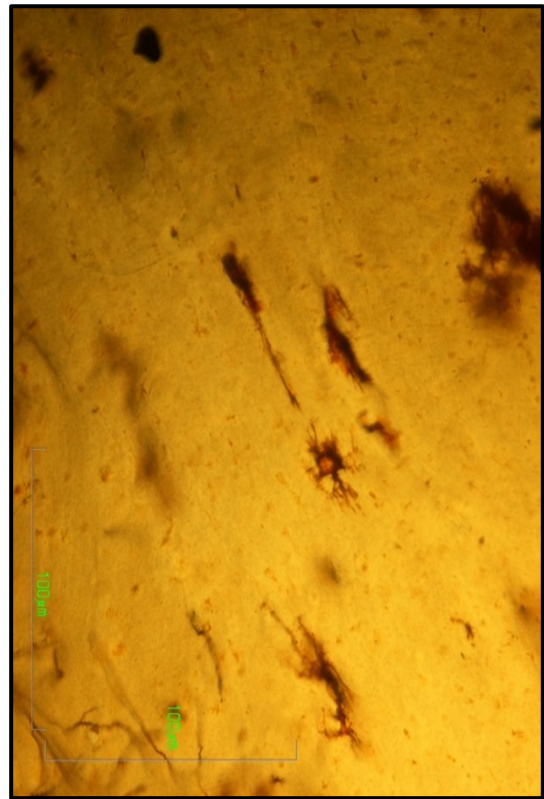


Fig.- 73 (40x)

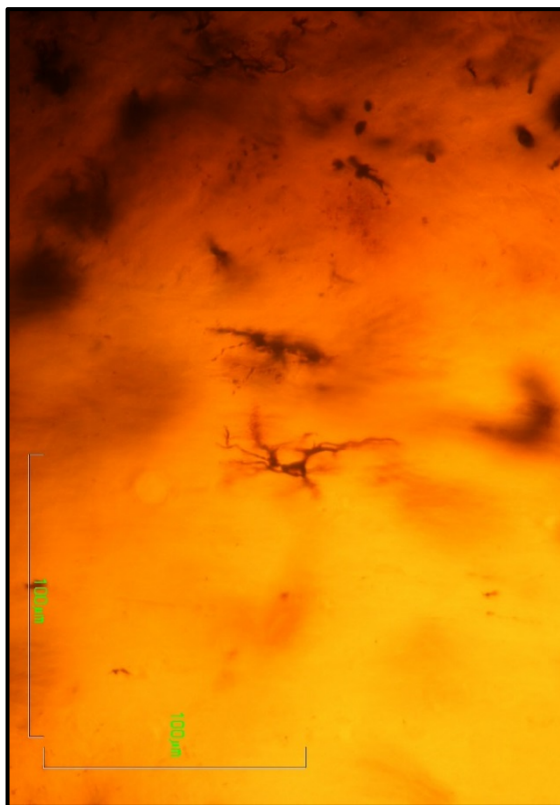


Fig.- 74 (40x)

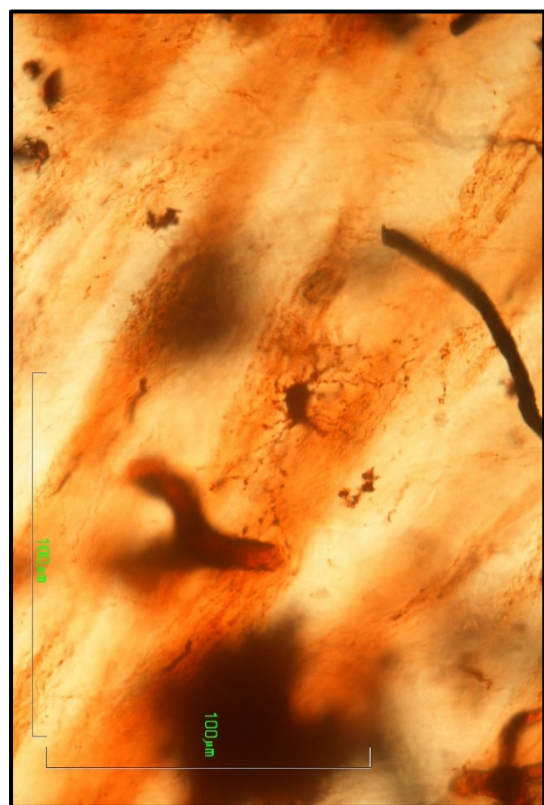


Fig.- 75 (40x)

Fig.-72. Dos oligodendrocitos en sustancia blanca, obsérvense las prolongaciones celulares alargadas en sentido paralelo al eje longitudinal de las fibras nerviosas. Técnica Golgi-Hortega. Cerebro de rata. 20x.

Fig.-73. Célula oligodendroglial con escasas y gruesas prolongaciones. Técnica Golgi-Hortega. Cerebro de rata. 40x.

Fig.-74. Célula oligodendroglial con prolongaciones que recuerdan en su distribución a las de la microglía de la cual se diferencian por la ausencia de espinas terminales. Técnica Golgi-Hortega. Cerebro de rata. 40x.

Fig.-75. Oligodendrocito totalmente impregnado con prolongaciones extremadamente delgadas con algunas dilataciones varicosas, distribuidas en los tres planos espaciales, con predominio del plano paralelo al eje de las fibras nerviosas. La extensión de las prolongaciones en este plano se aproxima a los 100 micrómetros. Técnica Golgi-Hortega. Cerebro de rata. 40x.

3.8. TUMORES

Pasamos a continuación a describir el proceso de las series tumorales facilitadas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario de Salamanca.

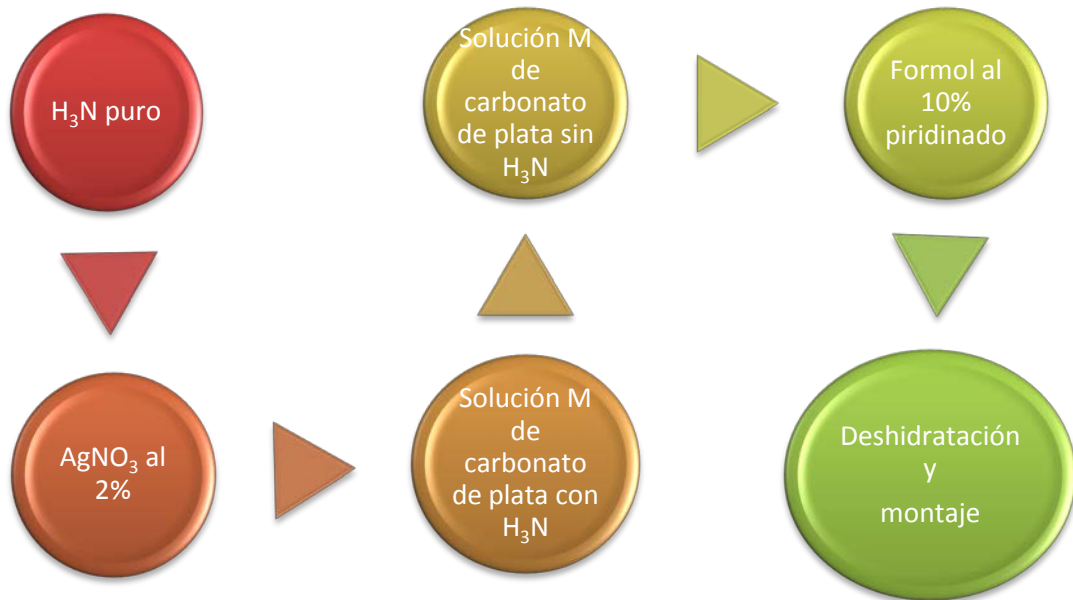
3.8.1. Técnica VIII. Coloración protoplásmica general. Panóptica

Como se expuso anteriormente se estudiaron una serie de tumores humanos mediante la técnica Panóptica, entre los que se encontraban meningiomas (9), astrocitomas (3), oligodendrogliomas (2), oligoastrocitomas (1), meduloblastoma (1), glioblastomas (20) y metástasis de adenocarcinomas (10), así como tres autopsias de cerebro, clínica y anatomopatológicamente demostrados.

3.8.1.1. Origen y procesado de muestras

Las piezas estaban fijadas en formol cuando se recogieron, una vez en nuestro laboratorio, se lavaron con agua destilada abundante para eliminar los restos de formol y posteriormente se introdujeron en botes de 100 mL con agua destilada saturada de azúcar común y unos granos de timol, para que el corte se pudiera realizar con facilidad. A partir de aquí se siguió el protocolo ya descrito.

Sirva a modo de recordatorio de la técnica VIII o Panóptica el siguiente esquema:



3.8.2. Técnica inmunohistoquímica en tumores humanos

En la actualidad, el diagnóstico de los tumores cerebrales se basa en los criterios revisados por la OMS. Su fundamento sigue siendo el estudio histológico apoyado por la inmunohistoquímica que contribuye a diagnosticar la estirpe tumoral.

La técnica Panóptica de Pío del Río Hortega ofrece mucha información sobre las muestras de tumores, pero no permite discriminar selectivamente moléculas determinadas e implicadas en los posibles mecanismos neoplásicos que no son detectables mediante las mismas. Es por ello por lo que hemos efectuado un estudio comparativo con las técnicas inmunohistoquímicas analizando PGFA (descrita en el apartado de astroglia), enolasa (enolasa neuronal específica) (NSE por sus siglas en inglés) y anti-cytokeratin (CAM5.2).

Hemos analizado la NSE porque es el marcador más constante en los meduloblastomas (182). Si bien es un marcador neuronal (183), se expresa en células gliales en ciertas condiciones. Específicamente, se han detectado niveles de actividad de la NSE en oligodendrocitos (184), Su expresión aumenta durante la diferenciación oligodendrocítica, pero se reprime una vez que la célula madura. En condiciones patológicas también se detecta la NSE en neoplasias gliales y en células gliales reactivas (185).

CAM5.2 es un marcador de células epiteliales. Los marcadores que se pueden utilizar en los tumores metastásicos en el SNC son múltiples, como múltiples son los tumores que pueden metastatizar en esa localización (186). Sin embargo, al ser la mayoría de origen epitelial, el marcador más útil es la citoqueratina CAM5.2 (186).

3.8.2.1. Origen y procesamiento de muestras

1. Tejidos tumorales o metastásicos fijados en formol tamponado al 10% durante 24 horas.
2. Inclusión de los cortes en parafina, siguiendo el protocolo habitual.
3. A continuación se realizan cortes de 4 μm en microtomo (Leica[®]), que se recogen en portaobjetos gelatinizados para favorecer su adherencia y evitar que se despeguen.
4. Se identifican los portaobjetos asignándole el anticuerpo que se desea marcar
 - ✓ PGFA (policlonal) que la utilizamos a una dilución de 1/100.
 - ✓ CAM5.2 prediluida.
 - ✓ NSE prediluida.
5. Secado de las secciones durante 24 horas en estufa a 60°C.
6. Desparafinado, aclarado y rehidratado de los cortes desde xilol hasta agua destilada del modo habitual.
7. Lavado con PBS.

A continuación se realiza la tinción de forma automática en inmuno teñidor Bon Max[®] de Leica (Leica Biosystems, Melbourne, Australia). Todos se procesan con los mismos tiempos en cada uno de sus pasos de incubación con el Bond[™] polímero de Leica. El Bond[™] polímero de Leica es un kit para inmunohistoquímica que ya viene preparado con los reactivos a utilizar, por lo que todo el proceso es totalmente automático, para que la tinción resulte por igual en todas las muestras y evitar falsos positivos.

El desenmascaramiento antigénico se realizó mediante la incubación de las secciones con una solución de buffer citrato (BioGenex, CA) a pH 6, en microondas durante tres minutos. El bloqueo de peroxidasa endógena con H₂O₂ al 3% durante 15 minutos. El anticuerpo primario, PGFA, CAM5.2 o NSE según nos interese, durante 20 minutos. La incubación con anticuerpo secundario (complejo de inmunoglobulinas), durante 8 minutos y se revela con DAB durante 10 minutos. Entre estos pasos hay lavados con PBS, por último, tinción de contraste con hematoxilina durante 5 minutos. Todo ello de forma automática.

1. Lavado con agua destilada.
2. Deshidratación de los cortes con concentraciones crecientes de EtOH (70, 80, 90%) hasta EtOH absoluto e Histo-Clear II de 5 minutos cada uno.
3. Montaje con medio permanente (DPX).
4. Observación al microscopio y fotografiado de los resultados obtenidos.

3.8.3. Resultados

Prácticamente todos los tumores son propicios a la impregnación argéntica realizada con la Técnica VIII (Panóptica), pero los gliomas en general, resultan más favorables. Las células típicas de cada uno de ellos son fácilmente evidenciables en su morfología. En meningiomas y metástasis de adenocarcinoma, hemos obtenido imágenes muy semejantes a las obtenidas con las técnicas inmunohistoquímicas como puede observarse en las microfotografías expuestas. Sin embargo los resultados obtenidos en los glioblastomas y en los oligodendrogliomas han sido poco expresivos de la estructura y morfología de sus elementos celulares, por lo que no resultarían satisfactorios para realizar un diagnóstico clínico firme.

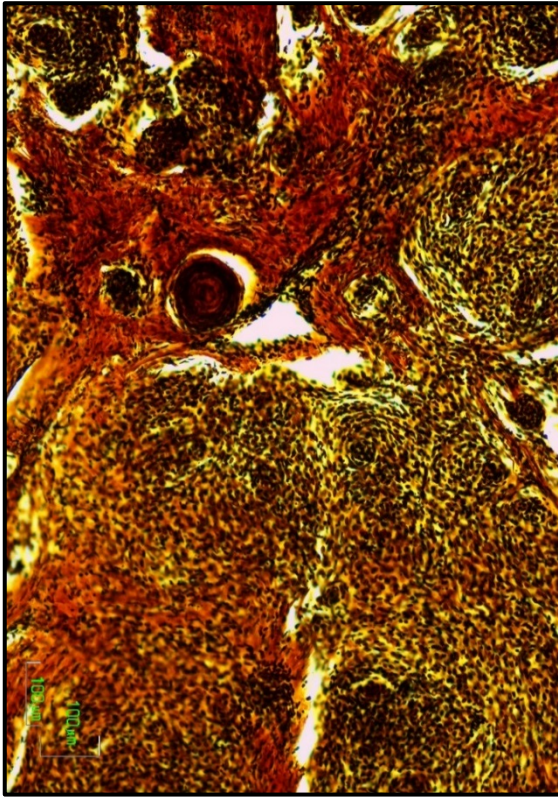


Fig.- 76 (10x)

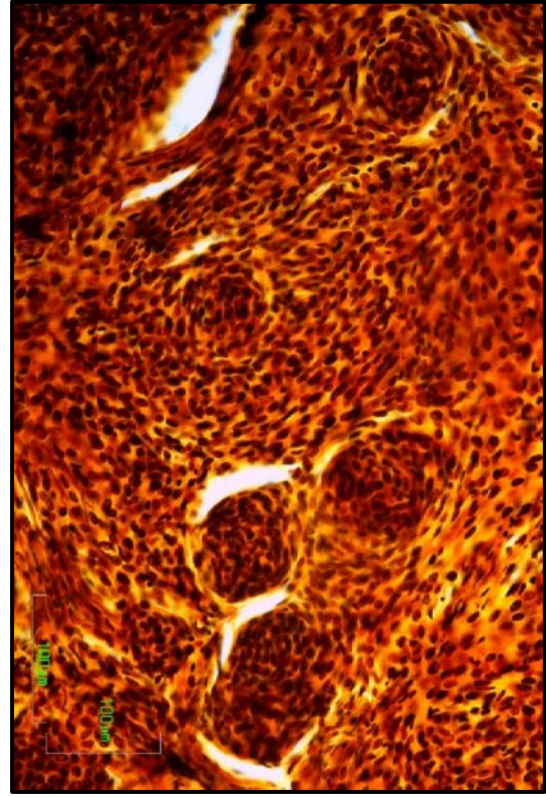


Fig.- 77 (20x)

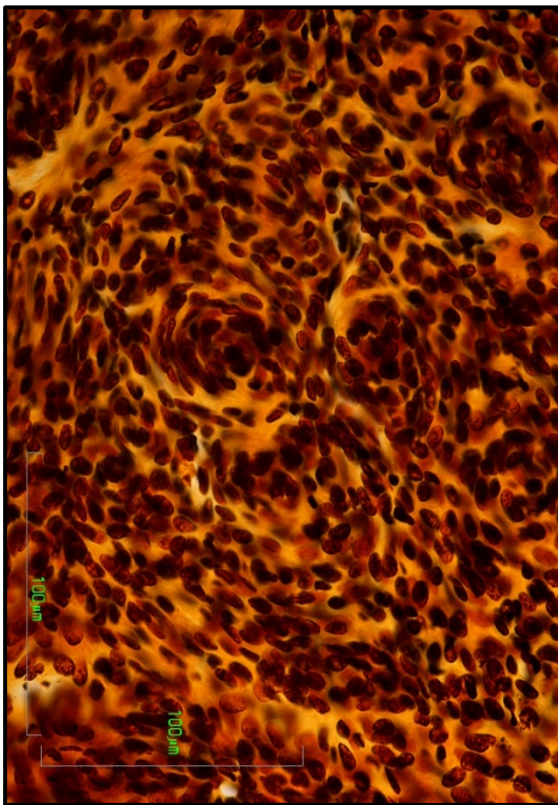


Fig.- 78 (40x)

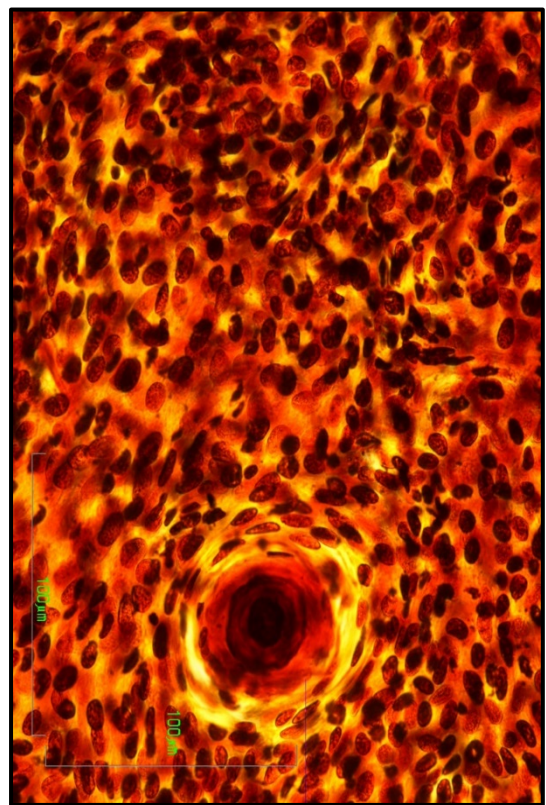


Fig.- 79 (40x)

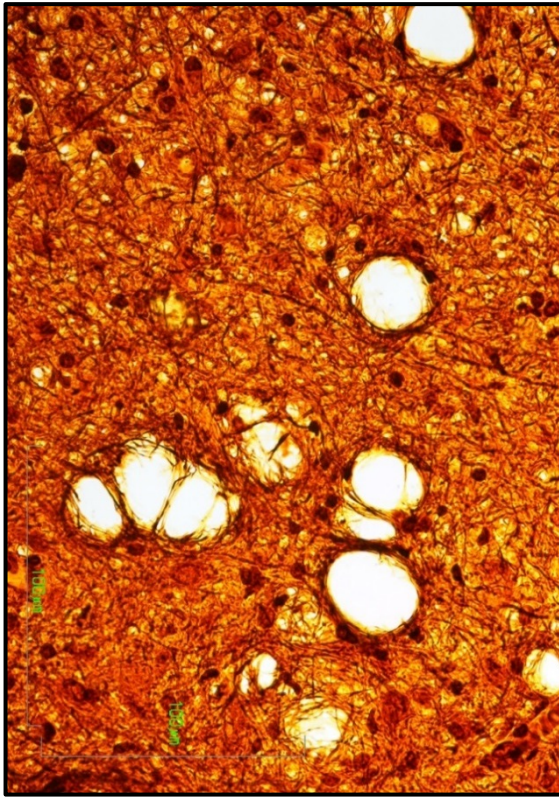


Fig.- 80 (40x)

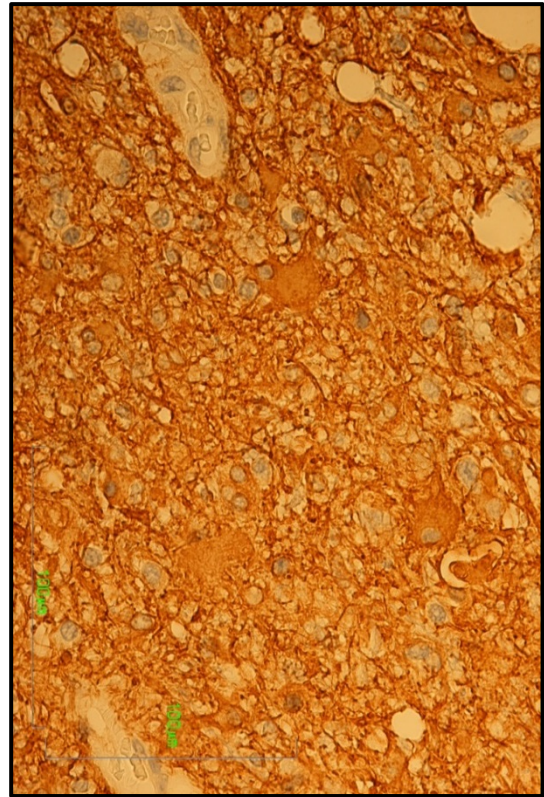


Fig.- 81 (40x)

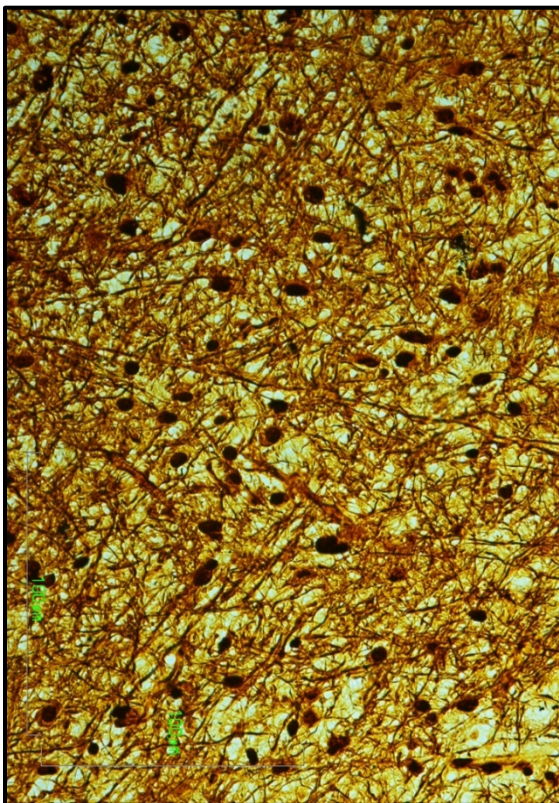


Fig.- 82 (40x)

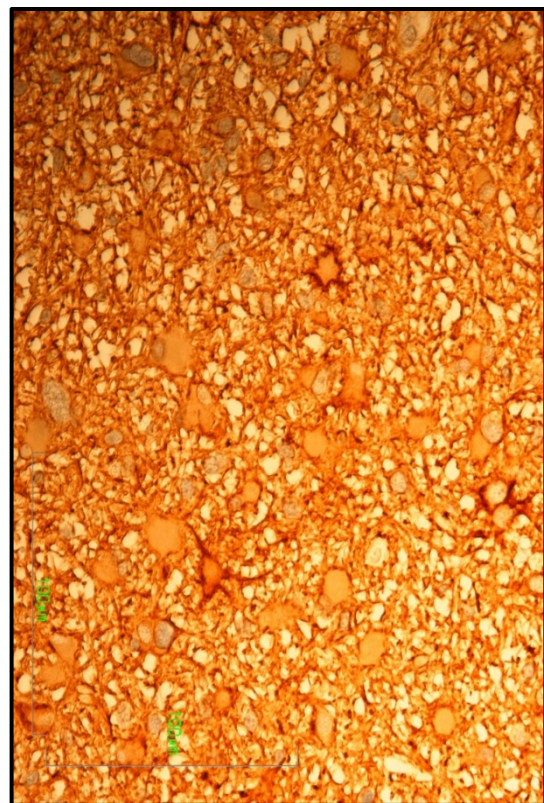


Fig.- 83 (40x)

- Fig.-76. Meningioma grado I de patrón histológico predominantemente transicional. Panorámica que muestra tabiques de aspecto conectivo-fibroblástico, remolinos espirales de células y diversos grados de transformación de cuerpos psamomatosos Técnica Panóptica de Pío del Río Hortega. Cerebro humano 10x.
- Fig.-77. Meningioma grado I de patrón histológico predominantemente transicional. Patrón celular meningoteliomatoso con disposición focal de las células que tienden a formar remolinos apretados que darán lugar a futuros cuerpos de psamoma. Técnica Panóptica de Pío del Río Hortega. Cerebro humano 20x.
- Fig.-78. Meningioma grado I de patrón histológico predominantemente transicional. Detalle que muestra la citología densa en esta área y la tendencia celular a formar remolinos apretados de células Técnica Panóptica de Pío del Río Hortega. Cerebro humano. 40x.
- Fig.-79. Meningioma grado I de patrón histológico predominantemente transicional. Detalle que muestra la citología de las células tumorales de núcleo oval con cromatina laxa sin nucléolos aparentes, ni atipias. El patrón celular, arremolinado no permite observar con nitidez los límites citoplásmicos, ni diferenciaciones citoplásmicas. En el tercio inferior se observa un cuerpo de psamoma en fase avanzada de formación. Técnica Panóptica de Pío del Río Hortega. Cerebro humano. 40x.
- Fig.-80. Impregnación argéntica de la trama que forman las numerosas prolongaciones astrogliales de las células tumorales. Astrocitoma difuso grado II. Técnica Panóptica de Pío del Río Hortega. Cerebro humano. 40x.
- Fig.-81. Inmunocitoquímica positiva de los somas y las prolongaciones de las células neuróglícas astrogliales tumorales. Astrocitoma difuso grado II. Técnica inmunohistoquímica (PGFA). Cerebro humano. 40x.
- Fig.-82. Otro detalle a gran aumento mostrando la trama densa de las prolongaciones del neuropilo tumoral. Astrocitoma difuso grado II. Técnica Panóptica de Pío del Río Hortega. Cerebro humano. 40x.
- Fig.-83. Detalle de la inmunocitoquímica para PGFA, donde la positividad de las prolongaciones astrogliales recuerda aunque con menor nitidez, la de la imagen anterior. Astrocitoma difuso grado II. Técnica inmunohistoquímica (PGFA). Cerebro humano. 40x.

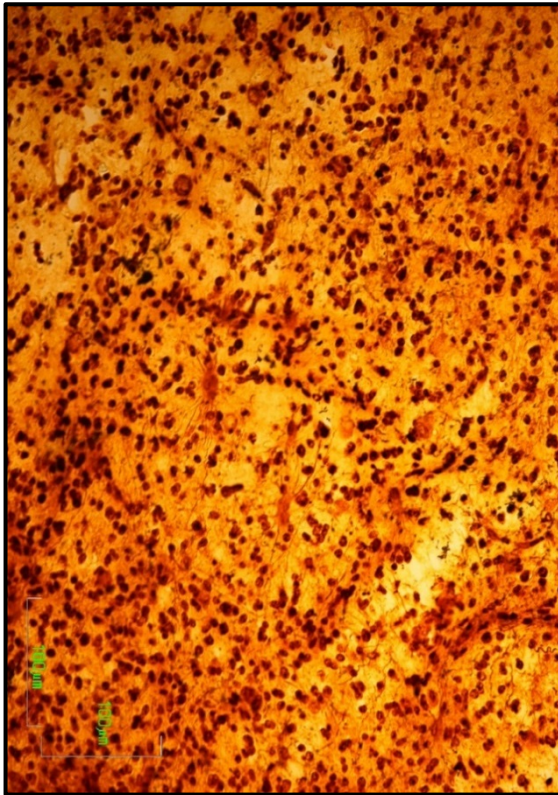


Fig.- 84 (20x)



Fig.- 85 (20x)

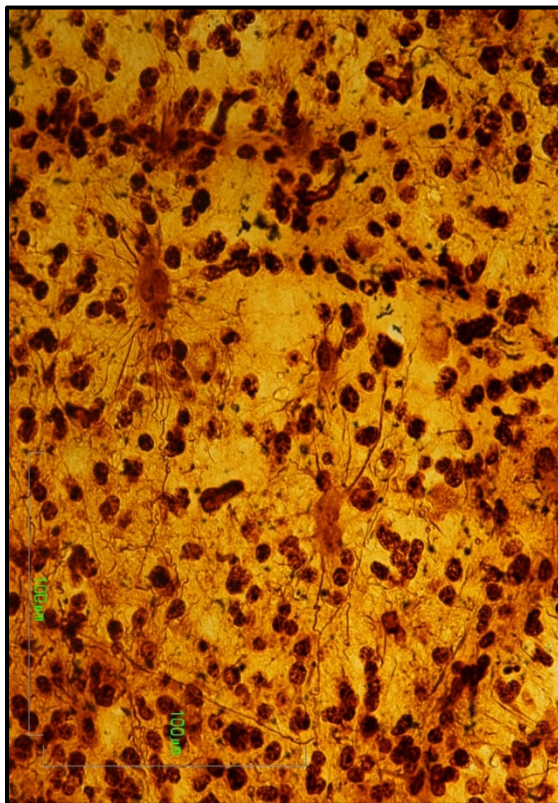


Fig.- 86 (40x)

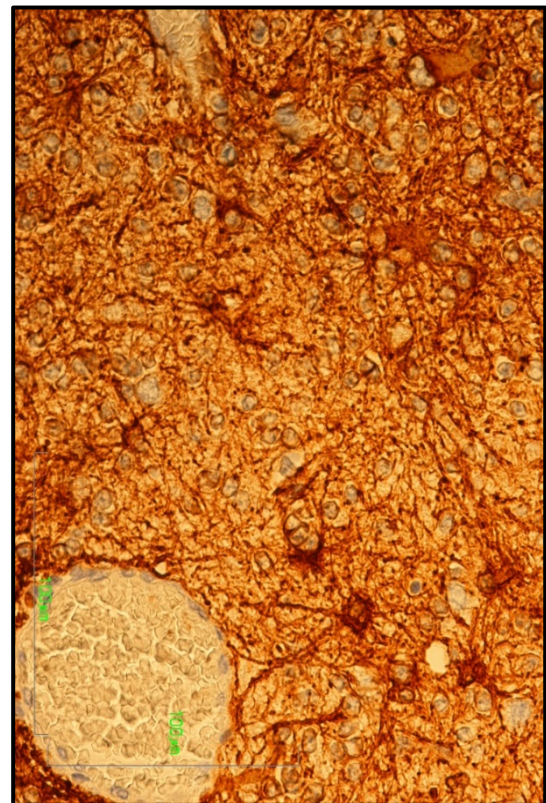


Fig.- 87 (40x)

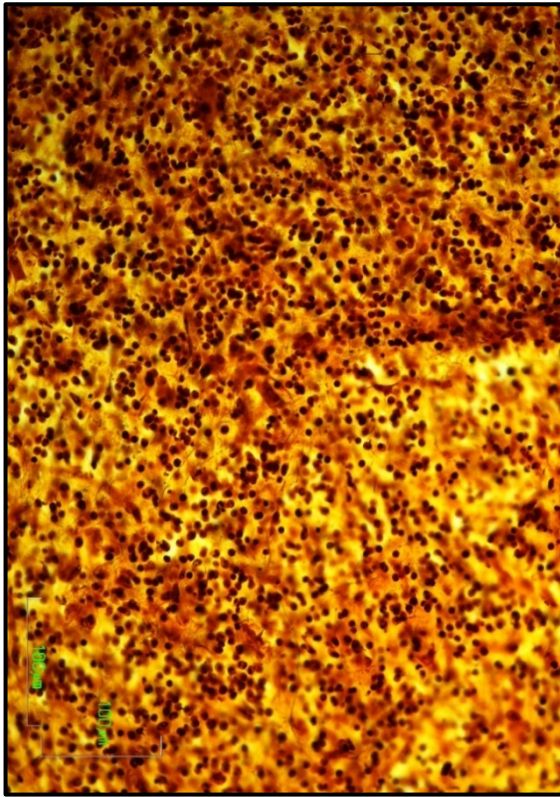


Fig.- 88 (20x)



Fig.- 89 (20x)

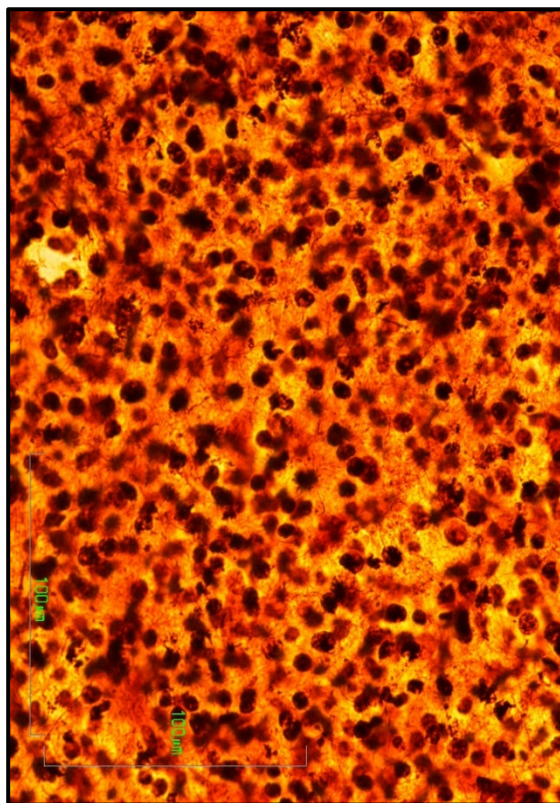


Fig.- 90 (40x)

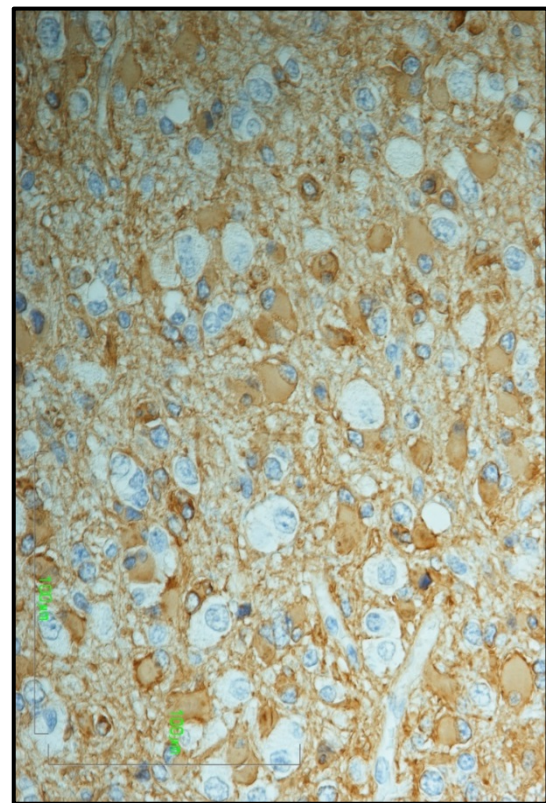


Fig.- 91 (40x)

- Fig.-84. Impregnación argéntica donde además de las células tumorales oligodendrogiales se observa la glía reactiva astrocitaria. Oligodendroglioma clásico grado II. Técnica Panóptica de Pío del Río Horteiga. Cerebro humano. 20x.
- Fig.-85. Área de reactividad astroglial PGFA positiva, en el tumor oligodendrogial. Oligodendroglioma clásico grado II. Técnica inmunohistoquímica (PGFA). Cerebro humano. 20x.
- Fig.-86. Detalle de la fig. 92 que muestra los astrocitos hipertróficos entre las células tumorales oligodendrogiales. Oligodendroglioma clásico grado II. Técnica Panóptica de Pío del Río Horteiga. Cerebro humano. 40x.
- Fig.-87. Gliosis astrocitaria PGFA positiva en el tumor oligodendrogial. Oligodendroglioma clásico grado II. Técnica inmunohistoquímica (PGFA). Cerebro humano 40x.
- Fig.-88. Área tumoral de predominio oligodendrogial con citología a base de pequeños núcleos redondeados hipercromáticos y prolongaciones delicadas sin orientación definida. Se observa una discreta anisomorfia nuclear. Oligoastrocitoma anaplásico (Glioma mixto grado III). Técnica Panóptica de Pío del Río Horteiga. Cerebro humano. 20x.
- Fig.-89. Inmunocitoquimia positiva para PGFA y numerosas células con citoplasma en *huevo frito* de hábito oligodendrogial. Oligoastrocitoma anaplásico (Glioma mixto grado III). Técnica inmunohistoquímica (PGFA). Cerebro humano. 20x.
- Fig.-90. La técnica Panóptica, muestra el fino entramado, a base de finas prolongaciones de hábito oligodendrogial, que sirve de fondo del tejido tumoral. Oligoastrocitoma anaplásico (Glioma mixto grado III). Técnica Panóptica de Pío del Río Horteiga. Cerebro humano. 40x.
- Fig.-91. Detalle de la inmunocitoquimia mostrando la positividad fundamentalmente citoplásmica de las células tumorales de estirpe astroglial, y la negatividad de las de hábito oligodendrogial. Oligoastrocitoma anaplásico (Glioma mixto grado III). Técnica inmunohistoquímica (PGFA). Cerebro humano. 40x.

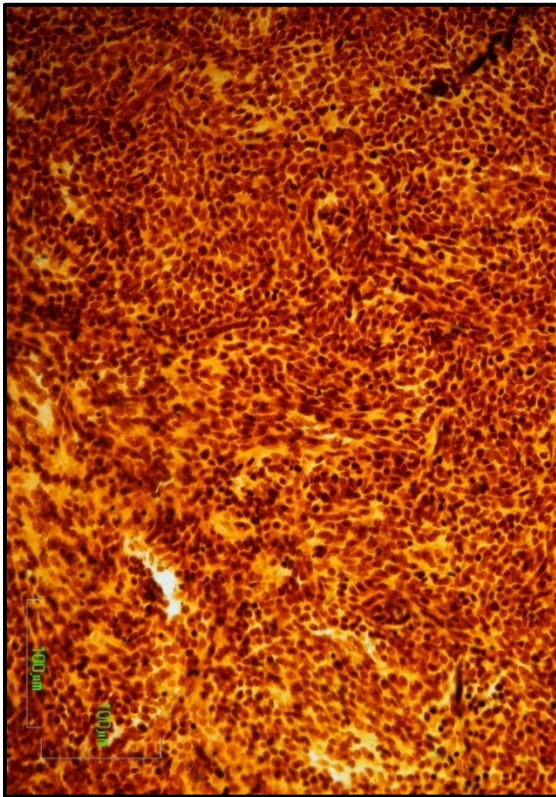


Fig.- 92 (20x)

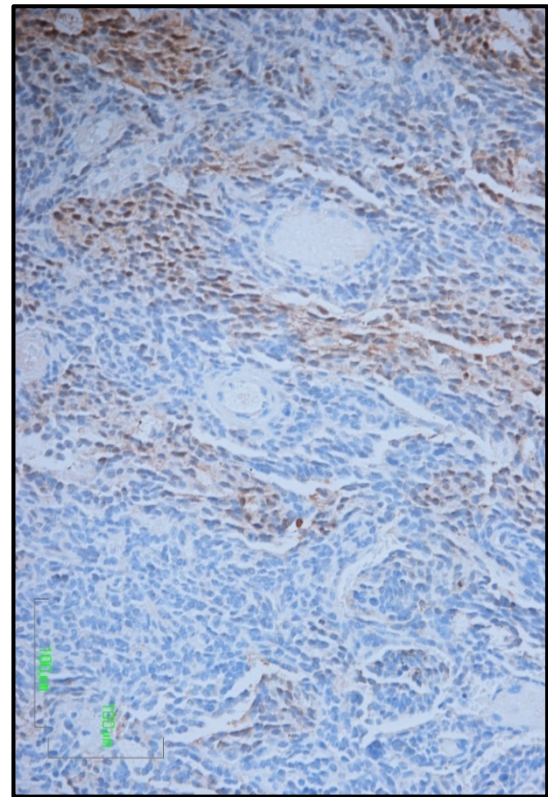


Fig.- 93 (20x)

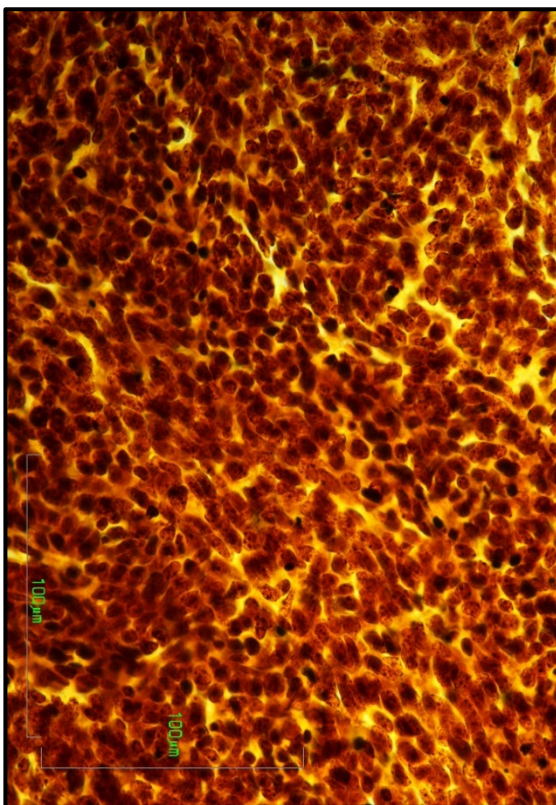


Fig.- 94 (40x)

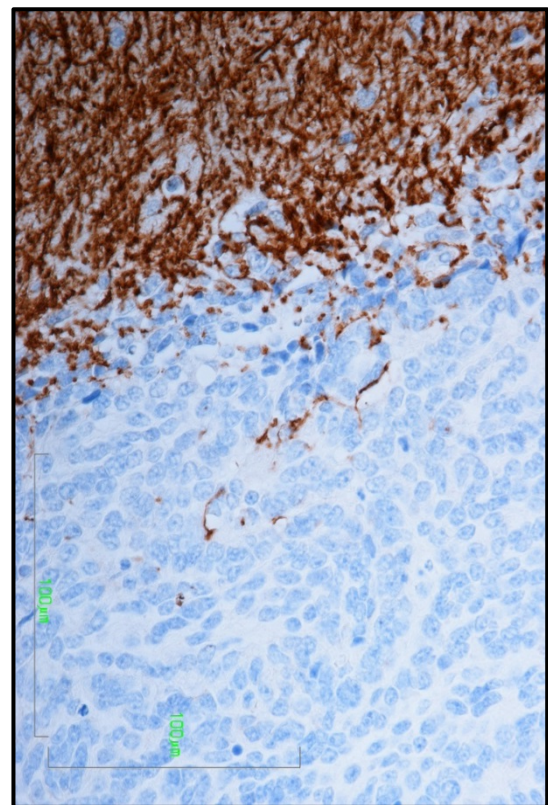


Fig.- 95 (40x)

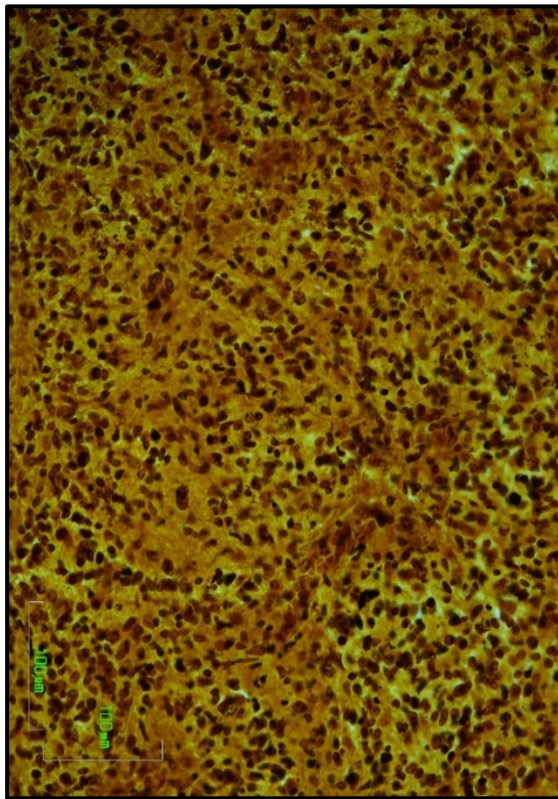


Fig.- 96 (20x)

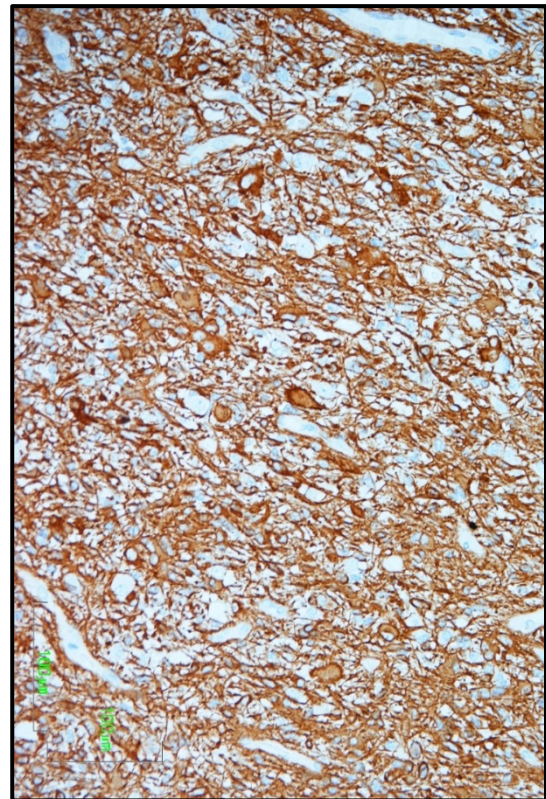


Fig.- 97 (20x)

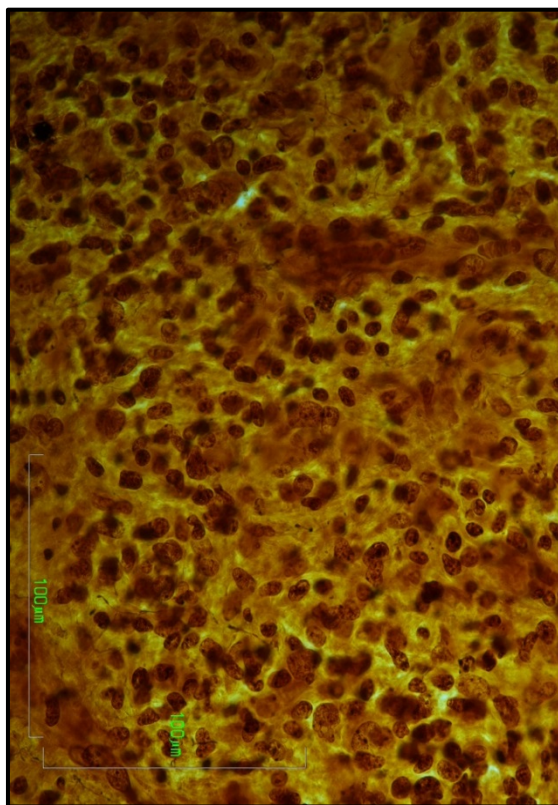


Fig.- 98 (40x)

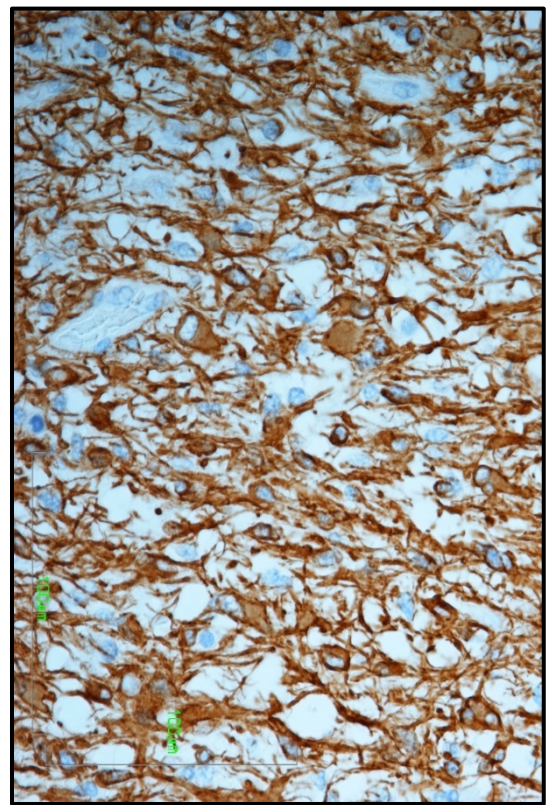


Fig.- 99 (40x)

Fig.-92. Imagen de la arquitectura tumoral del meduloblastoma, altamente celular sin patrón citoarquitectónico definido, y con tendencia a la formación de pseudorosetas celulares. Meduloblastoma desmoplásico. Técnica Panóptica de Pío del Río Hortega. Tejido cerebeloso humano. 20x.

Fig.-93. Imagen de la citología del meduloblastoma con positividad para la enolasa neuronal alternando con segmentos tumorales negativos para la enzima. Meduloblastoma desmoplásico. Técnica inmunohistoquímica (NSE). Tejido cerebeloso humano. 20x.

Fig.-94. Imagen de la impregnación argéntica, puramente nuclear, donde no se observan, ni límites ni diferenciaciones citoplásmicas. Meduloblastoma desmoplásico. Técnica Panóptica de Pío del Río Hortega. Tejido cerebeloso humano. 40x.

Fig.-95. Imagen inmunocitoquímica para PGFA, que presenta la negatividad de los elementos tumorales en contraste con la positividad de la capa molecular de la corteza cerebelosa adyacente. Meduloblastoma desmoplásico. Técnica inmunohistoquímica (PGFA). Tejido cerebeloso humano. 40x.

Fig.-96. Imagen que muestra el marcado polimorfismo celular de los elementos tumorales y la gran anisomorfia nuclear. Glioblastoma multiforme extensamente necrosado. Técnica Panóptica de Pío del Río Hortega. Cerebro humano. 20x.

Fig.-97. Inmunocitoquímica que muestra el origen glial de los elementos tumorales. Glioblastoma multiforme. Técnica inmunohistoquímica (PGFA). Cerebro humano. 20x.

Fig.-98. Detalle del polimorfismo celular tumoral y los restos de fibras nerviosas. Glioblastoma multiforme. Técnica Panóptica de Pío del Río Hortega. Cerebro humano. 40x.

Fig.-99. Componente fibrilar glial a gran aumento con pequeñas áreas microquísticas. Glioblastoma multiforme. Técnica inmunohistoquímica (PGFA). Cerebro humano. 40x.

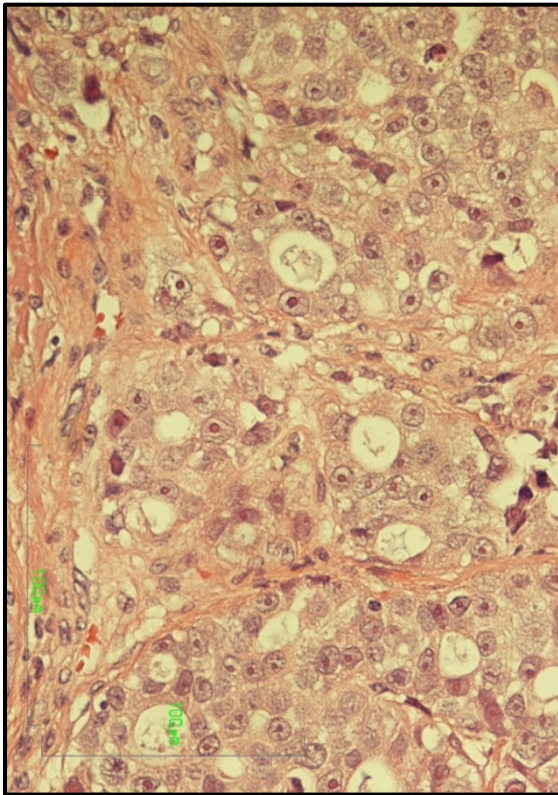


Fig.- 100 (40x)

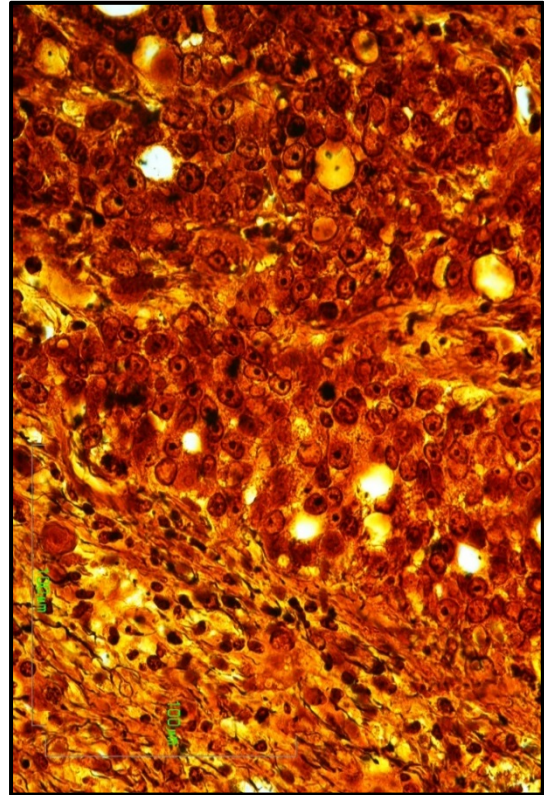


Fig.- 101 (40x)

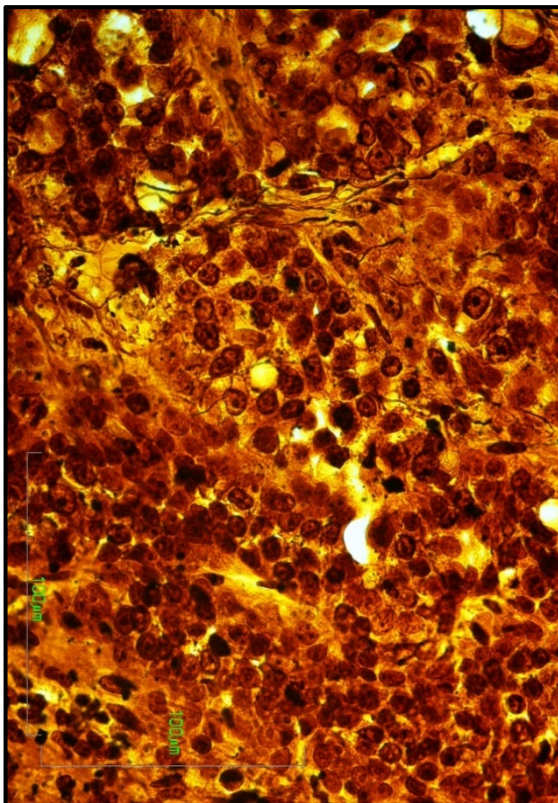


Fig.- 102 (40x)

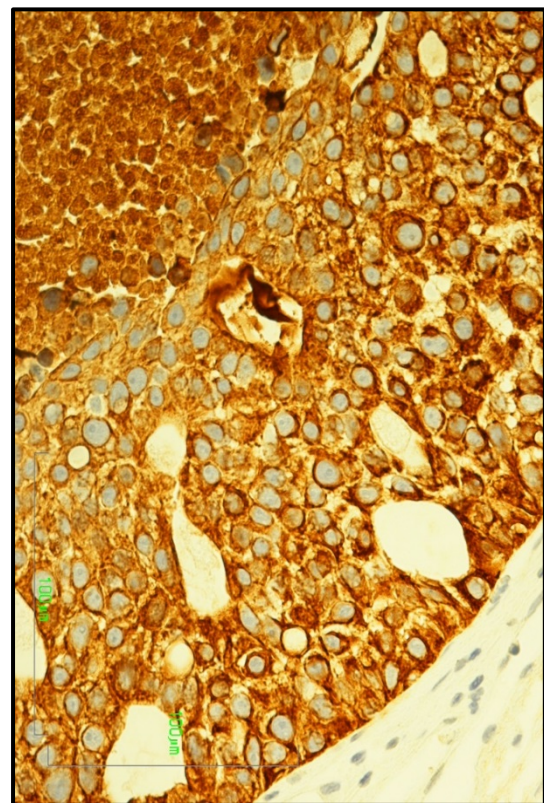


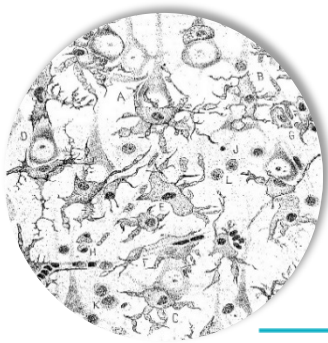
Fig.- 103 (40x)

Fig.-100. Detalle que muestra las agrupaciones celulares, separadas por tabiques conectivos, formando islotes y pequeñas cavidades quísticas. Citológicamente las células neoplásicas presentan un núcleo grande ovoide de cromatina laxa y con un nucléolo aparente. Metástasis de adenocarcinoma de patrón cribiforme. Tinción de hematoxilina eosina. Cerebro humano. 40x.

Fig.-101. Detalle que muestra la citología de las células tumorales metastásicas con granulaciones citoplásmicas. En el ángulo inferior izquierdo se observa tejido nervioso con fibras y prolongaciones celulares, adyacente a tejido conectivo que rodea a las células tumorales. Metástasis de adenocarcinoma de patrón cribiforme. Técnica Panóptica de Pío del Río Hortega. Cerebro humano. 40x.

Fig.-102. Detalle de la relación de las células tumorales con el parénquima nervioso, que muestra algunas fibras y prolongaciones gliales conservadas. Metástasis de adenocarcinoma de patrón cribiforme. Técnica Panóptica de Pío del Río Hortega. Cerebro humano. 40x.

Fig.-103. Inmunocitoquímica positiva para células tumorales y negativa para la reacción conectiva que se presenta en el ángulo inferior derecho. Metástasis de adenocarcinoma de patrón cribiforme. Técnica inmunohistoquímica (CAM5.2). Cerebro humano. 40x.



iv. DiSCVSiÓN

IV. DISCVSIÓN

En este trabajo se estudió y puso en práctica el método del carbonato de plata en sus variantes nucleares y núcleo-plasmáticas y se aplicó a distintos órganos y tejidos para visualizar fundamentalmente reticulina, astrogλία, microglía, oligodendrogλία y la citología de distintos tumores cerebrales.

La invención del método del carbonato de plata por parte de Pío del Río Horteiga supuso una gran aportación para el progreso de la Histología de principios del siglo XX. Con algunas variaciones y la utilización de unos cuantos reactivos, hábilmente combinados, demostró la eficacia de este método argéntico y fue capaz de evidenciar muchas de las estructuras tisulares de la economía. Sin embargo la aportación más importante de del Río Horteiga fue el desdoblamiento del tercer elemento del tejido nervioso en microglía y oligodendrogλία cerrando así las categorías citológicas del tejido nervioso y estimulando un gran interés por la investigación de estos tipos celulares. Los estudios sobre micro y oligodendrogλία fueron por tanto en aumento demostrándose la existencia de estos elementos incluso en retina y vías ópticas. (187, 188). El trabajo con animales, debido a su paralelismo tanto ontológico como filogenético reforzó, las tesis de Río-Horteiga sobre la estructura y funcionalidad de los elementos neuróglícos (48). Román Alberca se formó con del Río Horteiga en histopatología, destacando sus investigaciones sobre la encefalitis (48).

Otros investigadores, como Abelardo Gallego o Isaac Costero extendieron con sus trabajos experimentales el conocimiento de la microglía y de la oligodendrogλία al terreno de la anatomía zoológica en experimentos con anfibios, perros, conejos y otros animales. Gallego sobre la Histología de la encefalitis cerebral en la oveja. Costero sobre cultivos «in vitro» de la microglía con el objeto de contribuir al conocimiento de su histogénesis y su relación con el tejido conjuntivo. Con la aplicación de las técnicas argénticas de Pío del Río-Horteiga en sus investigaciones histológicas, demostraba experimentalmente el proceso hipertrófico durante el embarazo en el aparato reproductor femenino del ser humano y lo comparaba con el de otras especies animales (48).

La modificación de las técnicas de impregnación argéntica a partir de las técnicas de Golgi, Cajal y Achúcarro, desarrolladas con carbonato de plata, le permitieron demostrar a del Río Horteiga que el *tercer elemento* o célula adendrítica de Cajal, correspondía a dos tipos

celulares: la microglía y la oligodendroglía (64, 65, 100, 108, 189-191). Del Río Hortega nunca explicó (190), si fue por error, intuición o probatura, por lo que se le ocurrió mezclar Li_2CO_3 (empezó utilizando este reactivo en vez de Na_2CO_3) con AgNO_3 , por aquel entonces solían introducirse pequeñas modificaciones al método original debido a que los métodos argénticos son poco constantes (192), y con pequeñas variaciones se obtenían a veces mejores resultados.

Técnicas nucleares y nucleoplasmáticas:

Con las técnicas nucleares y nucleoplasmáticas (I, II, III, VII, VIII y XI) y sus variantes, hemos sido capaces de observar el núcleo y el citoplasma en hígado, riñón y cerebro de diferentes especies, con claridad semejante a la que se observa con las técnicas de hematoxilina/eosina o algunas anilinas como por ejemplo el azul de toluidina o el azul de metileno, además obtuvimos buenos resultados tanto de cuerpos neuronales, como de fibras nerviosas. Fuimos capaces de ver los elementos del sistema retículo endotelial con la técnica I, que también hubiéramos visualizado con la técnica VI descrita por del Río Hortega especialmente para esos elementos.

Con la técnica XI A que se describió para tejido neoplásico, obtuvimos imágenes de elementos neuronales, fibras nerviosas y células de glía ciertamente satisfactorias, en tejido normal. Pero como hemos venido apuntando, con algunas de ellas no hemos obtenido los resultados esperados, como por ejemplo con la Técnica VII B para células nerviosas, de la que no obtuvimos ningún resultado demostrativo. Hemos tenido que ser muy escrupulosos con la limpieza del material utilizado, cosa que en otras técnicas no es tan imprescindible.

Reticulina

También se estudiaron mediante la técnica de impregnación argéntica de Pío del Río Hortega (98), las fibras de reticulina y se compararon los resultados con los obtenidos mediante técnicas para cortes incluidos en parafina como por ejemplo el método de Gomori. Como quedó demostrado los resultados obtenidos con la técnica de del Río Hortega fueron más demostrativos de la red reticular, poniendo de manifiesto las más finas fibras, sin contaminante celular en algunas de ellas.

Las técnicas de impregnación argéntica en bloque ofrecen mejores resultados que las técnicas que utilizan la parafina o gelatina como medio de inclusión. Del Río Hortega en su

revisión del método del carbonato argéntico (63) solo la considera útil para el tejido conectivo, no sin antes advertir sus inconvenientes, como puede ser el de la retracción de los cortes durante la deshidratación y el montaje, para la cual propone incluso alguna que otra solución (63).

Astroglía

Para la demostración de la astroglía protoplásmica y fibrosa, del Río Hortega propone las variantes B, C y D de la técnica III, siempre y cuando la fijación se realice en formol bromuro de amonio (Cajal) y para la glía perivascular la técnica IV que tiene similares características a las utilizadas para la tinción de la microglía y la oligodendroglía (193). Sin embargo obtuvimos buenos resultados con la técnica I C, como se muestra en la figura 18, donde a mediano aumento es fácil adivinar las expansiones citoplásmicas de la astroglía protoplásmica.

Con la técnica VIII que utilizamos en material tumoral conseguimos buenos resultados de los astrocitos como se observa sobre todo en la figura 86, así como con las técnicas para la microglía y la oligodendroglía utilizadas para este trabajo. Del Río Hortega propuso además la técnica XI A para astrocitos y astroblastos neoplásicos (126). Sin embargo el trabajo de del Río Hortega sobre astroglía no es tan extenso como los realizados para microglía y oligodendroglía y para tejidos tumorales, porque además en aquella época el método que primaba para la investigación de esta estirpe celular era el método del cloruro de oro sublimado de Cajal.

Microglía

La microglía se activa rápidamente como reacción a cambios en el SNC, hecho que hemos comprobado con nuestros ensayos, tales como inflamación, isquemia, trauma, tumores o procesos neurodegenerativos (194), actuando con carácter fagocítico y como precursora de la reparación neuronal (195). La capacidad de la microglía de almacenar lípidos, hierro, pigmentos y otras sustancias, se pone de manifiesto en los procesos degenerativos y durante la formación de la mielina, puede redondearse y transformarse en corpúsculos granulados que emigran con movimientos *ameboides* (196).

Del Río Hortega averiguó que la microglía aparecía en forma de cuerpos amorfos en el cerebro en desarrollo; luego se diferenciaban en formas muy ramificadas que colonizaban todas las regiones del cerebro y establecían contactos con neuronas y astrocitos, pero no entre sí.

Además, cuando el cerebro sufría una grave lesión, respondían de manera espectacular (197). También observó que, en la reacción ante una herida incisa, las células ramificadas retraían sus finas prolongaciones para retornar a su conformación inmadura, redondeada. De esta manera, se dio cuenta de que en esta última etapa la microglía se asemejaba a los macrófagos que emigran a las áreas afectadas, proliferan y se vuelven muy fagocíticos. Así sugirió la idea de que la adopción de la forma redondeada de la microglía reflejaba una metamorfosis hacia el estado fagocítico, cumpliendo la misma función que los macrófagos del sistema inmunitario. Comienza pues a descubrir el verdadero significado de las células en bastoncillo y de los cuerpos gránulo-adiposos de Achúcarro, y ve ante sí la posibilidad de aclarar definitivamente la íntima estructura del sistema nervioso, cuando estuvo seguro de la fiabilidad de los resultados obtenidos con su método, se los mostró a Cajal, que lejos de felicitarle, llegó incluso a publicar dos artículos en el primero de los cuales hablaba de una modificación del método de Bielschowsky (198), que del Río Hortega ya había notificado anteriormente y el segundo en el que parecía que Cajal quisiera negar el descubrimiento de la microglía a del Río Hortega en beneficio de Robertson (48, 199), cuyos trabajos no conocía directamente y que incluso contenía algún error en el apellido (*Roberston* en lugar de *Robertson*) (82).

También Fernando de Castro y Lorente de Nó pretendieron despojarlo de su descubrimiento (200). Sin embargo en una publicación de 1921 (171), del Río Hortega deja bien claro que la microglía descrita por él no se correspondía con la mesoglía de Robertson (12). Posteriormente Cajal rectificaría (201) su actitud reconociéndole a del Río Hortega su descubrimiento (27).

Los investigadores alemanes Metz y Spatz acuñan en 1923 el término *Hortegasche Zellen* (106) (células de Hortega) para designar a la microglía. En 1926 López Enríquez publica varios trabajos sobre la microglía de la retina y las vías ópticas, en estado normal y patológico, realizados con el método del carbonato de plata amoniacal, que demuestran la existencia de células de microglía con características estructurales y morfológicas muy próximas a las descritas por del Río Hortega (187, 202, 203). A partir de aquí son muchas las investigaciones que se realizan en torno a la microglía (192), aunque el comienzo de la 2^a Guerra Mundial paralizó en cierta medida la producción de estudios científicos sobre ella (201).

En la década de los 60 se realizan estudios con carbonato de plata de piezas fijadas en formol adicionado del 1% de ácido acético o en formol bromuro de amonio e incluidas en parafina, como las realizadas por Naoumenko y Feigin (204), en las que la microglía en estado

normal les resulta más difícil de observar. Este tipo de técnica se basa en la utilización de soluciones muy concentradas de AgNO₃ (hasta el 20%, en estas soluciones de concentración de plata tan elevadas hay mucho riesgo de que la plata precipite, por lo que consideramos que este tipo de tinciones resultan muy arriesgadas).

Otra investigación realizada en esa década es un estudio de Ibrahim et al. (205), en la que utilizan como medio de inclusión la celoidina y como mordientes NaHSO₃ al 5%, o una solución de hidroxilamina (10 g de hidrocloreuro de hidroxilamina, 20 g de acetato de sodio y 40 mL de agua destilada), con el que consiguen teñir la microglía tanto normal como patológica, así como oligodendroglía en tejidos fijados durante largo tiempo en formol o EtOH del 70%. Este estudio tiene como punto de partida los estudios de Tsujiyama (206), el cual sugiere que actúan como agentes bloqueantes de grupos aldehídos y aunque no está del todo claro su mecanismo de acción, se cree que es tanto por su apetencia por los grupos aldehídos libres naturales de los tejidos, como por el formol utilizado en la fijación, lo que hace que actúen como mordientes en la impregnación de la plata (Gallyas) (207). Con la llegada del microscopio electrónico (208) vuelven a retomarse de manera exhaustiva las investigaciones sobre la microglía.

Con la utilización de los métodos inmunohistoquímicos (176, 177, 209, 210) los postulados de del Río Hortega han quedado demostrados así como el origen mesodérmico de esta estirpe celular. Se iniciaron estudios con anticuerpos monoclonales que se unieran a la microglía, de acuerdo con ello, Perry et al. (211) pensaron que si esos anticuerpos encontraban su diana en la microglía, podrían convertirse en una tinción adecuada. Así pudieron demostrar en 1985 que varios anticuerpos monoclonales podían mapear la microglía cerebral (212). A esta importante aportación se le sumó la llegada de métodos para mantener poblaciones puras de microglía en placas de cultivo (213), con lo que ya se podía examinar la actividad de estas células y además respaldaba la hipótesis de la función en la defensa inmunitaria del SNC.

Los resultados con los anticuerpos encajaban con los obtenidos por el equipo de Kreutzberg (214), quienes investigaron la capacidad migratoria y macrofágica de la microglía cerebral de roedores en relación con las neuronas lesionadas. Este grupo de investigadores también intentó comprobar la hipótesis de que las células microgliales parece ser que no se originan en los tejidos embrionarios que constituirán el SNC, sino que llegan acompañando a los vasos sanguíneos que penetran en el tejido nervioso. Es decir, que se origina fundamentalmente a partir del mesénquima, el tejido conjuntivo embrionario mesodérmico del cual proceden todas las capas de los vasos sanguíneos del cerebro y la médula espinal, incluyendo la adventicia. Así,

los experimentos del grupo de Perry y Kreutzberg han demostrado empíricamente que las células de la microglía se comportan como macrófagos del sistema nervioso (214), fagocitando microorganismos peligrosos. Pero no solo eso, sino que se ha demostrado que está presente en gran cantidad de procesos patológicos.

La sospecha de que la microglía podría contribuir a alteraciones neurológicas surgió tras el descubrimiento de que liberaba productos que coincidían con los emitidos por macrófagos fuera del SNC (208). Algunas de estas sustancias son peligrosas para las células si se producen en cantidades excesivas. Cuando la microglía activada se expone a determinados componentes bacterianos, generan especies reactivas de oxígeno. Otros productos, potencialmente letales, fabricados por microglía y macrófagos son las proteasas, enzimas que digieren proteínas y podrían llegar a lesionar las membranas celulares. Debemos citar también dos citoquinas (215, 216), moléculas mensajeras del sistema inmunitario que pueden aumentar la inflamación. Estas moléculas son la interleucina-1 (217-219) y la interleucina 3 (220, 221). La microglía en condiciones de activación produce un factor de necrosis tumoral que induce angiogénesis (222), de tal manera que podría estar involucrada en la reorganización del tejido (223, 224).

Algunas alteraciones neurológicas a las que pudiera contribuir la microglía son, por ejemplo el infarto cerebral; las víctimas de un infarto cerebral podrían perder neuronas por culpa de un celo excesivo de su microglía, según se desprende de experimentos realizados en ratas (225-227), el Síndrome de Inmunodeficiencia Humana (SIDA); el virus penetra en las células nerviosas, provocando una destrucción de la mielina, induciendo respuestas inflamatorias o autoinmunes, o simplemente perturbando el funcionamiento de las células endoteliales de los vasos sanguíneos de las meninges. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) infecta a la microglía y se ha demostrado que esa invasión provoca en la microglía una producción elevada de citoquinas inflamatorias y otras moléculas que son tóxicas para las neuronas (208, 228). En la enfermedad de Alzheimer (229) o la esclerosis múltiple (230) se observó que la microglía y los astrocitos se encontraban en las placas en desmielinización, presentes en las enfermedades degenerativas o en el síndrome de Down.

La microglía tiene la capacidad de modificar su comportamiento en respuesta a diversas señales de otras células y a enfermedades humanas, tanto agudas como crónicas (231). Su transformación en células activadas está regulada por mecanismos de control y está acompañada por la secreción de citoquinas, aminoácidos y especies reactivas de oxígeno. Por lo

tanto, representa un sistema de defensa y reparación, pudiendo ser responsable además de la destrucción del tejido y de la muerte neuronal (232).

La microglía se puede presentar como microglía en reposo con una morfología ramificada, un soma estático, procesos con alta motilidad y que se encuentra en el cerebro adulto en condiciones normales. Esta motilidad es necesaria en su búsqueda constante de cambios patológicos o procesos inflamatorios (233, 234) y microglía activada que se encuentra tanto durante el desarrollo embrionario como en estados de activación donde adquiere una morfología *ameboide* pudiendo migrar hacia el lugar de la lesión liberando diversos compuestos neuroactivos induciendo neuroprotección o en última instancia neurotoxicidad (231, 235).

La técnica llevada a cabo por nosotros para poner de manifiesto la microglía se basa como sugirió del Río Hortega, en la activación de dicho elemento mediante la realización de una herida incisa en el encéfalo (173), esto origina una proliferación de células microgliales activadas que hemos podido observar y que se basa en la afinidad y el depósito de Ag^+ que pasa a Ag^0 .

En nuestro estudio hemos comparado los resultados de la técnica de del Río Hortega con los obtenidos en la demostración de la microglía mediante técnicas histoquímicas con lectinas. Las lectinas son un grupo de proteínas de origen no inmune que tienen la propiedad de fijarse a algunos grupos de azúcares de las membranas celulares, tanto internas como externas (174, 175). En el SNC las lectinas tienen afinidad por las células microgliales (176), una de estas lectinas es la obtenida del *Lycopersicum esculentum* (LEA) (tomate) con afinidad por los residuos del azúcar poli-N-acetil lactosamina (177). El método consiste en la inyección por vía subcutánea de una solución acuosa de glutamato monosódico, del cual se ha observado que influye en la degeneración neuronal del núcleo arcuato cuando se administra a diferentes especies de roedores en edad neonatal (236-240), que se traduce en una proliferación de células microgliales (241, 242). Se trata de un método de fácil realización y que está muy estandarizado, pero la utilización de la técnica de del Río Hortega, en la que la obtención de los cortes no necesita la inclusión en parafina, sino que se realiza por congelación, nos ofrece mejores resultados, pues las imágenes microscópicas nos muestran mayor nitidez, en detrimento de mayores problemas en el procesamiento de las muestras, como la difícil obtención de cortes seriados y un mayor deterioro de estos, así como la optimización del tiempo que lleva realizarlos, pues como hemos dicho ya en varias ocasiones, las técnicas argénticas resultan de difícil realización y requieren de manos expertas o muy entrenadas para obtener resultados estimables.

Las técnicas inmunohistoquímicas con anticuerpos también se han sometido a estudio. La proteína analizada ha sido la Iba 1 que es una proteína de unión al calcio específica para microglía y macrófagos, es una nano proteína de 16,7kDa que se expresa específicamente en la microglía y se expande durante la activación de estas células. La microglía actúa como la forma principal y primera de defensa inmune activa en el SNC. Los anticuerpos Anti Iba1 están relacionados específicamente con la microglía, pero no tienen una reacción cruzada con las neuronas o los astrocitos.

Oligodendroglía

Los llamados *elementos apolares* del SNC fueron descritos por del Río Hortega como glía de escasas radiaciones u oligodendroglía en 1921 (108), sin conocer los trabajos de Robertson (12), dejando posteriormente bien claro que las *mesoglia cells* de Robertson no tenían tal origen, sino que se trataba de células de origen ectodérmico, es decir de células de oligodendroglía (171). Apunta también las dificultades y pobres resultados obtenidos con el método al cloruro de platino del citado autor. Propone la hipótesis de que los oligodendrocitos son los responsables de la formación de la mielina (109).

Aunque inicialmente basó sus hallazgos sobre oligodendroglía en el método del carbonato argéntico (108), reconoce que no es posible todavía hacer un estudio exhaustivo de los caracteres morfológicos y tisulares de dicho elemento celular, que achaca principalmente a problemas tintoriales, pero además revela que los métodos de Cajal al oro sublimado y del formol urano ofrecen resultados contradictorios en lo que a la tinción de la glía de escasas radiaciones se refiere, así como otros métodos clásicos que utilizan anilinas. Ensayó diversas variantes de la técnica y aprovecha las ventajas que ofrecen los hipnóticos para la demostración de las estructuras nerviosas y neuróglicas y en 1928 da a conocer una modificación a la técnica de Golgi (110) para la demostración de los oligodendrocitos y de sus distintas variedades, en la que emplea como líquido fijador formol, dicromato sódico ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e hidrato de cloral como agente hipnótico y que posteriormente modificaría utilizando $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Con esta modificación al método de Golgi, del Río Hortega describió todos los tipos de oligodendroglía, en el que supuso uno de los mejores y más completos trabajos descriptivos de la época.

La existencia de estos subtipos explicaría la complejidad celular del oligodendroglioma cuando se estudia con métodos especiales (243). Del Río Hortega inició el conocimiento de la oligodendroglía y a partir de entonces se han realizado numerosos estudios relacionados con el

estado normal y patológico de este elemento del SNC, que no han venido sino a confirmar los postulados de del Río Hortega (244, 245).

Con el método de del Río Hortega para oligodendroglía López Enríquez describe la oligodendroglía de las vías ópticas (188) y Marchesani la de la retina (246). Posteriormente con la combinación de los marcadores moleculares, (247) se ha perfeccionado la clasificación morfológica iniciada por del Río Hortega. Pero recientemente el análisis de los ARNs expresados en estas células cerebrales (248) ha revelado la posibilidad de clasificar los oligodendrocitos en seis subtipos según los cambios progresivos producidos en marcadores de expresión génica previamente conocidos y nuevos a lo largo de la diferenciación de oligodendrocitos.

Nosotros hemos podido observar células de oligodendroglía y consideramos que el método es fácilmente reproducible, no obstante queda pendiente la unificación de criterios morfológicos y genéticos que revelen la complejidad de los oligodendrocitos para clasificarlos (248), por lo que la organización propuesta por del Río Hortega sigue siendo algo que necesita estudios más profundos.

Tumores

El nombramiento de Pío del Río Hortega en 1928 como jefe del laboratorio de histopatología del Instituto Nacional de Oncología “Príncipe de Asturias” (90), supuso un profundo cambio en su trayectoria personal y científica con el que inicia una serie de investigaciones acerca de las características citológicas de diferentes grupos tumorales (95, 114) y profundiza en la histopatología aplicada al cáncer de las células nerviosas (115, 118). Aunque estos estudios no eran nuevos para él, pues ya había basado su tesis doctoral en este tipo de estudios.

Durante los años treinta empezaron a ser numerosas sus contribuciones y aportes al conocimiento de los tumores nerviosos, siendo el momento culminante de sus investigaciones oncológicas la ponencia que presentó en el Congreso del Cáncer en 1933 (48), un completo trabajo sobre la anatomía microscópica de los tumores del SNC y del SNP en el que abordó los problemas existentes para la construcción de una clasificación sistemática de los tumores nerviosos y apostó por una mejora constante de las técnicas de tinción áuricas y argentícas como solución diagnóstica (249)

A partir de aquí muchos de los estudiosos de aquella época iniciaron investigaciones orientadas hacia las patologías oncológicas (48). Dionisio Nieto se incorporó a estas líneas de investigación con trabajos patológicos de la pelagra, Pérez Lista hizo sus primeras contribuciones al estudio anatomopatológico del útero, López Enríquez trabajó en la degeneración de la retina y Vázquez López en la histopatología del reumatismo (48).

En nuestro trabajo se estudiaron una serie de tumores gliales humanos entre los que se encontraban, astrocitomas (3), oligodendrogliomas (2), oligoastrocitomas (1), meduloblastomas (1), glioblastomas (20) y meningiomas (9), así como metástasis de adenocarcinomas (10) y tres autopsias cerebrales clínica y anatomopatológicamente demostrados.

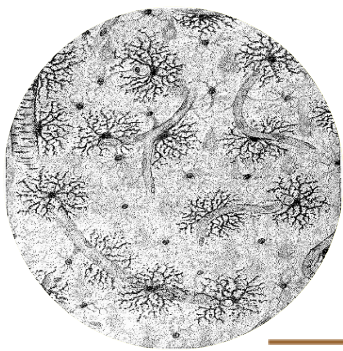
Siguiendo a del Río Hortega se utilizó su Técnica VIII (Panóptica) de impregnación argéntica para estudiarlos y los resultados obtenidos se compararon con la técnica de hematoxilina/eosina habitual e inmunohistoquímica para la PGFA, la NSE y la CAM5.2. Con la técnica del carbonato argéntico utilizado en los tumores del SNC, del Río Hortega demostró la existencia y morfología de las células neuróglícas tumorales (243).

Las técnicas inmunohistoquímicas nos aportan resultados más fiables, pero también más costosos económicamente hablando. Hoy en día la técnica inmunohistoquímica está muy estandarizada, sin embargo ha habido que recorrer un largo camino, plagado de ensayos, para obtener buenos resultados, pues no olvidemos que hasta hace unos pocos años el método de elección para poder determinar el tipo de tumor en estudio corría a cargo de las impregnaciones argénticas. Con ellas pudo del Río Hortega realizar su clasificación de los tumores del SNC (116).

La llamada imagen en huevo frito, que aparece también en alteraciones no tumorales como el edema cerebral, y su asociación en la imagen en panal de abejas, existen únicamente en material fijado en formol. Las preparaciones en fresco o con fijación idónea en glutaraldehído o las células emigradas en los cultivos de tejido carecen de este aspecto. Se trata pues de un artefacto por la rápida alteración citoplásmica, bien por alteraciones del medio como en las reacciones oligodendrogliales o por la fragilidad de los oligodendrocitos tumorales (243).

Bailey y Cushing (156) atribuyen un destacado protagonismo a las técnicas de impregnación argéntica como base indispensable para la edición de su libro (140). Igualmente Zülch (250) cita los estudios de del Río Hortega, aceptando su punto de vista clasificatorio y la división propuesta por él en 1932, en gliomas y paragliomas (115). Con ambos métodos

obtuvimos imágenes semejantes de las células tumorales en cuanto a su morfología se refiere. Con las técnicas habituales de hematoxilina eosina se observa solo el núcleo y citoplasma de las células, con las técnicas argénticas el núcleo, citoplasma y las prolongaciones de dichas células y con la inmunohistoquímica, además se caracteriza la estirpe celular.



V. CONCLUSIONES

V. CONCLUSIONES

- I. En este trabajo, hemos podido realizar en el laboratorio las técnicas del carbonato de plata y sus variantes siguiendo los protocolos descritos por su autor, D. Pío del Río Hortega, comprobando así la fiabilidad de los mismos.
- II. La variante de la técnica de carbonato de plata aplicada a la demostración de fibras de reticulina es la que más dificultades ha presentado, obteniéndose mejores resultados con los cortes más finos (10-15 micras), y aumentando discretamente la concentración de amoníaco, no observándose variaciones significativas tras aumentar la concentración de permanganato potásico o de ácido oxálico.
- III. En la ejecución de la técnica de microglía, se obtuvieron buenos resultados siguiendo los protocolos originales de D. Pío sin tener que recurrir a variaciones en la concentración de los reactivos.
- IV. En cualquier caso, la realización de las técnicas del carbonato de plata requiere un cierto entrenamiento en el manejo del laboratorio, tanto en el uso del material como en la preparación de los distintos reactivos, y plantea dificultades temporales por la caducidad de los mismos.
- V. La utilización en la actualidad de las técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas, las hace de elección frente a las del carbonato de plata por la sencillez, comodidad y reproductibilidad de las mismas. Con la inmunohistoquímica se caracteriza, además, la estirpe celular, por tanto, con fines diagnósticos es preferible la utilización de técnicas histoquímicas e inmunohistoquímicas.

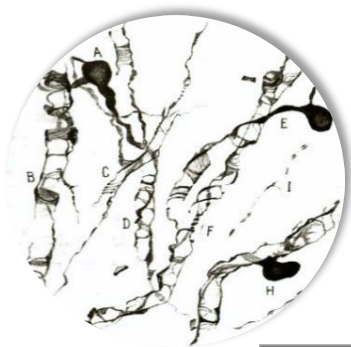


*Vi. LiSTA DE
ABREVIATURAS*

Vi. LISTA DE ABREVIATURAS

ABC:	Complejo avidina-biotina.
Ag⁺:	Catión plata.
Ag⁰:	Plata reducida.
BSA:	Albúmina de suero bovino.
c.s.:	Cantidad suficiente.
CAM5.2:	Anti-Cytokeratin.
CVC:	Centro Virtual Cervantes.
D:	Débil.
DAB:	Diaminobencidina.
e⁻:	Electrón.
EtOH:	Etanol.
F:	Fuerte.
g:	Gramo.
JAЕ:	Junta para la ampliación de estudios.
L:	Litro.
M:	Media.
M:	Molaridad (<i>Molar</i>).
mL:	Mililitro.
mm:	Milímetro.
nm:	Nanómetro.
N:	Normalidad (<i>Normal</i>).
NSE:	Enolasa.
OMS:	Organización Mundial de la Salud.
PGFA:	Proteína glial fibrilar ácida.

- SEA:** Servicio de Experimentación Animal.
- SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.
- SNC:** Sistema nervioso central.
- SNP:** Sistema nervioso periférico.
- TBS:** Tris Buffer Salino.
- TBST:** Tris Buffer Salino + Tween 20.
- Tris:** Hidroximetil aminometano.
- Tween 20:** Polisorbato o monolaurato de polioxietilen sorbitano.
- VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana.



*Vii. LISTA DE
REACTIVOS*

Vii. LISTA DE REACTIVOS

Acetato de cobre II:	$(\text{CH}_3\text{COO})_2 \text{Cu}$
Ácido clorhídrico:	HCl
Ácido crómico:	H_2CrO_4
Ácido fórmico:	H-COOH
Ácido oxálico:	$\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$
Ácido pícrico:	$\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$
Agua oxigenada:	H_2O_2
Amoníaco:	H_3N
Bromuro de amonio:	NH_4Br
Carbonato de calcio:	CaCO_3
Carbonato de litio:	Li_2CO_3
Carbonato de plata:	Ag_2CO_3
Carbonato de sodio:	Na_2CO_3
Cloruro de hierro III:	FeCl_3
Cloruro de mercurio II:	HgCl_2
Cloruro de oro III:	AuCl_3
Cromato de potasio:	K_2CrO_4
Dicromato de sodio:	$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
Dicromato de plata:	$\text{Ag}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
Dicromato de potasio:	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
Dimetilsulfóxido:	DMSO
Etanol:	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$
Glucosa:	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
Hidrato de cloral:	$\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$

Hidróxido de amonio:	NH ₄ OH
Hiposulfito de sodio:	Na ₂ S ₂ O ₃
Metanol:	CH ₃ -OH
Nitrato de plata:	AgNO ₃
Nitrato de sodio:	Na ₂ NO ₃
Nitrato de uranio:	UO ₂ (NO ₃) ₂
Permanganato de potasio:	KMnO ₄
Piridina:	C ₅ H ₅ N
Sulfato amónico férrico:	(FeSO ₄) ₂ NH ₄
Sulfato de sodio:	Na ₂ SO ₄
Sulfito de sodio:	Na ₂ SO ₃
Tanino:	C ₁₄ H ₁₄ O ₁₁
Tetróxido de osmio:	OsO ₄
Tolueno:	C ₆ H ₅ CH ₃
Xilol:	C ₆ H ₄ (CH ₃) ₂
Yodo:	I ₂
Yoduro potásico:	KI



Viii. ANEXO

Viii. ANEXO

A continuación vamos a describir los dibujos realizados por Pío del Río Hortega en sus más que abundantes aportaciones a la ciencia histológica y neurohistológica y con las que hemos decidido ilustrar los diferentes capítulos de este trabajo. Hemos querido guardar el mismo orden en el cual nosotros hemos ido describiendo las diferentes aportaciones de del Río Hortega, procurando que todas ellas sean significativas de las diferentes técnicas, por el contrario la imagen que ilustra el capítulo de bibliografía, corresponde a las diferentes células constituyentes de la glándula pineal, órgano que nosotros no hemos estudiado, sin embargo del Río Hortega aportó varios trabajos sobre ella y así hemos querido destacarlo.

íNDICE



En la piel del conejo hay células negras–melanóforos–que le dan color, y pelos seccionados que parecen ojos abiertos en la órbita de sus folículos (8).

JVSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



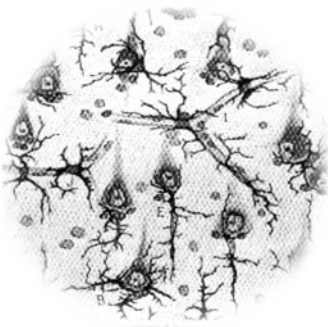
En el bazo hay como trama del tejido un sutil enrejado de fibras de sostén y asociación (conjuntivas) (8).

INTRODUCCIÓN



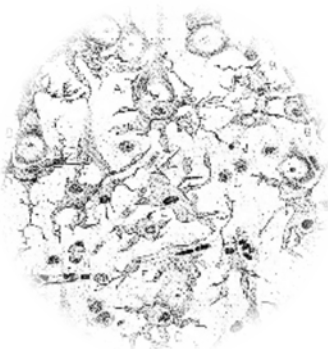
Distribución de la microglía en la corteza cerebral del conejo. Véase la forma variada de los corpúsculos microgliales y, sobre todo, las relaciones que tienen con los vasos (satélites vasculares) y con las células nerviosas (satélites neuronales). (Coloración. Técnica II) (173).

MATERIAL Y MÉTODO. RESULTADOS



Caracteres de la microglía de la corteza cerebral humana, en un caso de meningitis subaguda. Obsérvese la formación de células en bastoncito. A, célula de forma estrellada; B, C, satélites neuronales; D, corpúsculo alargado; E, F, G, H, diferentes tipos de Stäbchenzellen; I, J, K, L, satélites vasculares íntimamente adosadas a los vasos. (Coloración: técnica I) (173).

DISCUSIÓN



Microglía de la corteza cerebral del conejo en la proximidad de una herida producida dos días antes con un punzón candente. Obsérvese el aspecto monstruoso de los corpúsculos microgliales, que ofrecen la más variada forma globulosa y laminar. A, B, C, satélites neuronales; D, satélite apical, de aspecto laminar; E, G, satélites vasculares; F, célula aplanada íntimamente adosada a un vaso; H, I, J, pequeños corpúsculos redondeados; K, L, núcleos neuróglícos. (Coloración: técnica I) (173).

En una lesión del cerebro-encefalitis- las células de Hortega parecen monstruos voraces y son preciosos auxiliares que limpian el tejido de cuanto daña a las células nerviosas (8).

CONCLUSIONES

Distribución de la neuroglía perivascular en la corteza cerebral (Imagen compuesta con detalles observados en varias preparaciones) (193).

En el paisaje del tejido cerebral hay infinitos canales de riego-vasos sanguíneos-, y en sus orillas, células como matorrales-neuroglía- que colaboran a la función nerviosa (8).

LISTA DE ABREVIATURAS

Tumefacción transparente y proliferación de los oligodendrocitos de la corteza cerebral en la demencia paralítica. A, pléyade vascular; B, C, grupos perineuronales (pseudoneuronofagia); D, microglía; E, célula endotelial con inclusiones; F, fibras nerviosas recubiertas per expansiones de oligodendrocitos. (Carbonato argéntico) (110).

LISTA DE REACTIVOS

Oligodendrocitos del tipo tercero de la sustancia blanca cerebral. A, célula con envoltura para tres tubos mielínicos; B, anillos e infundíbulos; C, fibra espiroide; D, F, aspectos retiformes; E, expansión dividida en ángulo agudo que rodea a dos tubos; G, anillitos para delgadas fibras; H, célula monopolar con expansión en T, que envuelve a una fibra nerviosa; I, apéndices con placas y anillitos sobre fibras muy delgadas (110).

ANEXO



Evolución morfológica de las células derivadas del epitelio neural que forman el parénquima de los centros nerviosos. Los elementos neuronales y neuróglícos asociados en los centros participan muy diversamente en la génesis de neoplasias, como corresponde a su diferente capacidad de división. (167).

BIBLIOGRAFÍA



Morphological varieties of parenchyma cells of the adult pineal. A, B, C, cells with prolongations polarized toward the edges of the lobules (x); E, F, G, tripolar or multipolar cells with club-shaped prolongations in the center and the edge of the lobules; H, cells with long processes (165).



ix. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Romero Reverón R. Marcello Malpighi (1628-1694), Founder of Microanatomy. *Int J Morphol*. 2011;29(2):399-402.
2. Sánchez RM, Oliva NR. Historia del microscopio y su repercusión en la Microbiología. *Rev Hum Med*. 2015;15:355-72.
3. Lawson I. Crafting the microworld: how Robert Hooke constructed knowledge about small things. *Notes Rec R Soc Lond*. 2016;70(1):23-44.
4. Rowbury R. Robert Hooke, 1635-1703. *Science progress*. 2012;95(3):238-54.
5. Gest H. The remarkable vision of Robert Hooke (1635-1703): first observer of the microbial world. *Perspectives in biology and medicine*. 2005;48(2):266-72.
6. Peña Amaro J. Una aproximación a la belleza de la Histología. *Dendra Med Rev Humanid* 2015;14(2):176-87.
7. DeFelipe J. Cajal y sus dibujos: ciencia y arte. En: *Arte y neurología* [Internet]. 2005:[213-30 pp.]. Available from: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/>.
8. Río Hortega P. *Arte y artificio de la Ciencia Histológica*. Residencia. 1933:191-206.
9. Carrascal Marino E. *Histología Humana I. Citología, Embriología e Histología General*. Salamanca: L C; 2001.
10. Ramón y Cajal S. Sobre un nuevo proceder de impregnación de la neuroglia y sus resultados en los centros nerviosos del hombre y animales. *Trab Lab Invest Biol*. 1913;11:219-37.
11. Ramón y Cajal S. El proceder del oro-sublimado para la coloración de la neuroglia. *Trab Lab Invest Biol*. 1916;14:155-62.
12. Robertson WF. A microscopic demonstration of the normal and pathological histology of mesoglia cells. *J Ment Sci*. 1900;46:733-52.
13. Ramón y Cajal S. Sobre un sencillo proceder de impregnación de las fibrillas interiores del protoplasma nervioso. *Arch Latinos Med Biol*. 1903;1(1-8).
14. Ramón y Cajal S. Un sencillo método de coloración del retículo protoplásmico y sus efectos en los diversos centros nerviosos de vertebrados e invertebrados. *Trab Lab Inv Biol Univ* 1903;2:129-221.

15. Bielschowsky M. Die silberimpraegnation der neurofibrillen. *J Psych Neurol.* 1904;3:169–89.
16. Achúcarro N. Nuevo método para el estudio de la neuroglía y del tejido conjuntivo. *Bol Soc Esp Biol.* 1911;1 (7):139–41.
17. Río Hortega P. Noticia de un nuevo y fácil método para la coloración de la neuroglía y del tejido conjuntivo. *Trab Lab Invest Biol.* 1918;15:367-78.
18. Rivas Manzano M, Chavira Ramírez RCT, Ortiz Hernández HR. Adaptación de la técnica de impregnación argéntica de Llobart para la demostración de fibras nerviosas, en cualquier tejido en cortes por parafina. *Int J Morphol.* 2014;32(3):973-80.
19. Ulises Acuña A, Elguero J. Histoquímica. *An Quím.* 2012;108(2):114-8.
20. Ramón y Cajal S, Castro Fernández, F. *Elementos de Técnica Micrográfica del Sistema Nervioso.* 2^a ed. Barcelona: Salvat Editores; 1972.
21. Kasten FH. Paul Ehrlich: pathfinder in cell biology. 1. Chronicle of his life and accomplishments in immunology, cancer research, and chemotherapy. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission.* 1996;71(1):2-37.
22. Kay AB. The early history of the eosinophil. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology.* 2015;45(3):575-82.
23. González Santander, R. *La Escuela Histológica Española. IV. Expansión y repercusión internacional. Cajal, Río Hortega, y sus discípulos.* Madrid: Servicio de publicaciones. Universidad de Alcalá; 2000.
24. Pannese E. The Golgi Stain: invention, diffusion and impact on neurosciences. *J Hist Neurosci.* 1999;8(2):132-40.
25. Heinz T. Evolution of the silver and gold stains in neurohistology. *Biotechnic & Histochemistry.* 2005;80(5-6):211-22.
26. Gomis Blanco A. Santiago Ramón y Cajal y la culminación de la Teoría Celular. III Simposio "Ciencia y técnica en España de 1898 a 1945: Cabrera, Cajal, Torres Quevedo"; Lanzarote.2001. p. 117-25.
27. Ramón y Cajal S. *Recuerdos de mi vida: historia de mi labor científica.* Madrid: Alianza Editorial; 1981.
28. Baratas LA. *Introducción y desarrollo de la biología experimental en España entre 1868 y 1936.* Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1997.
29. Mazzarello P. Camillo Golgi's scientific biography. *J Hist Neurosci.* 1999;8(2):121-31.

30. Torres-Fernández O. La técnica de impregnación argéntica de Golgi. Conmemoración del centenario del Premio Nobel de Medicina (1906) compartido por Camilo Golgi y Santiago Ramón y Cajal. *Biomédica*. 2006;26:498-508.
31. Fairén A, Smith-Fernández A, DeDiego I. Organización sináptica de neuronas morfológicamente identificadas: el método de Golgi en microscopía electrónica. In: Armengol J, Miñano F, editors. *Bases experimentales para el estudio del sistema nervioso*. Vol. 1. Sevilla: Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla; 1996. p. 17-56.
32. Scheibel ME, Scheibel AB. The rapid Golgi method. Indian summer or renaissance? In: Nauta W, Ebesson S, editors. *Contemporary research methods in neuroanatomy*. New York: Springer-Verlag; 1970. p. 1-11.
33. Ramón-Moliner E. The Golgi-Cox technique. In: Nauta W, Ebesson S, editors. *Contemporary research methods in neuroanatomy*. New York: Springer-Verlag; 1970. p. 32-55.
34. DeFelipe J, Jones E. Santiago Ramón y Cajal and methods in neurohistology. *Trends Neurosci*. 1992;15:37-246.
35. López Piñero JM. Cajal y la estructura histológica del sistema nervioso. *Investigación y Ciencia*. 1993;197:6-13.
36. Grant G. Gustaf Retzius and Camillo Golgi. *J Hist Neurosci*. 1999;8(2):151-63.
37. Fernandez N, Breathnach CS. Luis Simarro Lacabra [1851–1921]: from Golgi to Cajal through Simarro, via Ranvier. *J Hist Neurosci*. 2001;10(1):19-26.
38. DeFelipe J. Sesquicentenary of the birthday of Santiago Ramón y Cajal, the father of modern neuroscience. *Trends Neurosci*. 2002;25:481-4.
39. Baratas LA. La obra neuro-embriológica de Santiago Ramón y Cajal. *Acta Hisp Med Sci Hist Illus*. 1997;17:259-79.
40. Jones EG. The impossible interview with the man of the Neuron Doctrine. *J Hist Neurosci*. 2006;15(4):326-40.
41. Coleman R. The long-term contribution of dyes and stains to histology and histopathology. *Acta histochemica*. 2006;108(2):81-3.
42. Ramón y Cajal S. Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev Trim Histol Norm Patol*. 1888;1:1-10.
43. DeFelipe J. The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2015;9:14.
44. Ramón y Cajal S. Las espinas colaterales de las células del cerebro teñidas por el azul de metileno. *Rev Trim Micrograf*. 1896;1:123-36.

45. Ramón y Cajal S. Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados. 2 vols. Madrid: Imprenta y Librería de Nicolás Moya; 1899-1904.
46. Langa MA. Santiago Felipe Ramón y Cajal (1852-1934) 1900-1934. Retazos Cajalinos: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 2015.
47. Ramón y Cajal-Junquera S. Contribución de S. Ramón y Cajal a la patología. Rev Esp Patol. 2002;35(1):77-88.
48. López Sánchez JM. Una escuela, dos laboratorios: Neurociencias en la Junta para Ampliación de Estudios. Rev Asoc Esp Neuropsiq. 2012;32(116):805-25.
49. Clark G. Staining procedures. 4^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1981. p. 134-5.
50. http://cvc.cervantes.es/ciencia/cajal/cajal_recuerdos/recuerdos/labor_25.htm. Cajal Recuerdos de mi vida Segunda parte, XXV: Centro Virtual Cervantes. Instituto Cervantes.
51. Pérez Trullen JM. La descripción de los ovillos neurofibrilares en la enfermedad de Alzheimer. Rev Esp Patol 2007;40(1):60-5.
52. Bielschowsky M. Eine modifikation meines silverimprägnationsverfahrens zur darstellung der neurofibrillen. J Psych Neurol. 1908;12:135-7.
53. Escalona-Zapata J. Técnicas Histológicas de la Escuela Española. En: McManus JFA, Mowry RW, editores. Técnica Histológica. Madrid: Atika; 1968. p. 511-95.
54. Aguirre de Viani C. Cajal y su Escuela. Salamanca: Junta de Castilla y León. Consejería de Educación y Cultura; 2002.
55. Achúcarro N. Nota sobre la estructura y funciones de la neuroglía y en particular de la neuroglía de la corteza cerebral humana. Trab Lab Invest Biol. 1913;11:187-217.
56. Achúcarro N. Algunos resultados histopatológicos obtenidos por el procedimiento del tanino y la plata amoniacal. Trab Lab Invest Biol. 1911;9:269-88.
57. Achúcarro N. Neuroglia y elementos intersticiales patológicos del cerebro impregnados por los métodos de reducción de la plata o por sus modificaciones. Trab Lab Invest Biol. 1911;9:161-79.
58. Achúcarro N. Las células amiboides de la neuroglia teñidas con el método de la plata reducida. Bol Soc Esp Biol. 1911;1(4):84-6.
59. Achúcarro N. Evolución de los pies vasculares neuróglícos en los vertebrados. Bol Soc Esp Biol. 1916;5:5-7.
60. Aguirre de Viani C. Pasado y futuro de la obra científica de Río Hortega. Arbor 2005;181(714):203-6.

61. Zarranz JJ. Nicolás Achúcarro Lund (1880-1918). *Neurosci Hist.* 2014;2(2):74-8.
62. Tremblay ME, Lecours C, Samson L, Sánchez-Zafra V, Sierra A. From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Frontiers in Neuroanatomy.* 2015;9:45.
63. Río Hortega P. El método del carbonato argéntico. Revisión general de sus técnicas y aplicaciones en Histología Normal y Patológica I. *Arch Histol Norm Patol.* 1942;1:165-206.
64. Río Hortega P. Un nuevo método de coloración histológica e histopatológica. *Bol Soc Esp Biol.* 1918;8:19-25.
65. Río Hortega P. Coloración rápida de tejidos normales y patológicos con carbonato de plata amoniacal. *Trab Lab Invest Biol.* 1919;17:229-35.
66. Burck H-C. Técnica Histológica. Manual para realizar preparaciones histológicas en el laboratorio. Madrid: Editorial Paz Montalvo; 1969.
67. García del Moral R. Laboratorio de Anatomía Patológica: Interamericana-McGraw-Hill; 1993.
68. Grizzle W. Theory and Practice of Silver Staining in Histopathology *Journal histotechnology.* 1996 19(3):183-95
69. Gómez-Biedma S, Soria E, Vivó M. Análisis electroquímico. *Rev Diagn Biol.* 2002;51:18-27.
70. López Cepero JM. Silver carbonate staining reveals mitochondrial heterogeneity. *J Histochem Cytochem.* 2004;52(2):211-6.
71. Kiernan JA. On Chemical Reactions and Staining Mechanisms. In: Kumar GL, Kiernan JAE, editors. *Special Stains and H & E 2nd ed: Carpinteria, Dako North America;* 2010.
72. Villarroel Peniza A, Suárez C. Métodos de impregnación metálica para el estudio de las fibras reticulares miocárdicas: Estudio comparativo. *Revista de la Facultad de Medicina.* 2002;25(2):224-30.
73. Alturkistani HA, Tashkandi FM, Mohammedsaleh ZM. Histological Stains: A Literature Review and Case Study. *Global Journal of Health Science.* 2016;8(3):72-9.
74. Río Hortega P. Notas técnicas. Innovaciones útiles en la técnica de coloración de la microglía y otros elementos del sistema macrófágico. *Bol Real Soc Esp Hist Nat.* 1927;27:199-210.
75. Scharenberg K. The silver carbonate techniques for the impregnation of the astroglia. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1960;19:622-7.

76. Riera Palmero J. La obra de Pío del Río Hortega en Valladolid. Valladolid: Ediciones del Seminario de Historia de la Medicina; 1991.
77. Riera Palmero J, Río-Hortega Bereciartu J. Pío del Río-Hortega. Epistolario y otros documentos inéditos. Primera parte (1902-1930). Valladolid: Ediciones del Seminario de Historia de la Medicina; 1993.
78. Río Hortega P. El maestro y yo. (Edición de A. Sánchez Álvarez-Insúa). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1986.
79. Río Hortega P. Histopatología del tejido nervioso en los tumores del encéfalo. La Clínica Castellana. 1911;3:265-89.
80. Río Hortega P. Fisiopatología de los tumores del encéfalo. Constitución del síndrome. La Clínica Castellana. 1912;4:226-86; 347-69.
81. Ramón y Cajal S. Contribución al conocimiento de la neuroglía del cerebro humano. Trab Lab Invest Biol. 1913;11:255-315.
82. López Piñero JM. Pío del Río Hortega. Madrid: Biblioteca de la Ciencia Española; 1990.
83. Aguirre de Viani C, Jiménez Carmena JJ. Pío del Río Hortega. León: Junta de Castilla y León. Consejería de Cultura y Turismo; 1991.
84. Río Hortega P. Nuevos detalles sobre la estructura del ovario. Bol Soc Esp Biol. 1913;2:64-8.
85. Río Hortega P. Investigaciones sobre el tejido muscular liso. Bol Soc Esp Biol. 1913;2:133-8.
86. Río Hortega P. Détails nouveaux sur la structure de l'ovaire. Trab Lab Invest Biol. 1913;11:163-75.
87. Río Hortega P. Investigations sur le tissu musculaire lisse. Trab Lab Invest Biol. 1913;11:177-85.
88. Río Hortega P. El centrosoma de las células nerviosas. Bol Soc Esp Biol. 1916;5:83-8.
89. Río Hortega P. Estudios sobre el centrosoma de las células nerviosas y neuróglías de los vertebrados, en sus formas normales y anormales. Trab Lab Invest Biol. 1916;14:117-53.
90. Ortiz Picón JM. La obra histoneurológica del doctor Pío del Río Hortega (1882-1945). Arch Neurobiol. 1971;34:39-70.
91. Río Hortega P. Nuevas reglas para la coloración constante de las formaciones conectivas por el método de Achúcarro. Trab Lab Invest Biol. 1916;14:181-8.

92. Río Hortega P. El conectivo interepitelial. *Trab Lab Invest Biol.* 1916;144:233-52.
93. Río Hortega P. Varias modificaciones al método de Achúcarro. *Bol Soc Esp Biol.* 1917;6:15-22.
94. Castro Fernández F. Cajal y la Escuela Neurológica Española. Editorial de la Universidad Complutense de Madrid. 1981:98-104.
95. Cano Díaz, P. Una contribución a la ciencia histológica: la obra de Don Pío del Río Hortega. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1985.
96. Río Hortega P. Una sencilla técnica para teñir rápidamente neurofibrillas y fibras nerviosas. *Bol Real Soc Esp Hist Nat.* 1921;21:204-10.
97. Río Hortega P. Condrioma y granulaciones específicas de las células neuróglícas. *Bol Real Soc Esp Hist Nat.* 1925;25:34-55.
98. Río Hortega P. Varias técnicas selectivas para la tinción del tejido conectivo reticular. *Bol Real Soc Esp Hist Nat.* 1925;25:204-10.
99. Río Hortega P. Manera sencilla de teñir epiteliofibrillas y ciertos retículos protoplásmicos de difícil demostración. *Bol Real Soc Esp Hist Nat.* 1926;26:107-8.
100. Río Hortega P. Sobre la verdadera significación de las células neuróglícas llamadas amiboides. *Bol Soc Esp Biol.* 1918;8:229-43.
101. Río Hortega P. El método del carbonato argéntico. Revisión general de sus técnicas y aplicaciones en Histología Normal y Patológica II. *Arch Histol Norm Patol.* 1942;2:329-62.
102. Río Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos I. La microglía en estado normal. *Bol Soc Esp Biol.* 1919;9:68-82.
103. Río Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos. *Bol Soc Esp Biol.* 1919;9:91-103.
104. Río Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos III. Naturaleza probable de la microglía. *Bol Soc Esp Biol.* 1919;9:108-20.
105. Río Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos IV. Poder fagocitario y movilidad de la microglía. *Bol Soc Esp Biol.* 1919;9:154-66.
106. Metz A, Spatz H. Die Hortegaschen Zellen (das sogenannte "dritte Element") und über ihre funktionelle Bedeutung. *Neurol Psychiatrie.* 1923;89:138-70.
107. Ochoa de Albornoz S. Recuerdo de D. Pío. En: *El maestro y yo.* (Edición de A. Sánchez Álvarez-Insúa). Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 1986. p. 27-33.

108. Río Hortega P. Estudios sobre la neuroglía. La glía de escasas radiaciones. (Oligodendroglía). *Bol Real Soc Esp Hist Nat.* 1921;21:63-92.
109. Río Hortega P. ¿Son homologables la glía de escasas radiaciones y la célula de Schwann? *Bol Soc Esp Biol.* 1922;10(1):25-8.
110. Río Hortega P. Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía. *Mem Real Soc Esp Hist Nat.* 1928;14:5-122.
111. Río Hortega P. Constitución histológica de la glándula pineal I. Células parenquimatosas. *Arch Neurobiol.* 1922;3:359-89.
112. Río Hortega P. Constitución histológica de la glándula pineal II. El substratum neuróglico. *Los Progresos de la Clínica.* 1928;36:178-97.
113. Río Hortega P. Constitución histológica de la glándula pineal III. Actividad secretora de las células parenquimatosas y neuróglicas. *Arch Neurobiol.* 1929;9:139-67.
114. Río Hortega P. Variaciones histológicas del cáncer de la piel. *Arch Esp Oncol.* 1930;1:25-92.
115. Río Hortega P. Estructura y sistematización de los gliomas y paragliomas. *Arch Esp Oncol.* 1932;2:411-677.
116. Río Hortega P. Nomenclatura y clasificación de los tumores del sistema nervioso central y periférico. *Arch Arg Neurol.* 1941;24:7-24.
117. Río Hortega P. La histología de los tumores nerviosos. *Ars Medica.* 1934;10:478-552.
118. Río Hortega P. Para el mejor conocimiento histológico de los meningoexoteliomas. *Arch Esp Oncol.* 1930;1:447-70.
119. Río Hortega P. Investigaciones sobre la neuroglía de los ganglios simpáticos. *Arch Histol Norm Patol.* 1942;1:83-138.
120. Río Hortega P. Investigaciones sobre la neuroglía de los ganglios sensitivos. *Arch Histol Norm Patol.* 1942;1:233-75.
121. Río Hortega P. Neuroblastomas. *Boletín de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires.* 1940;23:352-79.
122. Río Hortega P. Caracteres e interpretación de las células específicas de los neurinomas (schwanomas). *Arch Soc Arg Anat Norm Patol.* 1941;4:103-32.
123. Río Hortega P. Contribución al conocimiento citológico de los oligodendrogliomas. *Arch Histol Norm Patol.* 1944;2:267-305.

124. Río Hortega P. Sobre la interpretación estructural de los tumores del nervio y quiasma ópticos. Arch Soc Arg Anat Norm Patol. 1944;6:117-36.
125. Río Hortega P. El método del carbonato argéntico. Revisión general de sus técnicas y aplicaciones en Histología Normal y Patológica III. Arch Histol Norm Patol. 1943;3:231-44.
126. Río Hortega P. El método del carbonato argéntico. Revisión general de sus técnicas y aplicaciones en Histología Normal y Patológica IV. Arch Histol Norm Patol. 1945;4:577-604.
127. Río Hortega P. Aplicación de la técnica del carbonato argéntico al estudio de la neuroglía fibrosa en las gliosis. Semana Médica. 1944;52:613-7.
128. Río Hortega P. La neuroglía normal. Conceptos de angiogliona y neurogliona. Arch Histol Norm Patol. 1942;1:5-71.
129. Río Hortega P. Ensayo de clasificación de las alteraciones celulares del tejido nervioso. I. Alteraciones de las células nerviosas. Arch Histol Norm Patol. 1943;1:443-516.
130. Río Hortega P. Ensayo de clasificación de las alteraciones celulares del tejido nervioso. II. Alteraciones de las células neuróglícas. Arch Histol Norm Patol. 1943;2:5-100.
131. Río Hortega P. Naturaleza y caracteres de la trama reticular del bazo. Bol Real Soc Esp Hist Nat. 1921;21:371-84.
132. Río Hortega P. Sobre la existencia de filamentos especiales en el interior de las células hepáticas. Bol Real Soc Esp Hist Nat. 1921;21:438-49.
133. Río Hortega P. Contribución al estudio de los cuerpos de Negri. Bol Soc Esp Biol. 1918;8:7-12.
134. Río Hortega P. Sobre la existencia de células de Paneth en el apéndice vermiforme. Bol Soc Esp Biol. 1914;3:155-8.
135. Río Hortega P. Sobre la banda de cierre de los epitelios. Bol Soc Esp Biol. 1916;5:1-3.
136. Río Hortega P. Sobre ciertas células del apéndice vermiforme aún no descritas. Bol Soc Esp Biol. 1916;5:40-7.
137. Río Hortega P. Nota sobre un nuevo método para la coloración del espiroquete de la sífilis. Bol Soc Esp Biol. 1914;3:119-21.
138. Río Hortega P. Fundamentos y reglas de una técnica de impregnación férrica, aplicable especialmente al sistema retículo-endotelial. Bol Real Soc Esp Hist Nat. 1927;27:372-83.
139. Escalona-Zapata J. La última clasificación de la OMS de los tumores del sistema nervioso (2000). Consideraciones acerca de los oligodendrogliomas. . Rev Esp Patol. 2005;38(3):135-40.

140. Bailey P, Cushing H. A clasification of the tumors of the glioma group on a histogenetical basis with a correlated study of prognosis. Philadelphia: J.B. Lippincott Co; 1926.
141. Russell DS, Marshall AHE, Smith FB. Microgliomatosis a form of reticulosis affecting the brain. *Brain*. 1948;71(1):1-15.
142. Russell DS, Rubinstein LJ, Lumsden CE. Pathology of tumours of the nervous system. London: Edward Arnold; 1959.
143. Scherer HJ. Structural development in gliomas. *Am J Cancer* 1938;34(3):333-51.
144. Scherer HJ. The forms of growth in gliomas and their practical significance. *Brain*. 1940;63(1):1-35.
145. Kernohan JW, Mabon RF, et al. A simplified classification of the gliomas. Proceedings of the staff meetings Mayo Clinic. 1949;24(3):71-5.
146. Chater G, et al. Características demográficas y patológicas de los tumores del sistema nervioso central estudiados en la Clínica El Bosque. *Acta Neurol Colomb*. 2011;27:106-13.
147. Zulch KJ. Tipos histológicos de tumores del sistema nervioso central: Organización Mundial de la Salud; 1979.
148. Kautzky R, Zülch KJ, Wende S, TÄnzer A. *Neuroradiology on neuropathological basis*. Berlin: Springer; 1976.
149. Escalona-Zapata J. Uncommon oligodendrogliomas. . *Acta Neuropathol Suppl (Berl)*. 1981;7:94-6.
150. Meneses ACO, Kepes JJ, Sernberg NH. Astrocytic differentiation of neoplastic oligodendrocytes. *J Neuropath Exp Neurol* 1982;41: 368.
151. Raff MC, Miller RH, Noble M. A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature Lond*. 1983;303:390-6.
152. Flamm ES. The neurology of Jean Cruveilhier. *Medical History*, 1973;. 1973; 17 (4):343-55.
153. Parquet RA. Rudolf Carl Virchow. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2014;44(3):202.
154. Ventura HO. Rudolph Virchow and cellular pathology. *Clin Cardiol*. 2000;23(11):550-2.
155. Mazana JS. Rudolph Virchow en el I Centenario de su muerte. *An Med Int*. 2002;19(12):649-50.
156. Bennett H, Godlee R. Hospital for epilepsy and paralysis, regent's park.: excision of a tumour from the brain. *The Lancet*. 1884;124(3199):1090-1.

157. Aguirre-Cruz ML, Sotelo-Morales J. Tumores cerebrales. México: Ed Médica Panamericana; 2008.
158. Martin-Villalba A, Okuducu AF, Deimling A. The evolution of our understanding on glioma. *Brain pathology* (Zurich, Switzerland). 2008;18(3):455-63.
159. Daumas-Duport C, Scheithauer B, O'Fallon J, Kelly P. Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method. *Cancer*. 1988;62(10):2152-65.
160. Daumas-Duport C, Beuvon F, Varlet P, Fallet-Bianco C, editors. Gliomas: WHO and Sainte-Anne hospital classifications. *Annales de pathologie*; 2000.
161. Varas C, Robaina P, Macías V. Tumores del sistema nervioso central. *Biocáncer*. 2004;2(1):1-10.
162. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. World Health Organization histological classification of tumours of the central nervous system. Lyon: International Agency Research Cancer; 2007.
163. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007;114:97-109.
164. Ferguson S, Lesniak MS. Convection enhanced drug delivery of novel therapeutic agents to malignant brain tumors. *Current drug delivery*. 2007;4(2):169-80.
165. Río Hortega P. Pineal gland. In: Penfiel W, editor. *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. Vol. 2. New York: Hoeber; 1932. p. 635-703.
166. Río Hortega P. Microglia. In: Penfiel W, editor. *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. Vol. 2. New York: Hoeber; 1932. p. 481-534.
167. Río Hortega P. Anatomía microscópica de los tumores del sistema nervioso central y periférico. *Trab Lab Histopatol*. 1933;103:8-11.
168. Castellano B, Gonzales B, Jensen MB, Pedersen EB, Finsen BR, Zimmer J. A double staining technique for simultaneous demonstration of astrocytes and microglia in brain sections and astroglial cell cultures. *Histochem Cytochem*. 1991;39:561-8.
169. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*. 2000;25:1439-51.
170. Geddes JF, Thom M, Robinson SFD, Revesz T. Granular cell change in astrocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 1996;20:55-63.
171. Río Hortega P. El tercer elemento de los centros nerviosos. Histogénesis y evolución normal, éxodo y distribución regional de la microglía. *Mem Real Soc Esp Hist Nat*. 1921;11:213-68.

172. Luna LG. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3^a ed. New York: McGraw-Hill; 1968.
173. Río Hortega P. La microglía y su transformación en células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos. *Trab Lab Invest Biol.* 1920;18:37-82.
174. Lis H, Sharon N. The biochemistry of plant lectin (phytohemagglutinins). *Annu Rev Biochem.* 1973;42:541-50.
175. Streit WJ, Schulte BA, Balentine JD, Spicer SS. Histochemical localization of galactose-containing glycoconjugates in sensory neurons and their processes in the central and peripheral nervous system rat. *J Histochem Cytochem.* 1985;33:1042.
176. Acarin L, Vela JM, González B, Castellano B. Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in ameboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem.* 1994;42:1033-41.
177. Zhu BCR, Laine RA. Purification of acetyllactosamine-specific tomato lectin by erithroglycan-sepharose affinity chromatography. *Prep Biochem.* 1989;19:341-50.
178. Cerón J, Troncoso J. Alteraciones de las células de la microglía del sistema nervioso central provocadas por lesiones del nervio facial. *Biomédica.* 2016;36:619-31.
179. Reske-Nielsen E, Oster S, Reintoft I. Astrocytes in the prenatal central nervous system. *Acta Path Microbiol Immunol Scand Sect A.* 1987;95:339-46.
180. Oh D, Prayson R A. Evaluation of epithelial and keratin markers in glioblastoma multiforme. An immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med.* 1999;123:917-20.
181. Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedoa U, Matías-Guiu J. Astrocitosis en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología.* 2015;30(2):119-29.
182. Hayashi K, Hoshida Y, Horie Y, et al. Immunohistochemical study on the distribution of A and B subunits of S-100 protein in brain tumors. *Acta Neuropathol.* 1991;81:657-63.
183. Iwanaga T, Takahashi Y, Fujita T. Immunohistochemistry of neuron-specific and glia-specific proteins. *Archives of histology and cytology.* 1989;52 Suppl:13-24.
184. Sensenbrenner M, Lucas M, Deloulme JC. Expression of two neuronal markers, growth-associated protein 43 and neuron-specific enolase, in rat glial cells. *J Mol Med.* 1997;75(9):653-63.
185. Vinore SA, Marangos PJ, Bonnin JM, Rubinstein LJ. Immunoradiometric and immunohistochemical demonstration of neuron-specific enolase in experimental rat gliomas. *Cancer Res.* 1984;44(6):2595-9.

186. Coca S, Vaquero J, Martas JA, Moreno M, Rodríguez J. Características inmunohistoquímicas de los tumores cerebrales. *Neurocirugía* 1992;3:267-83.
187. López Enriquez M. Existencia de células de Hortega "microglia" en la retina y vías ópticas. *Bol Real Soc Esp Hist Nat.* 1926;26(5):294-301.
188. López Enriquez M. Oligodendroglía de las vías ópticas. *Bol Real Soc Esp Hist Nat.* 1926;26.
189. Río Hortega P. Lo que debe entenderse por tercer elemento de los centros nerviosos. *Bol Soc Esp Biol.* 1924;11:33-5.
190. Pérez-Cerdá F, Sánchez-Gómez MV, Matute C. Pío del Río Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Frontiers in Neuroanatomy.* 2015;9(92).
191. Gill AS, Binder DK. Wilder Penfield, Pío del Río-Hortega, and the discovery of oligodendroglia. *Neurosurgery.* 2007;60(5):940-8.
192. McCarter JC. A silver carbonate staining method for oligodendrocytes and microglia for routine use. *Am J Pathol.* 1940;16(2):233-5.2.
193. Río Hortega P. Algunas observaciones acerca de la neuroglía perivascular. *Bol Real Soc Esp Hist Nat.* 1921;21:204-10.
194. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological Reviews.* 2011;91(2):461-553.
195. Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci.* 2009;29(13):3974-80.
196. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Functional plasticity of microglia: A review. *Glia.* 1988;1(5):301-7.
197. Raposo C, Schwartz M. Glial scar and immune cell involvement in tissue remodeling and repair following acute CNS injuries. *Glia.* 2014;62(11):1895-904.
198. Ramón y Cajal S. Una modificación del método de Blalchowsky para la impregnación de la neuroglia común y mesoglia y algunos consejos acerca de la técnica del oro-sublimado. *Trab Lab Invest Biol.* 1920;18:129-41.
199. Ramón y Cajal S. Algunas consideraciones sobre la mesoglia de Roberston y Río-Hortega. *Trab Lab Invest Biol.* 1920;18:109-27.
200. Castro Fernández F, Lorente de Nó R. A propósito de la homología entre la glia de escasas radiaciones y la célula de Schwann y endocapsulares. *Bol Soc Esp Biol.* 1924;10:63-8.

201. Rezaie P, Male D. Mesoglia & Microglia. A historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *J Hist Neurosci*. 2002;11(4):325-74.
202. López Enríquez M. Las células de Rio-Hortega en los procesos patológicos de la retina y nervio óptico. *Bol Soc Esp Biol*. 1926;12.
203. López Enriquez M. Las células de Hortega de la retina y vías ópticas en estado normal y patológico. *Arch Soc Oftal Hispanoam*. 1927;27:322-49.
204. Naoumenko J, Feigin I. A modification for paraffin sections of silver carbonate impregnation for microglia. *Acta Neuropathol*. 1963;2(4):402-6.
205. Ibrahim MZ, Call N, Noden P. Modifications of the Hortega silver carbonate method adapted for celloidin-embedded and frozen sections. *Acta Neuropathol*. 1968;10(3):258-60.
206. Tsujiyama Y. Normal and pathological figures of neuroglia stained with Tsujiyama's method. In: Nakai J, editor. *Morphology of Neuroglia*. Tokyo: Shoin Ltd; 1963.
207. Gallyas F. Silver impregnation method for microglia. *Acta Neuropathol*. 1963;3:206-9.
208. Stollg G, Jander S. The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Progr Neurobiol*. 1999;58(3):233-47.
209. Kaur C, Ling EA, Wong WC. Lectin labelling of ameboid microglial cells in the brain of postnatal rats. *J Anat*. 1990;173:151-60.
210. Hayes CE, Goldstein IJ. An D-galactosyl-binding lectin from *Bandeiraea simplicifolia* seeds. *J Biol Chem*. 1974;249:1904-14.
211. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:119-45.
212. Perry VH, Hume DA, Gordon S. Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*. 1985;15(2):313-26.
213. McCarthy KD, Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol*. 1980;85(3):890-902.
214. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19(8):312-8.
215. Owens T, Babcock AA, Millward JM, Toft-Hansen H. Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Research Reviews*. 2005;48(2):178-84.
216. Campbell IL. Cytokine-mediated inflammation, tumorigenesis, and disease-associated JAK/STAT/SOCS signaling circuits in the CNS. *Brain Research Reviews*. 2005;48(2):166-77.

217. Giulian D, Baker TJ, Shih LC, Lachman LB. Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *J Exp Med*. 1986;164(2):594-604.
218. Giulian D, Chen J, Ingeman JE, George JK, Nojonen M. The role of mononuclear phagocytes in wound healing after traumatic injury to adult mammalian brain. *J Neurosci*. 1989;9(12):4416-29.
219. Giulian D, Lachman LB. Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. *Science (New York, NY)*. 1985;228(4698):497-9.
220. Frei K, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A. Astrocytes of the brain synthesize interleukin 3-like factors. *J Immunol*. 1985;135(6):4044-7.
221. Frei K, Bodmer S, Schwerdel C, Fontana A. Astrocyte-derived interleukin 3 as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophages. *J Immunol*. 1986;137(11):3521-7.
222. Selmaj K, Raine CS. Tumor necrosis factor mediates myelin damage in organotypic cultures of nervous tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1988;540:568-70.
223. Shigematsu K, Kamo H, Akiguchi I, Kimura J, Kameyama M, Kimura H. Neovascularization in kainic acid-induced lesions of rat striatum. An immunohistochemical study with laminin. *Brain research*. 1989;501(2):215-22.
224. Dusart I, Isacson O, Nothias F, Gumpel M, Peschanski M. Presence of Schwann cells in neurodegenerative lesions of the central nervous system. *Neuroscience letters*. 1989;105(3):246-50.
225. Graeber MB, Streit WJ, Kreutzberg GW. The third glial cell type, the microglia: cellular markers of activation in situ. *Acta histochemica Supplementband*. 1990;38:157-60.
226. Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Expression of Ia antigen on perivascular and microglial cells after sublethal and lethal motor neuron injury. *Experimental neurology*. 1989;105(2):115-26.
227. Graeber MB, Streit WJ, Kiefer R, Schoen SW, Kreutzberg GW. New expression of myelomonocytic antigens by microglia and perivascular cells following lethal motor neuron injury. *J Neuroimmunol*. 1990;27(2-3):121-32.
228. Giulian D, Vaca K, Noonan CA. Secretion of neurotoxins by mononuclear phagocytes infected with HIV-1. *Science (New York, NY)*. 1990;250(4987):1593-6.
229. Streit WJ. Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*. 2005;48(2):234-9.
230. Hendriks JJA, Teunissen CE, de Vries HE, Dijkstra CD. Macrophages and neurodegeneration. *Brain Research Reviews*. 2005;48(2):185-95.

231. Vilhardt F. Microglia: phagocyte and glia cell. *The International J Biochemistry & Cell Biology*. 2005;37(1):17-21.
232. Loane DJ, Byrnes KR. Role of microglia in neurotrauma. *Neurotherapeutics*. 2010;7(4):366-77.
233. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*. 2005;8(6):752-8.
234. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, NY)*. 2005;308(5726):1314.
235. Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke H. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends in Neurosciences*. 2007;30(11):596-602.
236. Olney JW. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science (New York, NY)*. 1969;164(3880):719-21.
237. Olney JW. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. An electron microscopic study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1971;30:75-90.
238. Redding TW, Schally AV, Arimura A, Wakabayashi I. Effect of monosodium glutamate on some endocrine functions. *Neuroendocrinology*. 1971;8(3):245-55.
239. Bakke JL, Lawrence N, Bennett J, Robinson S, Bowers CY. Late endocrine effects of administering monosodium glutamate to neonatal rats. *Neuroendocrinology*. 1978;26(4):220-8.
240. Bloch B, Gaillard RC, Brazeau P, Lin HD, Ling N. Topographical and ontogenetic study of the neurons producing growth hormone-releasing factor in human hypothalamus. *Regulatory peptides*. 1984;8(1):21-31.
241. Lemkey-Johnston N, Butler V, Reynolds WA. Glial changes in the progress of a chemical lesion. An electron microscopic study. *J Comp Neurol*. 1976;167(4):481-501.
242. Lemkey-Johnston N, Reynolds WA. Nature and extent of brain lesions in mice related to ingestion of monosodium glutamate. A light and electron microscope study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1974;33(1):74-97.
243. Fariña J, Escalona-Zapata J. La obra de Pío del Río Horteiga y sus consecuencias en la neuropatología. *Arbor*. 2005;181:221-32.
244. Dubois-Dalcq M. Regeneration of oligodendrocytes and myelin. *Trends Neurosci*. 1995;18(7):289-91.
245. Chamberlain KA, Nanescu SE, Psachoulia K, Huang JK. Oligodendrocyte regeneration: Its significance in myelin replacement and neuroprotection in multiple sclerosis. *Neuropharmacology*. 2016;110(Pt B):633-43.

246. Marchesani O. Die Morphologie der glia im nervus opticus und in der retina dargestellt nach dem neuesten Untersuchungsmethoden und untersuchungsergebnissen. Von Graefes Arch Ophtalm. 1926;117:575-605.
247. Hawkins V, Butt A. TASK-1 channels in oligodendrocytes: a role in ischemia mediated disruption. Neurobiol Dis. 2013;55:87-94.
248. Zeisel A, Muñoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lonnerberg P, La Manno G, Jureus A, et al. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. Science (New York, NY). 2015;347(6226):1138-42.
249. Río Hortega P. Anatomía microscópica de los tumores del sistema nervioso central y periférico. Ponencia del Congreso Internacional de Lucha Científica y Social Contra el Cáncer; Madrid: Junta Ampliación Estudios; 1934.
250. Zülch KJ. Brain Tumors. Their biology and pathology. New York: Springer; 1965.