

Archivos Latinos  
de MEDICINA y de BIOLOGÍA

---

Madrid \*\*\* Año I \*\*\* Tomo I \*\*\* Núm. 1

---

20 de Octubre de 1903.

# SOBRE UN SENCILLO PROCEDER DE IMPREGNACION

DE LAS

## FIBRILLAS INTERIORES DEL PROTOPLASMA NERVIOSO

POR

S. RAMON Y CAJAL



La cuestión de la textura fibrilar de las células nerviosas está á la orden del día. Sobre ella han publicado en estos últimos años interesantes trabajos Apathy, Bethe, Nissl, Lugaro, Held, Meyer, Simarro, Auerbach, Donaggio y otros. Concíbese bien que interese y atraiga el estudio de las neurofibrillas intraprotoplásmicas, porque la existencia de líneas ó caminos sólidos á través del blando jugo celular sugiere la idea de que ellos representan el cauce íntimo por donde circulan los impulsos nerviosos y el misterioso teatro de las más elevadas actividades de la substancia gris.

Mas, por desgracia, en el citado tema las observaciones son harto difíciles y delicadas y, no escaso el riesgo de cometer graves errores. Ello depende de la inconstancia é imperfección de los métodos de coloración, que no revelan siempre las neurofibrillas con definición perfecta, y sobre todo de que en tan arduos dominios de la citología tocamos ya al límite de la potencia resolutive del microscopio. Aquí es precisamente donde más falta nos hacen las coloraciones enérgicas, selectivas y precisas. Tratándose de resolver filamentos cuyo diámetro está á menudo por debajo de la décima de micra, es de todo punto necesario venir en ayuda del cuasi agotado poder resolutive de los objetivos apocromáticos 1,30 y 1,40 de Zeiss, con impregnaciones intensas y finísimas de los detalles perseguidos.

Dos buenos métodos se conocen hoy para el teñido selectivo de las neurofibrillas: el de

Bethe<sup>1</sup>, basado en la atracción que el molibdato amónico ejerce por las anilinas básicas, y el de Simarro<sup>2</sup>, fundado en la afinidad que el bromuro y ioduro potásicos (convertidos mediante los procederes fotográficos, primero en bromuro ó ioduro de plata y luego en plata metálica, previa exposición á la luz, revelado y fijado) tienen durante la vida por los referidos filamentos. Todavía existe otro método, el de Donaggio; pero este autor, cuyas preparaciones fueron exhibidas durante el último Congreso Médico Internacional de Madrid, no ha publicado todavía su *modus operandi*.

De los dos citados métodos, el de Bethe da resultados muy bellos; mas tiene el defecto de la inconstancia, según confiesa su propio autor. Para que se juzgue de esta veleidad, diremos que nosotros en trece ensayos sólo obtuvimos un éxito completo y dos resultados pasables. Otros observadores han sido menos afortunados aún, pues no han logrado nunca una impregnación aceptable. El de Simarro, que colorea las neurofibrillas de pardo claro, y aun de gris obscuro, destacando muy bien sobre fondo amarillo pálido, resulta algo más constante,

1 A. BETHE: Ueber die Neurofibrillen der Ganglienzellen von Wirbelthieren und Beziehungen zu Golginetzen.—*Arch. f. micros. Anat. &c.*—Bd. 55, 1900. (Véase también: *Zeitschrift. f. wissenschaft. Mikroskopie.*—Bd. 1899.)

2 L. SIMARRO: «Nuevo método histológico de impregnación por las sales fotográficas de plata.»—*Rev. trim. micrográfica*, vol. X, 1900.

aunque harto caprichoso, en lo referente á la intensidad del teñido. Así y todo nos ha fallado cuatro veces en siete tentativas, y los buenos preparados han exigido el uso de rebajadores ó de viradores para moderar ó aumentar, según los casos, el contraste de color entre el armazón fibrilar y el fondo. Adolece además del inconveniente de colorear muy imperfectamente las grandes células motrices, seleccionando de un modo especial los corpúsculos medianos y pequeños de la médula espinal (células comisurales y funiculares) y de no ser aplicable, al menos con resultados demostrativos, al cerebro, cerebelo y ganglios, limitación de que en parte adolece también el método de Bethe. Sin embargo, el método de Simarro es susceptible de mejora modificando el mecanismo de la reducción argéntica y suprimiendo una de las causas de la inseguridad, que es la inclusión en celoidina antes de la revelación y fijado. De todos modos, la necesidad de envenenar los animales durante un período de tiempo bastante largo, constituye un serio inconveniente, pues, por una parte, excluye toda tentativa de empleo en el hombre, y por otra, dificulta si no estorba por completo la aplicación del método en los embriones y animales de pocos días, así como en los afectos de lesiones nerviosas experimentales.

Fuera, pues, muy de desear encontrar un método sencillo, breve y constante, y que pudiera aplicarse, lo mismo al hombre que á los animales, sin el empleo de los agentes alterantes usados en el método de Bethe, ni la operación preliminar, engorrosa y pesada, del envenenamiento indispensable en el proceder de Simarro.

Inspirados en este propósito, venimos desde hace cuatro años trabajando por hallar nuevos modos de impregnación del tejido nervioso. Fruto de estos modestos ensayos (en los que solemos combinar de varios modos la acción de una sal metálica con un reductor poderoso) son el llamado método de la hidroquinona y ácido pirogálico<sup>1</sup> para el teñido de los axones, y diversos procedimientos de coloración de la mielina<sup>2</sup>.

Estos experimentos nos han llevado á analizar, cuidadosa y comparativamente, el mecanismo de acción de diversos agentes reductores, así como la influencia que en la finura y selección del precipitado metálico tiene la reacción neutra, ácida ó alcalina del reductor y el modo de penetración de la sal reductible. Tales experiencias, efectuadas con un gran número de compuestos metálicos, no están todavía acabadas. Ellas nos han conducido, sin embargo, al hallazgo de un hecho técnico de cierta importancia, á saber: que la precipitación de un metal en el espesor de una trama orgánica alcanza una gran finura y un poder selectivo aprovechable cuando la reducción se opera muy lentamente, al abrigo de la luz y en un baño neutro ó ácido. La intervención de los álcalis contraría, por lo común, la selección, y produce depósitos groseros é irregulares.

En concepto de agente impregnador nos valemos, preferentemente, del nitrato de plata neutro, el tan conocido reactivo de los cementos intercelulares, base de tantos métodos histológicos. Bajo las condiciones que luego se expondrán, esta sal argéntica proporciona, por reducción, una coloración roja oscura ó siena de las neurofibrillas, en la cual el precipitado metálico es tan delicado, que resulta imperceptible aun bajo los más potentes apocromáticos. El aspecto general del preparado es el de un corte teñido con vesubina.

Aparte su eficacia analítica, tiene esta impregnación selectiva la inapreciable ventaja de ser absolutamente constante. La técnica es, además, de una gran sencillez. Todo se reduce, en efecto, á dos operaciones sucesivas y, por decirlo así, automáticas: 1.ª, inmersión por algunos días del tejido nervioso en una solución concentrada de sal argéntica; 2.ª, acción en bloque y por veinticuatro horas de un reductor neutro, es decir, simplemente disuelto en agua.

He aquí detallados estos dos momentos técnicos:

1.º Piezas nerviosas frescas, de medio centímetro de espesor á lo más, se sumergen en nitrato de plata al 3 por 100. El líquido debe ser abundante, para que las piezas no empobrezcan demasiado el reactivo; en caso contrario, se añadirán al día siguiente algunos cristales de nitrato de plata ó líquido nuevo.

1 S. R. CAJAL: Pequeñas comunicaciones técnicas.—*Rev. trim. micr.*, tomo V, 1900.

2 S. R. CAJAL: Método para colorear la mielina en las preparaciones del método de Marchi.—*Trab. del Laboratorio de Investigaciones biológicas*. Madrid, volumen II, 1903.

Debe permanecer el tejido en este baño lo menos cuatro días, porque el nitrato de plata, según hizo ya notar Simarro, penetra muy lentamente á través de las superficies de sección. Lo mejor es aguardar una semana antes de proceder á la reducción, que saldrá igualmente bien, si no mejor, en todos los días siguientes hasta el mes ó mes y medio. Si se quisiera acortar este plazo, limitándolo, por ejemplo, á tres ó cuatro días, se apelará á la acción del calor (piezas colocadas en la estufa á 30 ó 35°).

Hay un claro indicio de la madurez de la acción de la sal argéntica: el matiz pardoclaro ó amarillento adquirido por la substancia gris en lo profundo de las piezas. Un color blanco uniforme, como lechoso, de la sección fresca del tejido, anuncia defecto de penetración del reactivo.

En general, el cerebro y cerebelo exigen más tiempo que la médula y los ganglios.

2.º Inmersión por doce á veinticuatro horas de las piezas en esta solución:

Hidroquinona ó ácido pirogálico.	1 gramo.
Formol.....	15 cent. cúb.
Agua destilada.....	100 —

El formol no es absolutamente necesario, pero endurece el tejido y nos ha parecido que afina algo el precipitado metálico. En vez del ácido pirogálico puede usarse cualquier otro reductor, como el ortol, el amidol, etcétera, siempre, bien entendido, sin adición de sulfito ni de álcali.

Es conveniente quitar el exceso de nitrato de la superficie de las piezas por un lavado de un par de minutos en agua destilada.

3.º Lavado por algunos segundos en agua para quitar el exceso de reductor; después: alcohol, celoidina ó parafina, y secciones microtómicas que se montarán, sin coloración ninguna subsiguiente, en bálsamo ó damar.

Cabe también teñir los cortes con tionina, azul de metileno ó un color básico cualquiera: con lo que los husos de Nissl y los nucleolos aparecerían impregnados de un matiz casi complementario del tomado por las neurofibrillas; mas esta doble coloración, provechosa en algún caso particular, no es necesaria, por ser el teñido del armazón protoplásmico, suficientemente interesante por sí, y porque en esta clase de preparados, destinados á ser examinados con mucha luz y con los más potentes apocromáticos, antes

conviene exagerar que amenguar la transparencia de los cortes.

La impregnación no tiene igual aspecto en toda la pieza. Los cortes más superficiales ó próximos á la puerta de entrada del reductor (éste penetra principalmente por los traumatismos) presentan exceso de impregnación con un color negro de las células que impide por completo el análisis histológico. Solemos, por tanto, rechazarlos, aunque alguna vez sean aprovechables previamente rebajados en ferricianuro de potasa é hiposulfito de sosa<sup>1</sup>.

Tampoco son aprovechables las regiones hondas correspondientes al centro de la pieza, las cuales exhiben matiz amarillento; sólo en los límites de la zona útil, de que luego hablaré, aparece tal cual elemento rosáceo ó café claro, donde se define, aunque en tono pálido, el retículo. La región verdaderamente buena, por ser la que ostenta la impregnación más enérgica y selectiva, es la intermediaria entre la superficial ó negra y la amarilla ó profunda, zona cuyas secciones muestran á simple vista color siena claro ó moreno rojizo. En tales cortes las neurofibrillas exhiben tono negro, café obscuro ó rojo chocolate, destacando muy bien del fondo amarillento del protoplasma y núcleo no teñidos y pudiéndoselas seguir con suficiente claridad en todo su curso. En algunos preparados las células aparecen poco coloreadas; en cambio muéstranse convenientemente teñidas en gris ó pardo las arborizaciones nerviosas pericelulares, arborizaciones que ningún método (el de Golgi sólo las tiñe en los animales jóvenes ó fetos) colorea bien en la época adulta.

Los citados preparados prueban parento-

1 La operación de rebajar es muy delicada, y exige tacto y habilidad especialísimas. Es, además, ocasionada á provocar retracciones en los cortes y, por tanto, condensaciones del armazón protoplásmico, poco favorables á la buena percepción de sus filamentos. De todos modos, como se logran, á veces, por este procedimiento preparaciones muy bellas, indicaremos brevemente la técnica:

Los cortes sacados del alcohol se llevan á esta solución: — ferricianuro de potasio, 0,50; alcohol, 50; agua, 100; — donde permanecerán algunos minutos. Mucho antes que la substancia gris adquiriera el tinte gris pardo claro, indicio de un buen rebajado, se trasladan al baño de hiposulfito de sosa: — hiposulfito, 5; agua, 100; alcohol, 25. Después: lavado en agua, deshidratación y damar. La adición del alcohol al ferricianuro modera ó impide la retracción de los cortes y retarda la acción del rebajador.

riamente, contra Bethe y Meyer, que las ramificaciones nerviosas pericelulares no se resuelven en la red fina y plana de Golgi, sino que, según descubrimos hace tiempo nosotros, forman un plexo ó nido terminal cuyos cabos son libres y varicosos; no siendo aquí posible la confusión cometida por aquellos autores entre la red de Golgi y nuestros nidos nerviosos, por cuanto el método que nos ocupa no colorea jamás la mencionada rejilla pericelular, rejilla que, como nosotros creemos haber demostrado, no es de naturaleza nerviosa, sino simple producto de coagulación de algún albuminoide<sup>1</sup>.

Un detalle interesante hay que añadir á las revelaciones de los métodos de Golgi y Ehrlich. Las ramas nerviosas pálidas, distribuidas en torno de los células, acaban mediante unas recias varicosidades, especie de mazas cónicas, granulosas, apoyadas por su base ó cabo libre sobre la superficie celular.

Estas escrescencias, que llamaremos *mazas terminales* y que se asemejan por cierto al *cono de crecimiento* de las fibras nerviosas embrionarias, están íntimamente adheridas á la membrana; lo prueba el hecho de que, cuando la neurona aparece algo retraída, las mazas terminales y sus pedículos siguen el movimiento del soma, que se presenta como rodeado de una empalizada de apéndices nerviosos. El aspecto general de las células en los casos en que las mazas terminales están bien coloreadas, recuerda la maculación de una piel de tigre. Estimamos probable que ciertas máculas dibujadas por Held en las mallas del retículo de Golgi, correspondan á dichas mazas nerviosas<sup>2</sup>.

Las células de mediana talla de la médula, cerebro, tálamo, etc., presentan las neurofibrillas al parecer anastomosadas, engendrando la red de que habla Donaggio.

En las células fuertemente teñidas se adquiere la impresión de que existen, como en los núcleos ordinarios en fase de descanso, dos clases de hilos: *primarios* ó *gruesos*, que parecen continuarse de una dendrita á otra; y *secundarios*, pálidos, granulosos y finos, que enlazan entre sí los filamentos primarios pro-

duciendo un enrejado irregular. Pero acerca de esto no cabe formular una opinión definitiva, pues pudiera ser que lo que llamamos filamentos secundarios fueran el resultado de alguna coagulación intra-protoplásmica.

Interesante es también la presencia en algunas dendritas de *filamentos colosales*, si no es que representan haces aislados y densos, cuyos elementos primarios resistan á la resolución del apocromático 1,40. Estos filamentos espesísimos corren por el eje de las dendritas, y llegados que son á la vecindad del núcleo, se descomponen en un grupo de hebras constitutivas de un armazón perinuclear bastante bien deslindado del resto del sistema fibrilar del protoplasma. También Simarro figura una disposición que corresponde quizás á la expuesta.

Otro hecho sobre cuya significación y generalidad nada podemos decir aún, consiste en la existencia dentro del núcleo, en ciertas células funiculares voluminosas, de un bastoncito espeso, recto ó encorvado, sin conexiones, visibles, con el nucleolo ni con el protoplasma. Este filamento liso y cilíndrico se impregna intensamente por la plata, destacando clarísimamente en el fondo incoloro del jugo nuclear. Alguna vez hemos visto también bastoncitos en el protoplasma celular del núcleo del cuerpo trapezoide; pero aquí se trata de un bastón más espeso terminado por cabos apuntados y apoyados sobre el núcleo. El estudio de estas formas que corresponden quizás á los bastoncitos vistos esporádicamente por Mann, Lenhossek, Held, Holmgren, etc., nos ocupará más adelante.

Para concluir con esta nota, manifestaremos que nuestro modo de reducir las sustancias metálicas en bloque y sin el concurso de la luz y de los álcalis, da también buenos resultados en los animales envenenados por los ioduros y bromuros (método de Simarro), consiguiéndose con esta modificación hacer muy constante y enérgica la impregnación de las neurofibrillas, las cuales se muestran sin dificultad en todos los centros nerviosos (médula, cerebro, cerebelo, bulbo raquídeo y ganglios). En realidad, con esta modificación se suman dos efectos: la coloración negra intensa de los corpúsculos funiculares de la médula y bulbo, que fijaron el bromuro ó ioduro de plata (reacción de Simarro), y que se reducen también en los baños neutros; y la coloración siena ó café propia de nuestro pro-

1 S. R. CAJAL: Consideraciones críticas sobre la teoría de A. Bethe acerca de la estructura y conexiones de las células nerviosas. — *Trab. del Lab. de Invest. biol.*, vol. II, 1903.

2 HELD: Ueber den Bau der grauen und weissen Substanz. — *Arch. f. Anat. u. Physiol. Anat. Abtheil.*, 1902:

cedimiento, localizada en todas las células que no fijaron los ioduros y bromuros alcalinos.

Este precipitado rojo se forma principalmente á expensas del nitrato y no por reducción de cloruros y albuminatos argénticos; persuadiéndolo el hecho de que si, como en el método de Simarro, se elimina del todo ó casi del todo dicho nitrato libre, dejando no más los cloruros y albuminatos argénticos, la reacción roja, que es justamente la reveladora de las neurofibrillas de todas las neuronas, disminuye mucho en intensidad ó falta por completo.

Pero el beneficio de enriquecer las revelaciones del método con la impregnacion negra suprainensiva de algunas células, no compensa los inconvenientes del envenenamiento

previo, ni el representado por las lesiones tróficas provocadas en las neuronas por la absorción de substancias tóxicas. Por estos motivos, nosotros, en vez de usar el método de Simarro modificado, nos valemos hoy casi exclusivamente del nuestro, pues sobre su capacidad para teñirlo todo, posee la ventaja valiosísima de la constancia y sencillez. Sin embargo, cuando se trate solamente de demostrar las neurofibrillas de las células de la médula espinal (tipos funiculares grandes ó pequeños) con gran vigor y contraste de colorido, el método de Simarro, aun sin la modificación antedicha, es irremplazable y muy merecedor de que se le estudie y se le practique concienzudamente.

Madrid, Septiembre de 1903.

#### Nouvelle méthode pour démontrer les fibrilles intérieures du protoplasma nerveux.

Ramón y Cajal nous apporte, avec sa communication ci-dessus, une contribution technique de premier ordre pour l'étude de la structure fibrillaire de la cellule nerveuse.

La méthode de Bethe est fort inconstant. Cajal dit, á fin qu'on puisse juger de cette variabilité dans les résultats, que sur treize fois, il a obtenu un seul bon resultat complet, et deux fois des préparations á peine acceptables. D'autres observateurs comptent des succès encore plus nombreux.

La méthode de Simarro présent surtout l'inconvénient de colorer d'une façon imparfaite les grandes cellules motrices, ayant une prédilection sélective pour les cellules petites et moyennes de la moëlle (cellules commissurales et funiculaires); et encore, elle ne donne pas des résultats positifs, appliquée á l'encéphale, et aux ganglions; ce qu'on peut dire aussi pour la méthode de Bethe. Malgré ça, la méthode de Simarro reste très utile dans certains cas; et il y a lieu d'y apporter quelques modifications avantageuses, en simplifiant le mécanisme de réduction de l'argent, et en supprimant l'une des causes d'insuccés, c'est á dire l'inclusion en celloidine avant de révéler et de fixer.

Il y a encore la méthode de Donaggio, dont furent présentées des bonnes préparations au dernier Congrès internationale de Madrid; mais son procédé technique n'a pas été publié jusqu'á présent.

La recherche d'une méthode simple et constante s'imposait, surtout en vue de la nécessité d'application á l'homme. Il fallait pourtant éliminer aussi l'opération préliminaire de l'empoisonnement, indispensable dans la méthode de Simarro.

A la suite d'un long étude comparatif et critique du mécanisme d'action de plusieurs reducteurs, Cajal a été conduit á proposer la technique suivante:

1.º) Petits morceaux de tissu nerveux ( $\frac{1}{2}$  cent.) sont submergés dans une solution 3 % de nitrat d'argent.

#### Nuovo metodo di impregnazione delle fibrille intrinseche del protoplasma nervoso.

Ramón y Cajal reca, con questa importantissima nota, un contributo tecnico di grande valore allo studio della struttura fibrillare delle cellule nervose.

Dei metodi di colorazione sino ad oggi proposti per questo fine, quello di Bethe ha il difetto della incostanza. Cajal riferisce, perché si giudichi di tale variabilità dei risultati, che su tredici tentativi ha ottenuto un solo risultato completo e due appena passabili. Altri osservatori sono stati anche meno fortunati. Il metodo di Simarro ha soprattutto l'inconveniente di colorare in modo molto imperfetto le grandi cellule motrici, dimostrando predilezione singolare per le piccole e medie cellule del midollo (cellule commissurali e funiculari); inoltre non dà risultati positivi applicato al cervello, al cervelletto ed ai gangli, come accade in parte anche per il metodo di Bethe. Malgrado ciò, il metodo di Simarro rimane utilissimo in molti casi, e in ispecie apportando alcune modificazioni al meccanismo della riduzione argéntica, e sopprimendo una delle cause di insuccesso, che è la inclusione in celloidina prima della rivelazione e fissazione.

Resta il metodo di Donaggio, di cui furono presentati assai buoni preparati al Congresso di Medicina di Madrid, ma di cui non è ancora stata pubblicata la tecnica.

Stando così le cose, era importante trovare un metodo semplice, breve e costante e che potesse adattarsi ugualmente all'uomo e agli animali, senza l'uso di sostanze alteranti quali si adoperano nel metodo di Bethe, e d'altra parte senza la operazione preliminare molto noiosa (e impossibile nell'uomo), dell'avvelenamento indispensabile nel metodo di Simarro.

In seguito ad un lungo esame comparativo del meccanismo d'azione di differenti sostanze riduttrici, Cajal è stato condotto a seguire la tecnica seguente, che propone come utilissima per la rivelazione delle neurofibrille:

(Le liquide doit être abondant, ou bien il faut le renouveler). On laisse dans le bain au moins quatre jours (une semaine, et jusqu' à un mois et demi). Si l'on désire abrégé, on port à l'étuve (30°-35°).

2.° Immersion de ces morceaux, pendant 12-24 heures, dans la solution suivante:

Acide pyrogallique.....	1 gr.
Formol.....	15 cent. cub.
Eau distillée.....	100 —

Le formol n'est pas indispensable. En substitution de l'acide pyrogallique on peut user un réducteur quelconque: Hydroquinone, Amidol, etc.; toujours sans addiction d'alcali.

3.° Lavage à l'eau, pendant quelques seconds; enfin alcool, celloidine ou parafine; sections microtomiques (de 5  $\mu$  à 15  $\mu$ ); montage en baume ou en Damar.

L'impregnation ne réussit pas de la même façon dans toutes les parties de chaque morceau. Les couches superficielles sont en excès, avec une coloration noire des cellules, qui empêche toute examen histologique: toutefois on peut encore les utiliser, en les faisant passer par des solutions de Ferricyanure de potassium (et alcool), et d'Hyposulfite de soude. Les couches profondes, au contraire, présentent une nuance jaune peu accentuée, trop claire.

Mais dans les cellules des couches intermédiaires les neurofibrilles sont évidentes, et se présentent avec une coloration noire, ou rouge chocolat, ou café, sur le fond jaune pâle du protoplasma et du noyau; ce qui permet de les suivre sur des longs trajets.

Ces préparations démontrent avec toute évidence, contre l'opinion de Bethe et de Meyer, que les ramifications nerveuses péricellulaires ne vont pas se résoudre dans le réseau de Golgi; mais au contraire elles constituent un plexus ou *nid terminal*, à terminations libres et variqueuses; de façon qu'il n'est plus possible l'erreur des deux auteurs cités, entre le réseau de Golgi et ces plexus nerveux, trouvés par Cajal.

D'autres faits très intéressants, sont mis en lumière par la nouvelle méthode, soit dans les dispositions intimes du protoplasma cellulaire, soit dans les rapports entre les cellules nerveuses et les terminations pericellulaires.

Pour le moment, il importe seulement faire relever que dans les cellules plus fortement colorées on distingue deux espèces de neurofibrilles; c'est à dire des filaments *primaires*, gros, qui semblent se continuer d'un dendrite à l'autre; et de filaments *secondaires*, pâles, fins, granuleux, qui semblent s'anastomoser avec les premiers et déterminer un réseau intraprotoplasmique. Certains dendrites contiennent aussi des énormes filaments, qui courent jusqu' au noyau, pour s'y diviser et former une armature *perinucléaire*, sur la quelle toute interprétation serait prématurée.

L'application de la nouvelle méthode à l'étude cytologique du système nerveux de l'homme promet des résultats fort intéressants.

1.° Piccoli pezzi di sostanza nervosa, ( $\frac{1}{3}$  cent.) si sommergono in soluz. nitrato d'argento 3%. (Il liquido deve essere abbondante, perché non si esaurisca troppo rapidamente). Si lasciano nel bagno al meno quattro giorni o una settimana, o più (sino a un mese e mezzo). Desiderando abbreviare, si ricorra alla stufa (30° o 35°).

2.° Immersione dei pezzi per 12 o 24 ore in questa soluzione:

Acido pirogallico.....	1 gr.
Formol.....	15 cent. cub.
Acqua distil.....	100 —

In luogo dell'acido pirogallico può adoperarsi qualunque altro riduttore, come l'idrochinone, l'amidol, eccetera, sempre senza aggiungere sostanze alcaline.

3.° Lavaggio in acqua per alcuni secondi; indi alcool, celloidina o paraffina; sezioni al microtomo (fine, da 5  $\mu$  a 15  $\mu$ ) che si monteranno, senza ulteriore colorazione, in balsamo o in damar.

La impregnazione non riesce ugualmente in tutto lo spessore del pezzo. Gli strati superficiali sono in eccesso d'impregnazione, con un color nero delle cellule, che impedisce l'esame istologico. Gli strati molto profondi, d'altra parte, presentano una tinta giallognola, troppo chiara. Ma nella regione intermedia, che è quella veramente utile, le neurofibrille si fanno evidenti, con un tono nero, o d'un rosso cioccolatte o caffè, distaccando nitidamente sul fondo giallognolo del protoplasma e del nucleo, rimasti quasi incolori; così che si possono seguire per lungo tratto nel loro percorso.

Questi preparati dimostrano perentoriamente, contro l'opinione di Bethe e di Meyer, che le ramificazioni nervose pericellulari non si risolvono nella rete fina e liscia di Golgi, ma invece formano un plesso o *nido terminalo*, a capi liberi e varicosi; di guisa che non è possibile la confusione commessa da cotesti autori fra la rete di Golgi e i nidi nervosi suddetti, trovati da Cajal. Infatti il nuovo metodo, or ora descritto, non colora giammai cotesta rete pericellulare.

Altri fatti, molto interessanti, rivela il nuovo metodo nella intima struttura cellulare, e nei rapporti fra le cellule e le terminazioni nervose pericellulari. Di essi l'A. si occuperà più largamente in un prossimo lavoro.

Qui importa solo aggiungere che la rete del Donaggio si mette in rilievo, come prodotto di anastomosi delle neurofibrille, nel protoplasma delle cellule di media grandezza del midollo. D'altra parte, appaiono nelle cellule fortemente colorate, due specie di neurofibrille; cioè: filamenti *primari* o *grossi*, che sembrano continuarsi da un dendrite all'altro; e filamenti *secondari*, pallidi, granulosi, assai fini, che allacciano probabilmente i filamenti primari. Alcuni dendriti presentano poi certi *filamenti colossali*, che corrono lungo il loro asse, sino al nucleo, e qui si scompaiono in un gruppo di fili sottili, che costituiscono una specie di armatura perinucléare. Ogni interpretazione sarebbe in questo momento prematura.

L'applicazione di questo metodo allo studio citologico del sistema nervoso dell'uomo darà risultati molto importanti.