

REVISTA

DE LA

REAL ACADEMIA DE CIENCIAS

EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

DE

MADRID

TOMO I.

MADRID

IMPRENTA DE L. AGUADO

CALLE DE FORTIJO, N.º 8.

1904.

5 (05)
2197
R 3

II.—Un método de coloración de los cilindros-ejes de las células nerviosas.

POR S. RAMÓN CAJAL.

Hasta hoy, el estudio de la marcha y conexiones de las fibras nerviosas del eje cerebro-raquídeo de los vertebrados adultos, se ha efectuado casi exclusivamente con el método de Weigert-Pal, que, según es bien sabido, impregna solamente el forro medular ó grasiento de los tubos nerviosos. Semejante proceder, al que se deben revelaciones muy valiosas, tiene una grave desventaja: la de no colorear la porción originaria y terminal de los tubos nerviosos ni los parajes correspondientes á las estrangulaciones y divisiones de las fibras, por la razón obvia de que, al nivel de estas partes, falta la vaina aisladora de mielina. Por consecuencia de esta deficiencia analítica, los preparados teñidos con la laca hematoxilínica no exhiben el menor rastro de ramificación nerviosa, ni permiten determinar con seguridad si tal ó cual tubo, penetrante en la substancia gris, tiene en ella su origen ó su terminación. Para compensar las citadas limitaciones se han imaginado otros procederes de teñido, entre los cuales mencionaremos el de Golgi y el de Ehrlich, los cuales son ya capaces, dentro de ciertas condiciones, de dar imágenes precisas del origen y terminación de las fibras nerviosas. Realmente, para el esclarecimiento de ciertas disposiciones particulares de la substancia gris, semejantes coloraciones son irremplazables, y á ellas se deben descubrimientos de gran transcendencia anatómica y fisiológica; pero dificultades técnicas, con frecuencia insuperables, nos obligan á prescindir á menudo de su empleo. Sabido es que el método de Golgi no da resultados algo constantes más que en los embriones y animales de pocos días; y en cuanto al de Ehrlich, es incapaz de impregnar otra cosa que la superficie de las piezas bañada por el aire.

No han faltado ciertamente laudables tentativas para crear procedimientos tintóreos específicos de los cilindros-ejes del sistema nervioso adulto. Apenas hay substancia de acción histológica selectiva que no haya sido utilizada con tal objeto: el carmín, la hematoxilina, las anilinas ácidas, el nitrato de plata, el cloruro de oro, etc., han dado, en manos de técnicos hábiles é ingeniosos, resultados de no escaso valor. Pero, innegablemente, las mejores preparaciones se han conseguido con el nitrato de plata precipitado por los reductores ó la acción de la luz. Fórmulas bastante aceptables, basadas sobre la afinidad que las sales de plata y de oro poseen por los cilindros ejes, en presencia de los reductores, hemos publicado nosotros en diversas épocas (1). También Fajersztajn (2) y Bielschowsky (3) han aconsejado proceder más ó menos parecidos utilizando el nitrato de plata alcalino y la propiedad precipitante del formol, sobre todo adicionado de una sal básica.

Mas fuerza es confesar que estos métodos de impregnación de los axones son engorrosos é inconstantes, y no permiten, sino en raras ocasiones, conseguir series regulares de cortes de los centros nerviosos del hombre y mamíferos adultos. El más grave inconveniente de que adolecen consiste en que la coloración, á la manera del método de Weigert, prende exclusivamente en las porciones meduladas de los axones, repugnando las estrangulaciones y divisiones de las fibras, con lo que las revelaciones conseguidas no van más allá de las logradas con el susodicho proceder de la laca hematoxilínica.

Tan notorias y lamentables deficiencias técnicas nos han movido en estos últimos meses á imaginar nuevas maneras de impregnar las fibras nerviosas con las sales de plata, habiendo logrado resultados que, en nuestro sentir, superan tanto bajo el aspecto de la constancia, cuanto en lo referente á capacidad

(1) *S. R. Cajal*: Pequeñas comunicaciones técnicas. *Rev. trim. microgr.* Tomo V, 1900.

(2) *Fajersztajn*: Ein neues Silberimprägnationsverfahren als Mittel zur Färbung der Axen cylinder. *Neurol. Centralbl.* Febrero, 1901.

(3) *Bielschowsky*: *Neurologischen Centralblatt*, 1902.

analítica, á todos los procederes propuestos hasta aquí para la coloración de los cilindros-ejes.

El nuevo método, simple modificación de otro recientemente aconsejado por nosotros para la impregnación argéntica de las neurofibrillas, se separa de los demás procederes de argentación por estas tres particularidades: *a*, fijación previa de las piezas en alcohol absoluto (ó de 40°), con ó sin adición de amoníaco; *b*, empleo de solución de nitrato de plata caliente y perfectamente neutro; *c*, reducción de las piezas en bloque, por 24 horas, en un baño neutro ó débilmente alcalino de hidroquinona. Según que el alcohol actúe más ó menos tiempo, la plata metálica, reducida á un polvo rojo completamente invisible al microscopio, se deposita selectivamente en los cilindros-ejes y neuronas grandes, respetando por completo la mielina, la neuroglia y casi todas las células nerviosas medianas y pequeñas de la substancia gris. Las partes impregnadas, cuyo matiz va del negro al café rojo, y aun al rojo puro, destacan admirablemente sobre fondo incoloro, siendo de notar que la selección no es eventual ni recae exclusivamente en algunos elementos, cual acontece en los procederes de Golgi y Ehrlich, sino que alcanza á todos los axones sin excepción, así como á sus estrangulaciones, bifurcaciones, colaterales y á su porción inicial ó punto de nacimiento en las neuronas. Con todo eso, la impregnación más intensa y selectiva recae en los axones medulados, cuyo curso cabe seguir á través de la substancia gris con la mayor comodidad.

He aquí el *modus operandi*:

1.º Piezas nerviosas frescas (la reacción se obtiene hasta dos días después de la muerte), que no pasen de tres milímetros de espesor, son fijadas, por 24 horas, en alcohol de 40° (Cartier). Una mezcla de alcohol y glicerina neutra da también buenos resultados como baño fijador.

2.º Llévanse después á un baño de nitrato de plata al 1 por 100 conservado en estufa (de 30° á 35°), donde permanece

(1) *S. Ramón Cajal*. *Trab. del Lab. de Inv. biol.* Tomo II, fascículo 4.—1903.

cerán de 5 á 6 días, según la dimensión de los trozos nerviosos (1). Es preciso que la sal argéntica haya tenido tiempo de penetrar en el centro del tejido; de lo contrario, las regiones centrales carecerían de reacción ó mostrarían una impregnación muy pálida. Una permanencia insuficiente en el baño argéntico se reconoce fácilmente por lo granuloso y basto de la impregnación.

3.º Previo lavado, por algunos segundos, en agua destilada, se abandonan las piezas, por un día, en este baño reductor:

Hidroquinona (ó ácido pirogálico). de 1 á 2 gramos.	
Agua destilada.....	100 "
Formol.....	10 "

Algunas veces añadimos al baño un poco de sulfito de sosa anhidro, con lo que las piezas muestran una impregnación algo más fina; pero esta adición no es necesaria, y tiene el inconveniente de ensuciar el reductor, que adquiere, por oxidación, un tono pardo obscuro. En realidad, bastan las sales alcalinas del tejido nervioso para fijar el ácido clorhídrico nacido por consecuencia de la reducción.

4.º Lavado rápido en agua, induración en alcohol, englobamiento en celoidina ó parafina, y ejecución de cortes finos (de 1,50 á 3 centésimas), que se montarán en damar sin ulterior coloración. Evítese la esencia de bergamota, porque ataca algo la impregnación; el mejor aclarador es la esencia de orégano, que se quitará con xilol.

Si algunos cortes (de ordinario los tomados del centro de las piezas) exhibieran una coloración roja demasiado pálida, no vacilaremos en virar la tinta con este baño de oro:

Sulfocianuro de amonio.....	3
Hiposulfito de sosa.....	3
Solución de cloruro de oro, unas gotas.	

(1) Por lo común nos servimos del nitrato de plata cristalizado del comercio y químicamente puro. No obstante, cabe emplear también con éxito el nitrato de plata fundido, de reacción neutra ó débilmente alcalina.

A los pocos minutos, el tono rojo se habrá transformado en gris negro; ocurrido esto, lávanse las secciones en agua destilada y se deshidratan, aclaran y montan como de ordinario (1).

Cuando la fijación previa en alcohol se ha prolongado más de 24 horas (por ejemplo, tres ó más días), las células y cilindros-ejes gruesos palidecen, adquiriendo un matiz amarillento sumamente pálido; mientras que, por el contrario, las delgadas fibras ameduladas, poco ó nada teñidas cuando dicho fijador actúa poco tiempo, ofrecen un tono negro ó café energético. En las preparaciones así obtenidas obsérvanse muy claramente las arborizaciones nerviosas pericelulares y los cabos ensanchados en forma de maza ó pirámide de las fibrillas terminales.

En fin, la adición al alcohol de 1 por 100 de amoníaco procura excelentes imágenes, aunque algo pálidas, de las neurofibrillas de las voluminosas neuronas, así como una impregnación muy completa de las fibrillas desprovistas de mielina. Las piezas fijadas en alcohol amoniacoal deberán permanecer en el baño de plata al 1 ó 1,50 por 100 de seis á siete días si la temperatura de la estufa no pasa de 32º. La impregnación granulosa y basta de las neurofibrillas anuncia también una demasiado corta permanencia en el baño argéntico caliente.

No es nuestro ánimo describir aquí detalladamente los efectos logrados con estas y otras variantes del método del nitrato de plata reducido. Concretarémonos tan sólo á apuntar las revelaciones del proceder al alcohol (fijación de las piezas en este líquido desde uno á tres días), por ser el más sencillo, consi-

(1) Para virar puede usarse también sin inconveniente una simple solución de cloruro de oro moreno ó amarillo, que actuará muy rápidamente; las piezas se llevarán después al hiposulfito. Si se quisiera aumentar todavía la intensidad del teñido, no hay sino llevar los cortes, recién sacados del cloruro de oro (sin hiposulfito), á un baño reductor fotográfico. Al depósito metálico áureo se añadiría la reducción de cierta cantidad de cloruro de plata que el cloruro de oro ácido produce constantemente en presencia de la plata precipitada y muy dividida. Pero este proceder, así como las intensificaciones logradas por los reactivos comunes (sublimado y amoníaco, bromuro de cobre y nitrato de plata, etc.), dan demasiada obscuridad á los fondos.

tante y cómodo de los procedimientos recomendados para la impregnación argéntica de los cilindros-ejes. Su constancia y expedición son tales, que se obtienen buenos resultados, no sólo en órganos frescos del hombre y vertebrados, sino hasta en centros nerviosos procedentes de cadáveres en que se inició la descomposición (dos á tres días), ó de animales que sufrieron graves lesiones de la substancia gris y blanca. Por tales ventajas, este proceder está llamado á dar resultados interesantes en las degeneraciones secundarias de las vías nerviosas, en las cuales, á diferencia del método de Marchi, que revela exclusivamente la mielina desintegrada, pone de manifiesto las alteraciones varicosas de los axones (1) y las mutaciones ocurridas en las fibrillas ameduladas y arborizaciones terminales.

Para dar alguna idea de las revelaciones del susodicho método en las piezas normales, vamos á reseñar brevemente las conseguidas en la médula espinal, cerebelo y ganglios raquídeos.

Médula espinal. Los cortes, moderadamente finos, de este centro muestran con toda claridad, coloreados en negro ó café intenso, todos los cilindros-ejes medulados, y en tono café ó rojo mucho más claro, las prolongaciones dendríticas de las neuronas y las fibras ameduladas. Las células mismas exhiben también una coloración parda en la cual se divisan, con espec-

(1) A fin de estudiar las alteraciones de los cilindros-ejes consecutivas á la sección de una vía nerviosa, hemos cortado el nervio óptico y algunas raíces posteriores en varios conejos. El resultado ha sido comprobar un aspecto moniliforme, como arrosariado de los axones, que se inicia desde los 8 ó 10 días y alcanza todo su apogeo á los 24 ó 25. Las vías nerviosas degeneradas se reconocen bien gracias al citado aspecto granuloso, y por presentar el axón, de distancia en distancia, adelgazamientos notables y flexuosidades que parecen corresponder á los parajes en donde los preparados de Marchi exhiben los depósitos de grasa libre. La lesión se acentúa más en las porciones de los axones próximas á la herida, tardando mucho en generalizarse á las ramas terminales ó colaterales meduladas. En otro trabajo volveremos á tratar de dichas experiencias, que no damos todavía por terminadas, ni están, por tanto, maduras para su publicación *in extenso*.

to granuloso, las neurofibrillas; pero, en tales preparados, la reacción es inferior á la observada en los cortes nitratados sin fijación ó fijados previamente en alcohol alcalino.

Descúbrese muy neta y cómodamente el brote del cilindro-eje del contorno celular ó del curso de una dendrita, comprobándose el hecho, señalado por Bethe y otros autores, de que, al nivel del comienzo del forro medular, el axón afecta una gran estrechez, á cuyo nivel las neurofibrillas se condensan en haz apretadísimo. Pero, mientras en los preparados de Bethe, de Simarro y de Donaggio, la porción estrechada del axón palidece notablemente, como en todas las ulteriores estrangulaciones, en los nuestros la intensidad del colorido consérvase en las partes adelgazadas, pudiendo, con la mayor comodidad, cual ocurre en los preparados de Golgi, perseguirse el trayecto entero del conductor hasta la substancia blanca (células funiculares), ó hasta las raíces anteriores (células motrices). Por lo demás, el adelgazamiento del axón, al nivel de las estrangulaciones, es mucho más notable que en los preparados de Ehrlich-Dogiel, faltando constantemente el espesamiento bicónico y el forro de cemento. Precisamente la ausencia de impregnación de tales partes accesorias de las estrangulaciones explica la exagerada angostura del axón en tales parajes, y acredita en aquéllas una composición química especial, muy diversa de la constitutiva del cilindro-eje. Al llegar el axón á la substancia blanca se bifurca á menudo, sobre todo cuando se trata de fibras comisurales, comprobándose una vez más el hecho, descubierto por nosotros hace tiempo, de que las colaterales y bifurcaciones de los tubos centrales se generan constantemente al nivel de las estrangulaciones de la mielina. Es muy frecuente ver también que una de las ramas divisorias de los tubos comisurales es mucho más delgada que la otra.

En los animales adultos, la extensión considerable de los itinerarios, y las revueltas de éstos, hacen en ocasiones difícil y penosa la persecución de un axón, habiendo necesidad en consecuencia, si se desea determinar enteramente el itinerario, de estudiar comparativamente varios cortes seriados. En cambio, los animales recién nacidos (perro, gato, conejo, etc.), mués-

transe a este respecto mucho más propicios, gracias á la cordedad de las distancias y á la relativa sencillez del curso de los tubos medulados. Y como nuestro método da en la médula joven los mejores resultados, aconsejamos á todo el que pretenda esclarecer, apelando á los recursos anatómicos directos, la marcha general de los axones por la substancia gris el empleo exclusivo de los mamíferos recién nacidos ó fetos de término. En estos animales, además, la gran transparencia de la substancia gris permite estudiar cómodamente cortes espesos hasta de 4 y 5 centésimas de milímetro.

Ocioso es consignar que se colorean también las bifurcaciones de las raíces sensitivas, pudiéndose comprobar en lo substancial las disposiciones hace tiempo descubiertas por nosotros (1) y confirmadas por von Lenhossék, van Gehuchten, Kölliker, Retzius y tantos otros sabios. A menudo, al nivel de dichas divisiones, el axón se ensancha, constituyendo una especie de triángulo, de cuyas esquinas proceden las ramas ascendente y descendente. Alguna vez fórmanse tres ramas en vez de dos, disposición ya notada por nosotros en la médula del gato cobreada por el azul de metileno (2). En cuanto á las colaterales sensitivas, emergen frecuentemente de una inflexión de los tubos del cordón posterior, y, en ocasiones, de una asa, bastante prolongada y de brazos sumamente próximos.

Si en vez de estudiar preparados fijados 24 horas en alcohol, se examinan los que sufrieron durante tres días la acción de este indurante, las fibras meduladas se muestran pálidas según dejamos dicho, y la reducción argéntica recae de preferencia sobre las fibrillas amielínicas y nidos pericelulares. Compruébase en estos cortes la riqueza enorme de ramificaciones nerviosas terminales residentes entre las células, y la existencia en los nidos nerviosos de dos clases de ramillas: las llegadas, radial ú oblicuamente, de territorios alejados de la célula motriz, y las que, antes de terminar, caminan paralelamente cier-

(1) S. Ramon Cajal: *Anatomischen Anzeiger*, Bd., 1890.

(2) S. R. Cajal: El azul de metileno en los centros nerviosos, *Rev. trim. microgr.*, tomo 1, 1896.

to trecho á lo largo del soma ó las dendritas. Las mazas terminales de Auerbach resaltan por su color negro ó café del contorno celular apenas teñido, y afectan por lo común menor dimensión que en las impregnaciones argénticas sin fijación alcohólica previa. Por lo demás, tales espesamientos finales aparecen sin excepción en todas las neuronas grandes y medianas, faltando exclusivamente en los corpúsculos del vértice y centro del asta posterior, y en aquellos parajes en que el soma hállase en contacto con elementos de neuroglia. Según hicimos notar en nuestro anterior trabajo, existen mazas ó varicosidades de trayecto y mazas de terminación. Las primeras representan excrecencias ó dilataciones de una fibrilla nerviosa, mediante las cuales toca ésta en el cuerpo neuronal, sin perjuicio de pasar á otros territorios de la misma célula, y aun á neuronas más apartadas. No es raro ver que la excrecencia colateral articular corresponde al vértice de una inflexión ó ángulo trazado por una fibra que se aparta bruscamente para marchar hacia otras neuronas. En fin, hagamos notar que, además de las fibrillas terminadas por mazas, obsérvanse otras hebras pericelulares casi lisas que se limitan á recubrir la célula y serpentear por sus expansiones.

Por lo que toca al protoplasma, preséntase pálidamente teñido, indicándose solamente las neurofibrillas. También el nucléolo aparece impregnado, mostrándose formado por un grupo de esférulas que no suelen adquirir en estos preparados la intensidad de coloración tomada por los cuerpos nucleares accesorios, muy finos y numerosos en los corpúsculos adultos.

Cerebela. Tíñense de color negro ó café todas las fibras meduladas y no pocas ameduladas, tales como las fibrillas paralelas de la capa molecular y las *cestas* de las células de Purkinjè. Estos plexos ó cestas pericelulares se impregnan constantemente en café ó pardo negro, así como los axones de que se originan, sorprendiéndose perfectamente la terminación inferior de las ramificaciones nerviosas, las cuales acompañan cierto trecho, según reconocimos hace tiempo, á la porción inicial de los axones de Purkinjè. Las descripciones publicadas en reciente trabajo, acerca de estas y otras disposiciones del

cerebelo, nos dispensan de entrar aquí en pormenores descriptivos.

Ganglios raquídeos. Las imágenes logradas en estos centros con nuestro método son en un todo comparables con las del proceder de Ehrlich, al cual lleva la ventaja de suministrar impregnaciones constantes y permitir la ejecución de cortes finos y regulares. A la fijación en alcohol puro es todavía preferible la del alcohol amoniacoal, con la que se consiguen además excelentes impregnaciones del retículo protoplásmico. Bajo el aspecto de la claridad de las imágenes y de la facilidad de persecución de las expansiones de los corpúsculos monopolares, son de recomendar los animales jóvenes ó recién nacidos; en los adultos es muy raro, dado lo laberíntico y largo de los itinerarios, que pueda perseguirse la prolongación citada desde su origen hasta su bifurcación.

Cuando los cortes están convenientemente orientados y los ganglios no son muy voluminosos, cabe observar muy bien: el punto de arranque de la expansión principal; el glomérulo inicial, que se colorea tan intensamente como la porción medulada del axón; y todo el itinerario de la expansión hasta la división en *T*, en la cual se comprueba una vez más que la rama destinada á la médula espinal es más fina que la dirigida á la periferia. Obsérvase también, contra el dictamen de Dogiel, que el glomérulo carece de mielina y yace en gran parte rodeado por numerosas células capsulares, á las cuales se debe que las revueltas no se toquen y se eviten comunicaciones laterales de corrientes. En algunos casos se ven llegar á los glomérulos y circular entre sus revueltas aquellas fibras simpáticas aferentes finas, descritas primeramente por nosotros, y confirmadas recientemente por Retzius.