

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
Departamento de Histología y Embriología General



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la lesión traumática en el sistema nervioso central**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Angel López Carbonell**

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
Facultad de Medicina  
Departamento de Histología y Embriología General

TP  
1988  
009



x-53-117469-6

**ESTUDIO DE LA LESION TRAUMATICA EN EL  
SISTEMA NERVIOSO CENTRAL**



Angel López Carbonell  
Madrid, 1986

**Colección Tesis Doctorales: N.º 9/88**

© **Angel López Carbonell**

**Edita e imprime la Editorial de la Universidad  
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía  
Noviciado, 3. 28015 Madrid  
Madrid, 1988  
Ricoh 3700  
Depósito Legal: M-1605-1988**

**A mis padres.**



### AGRADECIMIENTOS

- Al Prof. Dr. D. Jesús Boya Vegue, Director de esta Tesis, verdadero motor e impulsor de la misma, sin cuya ayuda y contagioso entusiasmo difícilmente habríamos podido acometer nuestra empresa.
- Al Prof. Dr. D. Jose Luis Calvo Martin, por todo lo que me ha ayudado y enseñado durante los años que hemos trabajado juntos.
- Al Dr. D. Enrique García-Mauriño Múzquiz, por la gran ayuda prestada en la realización del material iconográfico, sacrificando muchas horas de su tiempo.
- A la Profa. Dra. D<sup>a</sup>. Juliana Fariña González y al Dr. D. Vicente Furió Bacete, por las grandes atenciones que han tenido para conmigo y por sus consejos, de singular utilidad práctica.
- A D<sup>a</sup>. Clara Arnaiz y D<sup>a</sup>. Dolores Sanchez, por la eficaz ayuda técnica prestada.
- A D<sup>a</sup>. Marisol Campos, por su impecable labor de mecanografía del texto.

- Por último, a todos aquellos amigos y compañeros de trabajo que en algún momento me han ayudado, aconsejado o dado ánimos. Citarlos a todos sería empresa difícil, la lista quizás demasiado larga, e inevitable la omisión involuntaria de algún nombre.

A todos ellos, mi más sincero agradecimiento.

I N D I C E

	Página:
- INTRODUCCION . . . . .	1
- MATERIAL Y METODOS . . . . .	15
- RESULTADOS . . . . .	32
- DISCUSION . . . . .	69
- CONCLUSIONES . . . . .	93
- BIBLIOGRAFIA . . . . .	99



I N T R O D U C C I O N

El estudio de la herida cerebral experimental desde un punto de vista general, considerando todos aquellos elementos que van a intervenir en la cicatrización de la misma, ha sido un problema relativamente poco abordado. La mayor parte de los trabajos que se han ocupado globalmente de esta cuestión datan de la década de los veinte, pudiendo por lo tanto enfocar el estudio empleando únicamente microscopía óptica. No obstante, posteriormente se ha realizado un mayor número de estudios que se han ocupado exclusivamente de detalles muy particulares de la evolución de las heridas cerebrales, dejando prácticamente de lado aspectos de notable importancia.

El primer trabajo sistemático que hace referencia al tema de nuestra Tesis Doctoral corresponde a Wilson (1926), quien realizó un estudio en dos cerebros humanos de pacientes afectados de parálisis general, los cuales recibieron, con el fin de introducir ciertas sustancias en el sistema ventricular, punciones cerebrales con una aguja estéril. El autor cita el hallazgo de macrófagos y de unas células de glia con núcleos grandes y abundante citoplasma, encontrando además en las lesiones de mayor tiempo de evolución participación de un tejido conjuntivo en la reparación tisular.

Mucha más trascendencia científica y difusión adquirió el trabajo ya clásico de Río-Hortega y Penfield (1927), quienes efectúan punciones cerebrales en conejos y perros, empleando para el estudio histológico de las lesiones técnicas de impregnación metálica para microglia y astrogliá. Los autores comprueban la transformación de las células microgliales

hacia elementos ameboides y macrofágicos ( " corpúsculos granulares compuestos"), mientras que los astrocitos sufrirían una serie de modificaciones morfológicas: hinchamiento de soma y prolongaciones y fragmentación de estas últimas ("clasmatodendrosis"), división celular ( pero únicamente por amitosis), evolución hacia el tipo fibroso, y contracción de la cicatriz glial si media un tiempo de evolución suficiente.

En una línea de investigación complementaria a la emprendida con Río-Hortega, Penfield (1927) sostiene que el grado de adhesión meningo-cerebral producido es tanto mayor cuanto más cantidad de tejido cerebral lesionado permanece en el foco de lesión.

Tras el advenimiento del microscopio electrónico destaca el estudio ultraestructural de Schultz y Pease (1959), quienes estudian la formación de la cicatriz tras efectuar punciones cerebrales asépticas en ratas. Observan que las células microgliales se tornan redondeadas y se transforman en macrófagos, si bien afirman que sólo por datos ultraestructurales es imposible saber si un determinado macrófago espumoso es de origen microglial o hematógeno. En lesiones antiguas les es imposible identificar certeramente las células gliales, ya que encuentran un amplio espectro de tipos celulares intermedios entre células de citoplasma claro y núcleo pálido (presumiblemente astrocitarias) y células más pequeñas con citoplasma más denso y núcleo más oscuro (oligodendrogliales). Conforme la lesión se hace antigua, los astrocitos acaban formando una barrera completa entre el córtex cerebral por un lado y las células leptó-

meníngicas ( que han proliferado formando un núcleo en el centro de la lesión) por otro, existiendo una membrana basal entre la barrera astrocítica y la zona leptomeníngica.

Podemos considerar tres elementos que van a jugar un importante papel en la evolución de las heridas cerebrales: macrófagos, astrocitos, y vasos sanguíneos. Pasaremos a exponer aspectos relativos a cada uno de ellos.

#### MACROFAGOS:

Son el primer elemento en reaccionar al daño efectuado, y se encargan de la eliminación de todos los detritus necróticos que hayan podido producirse. La naturaleza de las células fagocitarias que aparecen en los focos de lesión de los centros nerviosos ha sido y es un tema ampliamente discutido, debido a que ni la morfología ni la ultraestructura nos permiten conocer si un determinado macrófago es de origen microglial o hematógeno. Precisamente, es acerca de la posible dualidad de dicho origen sobre lo que se ha realizado un mayor número de estudios, con resultados e interpretaciones harto discordantes.

La recopilación bibliográfica más completa sobre la microglia la efectuó Río-Hortega (1932), quien aportó una completa revisión de la estructura, naturaleza y conducta de este tipo celular. Para el autor, estas células representarían los componentes del sistema retículo-endotelial ( hoy denominado mononuclear-fagocítico) en el sistema nervioso central, y estarían probablemente implicadas en la eliminación de sustancias resultantes del metabolismo o de la destrucción neuronal.

Hoy día, la mayor parte de los autores tienden a estar de acuerdo en que las células microgliales en reposo representan una población celular uniforme, identificable mediante el microscopio óptico. Después de una demostración selectiva con el carbonato de plata de Río-Hortega (1919 a), las células de microglia en reposo pueden reconocerse, en el tejido cerebral indemne, como unos elementos pequeños con un cuerpo celular fusiforme o estrellado, del que parten dos o más prolongaciones citoplásmicas que a su vez se dividen en ángulos cercanos al recto, dando lugar a ramificaciones secundarias y terciarias. Existen formas monopolares, bipolares y multipolares (las más frecuentes), y en cuanto a la relación espacial con otros elementos del tejido, Río-Hortega (1932) las divide en satélites neuronales, vasculares y gliales.

Ultraestructuralmente, los primeros estudios (Luse, 1956) aportaron puntos de vista bastante contradictorios acerca de la identificación de la microglia. El problema radicaba en que no se mostraban imágenes aceptables de la misma, lo cual era origen de notable confusión. El único estudio con buena iconografía fue el de Blinzinger y Hager (1962). Debido a que la mayor parte de las observaciones estaban pobremente ilustradas, algunos autores dudaban o incluso negaban francamente la existencia de la microglia (Kruger y Maxwell, 1966; Eager y Eager, 1966; Wendell-Smith y cols., 1966; King, 1968; Caley y Maxwell, 1970). Un abrirse camino en esta controvertida cuestión fue logrado por Mori y Leblond (1969), quienes primero adaptaron el método del carbonato de plata para microscopía electrónica de rutina, con lo que clarificaron y caracterizaron la identifica-

ción de la microglia. Este tipo celular puede reconocerse ahora fácilmente con técnicas convencionales de microscopía electrónica (Mori, 1972 a; Barón y Gallego, 1972; Ling y cols., 1973; Boya, 1975; Peters y cols., 1976). Siguiendo a Boya (1975), el núcleo microglial posee la cromatina dispuesta periféricamente, en gruesos acúmulos, existiendo un nucleolo prominente. Ocasionalmente puede aparecer alguna irregularidad o incurvamiento en la membrana nuclear, pero no es un dato característico. Siempre se aprecia una pequeña cantidad de citoplasma alrededor del núcleo, de aspecto denso. El retículo endoplásmico rugoso está poco desarrollado, a menudo apareciendo largas cisternas aisladas. El Golgi es poco llamativo y siempre se sitúa en la vecindad del núcleo. Los lisosomas y los cuerpos osmiófilos deben ser considerados, para Boya (1975), como la característica ultraestructural más importante de este tipo celular, y como algo muy útil para su identificación; sus tamaños y cantidades varían de una célula microglial a otra, pero siempre aparecen cuerpos densos en el soma o en las prolongaciones. El autor encuentra también microtúbulos (pero únicamente en el soma, nunca en las prolongaciones), sin orientación u organización determinada. En raras ocasiones estas células poseen pequeñas gotas de aspecto lipídico, sin aparente relación con los lisosomas.

Los cuerpos densos citoplásmicos de la microglia poseen actividad de fosfatasa ácida (Hildebrand y Skoglund, 1971), pero las reacciones para peroxidasa endógena resultan negativas (Boya y cols., 1979).

Se trata de un tipo celular que se puede encontrar en cualquier lugar del sistema nervioso central, y en cuanto a su frecuencia relativa, oscila entre el 5% y el 19% del total de las células gliales en el animal adulto, según diferentes autores (Ling y Leblond, 1973; Ling; 1976, Sturrock, 1976; Kitamura y cols., 1977; Imamoto y Leblond, 1978).

La histogénesis de la microglia ha sido y es un problema muy debatido. Esquemáticamente, existen cuatro corrientes de opinión en cuanto al origen de este tipo celular:

a) Origen mesodérmico pial: es el concepto clásico de Río-Hortega (1919 a y b), quien sostenía que la microglia se originaba a partir de elementos mesodérmicos de las envolturas meníngeas (piamadre) y la adventicia de los grandes vasos. Investigadores modernos se han adherido a esta opinión (Cammmermeyer, 1970; Kawaguchi, 1978, 1980; Boya y cols., 1979).

b) Origen neuroectodérmico: fue Rydberg (1932) quien primero rechazó la hipótesis de una procedencia mesodérmica, postulando que la microglia se originaba a partir de células neuroectodérmicas cercanas al ventrículo lateral. En la actualidad, la idea de un origen neuroectodérmico para la microglia está sustentada tanto por la escuela japonesa (Fujita y Kitamura, 1976; Fujita, 1980; Fujita y cols., 1981; Kitamura y cols., 1984), como por la escuela alemana (Oehmichen, 1978).

c) Origen pericitario: algunos autores han admitido la transformación de pericitos hacia células microgliales en

el córtex cerebral no lesionado (Mori y Leblond, 1969; Mori, 1972 b; Barón y Gallego, 1972).

d) Origen monocítico: esta teoría es sostenida en la actualidad por numerosos investigadores (Imamoto y Leblond, 1978; Ling, 1978, 1979; Del Cerro y Monjan, 1979; Ling y cols., 1980).

Tanto la capacidad de división como la metamorfosis de microglia hacia macrófagos cerebrales bajo condiciones patológicas o lesiones experimentales, han recibido un amplio apoyo por parte de un gran número de autores (Blinzinger y Kreutzberg, 1968; Bignami y Ralston, 1969; Feigin, 1969; Blakemore, 1969, 1972, 1975; Fernando, 1971; Wong-Riley, 1971; Sjöstrand, 1971; Stenwig, 1972; Paterson y cols., 1973; Berner y cols., 1973; Torvik, 1975; Ling, 1981; Al-Ali y Robinson, 1982 a; Brierley y Brown, 1982 a), los cuales no excluyen la posibilidad de que aparezcan además macrófagos derivados de la sangre, especialmente en casos de herida cerebral. No obstante, existen autores, concentrados en dos escuelas (la alemana y la japonesa), que no admiten que la microglia sea una fuente de macrófagos. La escuela alemana (Oehmichen, 1978, 1980; Oehmichen y cols., 1979, 1980) ha empleado un gran número de diseños experimentales (autorradiografía, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, inyección de células marcadas), admitiendo la existencia de una microglia "en reposo" (que embrionariamente derivaría del neuroectodermo), incapaz de sufrir una activación para convertirse en macrófago. A los macrófagos cerebrales los llaman microglia "progresiva", considerando que son de origen exclusivamente

monocitario. La escuela japonesa (Kitamura, 1973; Fujita y Kitamura, 1975; Kitamura y cols., 1977; Kitamura, 1980; Tsuchihashi y cols., 1981; Fujita y cols., 1981) emplea una metodología similar, con conclusiones superponibles, afirmando además que en las lesiones cerebrales la microglia en reposo sufre un proceso de tumefacción, prolifera, y acaban por convertirse en astrocitos fibrosos.

Además de haberse considerado, como acabamos de ver, a microglia y/o monocitos como fuentes de macrófagos cerebrales, parecen existir, según algunos autores, evidencias de que otros tipos celulares pueden tener capacidades fagocíticas:

A) Pericitos: Maxwell y Kruger (1965 b), Imamoto (1972) y Boya (1976) opinan que los pericitos son capaces de abandonar su situación perivascular y transformarse en macrófagos cerebrales. Sin embargo, para Konigsmark y Sidman (1963), Stenwig (1972) y Kitamura (1980), tales células que se separan de los vasos y se transforman en macrófagos no son pericitos, sino monocitos. Además, otros investigadores no han hallado relación alguna entre fagocitos y pericitos (Dodson, 1973; Adrian y Williams, 1973; Dodson y cols., 1976; Lemkey-Johnston y cols., 1976; Brierley y Brown, 1982 b).

B) Astrocitos: Algunos autores admiten que los astrocitos poseen ciertas capacidades fagocíticas, tanto bajo condiciones fisiológicas (Ronnevi, 1977, 1978) como patológicas (Gontas y cols., 1963; Fernando, 1973; Lemkey-Johnston y cols., 1976; Wender y cols., 1980; Nathaniel y Nathaniel, 1981; Barrett y cols., 1984).

C) Oligodendrocitos: Maxwell y Kruger (1965 a y b) fueron los que hablaron por primera vez de un " oligodendrocito reactivo", con propiedades fagocíticas. Otros autores también admiten esta capacidad (Colonnier, 1964; McMahan, 1967; Cook y Wisniewski, 1973; Gayoso y cols., 1982; Triarhou y cols., 1985). Ludwin (1984) observa que los oligodendrocitos maduros captan timidina tritiada en respuesta a un daño, pero no menciona en absoluto el hallazgo de fagocitosis. Sin embargo, Fernando (1973), Murabe y cols. (1981) y Al-Ali y Robinson (1984) niegan por completo que los oligodendrocitos sean capaces de fagocitar.

D) Otras células: Brierley y Brown (1982 b) sostienen que los fibroblastos de los grandes vasos sanguíneos pueden originar macrófagos en el animal adulto. Al-Ali y Robinson (1982 a ) admiten que células del tejido conectivo-pial pueden fagocitar. También, parece que los neutrófilos son capaces de efectuar neuronofagia en áreas de necrosis hemorrágica (Means y Anderson, 1983).

#### ASTROCITO:

Es el más grande en tamaño de los tres tipos de células neurogliales, y constituyen el 30-65% del total de las mismas (Glees, 1955), estando muy ubicuamente distribuidos, tanto en la sustancia blanca como en la gris. Generalmente, a los astrocitos se les divide en protoplásmicos y fibrosos. Los primeros se hallan de ordinario en la sustancia gris, y se caracterizan por poseer un número de prolongaciones variable pero

abundante, las cuales emergen radialmente. Por el contrario, los fibrosos están localizados sobre todo en la sustancia blanca y en las superficies de cerebro y médula espinal, siendo sus prolongaciones más escasas, más lisas, más largas y más delgadas que las de los astrocitos protoplásmicos. Ambos tipos celulares poseen prolongaciones que se adosan a las paredes capilares ("pies chupadores"). Las prolongaciones astrocitarias de las zonas más periféricas de médula espinal y cerebro constituyen una lámina completa llamada "glia limitans" que separa el compartimento neuronal de las células piales ( Peters y cols., 1976; Nathaniel y Nathaniel, 1981).

Recientemente se ha comprobado que los astrocitos protoplásmicos y fibrosos poseen diferencias tanto antigénicas como en el desarrollo celular (Raff y cols., 1983; Miller y Raff, 1984).

Ultraestructuralmente (Nathaniel y Nathaniel, 1981), el núcleo del astrocito fibroso es ligeramente irregular, mientras que el del protoplásmico es algo más redondeado u oval. En ambos casos el nucleoplasma es homogéneo, con acúmulos de cromatina poco llamativos. El citoplasma es muy claro, y más abundante que el de los oligodendrocitos o microglia. Hay dos datos característicos de este tipo celular: los microfilamentos y el glucógeno. Los primeros son menos numerosos en los protoplásmicos que en los fibrosos, y miden 8-9nm. de grosor, siendo especialmente abundantes en los astrocitos subpiales que constituyen la glia limitans. El glucógeno se visualiza como material particulado electrodensito, de 10-40 nm. de diámetro. Estas

partículas de glucógeno se encuentran en el citoplasma perinuclear y especialmente en los pies chupadores. Otros organoides citoplásmicos son similares a los hallados en otras células, y están por lo general dispersos: pequeños segmentos de retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, polisomas,..; el complejo de Golgi posee lisosomas y gránulos de lipofucsina en su vecindad. Existen mitocondrias de estructura habitual, habiéndose descrito además otras de características inusuales en astrocitos de determinadas regiones del sistema nervioso central (Mugnaini, 1964; Blinzinger y cols., 1965; Morales y Duncan, 1971; Fernández y cols., 1983). Se han observado además "gap junctions" interastrocíticas, especialmente con gran frecuencia entre los pies chupadores perivasculares y entre las prolongaciones subpiales (Reese y Karnovsky, 1967; Brightman y Reese, 1969; Sipe y Moore, 1976).

Está universalmente aceptado que los astrocitos juegan un papel esencial en la reparación del daño al tejido nervioso. El término general empleado para referirse a la reacción astrocitaria es el de "gliosis" o "astrocitosis". Los dos cambios básicos (Duffy, 1983) son: proliferación e hipertrofia. En cuanto a la proliferación astrocitaria, mediante técnicas de impregnación metálica Río-Hortega y Penfield (1927) observaron un aumento del número de astrocitos alrededor de una herida cerebral experimental, pero al no poder encontrar figuras mitóticas dedujeron que los astrocitos proliferaban por división amitótica. Medidas microespectrofotométricas del núcleo de los astrocitos reactivos en el cerebro humano han evidencia-

do que el contenido de DNA se dobla, y que el núcleo posee un tamaño más grande que el del núcleo diploide habitual (Lapham, 1962; Laphman y Johnstone, 1964); sin embargo, en ausencia de figuras mitóticas estos autores también concluyen que estas células sufren un proceso de división amitótica. Pero Cavanagh (1970), en un excelente estudio ( con empleo adicional de autorradiografía) sobre proliferación celular alrededor de una herida cerebral, no encuentra ninguna evidencia de división amitótica en astrocitos, y sí de mitosis habituales de este tipo celular. Más recientemente, Latov y cols. (1979) combinan la tinción de inmunoperoxidasa para la proteína glial ácida fibrilar (PGAF) con marcaje con timidina tritiada y autorradiografía, efectuando herida cerebral en ratones, y observan que algunos de los astrocitos inmunoreactivos del área lesional presentan marcaje autorradiográfico, por lo que concluyen que los astrocitos poseen capacidad de división y que la multiplicación de los mismos puede ser un factor significativo en la producción de una cicatriz en el cerebro lesionado.

La hipertrofia astrocitaria se manifiesta al microscopio óptico por un agrandamiento del cuerpo celular (Duffy, 1983), mientras que las características ultraestructurales aceptadas por la mayoría de los autores como típicas de los astrocitos reactivos son el aumento de la cantidad tanto de microfilamentos (Tani y cols., 1964; Al-Ali y Robinson, 1978; Nathaniel y Nathaniel, 1981) como de glucógeno intracitoplásmico (Hager y cols., 1967; Guth y Watson, 1968; Al-ALI Y Robinson, 1978; Nathaniel y Nathaniel, 1981). A este respecto es interesante

señalar que tanto la gliosis como la acumulación glucogénica son prácticamente inexistentes cuando el daño se efectúa en ratas neonatales (Sumi y Hager, 1968; Berry y cols., 1983; Barret y cols., 1984).

Los astrocitos, además, participan en el edema cerebral (Gonatas y cols., 1963; Schröder y Wechsler, 1965; David y cols., 1967).

#### VASOS CEREBRALES:

En cuanto a la reacción y regeneración que sufren los vasos cerebrales tras la herida, Schultz y Pease (1959) y Blinzinger y cols. (1965) hacen notar la notable resistencia de las membranas basales vasculares, que permanecen prácticamente indemnes cierto tiempo después de efectuada la lesión a pesar de haberse desintegrado los elementos celulares que las formaron. Dichas membranas basales, según Cancilla y cols. (1979) servirían de soporte y guía para la restitución de la integridad del vaso mediante procesos neoformativos vasculares que comenzarían cierto tiempo tras el daño; la cronología de dichos procesos ha sido estudiada por diversos autores, los cuales no han llegado por completo a resultados concordantes (Huntington y Terry, 1966; Yanagihara y cols., 1967; Cavanagh, 1970; Cancilla y cols., 1979; Cancilla y De Bault, 1980).

Parece, asimismo, que los macrófagos jugarían un importante papel en la regeneración vascular (Beck y cols., 1983).

**MATERIAL Y METODOS**

Para nuestro estudio hemos empleado ratas albinas de la raza Wistar, de dos meses de edad, mantenidas en adecuadas condiciones ambientales y nutricionales.

Las lesiones en el parénquima nervioso las hemos realizado según la siguiente metodología:

- 1<sup>º</sup>) Anestesia de los animales mediante inyección intraperitoneal de hidrato de cloral, 0'7 cm<sup>3</sup> de una solución al 10%.
- 2<sup>º</sup>) Incisión longitudinal medial ( 2 cms.) de la piel del cráneo.
- 3<sup>º</sup>) Sección del periostio con visualización de las suturas óseas.
- 4<sup>º</sup>) Perforación (de 1mm. de grosor) de ambos huesos parietales, con un torno dental.
- 5<sup>º</sup>) Punción cerebral bilateral, introduciendo por los orificios practicados una aguja candente de 1mm. de espesor, alcanzando una profundidad de 3-4 milímetros. Mediante este sistema, además de evitar infecciones, se va a provocar una necrosis, con lo que se exagerarán los posibles procesos regenerativos.
- 6<sup>º</sup>) Sutura cutánea.

El despertar de la anestesia acontecía tras 30-45 minutos, y en la conducta del animal destacaba cierta hipoactividad, que revertía a las pocas horas.

Prácticamente en ningún caso han ocurrido infecciones , por lo que no hemos juzgado necesaria la administración profiláctica de antibióticos. La mortalidad ha sido casi inexistente (2%).

Los animales se sacrificaron a los siguientes períodos de tiempo de evolución de la lesión:

- 24 horas; 48 horas; 3,5,7,10,15,20,25,30 y 45 días.
- 2,3,4,5,6,7, 8, 10 y 12 meses.

Para extraer el encéfalo hemos procedido de la siguiente manera:

- 1ª) Ligera anestesia etérea.
- 2ª) Decapitación del animal y eversión de la piel del cráneo.
- 3ª) Eliminación cuidadosa de la calota.
- 4ª) Extracción encefálica, de delante a atrás.
- 5ª) Inmediata inmersión en el correspondiente líquido fijador ( véase más adelante).

No obstante, la mayoría de las piezas para estudio electromicroscópico han sido fijadas por perfusión, según la siguiente metodología:

- 1ª) Anestesia del animal mediante inyección intraperitoneal de hidrato de cloral:  $0.7 \text{ cm}^3$  de una solución al 10%. Además, conjuntamente con el anestésico, se administran  $1 \text{ cm}^3$  de heparina sódica al 1%.

- 2º) Sujeción del animal en una cubeta de disección, colocándolo en decúbito supino.
- 3º) Extensa sección longitudinal medial de la piel, desde el cuello hasta la parte inferior del abdomen, despegándola adecuadamente de los planos musculares por disección roma, en sentido lateral, y rechazando ambos colgajos cutáneos hacia los lados.
- 4º) Apertura longitudinal de la pared abdominal, efectuando una sección transversal horizontal a la altura del reborde costal, a cada lado, rechazando los colgajos musculares.
- 5º) Perforar el diafragma y cortar un trayecto de unos 3 cms. muy cerca de su inserción anterior en la pared torácica. Con ello, los pulmones se colapsan y el animal efectúa acusados movimientos respiratorios. Procediendo con la mayor rapidez, se realizan dos cortes paralelos al esternón, a 1 cm. por fuera del mismo, llegando hasta las clavículas.
- 6) Rechazo del peto esternocostal hacia arriba, sujetándolo con unas pinzas.
- 7º) Dar un pequeño corte a la aurícula derecha, retirando con un aspirador la sangre que mana de la misma. El aspirador se mantiene conectado hasta la finalización de la perfusión.

- 8ª) Sujetar el corazón (que se halla latiendo a gran velocidad, prácticamente en fibrilación) con unas pinzas, y cortar con tijeras por completo la punta de la víscera.
- 9ª) Colocar en el orificio practicado a nivel del apex (que corresponde a ventrículo izquierdo) una cánula de vidrio cuya punta se introduce en raíz aórtica. Dicha cánula está conectada a una goma que a su vez comunica con un recipiente que contiene 300 cm<sup>3</sup> del fijador (glutaraldehído al 3%). El recipiente se sitúa a una altura de 80 cms. sobre el plano de la mesa, lo cual producirá la presión necesaria para que el líquido circule a través del circuito vascular mayor del animal. La goma se ha rellenado previamente con buffer fosfato 0'1 M., con el fin de que primero se elimine la sangre sin que llegue a entrar en contacto directo con el líquido fijador. Opcionalmente se pueden clampar los grandes vasos inmediatamente por encima del diafragma. Mantenemos circulando el líquido hasta agotar los 300 cm<sup>3</sup>. Una vez terminada la perfusión, se guarda en nevera al animal unos 60 minutos, y tras ese tiempo se extrae el encéfalo de análoga manera a la descrita anteriormente, introduciéndolo en líquido fijador (glutaraldehído al 3%).

Para cada etapa evolutiva hemos empleado 6 animales.

Los fijadores utilizados han sido:

- a) Formol-neutro al 10%.
- b) Bouin-acético.
- c) Formol-bromuro.
- d) Glutaraldehído al 3%.

Se preparan de la siguiente manera:

a) Formol-neutro al 10%: 10 cm<sup>3</sup>. de solución comercial de formol puro (formaldehído al 35-40%) y hasta 100 cm<sup>3</sup> de agua destilada.

b) Bouin-acético:

- Acido pícrico a saturación en agua destilada, 1000 cm<sup>3</sup>.
- Formol puro (formaldehído al 35-40%), 100 cm<sup>3</sup>.
- Acetato de cobre neutro, 25 gramos.

Se añade en el momento del uso un 3% de ácido acético glacial.

c) Formol-bromuro:

- Formol-neutro, 15 cm<sup>3</sup>.
- Agua destilada, 85 cm<sup>3</sup>.
- Bromuro de amonio, 2 gramos.

d) Glutaraldehído al 3%:

Se mezcla en el momento del uso:

- Solución de glutaraldehído al 25%, 12 cm<sup>3</sup>.
- Buffer fosfato 0'2 M., pH= 7'4, 50 cm<sup>3</sup>.
- Agua destilada, 38 cm<sup>3</sup>.

La solución fijadora final que queda es glutaraldehído al 3% en buffer fosfato 0'1M., pH = 7'4. Se mantiene a 4°C.

El buffer fosfato se prepara a partir de dos soluciones:

- Solución A (ácida):

Fosfato monosódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; Pm=137'99) al 2'76% en agua destilada.

- Solución B (básica):

Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; Pm= 268) al 5'36% en agua destilada.

Fosfato disódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; Pm=358'16) al 7'16% en agua destilada.

Se puede emplear cualquiera de los dos productos. Varía la concentración debido al diferente peso molecular.

Estas dos soluciones madre se conservan varias semanas en el frigorífico. La solución B suele cristalizar a baja temperatura, por lo que es necesario ponerla a temperatura ambiente un tiempo antes de realizar la mezcla, con el fin de redissolver los cristales.

Para preparar el buffer se mezclan las dos soluciones en la siguiente proporción:

Solución A, 16 partes.

Solución B, 84 partes.

Con lo que resulta un buffer fosfato 0'2M. y de pH=7'4.

En cada una de las fases estudiadas se han realizado las siguientes técnicas histológicas:

A) Microscopía óptica:

- A.1) Hematoxilina-eosina, como técnica general de rutina.
- A.2) Van Gieson, para el estudio del componente conectivo.
- A.3) Hematoxilina fosfotúngstica, para la demostración de fibras gliales (que se tiñen de azul), y su fácil diferenciación de las fibras colágenas ( que lo hacen de rojo).
- A.4) Perls, con el objeto de investigar la formación y destino de los corpúsculos gránulo-férricos.

B) Microscopía electrónica: ver más adelante.

Además, en etapas tempranas hemos sacrificado animales adicionales con el fin de aplicar algunas técnicas especiales para microscopía óptica:

- a) Técnica argéntica de Weil y Davenport (1933) para microglia, que es de singular utilidad (Esiri y Boos, 1984) para la objetivación de microglia reactiva, tanto en material fijado en simple formol al 10% como en el fijado en glutaraldehído al 3%.

b) Técnicas histoquímicas:

- b.1) Técnica de Miller y Palade (1964), para fosfatasa ácida.
- b.2) Técnica de Fahimi (1969), para peroxidasa.

Y en etapas más tardías, se sacrificaron también animales para efectuar:

- a) Técnica del oro sublimado para la demostración de astrocitos. Nos ha sido de gran utilidad la modificación de Río-Hortega (citado por Cajal y De Castro, 1933) del método aúrico de Cajal, la cual nos ha brindado mejores resultados que el método clásico.

Los cerebros se tallaron en piezas de 0'5 cms. de espesor que incluyeran el trayecto de la herida, y los fijadores y métodos de inclusión y corte para cada una de las técnicas han sido:

- a) para las técnicas habituales de microscopía óptica, Bouin-acético o Formol al 10%, 2-3 días de fijación. Tras lavado abundante en agua corriente se deshidratan las piezas en alcoholes progresivos, se aclaran con benzoles, y se sumergen en parafina líquida (una noche). Se preparan los bloques de parafina correspondientes, orientando la pieza de un hemisferio para ser cortada según un plano longitudinal (parelelo al trayecto), y la contralateral según un plano transversal (perpendicular al trayecto). Los cortes se realizaron a 7 micras

- de grosor, con un microtomo Leitz tipo Minot, seriándose por completo las piezas.
- b) Para la técnica de Weil y Davenport (1933), glutaraldehído al 3%, un día. Los cortes se efectuaron por congelación, con un grosor de 20-25 micras, y en un sentido perpendicular al trayecto.
  - c) Para la variante de Río-Hortega del oro sublimado de Cajal, formol-bromuro, 5 días. Los cortes se realizaron también por congelación, perpendicularmente al trayecto, a un grosor de 20-25 micras.
  - d) Para las técnicas de histoquímica, glutaraldehído al 3%, un día. Cortes por congelación, perpendiculares al trayecto, de 20-25 micras. Ambas técnicas se aplicaron alternativamente en cortes sucesivos de la misma pieza, con objeto de comparar las imágenes obtenidas.
  - e) Para microscopía electrónica, glutaraldehído al 3%, un día. Tras este tiempo, se seccionaba longitudinalmente el bloque en dos mitades por el centro del trayecto, seleccionándose muestras del tamaño adecuado para el procesamiento ulterior (piezas cuboideas de 1mm. de lado), tanto de la zona correspondiente a la pared de la herida, como de una región situada a 1mm. por fuera de la misma.

#### DESCRIPCION DE LAS TECNICAS

##### - HEMATOXILINA-EOSINA:

- 1º) Desparafinación e hidratación.

- 2º) Hematoxilina de Carazzi, 10-15 minutos.
- 3º) Lavado en agua corriente, 30 minutos como mínimo.
- 4º) Eosina al 1'25%, 3 minutos.
- 5º) Deshidratación, aclaramiento con carboxilol, xilol y montaje con Bálsamo del Canadá.

- VAN GIESON:

Reactivos:

a) Hematoxilina de Weigert:

Consta de dos soluciones:

- Solución A:

- Hematoxilina, 1 gramo.
- Alcohol de 96º, 100 cm<sup>3</sup>.

- Solución B:

- Percloruro de hierro al 29%, 4 cm<sup>3</sup>.
- Acido clorhídrico de densidad 1'124 (que se prepara con 100 cm<sup>3</sup>. de HCl concentrado y 50 cm<sup>3</sup>. - de agua destilada), 1 cm<sup>3</sup>.
- Agua destilada, 95 cm<sup>3</sup>.

Las dos soluciones se mezclan en el momento de ser utilizadas, empleando exactamente la misma cantidad de cada una de ellas.

b) Picrofuchsinina:

- Solución saturada en agua de ácido pícrico, tres partes.
- Solución acuosa de fuchsinina ácida al 1% una parte.

**Método:**

- 1º) Desparafinar e hidratar.
- 2º) Hematoxilina de Weigert, 10 minutos.
- 3º) Lavado en agua corriente.
- 4º) Picrofuchsin, 10-30 segundos.
- 5º) Deshidratación directamente desde alcohol absoluto y montaje.

**- HEMATOXILINA FOSFOTUNGSTICA:**

**Reactivos:**

a) Mezcla de oxidación:

- Permanganato potásico al 1%, 50 cm<sup>3</sup>.
- Acido sulfúrico al 10%, 1'5 cm<sup>3</sup>.
- Agua destilada, 48'5 cm<sup>3</sup>.

b) Hematoxilina fosfotúngstica:

- Acido fosfotúngstico, 20 gramos.
- Hematoxilina, 1 gramo.
- Agua oxigenada, 2 cm<sup>3</sup>.
- Agua destilada, 1000 cm<sup>3</sup>.

**Método:**

- 1º) Desparafinación e hidratación.
- 2º) Mezcla de oxidación, 10 minutos.
- 3º) Lavado rápido en agua destilada.
- 4º) Acido oxálico al 5% hasta blanqueo de los cortes.
- 5º) Lavado rápido en agua destilada.
- 6º) Hematoxilina fosfotúngstica, 24 horas.
- 7º) Deshidratación desde alcohol absoluto y montaje.

- PERLS:

Reactivos:

- a) Mezcla ferrocianuro potásico-ácido clorhídrico:
  - Ferrocianuro potásico al 10%, cuatro partes.
  - Acido clorhídrico al 10%, una parte.
- b) Safranina al 0'5%.

Método:

- 1º) Desparafinar e hidratar.
- 2º) Mezcla ferrocianuro potásico-ácido clorhídrico, 5 minutos.
- 3º) Añadir a la solución anterior medio volumen de ácido clorhídrico al 10%, dejando actuar esta mezcla 20 minutos.
- 4º) Lavado en agua corriente.
- 5º) Safranina, 30 segundos.
- 6º) Lavado rápido, deshidratación, aclaramiento y montaje.

- ORO SUBLIMADO ( VARIANTE DE RIO-HORTEGA):

- 1º) Cortes por congelación.
- 2º) Lavado en agua amoniacal, y después en agua acetificada.
- 3º) Inmersión en el siguiente baño:
  - Solución de cloruro de oro pardo al 1/500, 50 cm<sup>3</sup>.
  - Biclорuro de mercurio cristalizado, 0'75 gramos.Disolver en caliente, filtrar, y añadir 20 gotas de ácido acético.  
Poner el producto resultante en una placa de Petri, introducir los cortes y llevar a la estufa a 30-35º hasta que adquieran un color pardo oscuro.
- 4º) Lavado en agua destilada.

5º) Fijación en hiposulfito sódico al 5%.

6º) Nuevo lavado, deshidratación, aclaramiento y montaje.

-TECNICA DE WEIL Y DAVENPORT (1933):

1º) Cortes por congelación.

2º) Lavado en agua destilada.

3º) Lavado en agua amoniacal, 2-3 minutos.

4º) Solución de plata amoniacal, 10-20 segundos. Esta solución se prepara añadiendo a 2 cm<sup>3</sup>. de amoniacal 18-20 cm<sup>3</sup>. de nitrato de plata al 10%, agitando mientras se hecha poco a poco la plata. El punto óptimo se alcanza cuando la solución toma un tono débilmente opalescente. Si hay un exceso de plata, se añade una gota de amoniacal para terminar de disolver el precipitado.

5º) Reducción en formol al 10%.

6º) Lavado en agua destilada.

7º) Deshidratación, aclaramiento y montaje.

-TECNICA DE MILLER Y PALADE (1964):

Soluciones:

a): Buffer acetato 0'1 M., pH=5.

Se prepara así:

- 70 partes de acetato sódico 0'1 M.

- 30 partes de ácido acético 0'1 M.

Se añade un 7'5% de sacarosa.

b) Beta-glicerofosfato sódico al 1%.

c) Nitrato de plomo al 0'6%.

d) Medio de incubación: se obtiene mezclando 5 partes de

buffer, 3 de glicerofosfato, y 2 de la solución de plomo.

Método:

- 1º) Cortes por congelación, recogiénolos en buffer acetato.
- 2º) Sumergir en el medio de incubación, un mínimo de 30 minutos. a 37°C.
- 3º) Lavado breve en agua destilada.
- 4º) Lavado breve en ácido acético al 2%.
- 5º) Sulfuro de amonio al 2%, unos segundos.
- 6º) Lavado en agua destilada.
- 7º) Deshidratación, aclaramiento y montaje.

-TECNICA DE FAHIMI (1969):

- 1º) Cortes por congelación, recogiénolos en buffer fosfato 0'1 M.
- 2º) Sumergir los cortes en el medio de incubación hasta que adquieran un color marrón claro ( unos 10-20 minutos). El medio se prepara así:
  - Diaminobencidina, 9'9 mg. en 10 cm<sup>3</sup>. de buffer fosfato 0'1 M.
  - Agua oxigenada al 1 por mil, 1'5 cm<sup>3</sup>.
- 3º) Lavado en agua destilada.
- 4º) Deshidratación, aclaramiento y montaje.

Estas dos técnicas histoquímicas fueron aplicadas también a algunos cortes de tejido que se procesaron ulteriormente para estudio con microscopía electrónica.

**- TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA:**

- 1º) Fijación en glutaraldehído al 3% en buffer fosfato 0'1 M., pH= 7'4, a 4°C.
  - 2º) Lavado en buffer fosfato 0'1 M., pH= 7'4, a 4°C. durante varias horas.
  - 3º) Postfijación en tetraóxido de osmio al 1% en buffer fosfato 0'1 M., 1-1'5 horas.
  - 4º) Dos lavados en buffer fosfato 0'1 M., pH= 7'4.
  - 5º) Deshidratación en acetonas de concentración creciente.
  - 6º) Infiltración del tejido durante doce horas en una mezcla tres partes de acetona y una de Vestopal W.
  - 7º) Depositar la pieza en una cápsula de gelatina rellena con el medio de inclusión ( Vestopal W). Mantener 24 horas a temperatura ambiente.
  - 8º) Polimerización: 2-2'5 días en estufa de 60° C.
- Se obtuvieron secciones semifinas y ultrafinas con un ultramicrotomo modelo LKB.

Las secciones semifinas se han teñido con azul de toluidina al 1% en bórax (borato sódico) al 1%, 5 minutos en estufa de 60° C.

Las secciones ultrafinas se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo, de la siguiente manera:

- 1º) Acetato de uranilo al 2%, una hora.
- 2º) Dos lavados en agua destilada.
- 3º) Citrato de plomo, 5-7 minutos.

Se prepara según Reynolds (1963), con:

- Nitrato de plomo, 1'33 gramos.
- Agua bidestilada, 30 cm<sup>3</sup>.
- Citrato sódico. 2H<sub>2</sub>O, 1'76 gramos.

Se mezclan los dos primeros, y después de una disolución completa se añade el citrato y se agita hasta que el precipitado sea muy fino. Se añaden 8 cm<sup>3</sup> de solución de sosa normal (4%), completando hasta 50 cm<sup>3</sup>. con agua destilada o bidestilada.

El modelo de microscopio electrónico utilizado para el exámen de las muestras ha sido un Philips EM 201, operando con un potencial de aceleración de 60 kilovoltios.

R E S U L T A D O S

1-3 DIAS DE EVOLUCION:

En los primeros momentos tras la lesión, el cuadro morfológico está dominado por la necrosis, con la consiguiente respuesta celular inflamatoria. Así, 24 horas después de la lesión aparece marcada necrosis parenquimatosa en el foco. En muchos lugares no hay una neta separación entre el parénquima conservado y el necrótico. Los bordes del trayecto aparecen por completo desflecados y carentes de organización. (Figs. 1 y 2).

En el magma necrótico central y en la vecindad se aprecian en ocasiones arteriolas y capilares, aquéllas con pared necrosada y con numerosos polimorfonucleares neutrófilos en el interior y alrededores. Con frecuencia desaparecen las células endoteliales, permaneciendo dos finas líneas paralelas y próximas, remedando una " sombra " de la pared vascular. No obstante, en algún caso, se han visto vasos con estructura aparentemente bien conservada incluso en el seno del magma central, pero sobre todo en la vecindad del trayecto.

Existe un evidente edema en el parénquima vecino al lugar de la punción, el cual adopta un aspecto esponjiforme. El edema es más marcado a niveles más profundos del trayecto, no llegando a constituirse un halo neto separado nítidamente del parénquima sano, tendiendo por lo general a ser difuso. (Figs. 1, 2 y 3).

Hay abundante hemorragia, en forma de focos dispersos intraparenquimatosos en la vecindad del trayecto, acúmulos de hematíes en el hueco de la herida y marcada hemorragia perivascular. ( Figs. 2 y 4).

Entre el material necrótico aparecen ocasionalmente elementos fusocelulares de núcleo muy fino, elongado y denso, interpretables como células endoteliales en vías de degeneración.

En cuanto a la respuesta celular inflamatoria, se expresa fundamentalmente por polimorfonucleares neutrófilos muy abundantes que se sitúan dispersos o en pequeños acúmulos tanto en el material necrótico como en los márgenes del trayecto (Fig. 5). Con frecuencia están ocupando luces vasculares, observándose en ocasiones imágenes de " marginación leucocitaria" (Fig. 6). De modo ocasional, especialmente en la profundidad del trayecto, existen minúsculos glóbulos basófilos interpretables como provenientes de una desintegración nuclear (cariorraxis). (Fig. 7).

Los macrófagos son relativamente escasos, observándose algunas células de aspecto ameboides, citoplasma no muy abundante, y núcleo redondeado o algo arriñonado. Se sitúan con frecuencia en la vecindad de los vasos y ocasionalmente los hemos observado en el espacio de Virchow-Robin (Fig. 8). Algunos de estos macrófagos aparecen en relación con el material necrótico. Se ha observado, en este día, fagocitosis de hematíes.

En contadas ocasiones se han visto mitosis, de elementos de muy probable naturaleza macrofágica.

La reacción vascular es del todo inaparente. Es manifiesta la congestión vascular.

En cuanto a las modificaciones sufridas por la meninge, hay rotura, dislaceración y necrosis, con congestión vascular y focos hemorrágicos (Figs. 2 y 6). Se ven además polimorfonucleares neutrófilos dispersos que tienden a veces a situarse alrededor de vasos subaracnoideos.

A las 48 horas el aspecto general es bastante similar a la etapa anterior, con diferencias poco aparentes. El edema constituye un halo marcado y bastante neto, mucho más evidente por fuera del material necrótico. El grado de hemorragia es análogo al encontrado a las 24 horas.

En lo que respecta a los macrófagos, se aprecian numerosas formas ameboides y pseudopódicas, así como moderado número de células totalmente catalogables como "corpúsculos gránulo-adiposos", que a veces engloban hematíes (Fig. 9).

Con relativa frecuencia se ven mitosis en la vecindad del trayecto (Fig. 10), que parecen corresponder tanto a elementos macrofágicos como gliales, ya que a veces se han objetivado

figuras mitóticas en posición de satélite neuronal.

Se inicia la reacción adventicial en las arterias vecinas al foco de la lesión.

La meninge, en las zonas adyacentes al lugar de penetración, muestra edema, hemorragia discreta y escasos restos necróticos.

A las 72 horas, los polimorfonucleares neutrófilos existen en cantidad moderada o escasa. Muy ocasionalmente se ven glóbulos de desintegración nuclear.

El tipo de macrófago que predomina, si bien se siguen observando formas de transición, es ya el "corpúsculo gránulo-adiposo". Tales elementos son numerosos, tanto a nivel de los márgenes del trayecto, en zonas superficiales, como en las áreas de edema o incluso en el fondo (Fig. 11). Poseen tendencia a situarse perivascularmente, a veces en espacios de Virchow-Robin.

Con cierta frecuencia, en las áreas más edematosas y necróticas, se ven elementos celulares fusiformes que se sitúan bien aislados o en pequeños hacecillos de dos o tres células, y a veces se aprecia cómo corresponden a fragmentos rotos de pequeños vasos (Fig. 12).

Se observan con facilidad mitosis en los márgenes del trayecto.

Se acentúa la reacción vascular. Las arterias vecinas al foco de lesión aparecen frecuentemente con aumento del número de células adventiciales y también con células que ocupan el espacio de Virchow-Robin.

A nivel del fondo de la punción, en plena sustancia blanca edematosa, parecen existir intentos de neoformación vascular, en forma de algún cordoncillo sólido de elementos de núcleo alargado, que emerge del parénquima y se dirige hacia el foco.

La meninge presenta edema y hemorragia discretos. Se aprecia una franca reacción meníngea con aumento del espacio subaracnoideo, que aparece hipercelular. Existen frecuentes figuras de mitosis en elementos perivasculares meníngeos (Figs. 13 y 14).

Los hallazgos ultraestructurales en estas fases precoces son anodinos, estando dominados por la necrosis y licuefacción tisular, y la aparición de macrófagos.

**5 DIAS DE EVOLUCION:**

A los cinco días de evolución todavía se aprecia una evidente necrosis parenquimatosa, constituyéndose un núcleo central de material necrótico que ocupa casi por completo el hueco (Fig. 15).

Se observa un halo de edema muy bien delimitado, localizado por fuera de la banda de reacción macrofágica.

Con respecto a la respuesta celular inflamatoria (Fig. 16), está formada principalmente por células macrofágicas, siendo los "corpúsculos gránulo-adiposos" el elemento predominante (Fig. 17). Constituyen una neta banda que rodea concéntricamente a la zona necrótica central, y con frecuencia se observan en disposición perivascular alrededor de vasos arteriales (Fig. 18). Son evidentes y llamativos los fenómenos de eritrofagocitosis.

En número variable según el animal considerado, pero presentes en todos los casos estudiados, se han visto células gigantes multinucleadas, que poseen entre tres y diez o más núcleos. Se sitúan entre las demás células macrofágicas (Fig. 19).

Se visualizan sin ninguna dificultad numerosas figuras mitóticas, sobre todo a nivel de la banda de macrófagos, corres-

pondiendo, por tanto, a células fagocitarias en división. En el halo de edema, así como en el parénquima inmediatamente adyacente al mismo, se ven ocasionales mitosis, algunas de ellas de elementos situados en posición de satélite perineuronal.

Con respecto a la reacción vascular, en esta etapa tienen lugar hechos llamativos, detectándose procesos neoformativos en forma de numerosos brotes o yemas de apariencia maciza, constituidos por hacecillos de células fusiformes que se dirigen perpendicularmente hacia el trayecto. Estas formaciones son evidentes especialmente a nivel del halo de edema. Se ha visto alguna ocasional mitosis de los elementos que componen estos cordones.

En vasos sanguíneos cercanos al foco suele verse un número algo aumentado de células perivasculares (constituidas sobre todo por elementos fusocelulares y macrofágicos). Otras veces hay una densa agrupación de células de núcleos alargados que rodean en varias capas a vasos arteriales cercanos a la meninge, obliterando el espacio perivascular (Fig. 21). Se ha visto alguna figura mitótica a ese nivel.

Con respecto a las reacciones sufridas por la meninge, en el espacio subaracnoideo vecino al lugar de la punción, hay una moderada proliferación de elementos fibroblastoides que tienen a constituir manguitos alrededor de vasos arteriales. Tales elementos son de carácter análogo a los descritos anteriormente

obliterando los espacios de Virchow-Robin, existiendo - de igual modo - alguna ocasional mitosis.

Puede establecerse, pues, que en cortes perpendiculares a la trayectoria de la punción, se ponen de manifiesto varias zonas concéntricas que, desde la zona central a la periferia, son las siguientes: 1) Zona necrótica central; 2) Zona muy celular de macrófagos, con gran cantidad de elementos globulares, que presentan frecuentemente material fagocitado en su interior; 3) Banda edematosa con abundantes vasos neoformados; y 4) la zona más externa que corresponde a parénquima nervioso con alteraciones mínimas y que presenta un cierto aumento de la celularidad a expensas de elementos de núcleo pequeño y denso, con frecuencia de forma alargada (Fig. 20).

La técnica argéntica de Weil y Davenport (1933) pone de manifiesto típicos microgliocitos de morfología ramificada en áreas alejadas de la lesión, pero al irnos acercando al foco se tornan hipertróficos (con prolongaciones más cortas, más gruesas y menos ramificadas), apareciendo tales elementos a nivel de la zona del parénquima con el cierto aumento de la celularidad antes descrito. Más cerca del trayecto, se observan formas pseudopódicas y ameboides (zona correspondiente a la banda de macrófagos), y por último, en el área adyacente a la necrosis aparecen las formas globulosas (Figs. 22, 23 y 24).

La técnica para la demostración de la fosfatasa ácida (Miller y Palade, 1964) demuestra la existencia, a nivel de la región correspondiente a la banda de macrófagos anteriormente descrita, de numerosas células globulosas cuyo citoplasma está cargado de gránulos que dan la reacción intensamente positiva para dicho enzima (Fig. 25). También se observa una intensa positividad pericitaria a todos los niveles.

Con la técnica de Fahimi (1969) para la demostración de la peroxidasa se observa, en el seno de la banda macrofágica, un número escaso de células globulosas con positividad granular citoplásmica (Figs. 26 y 27). Los hematíes aparecen con un color casi negro, debido a la intensa actividad pseudoperoxidática de la hemoglobina que contienen. En las zonas externas, por fuera de la banda de macrófagos, no se han encontrado células peroxidasa-positivas.

Con respecto al estudio ultraestructural, en regiones cercanas al foco son evidentes las alteraciones neuronales, con grados variables de edema intracelular y disgregación de organelas. Existe también un masivo edema de somas y prolongaciones astrocitarias, las cuales aparecen como grandes masas esféricas de aspecto claro ocupadas por algunos restos grumosos amorfos.

Se observan, en el neuropilo cercano a la herida, prolongaciones celulares (presumiblemente neuronales) con curiosas

imágenes de carácter degenerativo: es relativamente frecuente ver formaciones esféricas de gran tamaño que contienen en su centro un apretado acúmulo de filamentos con algunas vesículas, y en su periferia numerosísimos cuerpos densos, estructuras laminares, mitocondrias alteradas, .... etc. (Fig. 28). A veces, en estas formaciones se ve en un lado una estructura en forma de "V" muy abierta, alargada, constituida por un apilamiento de membranas que parecen constituir delgadas cisternas (Fig. 29). En otras ocasiones las prolongaciones neuronales pueden llegar a identificarse como axones con su cubierta mielínica, la cual suele estar alterada y el axón completamente retraído flotando en un amplio espacio claro en el interior del túbulo mielínico, o incluso habiendo desaparecido por completo, conservándose entonces tan sólo restos de mielina periféricos.

Se ha comprobado ultraestructuralmente la existencia de mitosis en células de probable carácter macrofágico, por la presencia de cuerpos densos identificables como lisosomas (Figs. 30 y 31).

En zonas más alejadas de la lesión, aun cuando pueda llegar a objetivarse cierta desorganización del neuropilo, es posible observar ya neuronas perfectamente conservadas.

Los macrófagos son extraordinariamente abundantes alrededor del material necrótico y también se aprecian tanto en el

seno del mismo como en el parénquima que rodea a la banda de macrófagos. Poseen un núcleo con cromatina en grumos dispersos, en general periféricos, y un nucleoplasma denso (Fig. 32). Los contornos celulares son muy irregulares, con emisión de múltiples pseudópodos de calibres variables, a veces extraordinariamente delgados. El citoplasma posee organelas habituales, destacando el que las cisternas de retículo endoplásmico rugoso son largas y de disposición aislada. El organoide más numeroso y llamativo son los lisosomas, que poseen positividad para la fosfatasa ácida con las técnicas ultrahistoquímicas empleadas (Fig. 33). Algunos de ellos son de tipo primario (cuerpos densos rodeados por membrana) y en general de tipo secundario, con contenido irregular. A veces hay lisosomas secundarios que llegan a ocupar la mayor parte del volumen celular. También se han visto gotitas de lípidos (de tamaño uniforme, coexistiendo o no con los lisosomas), vacuolas claras intracitoplásmicas, y raras veces dilatación de la membrana nuclear.

Se comprueba ultraestructuralmente la existencia de fenómenos de eritrofagocitosis, observándose fragmentos de hematíes o hematíes enteros en el interior de macrófagos (Fig. 34). Asimismo, se ha visualizado fagocitosis de axones degenerados, y en ocasiones intentos de englobar pequeños capilares necróticos (Figs. 35 y 36).

Los polimorfonucleares neutrófilos que han podido verse exhiben un citoplasma a menudo cargado de material floculento.

En zonas algo más alejadas del lugar de la punción, los macrófagos tienden a situarse en relación con vasos, con frecuencia en el espacio de Virchow-Robin. En estos casos poseen lisosomas sobre todo primarios y alguna ocasional gotita lípida, siendo extraño observar en sus citoplasmas lisosomas secundarios. Han podido visualizarse, además, macrófagos en estrecho contacto con neuronas degeneradas.

Los vasos sanguíneos de tipo capilar cercanos al foco poseen un endotelio muy engrosado, con abundantes polirribosomas y retículo rugoso a veces dilatado. En ocasiones, la superficie luminal endotelial emite prolongaciones cortas y filiformes. Los brotes vasculares están siempre rodeados por membrana basal.

En espacios de Virchow-Robin cercanos a la lesión se aprecia dilatación, así como células ricas en cuerpos densos de variables tamaños, con típica apariencia macrofágica (Figs. 37 y 38).

Los astrocitos son el asiento ultraestructural fundamental del edema (Figs. 39 y 40), localizado tanto en el soma como en las prolongaciones (algunas poseen dilataciones bulbosas). Parece existir un muy discreto aumento del número de filamentos intracitoplásmicos (no repartidos homogéneamente, sino más bien tendiendo a agruparse). Hay algún cuerpo denso con aspecto de lisosoma primario, y ocasionales gotas de lípidos. No se han visto lisosomas secundarios ni tampoco imágenes de pseudomielina.

7-10 DIAS DE EVOLUCION:

Con respecto a la necrosis parenquimatosa, hay una neta disminución de la cantidad de material necrótico, el cual es ya escaso a los 10 días, situándose bien a nivel profundo o formando un pequeño tapón muy superficial (Fig. 41). Está en todos los casos infiltrado por macrófagos, fibroblastos y algunos vasos. Donde no queda material necrótico existe una cavidad (Fig. 42). Preferentemente a niveles muy superficiales se han visto, en estrecha proximidad al trayecto, vasos arteriales de pared necrótica con un aspecto por completo superponible al de la necrosis fibrinoide, y rodeados por elementos adventiciales fibroblastoides.

Hay un moderado número de "corpúsculos gránulo-adiposos", algunos muy grandes y espumosos. Tienden a adherirse a las paredes de la cavidad o a aparecer libremente en el hueco (Fig. 43). También se adhieren a la parte inferior del tapón necrótico superficial ( si éste existe), o bien obliteran la zona más inferior del trayecto. Con frecuencia se entremezclan con los elementos fusocelulares mesenquimales. Los " corpúsculos gránulo-férricos" son objetivables ya el séptimo día, con su citoplasma cargado de granulaciones parduzco-doradas que se tiñen de azul brillante con la técnica de Perls (Fig. 44). Tales elementos tienden a localizarse preferentemente en la mitad inferior del trayecto, y con frecuencia constituyen pequeñas agrupaciones a veces situadas en las adventicias de vasos arteriales.

Superficialmente aparecen densos acúmulos de elementos fibroblastoides-meningocíticos que separan el tapón necrótico (cuando lo hay) del resto del parénquima (Fig. 45).

La pared interna del hueco, en algunas áreas de niveles superficiales, aparece revestida por elementos fusocelulares aplanados de núcleo denso. El parénquima que bordea al trayecto en zonas más inferiores carece de estructuración. (Figs. 43 y 46).

Los vasos neoformados de tipo capilar ya están canalizados, observándose así con facilidad entre las células que ocupan el trayecto cuando éste se oblitera. Hay - por otra parte - un evidente aumento del número de células adventiciales en vasos adyacentes al hueco.

Las técnicas argénticas e histoquímicas brindan imágenes bastante superponibles a las descritas en la etapa anterior.

En la meninge aparece una moderada proliferación superficial de elementos meningocitarios de núcleos alargados u ovalados, que forman cordones sólidos bastante celulares (con a veces cierta tendencia al arremolinamiento celular), anastomosándose unos con otros. A niveles superficiales y medios existe una laxa trama reticular constituida por células fusiformes que revisten la cara interna del trayecto, mezclados con células macrofágicas.

Ultraestructuralmente se aprecian imágenes de degeneración de neuronas o prolongaciones de neuronas similares a las descritas a los 5 días, con una disposición periférica de cisternas en "V" muy típica. Son muy grandes (hasta tres veces el tamaño de otras células) y en ocasiones están ya rodeadas por macrófagos (Fig. 47).

Los macrófagos poseen gran cantidad de gotas de lípidos, a veces muy grandes, y enormes cuerpos residuales e imágenes laminares concéntricas de pseudomieline (Fig. 48). Las características de núcleo y citoplasma son análogas a las citadas en la fase anterior.

En plena zona de licuefacción y necrosis se ven círculos de membrana basal que interiormente conservan restos desvitalizados de endotelio (Fig. 49), lo cual confirma el que la basal es capaz de mantener su estructura cierto tiempo después de que se haya destruido la célula que la formó.

Existen vasos neoformados con endotelios muy hipertróficos y hendiduras lumbales, siendo éstas de mayor tamaño que a los 5 días, y discurriendo por ellas hematíes o plaquetas. Alrededor de estos cordones se suele ver una membrana basal algo irregular, en ocasiones reduplicada, o bien un material floculento y filamentoso parecido a matriz de lámina basal (Fig. 50). Hay ocasiones en que capilares adyacentes o cercanos al foco

exhiben endotelios ricos en vesículas pinocitósicas (Figs. 51 y 52), y prácticamente siempre están algo separados de su membrana basal, siendo ésta discretamente irregular. Los pericitos que se observan presentan un espacio vacío entre su plasmolema y la membrana basal (tanto la de la vertiente endotelial como la de la vertiente parenquimatosas). Alguno de ellos emite incluso pequeñas prolongaciones pseudopódicas que parecen intentar introducirse en el neuropilo (Fig. 53).

En vasos más grandes con espacios de Virchow-Robin aparecen a menudo células perivasculares activadas de citoplasma oscuro que poseen gotas de lípidos y cuerpos densos. Estos espacios perivasculares, además, a veces están llenos de prolongaciones celulares pseudopódicas.

Hay un gran edema astrocitario, tanto en soma como en prolongaciones, y las células de esta naturaleza (Fig. 54) llegan a destacar por este motivo muy llamativamente en los cortes semifinos. Los pies chupadores están muy distendidos, colapsando prácticamente a capilares delgados (Fig. 55).

El borde del hueco presenta en muchas zonas una destrucción absoluta. Hay macrófagos adyacentes al mismo borde, y gran edema extracelular, en forma de amplios espacios vacíos en el seno del tejido (Fig. 48). De manera parcelar hay un revestimiento por membrana basal, irregular, discontinuo a veces y

otras redundante. En el borde se observan frecuentemente pequeñas invaginaciones de forma caprichosa (Fig. 56). Siempre que se ve membrana basal está aplicada sobre células de naturaleza astrocitaria (Fig. 57). Con frecuencia hay microfibrillas colágenas adyacentes a esa basal (Fig. 58). En pleno hueco se detectan algunos restos celulares necróticos (Figs. 56 y 57).

15 DIAS DE EVOLUCION:

Las diferencias con respecto a la fase anterior son relativamente escasas a nivel de microscopía óptica.

En pleno foco se aprecian vasos de morfología normal, no apreciándose necrosis fibrinoide de las paredes vasculares.

Hay un abundante número de corpúsculos gránulo-adiposos. A veces son bi o trinucleados, y en ocasiones alcanzan considerable tamaño, rechazando el núcleo a la periferia (Fig. 59). Aparecen bordeando el hueco de manera irregular, otras veces en acúmulos aislados en la cavidad, y profundamente rellenando el trayecto final de la punción. Alguna vez quedan encerrados grupos de ellos entre áreas con proliferación de elementos fibroblastoides, adoptando un aspecto epitelioides tales acúmulos de macrófagos (Fig. 60). La técnica de Perls demuestra abundantes corpúsculos gránulo-férricos con masivos depósitos de hemosiderina, disponiéndose de manera similar que a los 10 días, observándose además algunos situados entre la proliferación celular meníngea superficial.

Existen mitosis, en escaso número, de elementos celulares de probable carácter macrofágico, ya que suelen aparecer entre grupos de macrófagos. Otras corresponden a elementos meningocitarios que rodean a vasos arteriales gruesos.

La pared interna del trayecto está revestida superficialmente por elementos meníngeos fibroblastoides que forman cordones sólidos. A nivel medio se ven elementos similares estrellados que forman una malla laxa, y macrófagos (Figs. 61 y 62). A niveles profundos la organización de la pared es poco evidente. Con hematoxilina fosfotúngstica se observan en ciertas zonas del borde fibras teñidas de azul (gliales) en íntima relación con fibras de color rojo (colágenas).

La proliferación meníngea es marcada a nivel superficial, formándose una lámina no muy gruesa pero sí muy celular (Fig. 63), constituida por elementos fusocelulares agrupados en haces, que tienden a envolver circularmente a vasos sanguíneos y a veces a constituir remolinos celulares (Fig. 64). Esta proliferación penetra hasta un nivel relativamente superficial, y más hacia la profundidad se aprecia bien cómo tienden a ser sustituidos los cordones sólidos por una malla muy laxa de elementos fibroblastoides estrellados (Fig. 61).

Los vasos cercanos a la meninge exhiben una intensa proliferación adventicial de elementos meningocitarios que en ocasiones llegan a comprimir el propio vaso.

La técnica argéntica de Weil y Davenport (1933) revela una discreta atenuación global de la reacción microglial.

El dato ultraestructural más importante es la existencia de una membrana basal neta y definida que reviste completamente los bordes del hueco de la herida (Fig. 65). Dicha membrana basal se sitúa suprayacente a prolongaciones y somas de astrocitos, poseyendo aquéllas un contorno muy irregular, complejamente interdigitadas y cargadas de abundantes filamentos. Entre dichas prolongaciones suele haber axones aislados. Sobre la membrana basal aparecen con frecuencia microfibrillas colágenas, aisladas o en pequeños paquetes (Fig. 66). Se han visto algunas zonas desprovistas de membrana basal, presumiblemente correspondientes a niveles profundos, si bien tal hallazgo ha sido excepcional.

En el seno del hueco existen células que poseen núcleos con cromatina en grumos gruesos periféricos, abundantes polirribosomas, algunas cisternas de retículo endoplásmico rugoso (en general cortas), Golgi desarrollado y ocasionales cuerpos densos (Fig. 67). Estas células emiten delgadas prolongaciones a considerable distancia, relacionándose unas con otras a veces mediante complejos de unión (Fig. 68), y en ocasiones tienden a revestir incompletamente finas prolongaciones tubulares de astrocitos llenas de filamentos rodeadas por membrana basal (Fig. 69). Entre esa membrana basal y el revestimiento por prolongaciones de células de tipo mesenquimal se suelen situar microfibrillas colágenas en escasa cantidad. A veces, en el hueco, existen varias prolongaciones astrocitarias tubulares juntas, formando un haz; el conjunto suele estar revestido por membrana basal,

aunque pueden visualizarse discontinuidades o irregularidades en tal revestimiento (Fig. 70).

Todavía se observan algunas figuras de mitosis (Fig. 71).

Los macrófagos son de nucleoplasma y hialoplasma den sos. Poseen gotas de lípidos, algún cuerpo denso, y numerosos cuerpos residuales. Se suelen situar cerca del borde, junto con alguna excepcional célula sanguínea emigrante. En el parén quima algo alejado se aprecia microglia activada, con cuerpos densos intracitoplásmicos (Fig. 72).

Se visualizan, en las cercanías del foco, algunas imágenes de degeneración neuronal similares a las descritas en fases anteriores, así como alteraciones de la mielina: frecuentemente engrosada, y a veces fragmentada o separada en dos o más círculos concéntricos.

Los astrocitos exhiben evidente aumento del número de filamentos. Los pies chupadores se ven hipertróficos y con numerosos filamentos (Fig. 73).

En vasos cercanos a la lesión se aprecia una franca activación adventicial (Fig. 74), observándose células perivas culares con cuerpos densos y otras con lisosomas secundarios

- 54 -

o imágenes de pseudomielina. Algunos espacios de Virchow-Robin se hallan ocupados por numerosas prolongaciones pseudopódicas celulares.

20-25 DIAS DE EVOLUCION:

Tras este tiempo de evolución, prácticamente no existe material necrótico a nivel del trayecto, ni tampoco se aprecian vasos sanguíneos con signos morfológicos de necrosis.

Se siguen viendo macrófagos, en moderado número, gran parte de los cuales presentan gránulos de hemosiderina en el citoplasma.

En cortes tangenciales paralelos al trayecto destaca la presencia de una gran hiper celularidad (Fig. 75), a base de numerosos elementos de núcleo pequeño, ovalado y denso, juntamente con otros de núcleos más grandes, con cromatina más clara. Entre ambos tipos celulares se visualizan varios macrófagos con morfología de corpúsculo gránulo-adiposo (Fig. 76).

La técnica argéntica aplicada para demostrar células microgliales permite observar en los márgenes de la lesión un neto predominio de formas hipertróficas, con marcada disminución de formas ameboides.

Ultraestructuralmente, los macrófagos que se observan poseen por lo general un citoplasma cargado de grandes cantidades de un material muy electrodense y a veces granular. El hialoplasma es denso, con cisternas largas y aisladas de retículo endoplásmico rugoso. Los hay tanto en el hueco de la herida como

en el seno del parénquima. En el neuropilo algo alejado del foco existen típicas células microgliales con cuerpos densos, así como algún ocasional mononuclear emigrante.

Las células perivasculares adventiciales son de contorno irregular, poseyendo cuerpos densos lisosómicos y en ocasiones imágenes de pseudomielina y gotas lipídicas (Fig. 77). Los espacios de Virchow-Robin aparecen además ocupados por numerosas secciones de pseudópodos, mientras que otros están llenos de células de hábito meningocitario ricas en retículo rugoso. Los pericitos de zonas alejadas poseen típica morfología de reposo, si bien en áreas adyacentes al foco se ha visualizado alguno discretamente despegado de su membrana basal externa.

Los vasos que se hallan en el hueco de la herida están rodeados por una membrana basal a menudo redundante o multiplicada, y relacionada casi constantemente con microfibrillas colágenas. Están parcial o totalmente rodeados por finas prolongaciones filiformes de elementos meningocitarios que forman una laxa malla y se unen unas con otras a veces mediante complejos de unión (Fig. 78).

Los astrocitos que se hallan en el neuropilo presentan ocasionalmente algún cuerpo denso y cantidad variable de filamentos intracitoplásmicos, a veces muchos, de manera que éstos se disponen en gruesos haces, y los escasos organoides ( mitocondrias, algo de retículo rugoso o polirribosomas) lo hacen entre

las masas de filamentos o en zonas periféricas del citoplasma (Fig. 79). A menudo se aprecian surcando el neuropilo prolongaciones astrocitarias gruesas casi sin organelas, sólo poseyendo filamentos. Se ha visualizado un astrocito en mitosis. Algunos pies chupadores están dilatados, sin prácticamente aumento del número de filamentos, en zonas algo alejadas del foco.

Los astrocitos que forman la barrera glial limitante poseen gran cantidad de filamentos y escasos organoides. El revestimiento por membrana basal es continuo e ininterrumpido, relacionándose dicha basal con microfibrillas colágenas. Existen invaginaciones poco profundas hacia el neuropilo, siempre revestidas por membrana basal y conteniendo microfibrillas colágenas. Se detectan algunos complejos de unión interastrocitarios cerca de la cavidad (Fig. 80). En el hueco puede aparecer algún hacecillo de fibras gliales, revestido por membrana basal, y parcialmente cubierto por prolongaciones de células leptomeníngicas.

La meninge, además de la malla laxa ya descrita, presenta acúmulos celulares sólidos, con interdigitaciones de escasa complejidad, poseyendo las células bastante retículo rugoso, Golgi evidente, mitocondrias, complejos de unión y nunca membrana basal. Entre las células no es raro ver pequeños huecos llenos de microfibrillas colágenas, no revestidos por membrana basal (Fig. 81).

**30-45 DIAS DE EVOLUCION:**

En estas etapas hay ya una absoluta ausencia de material necrótico, apreciándose en los cortes longitudinales una neta y delimitada cavidad (Fig. 82).

Continúan observándose macrófagos, la mayor parte de los cuales son corpúsculos gránulo-férricos que se sitúan tanto en meninge como a lo largo de las paredes de trayecto, constituyendo con frecuencia acúmulos de varios elementos.

En las regiones profundas se visualizan inequívocamente con la hematoxilina fosfotúngstica toscas fibras gliales teñidas de azul mezcladas con fibras colágenas, teñidas de rojo. Con el oro sublimado se confirma la existencia de una importante gliosis en los márgenes del trayecto, apareciendo un número aumentado de astrocitos a ese nivel, con prolongaciones engrosadas e irregulares (Fig. 83).

La técnica argéntica para la demostración de microglía revela la presencia de formas hipertróficas y de elementos de morfología más ramificada que en etapas previas.

Ultraestructuralmente, los astrocitos de las regiones cercanas al foco presentan marcado aumento de la cantidad de filamentos intracitoplásmicos, escaso número de cuerpos densos,

y algún acúmulo de lipofucsina en localización perinuclear o somática. Los filamentos se disponen en haces que dejan espacios desprovistos de ellos, y es en tales zonas donde tienden a situarse las organelas astrocitarias, entre las que cabe citar algunas cortas cisternas de retículo endoplásmico rugoso y escasos polirribosomas o mitocondrias. La cantidad de filamentos intracitoplásmicos es muy variable, dotando a las células de una electrodensidad diferente unas de otras, cuando se observan a bajos aumentos.

La barrera glial limitante está constituida por numerosas prolongaciones astrocitarias con complejas interdigitaciones y a veces un discreto ensanchamiento del espacio extracelular, así como complejos de unión (Fig. 84). La orientación de los numerosos filamentos que poseen estas prolongaciones es predominantemente uniforme en cada una de ellas, entrecruzándose sólo raras veces en el seno de una misma prolongación. El grosor de esta barrera glial limitante es variable según las zonas, siendo en ocasiones bastante delgada (Fig. 85). El borde que mira al hueco posee un contorno irregular, y está completamente revestido por membrana basal. Pueden observarse pequeñas invaginaciones (que a veces contienen reduplicaciones de membrana basal), y otras más profundas que alojan en ocasiones vasos sanguíneos. En el seno de la barrera glial no es raro ver atrapadas algunas células, que por lo general son macrófagos de gran tamaño y con enorme cantidad de cuerpos densos, u otras veces alguna

célula sanguínea emigrante de tipo mononuclear. A veces hay también a ese nivel restos de mielina degenerada.

En plena cavidad de la herida existen, junto a algunos macrófagos ( con gran cantidad de cuerpos densos, gotas lipídicas y material particulado electrodenso granular), cordones sólidos constituidos por cuatro o cinco prolongaciones astrocitarias ricas en filamentos, revestido el conjunto de ellas por membrana basal ( Fig. 86). Se puede ver incluso algún ocasional soma astrocitario formando parte de esos cordones. Hay microfibrillas colágenas en relación con la membrana basal y también aisladas en el hueco. Además, tales cordones gliales tienden a estar revestidos incompletamente por elementos meningocitarios aplanados o por sus prolongaciones. En ocasiones se establecen curiosas asociaciones de vecindad entre un vaso capilar, un cordón glial (ambos revestidos por su respectiva membrana basal), y elementos meníngeos que envuelven parcialmente a uno, otro, o ambos (Fig. 87).

Los meningocitos del hueco se presentan bien aisladamente, bien formando cordones y acúmulos sólidos (siempre de mucho mayor calibre que los cordones gliales) con interdigitaciones y complejos de unión intercelulares.

En los vasos sanguíneos cercanos a la meninge se observan a veces los espacios de Virchow-Robin ocupados por una proliferación de elementos meningocitarios y algunos macrófagos.

También se ven prolongaciones pseudopódicas de células adventiciales y ocasionales prolongaciones celulares de aspecto degenerativo.

Ya en el parénquima algo alejado, los vasos sanguíneos poseen con frecuencia células perivasculares con numerosos cuerpos densos, a veces similares a lipofucsina. Los pies chupadores están ensanchados, presentando acúmulos de filamentos en cantidad variable (Fig. 88).

En el neuropilo hay imágenes de degeneración tanto axonal como mielínica (grandes acúmulos redondeados de mielina, engrosamientos focales o fragmentaciones concéntricas de la misma). También se ha observado en una ocasión una mielinización anormal: una célula oligodendroglial totalmente envuelta por mielina.

Es de destacar el hecho de que a los 45 días de evolución se encuentran sin dificultad células plasmáticas, en ocasiones poseyendo un retículo rugoso algo dilatado. Se han visto tanto en la cavidad (Fig. 89), como en espacios de Virchow-Robin, y ocasionalmente en el seno del parénquima nervioso.

2-3 MESES DE EVOLUCION:

En esta fase todavía existen macrófagos, siendo muy escasos los corpúsculos gránulo-adiposos, y existiendo sin embargo un moderado número de corpúsculos gránulo-férricos, los cuales se sitúan tanto en meninge como empotrados en el límite fibrilar del paréquima que rodea al hueco, así como en apretados acúmulos en profundidad.

Con la hematoxilina fosfotúngstica y el oro sublimado se comprueba la existencia de una importante gliosis peritrayecto. En algunos casos, con la hematoxilina fosfotúngstica, se visualizan algunas delicadas fibrillas teñidas de azul entre la laxa malla de elementos meningocitarios.

A niveles profundos, en el seno del parénquima cercano a la cavidad de la herida, se han visto focos de calcificación distrófica.

Ultraestructuralmente, destaca una neta barrera glial limitante con el hueco de la herida, constituida por prolongaciones astrocitarias de calibres variables muy ricas en filamentos y con notable escasez de organoides (algún cuerpo denso, algunas mitocondrias, polirribosomas, ..., con frecuencia agrupándose en pequeñas regiones situadas entre los haces de filamentos) (Fig. 90). Hay complejas interdigitaciones entre las prolongaciones

astrocitarias que constituyen la glia limitans neoformada, siendo a veces de morfología realmente caprichosa (Fig. 91), y observándose no raramente pequeños espacios intercelulares entre las complicadas prolongaciones astrocitarias que se entrelazan. Ocasionalmente, se aprecian complejos de unión interastrocíticos.

El límite entre la glia limitans neoformada y la cavidad de la herida es tremendamente irregular, apareciendo en pleno hueco secciones longitudinales, oblicuas o transversales, de cordones gliales macizos llenos de filamentos, revestido el conjunto por una membrana basal (Fig. 92). Están constituidos por prolongaciones astrocitarias que se interdigitan quizás algo menos complejamente que las descritas en el párrafo anterior, existiendo además pequeñas hendiduras extracelulares entre unas prolongaciones astrocitarias y otras, así como mecanismos de unión. A veces esos cordones contienen en su seno vasos, macrófagos (Fig. 93) o incluso somas astrocitarios.

El parénquima algo alejado del foco posee morfología enteramente normal, salvo algún astrocito o prolongación astrocitaria hipertrófica con número aumentado de filamentos intracitoplásmicos. Pueden verse células microgliales en reposo, y algunas con carga lisosómica aumentada. Los vasos todavía presentan algunas células perivasculares con cuerpos densos.

La meninge muestra una organización y desarrollo análogos a los de la etapa anterior. Pueden verse cordones sólidos

constituidos por células de citoplasma denso, que contienen algo de retículo rugoso o ribosomas libres, moderada cantidad de mitocondrias y algún cuerpo denso. Entre las células quedan frecuentes cavidades a modo de " bolsillos ", que contienen microfibrillas colágenas. En otros campos predomina la organización meníngea en forma de células con largas y finas prolongaciones que se solapan unas con otras a considerable distancia del soma celular, formando una laxa malla meníngea reticular.

En la cavidad se detecta una cantidad variable de microfibrillas colágenas (Fig. 94), así como algunos hacecillos de fibras oxitalanas (Fig. 95).

Es remarcable el hecho de que con cierta facilidad se observan células plasmáticas en el hueco, a veces extraordinariamente activas (Fig. 96), con gran dilatación del retículo endoplásmico rugoso, exhibiendo incluso algunas un contorno abollonado. Pueden relacionarse tanto con elementos meníngeos como con cordones gliales, y también se han visto inmersas en el parénquima, a nivel de la gliosis marginal.

4-5-6 MESES DE EVOLUCION:

En estas etapas ya no se aprecian corpúsculos gránulo-adiposos, pero sigue existiendo un moderado número de corpúsculos gránulo-férricos situados a todos los niveles, especialmente en regiones profundas.

En algunos casos pueden observarse delicados septos filiformes de apariencia fibrilar o fibro-vacular surcando el hueco de la herida, detectándose en los mismos alguna fibra glial con hematoxilina fosfotúngstica. Con el oro sublimado se pone de manifiesto una marcada gliosis alrededor del trayecto, con notable engrosamiento de las prolongaciones astrocitarias que se dirigen radialmente hacia el foco (Figs. 97 y 98).

Ultraestructuralmente, la glia limitans astrocitaria neoformada es de morfología superponible a la de las fases previas.

Los macrófagos continúan presentando gran cantidad de cuerpos densos de apariencia toscamente granular.

Las células meníngicas se organizan como ya hemos citado en fases anteriores. Algunas de ellas poseen cuerpos densos pequeños de aspecto finamente granular.

- 66 -

En la cavidad de la herida se visualizan con relativa frecuencia células plasmáticas provistas de un llamativo retículo endoplásmico rugoso muy dilatado y contorno externo a menudo irregular, con a veces prolongaciones bulbosas periféricas.

ETAPAS TARDIAS ( 7-12 MESES DE EVOLUCION):

A nivel de microscopía óptica no se detectan diferencias significativas con las fases inmediatamente previas. Únicamente es de destacar el hecho de que permanecen macrófagos cargados de hierro en todas las etapas estudiadas: siempre un número escaso o moderado de ellos, que se disponen bien aisladamente o tendiendo a formar pequeños grupos, tanto en el seno de la proliferación meníngea superficial como a niveles medios o profundos, inclusive en áreas donde el trayecto carece de luz. Estos macrófagos con gránulos de hemosiderina son los únicos que se visualizan, no observándose ninguno cargado exclusivamente con material lipóideo.

El estudio ultraestructural no aporta hallazgos especialmente llamativos. Hemos de citar la presencia de axones mielinizados en el interior de cordones gliales envueltos por membrana basal (Fig. 99) de morfología análoga a la descrita en etapas previas. Tales cordones pueden presentar surcos o invaginaciones ocupadas por microfibrillas colágenas, las cuales siempre se hallan separadas por basal de la superficie de la fibra glial (Fig. 100).

En escaso número, pero presentes en todas las fases y en cada uno de los casos estudiados, existen células plasmáticas situadas preferentemente a nivel del hueco de la herida.

Alguna de ellas presenta un retículo rugoso enormemente dilatado y lleno de un material electrodense (Fig. 101).

Siguen apareciendo macrófagos hasta las etapas más tardías, con masivos acúmulos de material electrodense granular (Fig. 102). Están tanto en el hueco como inmersos en la trama fibrilar astrocitaria de la glia limitans neoformada.

La organización de la meninge neoformada no sufre variaciones (Figs. 103 y 104).

Por último, en la etapa más avanzada (12 meses), son fácilmente detectables aumentos de la cantidad de lipofucsina intraneuronal, e incluso intraastrocitaria.

D I S C U S S I O N

**MACROFAGOS:**

Nuestro estudio demuestra claramente la presencia de macrófagos ya en etapas muy precoces, que - según hemos visto - forman una banda muy celular alrededor del material necrótico central tras 5 días de evolución de la herida.

Con las técnicas argénticas se confirma la existencia de una reacción microglial, comprobándose la traslación y evolución de los elementos microgliales, tal y como describió Río-Hortega (1932). Con las técnicas histoquímicas observamos cómo la práctica totalidad de los macrófagos que constituyen ese anillo tan celular poseen granulaciones fosfatasa ácida-positivas, mientras que granulaciones peroxidasa-positivas sólo las muestran una pequeña cantidad de macrófagos. La peroxidasa se ha detectado en los monocitos de varios animales (Dannenberg y cols., 1963; Van Furth y cols., 1970; Nichols y cols., 1971, Daems y Brederoo, 1973; Caxton-Martins y Daimon, 1976), y en el caso particular de la rata ha sido confirmado por Daems y cols. (1975, 1976) y por Bentfeld y cols. (1977). Sin embargo este enzima está ausente en los macrófagos endógenos cerebrales y en sus precursores, que por el contrario presentan granulaciones fosfatasa ácida-positivas (Hildebrand y Skoglund, 1971; Ling, 1977; Boya y cols., 1979). En este 5º día después de la operación existen en la pared de la herida una pequeña cantidad de macrófagos con granulaciones peroxidasa-positivas, que corresponderían a elementos sanguíneos extravasados, pero la mayor parte de los macrófa-

gos allí existentes no presentan este tipo de granulaci3n, por lo que no se les puede considerar de naturaleza hemat3gena.

Podemos admitir, por tanto, un doble origen para los macr3fagos que aparecen en las heridas cerebrales: unos fosfatasa 3cida-positivos y peroxidasa-negativos (macr3fagos end3genos de origen microglial) y otros fosfatasa 3cida-positivos y peroxidasa-positivos (ex3genos, de origen hemat3geno), siendo los macr3fagos end3genos considerablemente m3s abundantes que los hemat3genos.

No obstante, Blinzinger y cols. (1978) mantienen que los monocitos emigrados pierden con facilidad los gr3nulos peroxidasa-positivos al presentar aumentada su actividad fagoc3tica. Caso de admitir este hecho, podr3amos pensar que parte de los macr3fagos fosfatasa-3cida positivos y peroxidasa-negativos de nuestro estudio, pueden ser en realidad monocitos que han perdido su actividad peroxid3sica. Pero entonces deber3an encontrarse elementos peroxidasa-positivos en zonas alejadas del foco, donde todav3a no hayan tenido ocasi3n de fagocitar y de perder su actividad peroxid3sica, y no exclusivamente en las 3reas muy pr3ximas a la lesi3n, como de hecho ocurre.

Un gran n3mero de autores, que ya fueron citados en la Introducci3n, coinciden con nosotros en admitir que la microglia puede originar macr3fagos cerebrales, dejando tambi3n abierta la posibilidad de que monocitos sangu3neos puedan emigrar del

torrente circulatorio y dirigirse hacia el foco, transformándose en macrófagos.

Uno de los pilares fundamentales en los que se basan las escuelas japonesa y alemana para concluir que todos los macrófagos cerebrales son de origen monocitario y negar la existencia de macrófagos endógenos, es el empleo de técnicas autoradiográficas con timidina tritiada. A este respecto, Adrian y Schelper (1981) demuestran claramente (efectuando el mismo experimento utilizando dos marcadores distintos, timidina tritiada y uridina- $I^{125}$ ) que muchas de las células que aparecen marcadas en el tejido nervioso dañado cuando se inyecta timidina tritiada antes de la lesión se han marcado por reutilización de un precursor marcado de DNA que estaría disponible sistémicamente durante períodos de tiempo mucho mayores que los que hasta ahora se consideraban. Por tanto, parece necesaria una cuidadosa reinterpretación de aquellas conclusiones a las que se ha llegado en estudios con timidina tritiada como marcador.

Con respecto a la nomenclatura utilizada por la escuela alemana (Oehmichen, 1978) para designar a macrófagos y microglia, hemos de decir que no nos parece en absoluto clarificadora. Este autor, que niega que la microglia sea capaz de fagocitar, denomina a tal tipo celular "microglia en reposo" ("resting microglia"), mientras que a los macrófagos cerebrales (que para él son de origen exclusivamente monocitario) los llama "microglia progresiva" ("progressive microglia"). No acabamos de enten

der por qué llama de igual modo ("microglia") a dos tipos celulares para él tan distintos e independientes, variando únicamente el adjetivo calificativo ("resting" o "progressive").

Cronológicamente, en cuanto al tiempo en que tardan en aparecer los macrófagos en el borde de la herida, llegamos a conclusiones análogas a las de otros autores. Así para Huntington y Terry ( 1966 ) se aprecian ya a los dos días de la lesión, y para Al-Ali y Robinson (1982 a) a los cinco días hay, en las áreas de infiltración fagocítica, una alta positividad para las reacciones de fosfatasa ácida.

El destino de estos macrófagos plantea interesantes vías de discusión. En nuestros resultados hablamos de dos tipos de macrófagos, " corpúsculos gránulo-adiposos" (con citoplasma cargado de material lipóideo) y " corpúsculos gránulo-férricos" (conteniendo pigmento férrico en forma de gruesos gránulos de hemosiderina). El empleo de esta diferente denominación obedece sobre todo al deseo de respetar una nomenclatura clásica, ya que admitimos - como es lógico - que se trata de un mismo tipo celular que, según el tipo de material fagocitado, adoptará una u otra morfología.

Pero el comportamiento ulterior de tales macrófagos difiere claramente: mientras que los corpúsculos gránulo-adiposos van poco a poco disminuyendo en número hasta desaparecer por completo (virtualmente ausentes a partir de los 2 meses ), los

corpúsculos gránulo-férricos siempre permanecen en número moderado entre la proliferación meníngea o empotrados en las paredes de la herida, inclusive en las etapas más tardías estudiadas.

Hay diversas opiniones con respecto al destino de los macrófagos en las lesiones del tejido nervioso: bien entrarían en la circulación sanguínea o cederían el material fagocitado a la misma (Colmant, 1968; Kreutzberg, 1968; McKeever y Balentine, 1978), bien se lisarían (Fujita y Kitamura, 1976), o bien se convertirían de nuevo en células microgliales (Imamoto y Leblond, 1977; Ling, 1981). La última hipótesis está sustentada en el hecho de encontrar células microgliales marcadas en la lesión varios días después de que el foco estuviera rodeado por macrófagos previamente marcados, cuando ya éstos hubieran desaparecido. Creemos que tal evento podría explicarse por la captación por parte de células microgliales de pequeñas cantidades de marcador que hubieran escapado al espacio extracelular tras la lisis de un macrófago. Además, caso de admitir que los macrófagos reviertan a microglia, debería observarse con técnicas argentícas un claro aumento del número de células microgliales en reposo alrededor de la lesión cuando ya haya tenido lugar la cicatrización completa, cosa que no hemos podido evidenciar. Las otras dos hipótesis mencionadas las consideramos más factibles. En tal caso, un determinado macrófago cargado de material lipoi-deo podría con facilidad entregarlo al torrente sanguíneo, o ser tal material reabsorbido en casos de lisis celular. Cuando

un macrófago - por el contrario - esté totalmente repleto de una sustancia del tipo de la hemosiderina, consideramos que la entrega de la misma hacia la sangre debe ser más dificultosa, y además en casos de lisis celular otros macrófagos la fagocitarían de nuevo. Aparte de estas consideraciones, creemos que una célula tan masivamente cargada de hemosiderina como las que hemos visualizado (máxime cuando en muchas ocasiones aparecen atrapadas en una densa trama de prolongaciones astrocitarias llenas de filamentos), debe de presentar una acusada disminución de su motilidad y capacidad migratoria, lo cual podría dificultar su acercamiento al vaso y su hipotética entrada o entrega del material al torrente sanguíneo. Caso de ser ciertas estas consideraciones, se explicaría el por qué de la permanente presencia de macrófagos cargados de hierro en la zona de la cicatriz.

Con respecto a la posibilidad de que otros tipos celulares puedan ejercer funciones fagocíticas, creemos que la pequeña cantidad de cuerpos densos que presentan algunos astrocitos no es requisito suficiente para admitir que posean capacidad fagocitaria. Llegamos en este sentido a la misma conclusión que Al-Ali y Robinson (1982 b), quienes detectan un aumento del número de cuerpos densos intracitoplásmicos en los astrocitos (mantenido entre los 5 y 30 días post-lesión y decreciendo ulteriormente), pero la escasa actividad de fosfatasa ácida que presentan estas células les hace admitir que juegan un mínimo o nulo papel en los procesos de fagocitosis.

Tampoco hemos detectado cambios en los oligodendrocitos que puedan hacer pensar en una supuesta capacidad fagocitaria.

Al-Ali y Robinson (1982 a) admiten que las células del tejido conectivo pial pueden fagocitar. Nosotros, en efecto, hemos encontrado algún cuerpo denso en el citoplasma de las células leptomeníngicas, y en ocasiones, en etapas tardías, algún pequeño acúmulo de material electrodense granular similar al que se halla en grandes cantidades en el interior de los macrófagos. Podríamos entonces admitir cierta escasa capacidad fagocitaria de las células leptomeníngicas. En este sentido, no conviene olvidar que se ha demostrado (Merchant y Low, 1979) que cerca del 10% de los macrófagos subaracnoideos que aparecen en casos de severos cambios experimentales inducidos en la leptomeninge, parecen provenir de la transformación macrofágica de células piales reactivas, siendo el resto de naturaleza hematogena.

En cuanto a que las células perivasculares adventiciales y los pericitos posean capacidad de convertirse en macrófagos, nosotros respondemos afirmativamente, dada la gran carga lisosómica que hemos detectado en muchas células adventiciales, así como el contorno algo irregular y el despegamiento pericitario de la membrana basal que los envuelve. No comprendemos la postura de autores como Kitamura (1980), quien considera como monocitos emigrando esas imágenes del pericito con su superficie

despegada de la basal, pero todavía encerrado en la cavidad que forman las dos membranas. Si se tratara de monocitos circulantes escapando del vaso, ¿cómo interpretar la existencia de las dos membranas basales?.

En otro orden de cosas, citemos que la formación de células gigantes multinucleadas, que nosotros hemos detectado con suma facilidad al 5º día de evolución de la lesión, y de manera ocasional y errática en etapas posteriores, la consideramos como proveniente de la fusión de varios fagocitos para constituir células gigantes de cuerpo extraño. En la literatura sólo hemos encontrado una referencia al respecto, en el trabajo de Al-Ali y Robinson (1982 a), autores que las consideran consecuencia de una demora en la eliminación de la fibrina.

**VASOS SANGUINEOS:**

En nuestro estudio hemos comprobado ultraestructuralmente que en etapas precoces aparecen en el seno del material necrótico vasos de tipo capilar con endotelios prácticamente destruidos, pero que conservan morfológicamente casi intacta la membrana basal. Parece ser, pues, que tal membrana es la estructura más resistente del vaso, y que es capaz de permanecer cierto tiempo sin depender de los elementos celulares que la elaboraron. Tal hallazgo ya fue descrito por Schultz y Pease (1959), y corroborado más tarde por Blinzinger y cols. (1969).

Con respecto a la cronología del comienzo de los fenómenos de regeneración vascular, detectamos un activo crecimiento de capilares en los bordes de la lesión a los 5 días de evolución, en forma de yemas o brotes vasculares de apariencia maciza con microscopía óptica. En este sentido, hay una importante discordancia en los datos aportados por los diferentes autores. Así, Huntington y Terry (1966) encuentran proliferación capilar a los 12-13 días tras la lesión; Yanagihara y cols. (1967), a las 48 horas; Cavanagh (1970) y Cancilla y cols. (1979), a los 3 días; Du Bois y cols. (1985), a partir del 5º día con pico al 7º-10º día. Tales diferencias creemos que podrían ser debidas al diferente diseño experimental empleado: herida cerebral (Huntington y Terry, 1966; Cavanagh, 1970), implantación intracerebral de cuerpo extraño (Yanagihara y cols., 1967), lesión por frío (Cancilla y cols., 1979), o daño isquémico (Du Bois y cols.

, 1985). Además, Cancilla y De Bault (1980) repiten su experimento utilizando timidina tritiada como marcador, detectando la incorporación de la misma a células endoteliales de vasos sanguíneos del borde de la lesión, 3 días después de ésta.

Ultraestructuralmente, no hemos podido encontrar yemas vasculares macizas, sin luz central, pudiéndose interpretar siempre las imágenes obtenidas de tales supuestas estructuras como cortes tangenciales. Sí hemos visto una notable hipertrofia endotelial, sobre todo al 7<sup>º</sup>-10<sup>º</sup> día, existiendo siempre una hendidura luminal central de calibre variable. Las células endoteliales en estas etapas precoces poseen un retículo rugoso dilatado y polirribosomas en cantidad apreciable, lo cual lo interpretamos como signos de actividad. La membrana basal la hemos observado a menudo reduplicada y con irregularidades. A los 15 días de evolución todos estos cambios son ya poco patentes. Los datos ultraestructurales citados coinciden plenamente con los aportados por Cancilla y cols. (1979).

Un fenómeno interesante que hemos encontrado a los 7-10 días después de la herida es la presencia de numerosas vesículas pinocitósicas en el endotelio de algunos capilares situados en el borde de la lesión. Es sabido que los capilares cerebrales poseen una serie de especializaciones responsables de la constitución de la barrera hémato-encefálica: uniones estrechas interendoteliales, y ausencia de vesículas pinocitósicas y de fenestraciones (Cancilla y cols., 1979). Por la lesión,

puede haber apertura de uniones estrechas, incremento de la pinocitosis, y formación de canales entre las superficies luminal y abluminal del endotelio, e incluso de fenestraciones (Cancilla y cols., 1979). Por este motivo, creemos que el hallazgo de tales vesículas de pinocitosis en cantidad aumentada puede deberse a cierto grado de daño endotelial, lo que probablemente jugaría un papel importante en la formación o resolución del edema, tal y como concluye Castejón (1984) tras estudiar electromicroscópicamente los endotelios vasculares en casos de diversas patologías cerebrales acompañadas de edema.

No obstante, también podría pensarse que las vesículas pinocitósicas que hemos encontrado en capilares regenerados se deben ( en concomitancia o no con un daño vascular) a una inmadurez de la célula endotelial, con pérdida de las características morfológicas de la barrera hémato-encefálica adulta y comportamiento como barrera hémato-encefálica fetal, que como se sabe es inmadura y deficiente (Saunders, 1978).

En otro orden de cosas, parece ser que los macrófagos - que nosotros hemos visualizado con gran frecuencia en la inmediata vecindad de los vasos sanguíneos - jugarían un papel esencial en la regeneración vascular cerebral, ya que se ha comprobado (Beck y cols., 1983) que la depleción de macrófagos mediante irradiación disminuye significativamente (en comparación con los animales no irradiados) el índice de marcaje con timidina tritida de las células endoteliales reactivas, retardándose asimismo

la neoformación vascular a nivel del borde de la lesión. Tales diferencias de marcaje no ocurren en las lesiones cutáneas experimentales, por lo que los autores sugieren que los macrófagos sirven de estímulo para la regeneración del endotelio de los vasos cerebrales tras daño local por congelación, mientras que el endotelio de los capilares cutáneos no reaccionaría al influjo macrofágico. Sin embargo, en experimentos "in vitro" estos investigadores no han sido capaces de demostrar que macrófagos activados induzcan la proliferación de células endoteliales en cultivo de tejidos, aunque sí la migración de las mismas.

**ASTROCITOS:**

En nuestro estudio hemos comprobado que el asiento ultraestructural fundamental del edema radica en los astrocitos, y sólomente se aprecia edema extracelular en las áreas de mayor desestructuración muy próximas al magma necrótico del centro de la herida. El que los astrocitos juegan un papel importante en el edema cerebral está sustentado por numerosos investigadores (Gonatas y cols., 1963; Schröder y Wechsler, 1965; David y cols., 1967; Ikuta y cols., 1983). Además, se ha visto (Trachtenberg, 1983) que en lesiones contusas corticales los astrocitos son capaces de captar peroxidasa de rábano, lo cual podría representar un mecanismo de aclaramiento del espacio extracelular de proteínas séricas extravasadas.

Con respecto a la proliferación celular astrocitaria, hemos hallado figuras mitóticas, localizadas ultraestructuralmente en este tipo celular, en zonas situadas por fuera de la banda de macrófagos, a partir del 5º día de evolución de la lesión. Latov y cols. (1979) demuestran la actividad mitótica de los astrocitos combinando la técnica de inmunoperoxidasa para la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) con marcaje de timidina tritiada y autorradiografía, detectando marcaje autorradiográfico en astrocitos inmunoreactivos del área lesional. Cavanagh (1970) encuentra un pico máximo de actividad mitótica astrocitaria a los 3 días de la lesión, lo cual coincide bastante con los resultados de Fog y Pakkenberg (1983), quienes sitúan tal pico a los 2 días, y con Ikuta y cols. (1983) que lo establecen a los 3

días. Sin embargo, esta cronología está en franca discordancia con los hallazgos de Huntington y Terry (1966), quienes detectan la proliferación astrocitaria activa a los 12-13 días tras la herida.

Con las técnicas de la hematoxilina fosfotúngstica y especialmente con el oro sublimado, demostramos una apreciable gliosis ya a los 30 días de evolución de la lesión, con una gran hiper celularidad e hipertrofia de las prolongaciones astrogliales que se dirigen radialmente hacia el foco. Ultraestructuralmente hemos detectado un aumento de la cantidad de filamentos intracitoplásmicos en los astrocitos, que llega a ser patente ya a los 15 días, hecho más marcado en las prolongaciones celulares que van a constituir la glia limitans neoformada, o bien en los somas astrocitarios muy próximos a la misma. Con el tiempo, la cantidad de filamentos llega a ser masiva, y no hemos podido verificar disminución en su número o densidad, ni siquiera en las fases más tardías estudiadas. A este respecto, Dahl y Bignami (1983) mencionan que la transformación de astrocitos protoplásmicos en astrocitos fibrosos con positividad inmunohistoquímica para la GFAP, persiste por períodos indefinidos de tiempo. Sin embargo, Al-Ali y Robinson (1982 b) hacen notar que a partir de los 2 meses disminuye algo la cantidad de filamentos intracitoplásmicos astrocitarios.

Un dato fundamental es la cronología de la aparición de la membrana basal que limita la cavidad de la herida, lo

cual consideramos que marca el comienzo de una cicatrización eficaz con neta y plena separación de los elementos mesodérmicos y neuroectodérmicos. Nuestros resultados indican que a los 10 días de evolución de la lesión ya existen áreas revestidas por basal, tornándose este revestimiento prácticamente completo a los 15 días. Esta basal siempre descansa sobre células o prolongaciones de células de inequívoca naturaleza astrocitaria. A este respecto, las escasas publicaciones existentes aportan conclusiones similares. Así, Feringa y cols. (1984), estudiando la formación de membrana basal entre tejido nervioso y tejido cicatricial, observan que a los 15 días después de la sección de la médula espinal hay membrana basal en muchas áreas, siempre inmediatamente adyacente a la superficie de una célula glial de tipo astrocitario y en general con colágeno en su vecindad. Bernstein y cols. (1985), empleando un diseño experimental análogo, detecta la basal más tempranamente: a los 4-5 días ven una lámina con agregados de partículas de electrodensidad variable inmersas en una matriz densa, y a los 6-10 días ya observan una membrana basal de morfología enteramente normal.

Parece ser que el colágeno podría ser un desencadenante para la formación de membrana basal por las células astrocitarias (Berry y cols., 1983; Feringa y cols., 1984; Maxwell y cols., 1984). Nosotros hemos detectado con bastante frecuencia microfibrillas colágenas en estrecha vecindad con la membrana basal neoformada.

La nueva glia limitans constituida, según nuestros resultados, posee tres características ultraestructurales fundamentales: a) grosor aumentado, con prolongaciones astrocitarias anchas y gruesas, enormemente ricas en filamentos; b) gran complejidad de las interdigitaciones de tales prolongaciones; y c) llamativa irregularidad en la superficie, con invaginaciones y evaginaciones prominentes. Esto último explica la existencia a nivel del hueco de los cordones gliales macizos revestidos por membrana basal que hemos visto seccionados en todas las direcciones. Tales irregularidades superficiales también han sido verificadas en la médula espinal tras lesión de raíces dorsales (Nathaniel y Nathaniel, 1981), y en cerebros humanos tanto normales como con diversas patologías (Ramsey, 1965). Según nuestra opinión, deben ser interpretadas como resultantes de la plasticidad y capacidad reparativa del astrocito.

De más difícil explicación puede resultar el hallazgo de fibras nerviosas mielínicas en el interior de un cordón glial macizo en el seno del hueco, tal y como hemos descrito en nuestros resultados. Lo más lógico es pensar que fibras nerviosas mielinizadas que se sabe que aparecen en la leptomeninge (Krahn, 1983) puedan acompañar en parte a la proliferación meníngea hacia el interior de la herida, y ser recubiertas entonces por prolongaciones astrocitarias que todavía no hubieran sintetizado su membrana basal, durante fases tempranas de la reparación de la lesión.

La frecuente e íntima relación ultraestructural de haces de microfibrillas colágenas con los cordones gliales, permite dar una explicación sencilla al frecuente hallazgo, en los cortes para microscopía óptica teñidos con hematoxilina fosfotúngstica, de fibras colágenas teñidas de rojo mezcladas con alguna delicada fibra teñida de azul, de carácter glial, en el seno de la trama fibrilar presente en el hueco de la lesión.

**MENINGE:**

En nuestro estudio hemos detectado una regeneración meníngea evidente ya a los 15 días de evolución de la lesión, observándose con microscopía óptica cómo - especialmente en las regiones más superficiales del trayecto - existe una proliferación de elementos fibroblastoides de núcleo ovalado o alargado que se disponen en haces, en ocasiones rodeando circularmente a vasos sanguíneos, y otras veces en forma dispersa, con elementos aislados de tosca morfología estrellada.

Con microscopía electrónica comprobamos que en esta misma fase hay ya en el seno de la cavidad de la herida, en las áreas próximas a la glia limitans neoformada, numerosas prolongaciones celulares filiformes que tienden a solaparse unas con otras, relacionándose con frecuencia mediante complejos de unión. Las células que constituyen esta verdadera malla laxa reticular gracias a la considerable distancia a la que envían sus prolongaciones, poseen un aparato de Golgi bien desarrollado, retículo rugoso a menudo dilatado y abundantes polirribosomas, todo lo cual sería un indicio de actividad celular, hecho lógico tratándose de elementos regenerativos en una fase evolutiva temprana. Estas células o sus prolongaciones tienden a rodear a vasos sanguíneos, y se relacionan a menudo con hacecillos de microfibrillas colágenas o microfibrillas individuales.

A partir de los 20 días, además de lo anterior, son ya muy patentes ultraestructuralmente los acúmulos meningocitarios sólidos, con células de naturaleza similar a la descrita, que se unen a veces mediante complejos de unión, y que dejan frecuentemente pequeñas cavidades o huecos entre células adyacentes, que suelen estar ocupados por abundantes microfibrillas colágenas. En ocasiones estos acúmulos celulares sólidos adoptan una morfología arremolinada, lo cual sería indicio de reactividad.

Durante todas las fases estudiadas se mantiene este tipo de organización de la meninge, que, en resumen, podemos establecer que se realiza siguiendo dos patrones morfológicos fundamentales: a) malla laxa reticular, con células aisladas de morfología estrellada que envían prolongaciones a considerable distancia del soma, solapándose unas con otras, tendiendo siempre estos elementos a revestir cualquier estructura que se halle en el nuevo espacio subaracnoideo constituido, tanto vasos como cordones gliales macizos; y b) acúmulos meningocitarios sólidos, bien en forma de cordones anchos y alargados, bien en forma de masas celulares más redondeadas. Nunca existe ningún tipo de relación definida con membranas basales.

Los únicos cambios que ocurren con el transcurso del tiempo son una disminución de la cantidad de organoides, hecho que tiene lugar de manera paulatina, de modo que a partir de los 30-45 días son relativamente escasos, con Golgi poco prominente, algunas cortas cisternas de retículo rugoso, y rosetas polirri-

bosómicas dispersas, juntamente con algún cuerpo denso.

El único estudio efectuado hasta la fecha que aborda la regeneración meníngea es el de Schultz y Pease (1959), quienes básicamente obtienen hallazgos similares a los nuestros, si bien en etapas tardías (225 días tras la herida cerebral) refieren que la masa de células meníngeas que ha colonizado el hueco es compacta, mezclada con colágeno, no haciendo mención de la existencia de algo similar a lo que nosotros hemos denominado "malla laxa".

Esta regeneración meníngea que describimos, en realidad, lo que hace es reproducir en gran parte la organización de la meninge normal. Nosotros, en la leptomeninge normal que rodea al tallo de la glándula pineal de la rata, que presenta siempre un engrosamiento a ese nivel, hemos visto tanto una malla laxa de finas prolongaciones de células meningocitarias como incluso acúmulos celulares meníngeos sólidos, si bien aquélla era de menor complejidad que la descrita en el caso de la herida, y éstos eran algo más delgados y nunca de morfología arremolinada.

En las descripciones anatómicas sobre la leptomeninge normal se ha descrito que las células leptomeníngeas tienen múltiples prolongaciones que se solapan unas con otras, delimitando cavidades a modo de túneles que contienen fibras conectivas (Andres, 1967; Himango y Low, 1971; Oda y Nakanishi, 1984). La cubierta pial sería más delgada que la aracnoidea, y en muchas

zonas constaría sólo de una célula de grosor, existiendo a veces fenestraciones, de manera que la lámina basal que cubre la glia limitans está expuesta directamente al espacio subaracnoideo (Brightman, 1965; Morse y Low, 1972; Oda y Nakanishi, 1984). Este último aspecto lo hemos comprobado en el material de nuestro estudio con gran frecuencia.

Además de las microfibrillas colágenas hemos encontrado otro tipo de fibrilla, de 10-15 nm. de grosor, carentes de estriación transversal, y con aparente estructura tubular. Se trata de fibras oxitalanas, que aparecen en escaso número, algo onduladas, a veces dispuestas aisladamente pero con más frecuencia en pequeños haces más o menos desordenados, y relacionados por lo general con microfibrillas colágenas.

Las fibras oxitalanas fueron descritas por primera vez por Fullmer y Lillie (1958), como un tipo especial de fibra del tejido conectivo, que posteriormente ha sido incluido en un grupo compuesto por tres tipos interrelacionados de fibras: elásticas, oxitalanas y de elaunina (Cotta-Pereira y cols., 1978). Según Fullmer (1960), poseen las siguientes características: a) no se tiñen con las técnicas de rutina para fibras elásticas; b) se tiñen con tales técnicas cuando se someten previamente los cortes a una pre-oxidación con ácido peracético; y c) se hallan en tejidos adultos normales.

Ultraestructuralmente estas fibras corresponden a fibrillas de 10-15 nm. de grosor, sin estriación transversal, siendo muy similares al componente microfibrilar periférico de las fibras elásticas (Carmichael y Fullmer, 1966; Sheetz y cols., 1973; Cotta-Pereira y cols., 1976, 1978; Soames y Davies, 1978; Alexander y cols., 1981; Goldfischer y cols., 1983).

Las fibras oxitalanas se han descrito en diversos lugares: ligamento periodóntico (Sims, 1975; Soames y Davies, 1978), dermis (Cotta-Pereira y cols., 1976), córnea (Alexander y cols., 1981), glándula pineal (Calvo y Boya, 1983), y adventicia aórtica (Takagi y cols., 1984). Sin embargo, hasta la fecha no habían sido identificadas en meninge, si bien Oda y Nakanishi (1984) mencionan fibrillas de morfología similar, pero sin identificarlas en absoluto como oxitalanas.

Creemos que estas fibras no pueden interpretarse como fibrillas de pre-elastina, debido a que en ninguna ocasión hemos visualizado fibras elásticas. Además, incluso su estructura tubular ha sido ya descrita ("fibrotúbulos" de Cotta-Pereira y cols., 1976; Calvo y Boya, 1983). En observaciones que hemos realizado en una investigación paralela, estudiando la leptomeninge normal de la región del tallo pineal, hemos hallado este tipo fibrilar, por lo que concluimos que se trata de una población de fibras adicional a las colágenas, constituyente leptomeningeo normal, que como es lógico existe también en la leptomeninge regenerada, si bien en ésta hace su aparición en etapas

más tardías que las microfibrillas colágenas.

Con respecto al constante hallazgo ultraestructural a partir de los 45 días de evolución de la lesión de células plasmáticas situadas preferentemente en el seno de la cavidad de la herida, algunas muy activas con gran dilatación de retículo rugoso, creemos que podría ser debido a una cierta cronicidad del proceso. En etapas previas hemos visto algún ocasional linfocito emigrante inmerso en el parénquima cercano al borde de la herida y raras veces en el seno del hueso, los cuales no han sido observados ulteriormente, pudiendo haberse transformado ya en células plasmáticas. La única aportación bibliográfica relacionada con este hallazgo la aportan Schultz y Pease (1959), quienes en fases tardías ( a partir de los 30 días de la herida) detectan células plasmáticas, muchas de ellas con retículo rugoso enormemente dilatado. Sin embargo, los autores no hacen comentarios sobre estos hallazgos en la discusión de su publicación.

CONCLUSIONES

- 1) En las lesiones en las que se produce una necrosis amplia de tejido nervioso, no se consigue rellenar la pérdida de parenquima, quedando siempre una depresión a ese nivel.
- 2) Los macrófagos hacen su aparición en etapas muy precoces. Al 5º día después de la lesión ya se ha formado una banda muy celular alrededor del material necrótico.
- 3) Con técnicas argénticas se confirma la existencia de una activación microglial, comprobándose la hiperplasia, hipertrofia y traslación de los elementos microgliales hacia el foco de lesión.
- 4) La práctica totalidad de los macrófagos que aparecen son fosfatasa ácida-positivos, mientras que sólo una pequeña cantidad de los mismos son peroxidasa-positivos, por lo que admitimos un doble origen para tales macrófagos: unos fosfatasa ácida-positivos y peroxidasa-negativos (macrófagos endógenos, de origen microglial), y otros fosfatasa ácida-positivos y peroxidasa-positivos (exógenos, de origen hematógeno).
- 5) Estos macrófagos permanecen en la lesión por períodos de tiempo considerablemente mayores que en procesos reparativos de otras partes del organismo.

- 6) Las células perivasculares adventiciales y los pericitos son una fuente adicional de macrófagos cerebrales.
- 7) Las células leptomeníngicas parecen poseer una pequeña capacidad fagocitaria.
- 8) La lámina basal es la estructura vascular más resistente, siendo capaz de permanecer en las áreas de necrosis cierto tiempo después de desaparecer los elementos celulares del vaso.
- 9) A los 5 días de evolución de la lesión hay ya una franca reacción vascular neoformativa.
- 10) Ultraestructuralmente los brotes vasculares se caracterizan por poseer endotelios muy hipertróficos con abundancia de organoides, vesículas pinocitósicas y hendiduras lumbinales, rodeados por una lámina basal irregular y a menudo reduplicada.
- 11) A los 30 días los capilares neoformados presentan una ultraestructura dentro de los límites de la normalidad.
- 12) El asiento ultraestructural fundamental del edema radica en los astrocitos, apreciándose edema extracelular únicamente en las áreas de mayor desestructuración tisular.

- 13) Al 5º día de la lesión, ya aparecen las primeras figuras de mitosis en células astrocitarias.
- 14) A los 10 días tras la punción ya existen pequeñas áreas que poseen una lámina basal que recubre la pared interna del trayecto. A los 15 días se consigue ya el revestimiento prácticamente completo.
- 15) Una lámina basal siempre descansa sobre prolongaciones celulares de inequívoca naturaleza astrocitaria.
- 16) A los 30 días de evolución son apreciables ya fenómenos de gliosis, con notable hiper celularidad y gran hipertrofia de las prolongaciones astrogliales que se orientan hacia el foco de lesión.
- 17) Ultraestructuralmente se detecta un aumento de la cantidad de microfilamentos citoplásmicos en los astrocitos, lo cual es patente ya a los 15 días de evolución de la lesión.
- 18) La glia limitans o barrera glial limitante que se constituye posee un mayor grosor que la glia limitans normal. Presenta gran complejidad en las interdigitaciones de las prolongaciones astrocitarias que la forman.

- 19) La superficie de la barrera glial limitante neoformada es muy irregular. Es frecuente la existencia de paquetes de prolongaciones de astrocitos que pasan al " territorio" meníngeo, pero siempre presentan un revestimiento continuo de lámina basal.
- 20) Existe una regeneración meníngea que comienza a ser evidente a los 15 días de evolución de la herida.
- 21) Ultraestructuralmente la regeneración meníngea se realiza en forma de malla reticular formada por prolongaciones de meningocitos estrellados o por acúmulos meningocitarios sólidos.
- 22) Se han detectado distintos grados de activación de las células meníngeas en relación con la regeneración, lo cual se refleja ultraestructuralmente en la variable cantidad de organoides.
- 23) La organización de la meninge neoformada reproduce con bastante fidelidad la estructura de la meninge normal en la mayor parte de la superficie regenerada.
- 23') En la meninge regenerada aparecen tractos gruesos y macizos de meningocitos, que no son frecuentes en la meninge normal.

- 98 -

24) Se demuestra la existencia de fibras oxitalanas en la meninge regenerada.

B I B L I O G R A F I A

- ADRIAN, E.K. y SCHELPER, R.L.: " Microglia, monocytes and macrophages". En: Fedoroff, S., " Glial and neuronal cell biology". pp. 113-124. Alan R. Liss, Inc. New York (1981)
- ADRIAN, E.K. y WILLIAMS, M.G.: " Cell proliferation in injured spinal cord. An Electron microscopic study". J. Comp. Neurol. 151:1-24 (1973).
- AL-ALI, S.Y.A. y ROBINSON, N.: "Response of cortical astrocytes to a needle wound seen ultrastructurally". J. Anat. 126:420 (1978).
- AL-ALI, S.Y.A. y ROBINSON, N.: " Brain phagocytes: source of high acid phosphatase activity". Am. J. Pathol. 107: 51-58 (1982 a).
- AL-ALI, S.Y.A. y ROBINSON, N.: " Ultrastructural study of enzymes in reactive astrocytes: clarification of astrocytic activity". Histochem. J. 14:311-321 (1982 b).
- AL-ALI, S.Y.A. y ROBINSON, N.: " Neuronal and oligodendrocytic response to cortical injury: ultrastructural and cytochemical changes". Histochem. J. 16:165-178 (1984).
- ALEXANDER, R.A., CLAYTON, D.C., HOWES, R.C. y GARNER, A.: "Effect of oxidation upon demonstration of corneal oxytalan fibres: a light and electron microscopical study". Med. Lab. Sci. 38:91-101 (1981).
- ANDRES, K.H.: " Zur feinstruktur der arachnoidalzotten bei mammalia". Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 82:92-109 (1967)

- BARON, M. y GALLEGO, A.: " The relation of the microglia with the pericytes in the cat cerebral cortex". Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 128:42-57 (1972).
- BARRETT, C.P., DONATI, E.J. y GUTH, L.: "Differences between adult and neonatal rats in their astroglial response to spinal injury". Exp. Neurol. 84:374-385 (1984).
- BECK, D.W., HART, M.N. y CANCELLA, P.A.: " The role of the macrophage in microvascular regeneration following brain injury". J. Neuropathol. Exp. Neurol. 42:601-614 (1983).
- BENTFELD, M.E., NICHOLS, B.A. y BAINTON, D.F.: " Ultrastructural localization of peroxidase in leukocytes of rat bone marrow and blood". Anat. Rec. 187: 219-240 (1977).
- BERNER, A., TORVIK, A. y STENWIG, A.E.: " Origin of macrophages in traumatic and wallerian degeneration in peripheral nerves". Acta Neuropathol. 25:228-236 (1973).
- BERNSTEIN, J.J., GETZ, R., JEFFERSON, M. y KELEMEN, M.: "Astrocytes secrete basal lamina after hemisection of rat spinal cord". Brain Res. 327:135-141 (1985).
- BERRY, M., MAXWELL, W.L., LOGAN, A., MATHEWSON, A., McCONNELL, P., ASHHURST, D.E. y THOMAS, G.H.: " Deposition of scar tissue in the central nervous system". Acta Neurochirurg. , Suppl. 32, 31-53 (1983).
- BIGNAMI, A. y RALSTON, H.J.: " The cellular reaction to wallerian degeneration in the central nervous system of the cat". Brain Res. 13:444-461 (1969).

- BLAKEMORE, W.F.: " The ultrastructure of the subependymal plate in the rat". J. Anat. 104:423-433 (1969).
- BLAKEMORE, W.F.: " Microglial reactions following thermal necrosis of the rat cortex: an electron microscopic study". Acta Neuropathol. 21:11-22 (1972).
- BLAKEMORE, W.F.: " The ultrastructure of normal and reactive microglia". Acta Neuropathol., Suppl. VI, 273-278 (1975).
- BLINZINGER, K. y HAGER, H.: " Elektronenmikroskopische untersuchungen über die feinstruktur ruhender und progressiver mikrogliazellen im säugetiergehirn". Beith. Pathol. Anat. 127:173-192 (1962).
- BLINZINGER, K.H. y KREUTZBERG, G.: "Displacement of synaptic terminals from regenerating motor neurons by microglial cells". Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 85:145-157 (1968).
- BLINZINGER, K., REWCASTLE, N.B. y HAGER, H.: "Observations on prismatic type mitochondria within astrocytes of the syrian hamster brain". J. Cell Biol. 25:293-301 (1965).
- BLINZINGER, K., MATSUSHIMA, A. y ANZIL, A.P.: "High structural stability of vascular and glial basement membranes in areas of total brain tissue necrosis". Experientia (Basel) 25:976-977 (1969).
- BLINZINGER, K.H., HERRLINGER, H., LUH, S. y ANZIL, A.P.: "Ultrastructural cytochemical demonstration of peroxidase-positive monocyte granules: an additional method for studying the origin of mononuclear cells in encephalitic lesions". Acta Neuropathol. (Berl.) 43:55-61 (1978).

- BOYA, J.: " Contribution to the ultrastructural study of microglia in the cerebral cortex". Acta Anat. 92:364-375 (1975).
- BOYA, J.: " An ultrastructural study of the relationship between pericytes and cerebral macrophages". Acta Anat. 95:598-608 (1976).
- BOYA, J., CALVO, J. y PRADO, A.: " The origin of microglial cells". J. Anat. 129:177-186 (1979).
- BRIERLEY, J.B. y BROWN, A.W.: " The origin of lipid phagocytes in the central nervous system: I. The intrinsic microglia". J. Comp. Neurol. 211:397-406 (1982 a).
- BRIERLEY, J.B. y BROWN, A.W.: " The origin of lipid phagocytes in the central nervous system: II. The adventicia of blood vessels". J. Comp. Neurol. 211:407-417 (1982 b).
- BRIGHTMAN, M.W.: " The distribution within the brain of ferritin injected into cerebrospinal fluid compartments. II. Parenchymal distribution". Am. J. Anat. 117:193-219 (1965).
- BRIGHTMAN, M.W. y REESE, T.S.: " Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain". J. Cell Biol. 40:648-677 (1969).
- CALEY, D.W. y MAXWELL, D.S.: " Development of the vessels and extracellular spaces during postnatal maturation of rat cerebral cortex". J. Comp. Neurol. 138:31-48 (1970).

- CALVO, J. y BOYA, J.: "Oxytalan fibres in the rat pineal gland". J. Anat. 136:363-366 (1983).
- CAMMERMEYER, J.: "The life history of the microglial cell: a light microscopic study". Neurosci. Res. 3:43-129 (1970).
- CANCELLA, P.A. y DE BAULT, L.E.: " Freeze-injury and repair of cerebral microvessel". Adv. Exp. Med. Biol. 131:257-269 (1980).
- CANCELLA, P.A., FROMMES, S.P., KAHN, L.E. y DE BAULT, L.E.: " Regeneration of cerebral microvessels. A morphologic and histochemical study after local freeze-injury". Lab. Invest. 40:74-82 (1979).
- CARMICHAEL, G.G. y FULLMER, H.M.: " The fine structure of the oxytalan fiber". J. Cell biol. 28:33-36 (1966).
- CASTEJON, O.J.: " Increased vesicular and vacuolar transport in traumatic human brain edema. A combined electron microscopic study and theoretical approach". J. Submicrosc. Cytol. 16:359-369 (1984).
- CAVANAGH, J.B.: " The proliferation of astrocytes around a needle wound in the rat brain". J. Anat. 106:471-487 (1970).
- CAXTON-MARTINS, A. y DAIMON, T.: " Histochemical observations on chicken blood and bone marrow cells". J. Anat. 122:553-558 (1976).

- CERRO, M. del y MONJAN, A.A.: " Unequivocal demonstration of the hematogenous origin of brain macrophages in a stab wound by a double-label technique". *Neuroscience* 4: 1399-1404 (1979).
- COLMANT, H.J.: "Allgemeine histopathologie der glia". *Acta Neuropathol., Suppl.* 4, 61-76 (1968).
- COLONNIER, M.: " Experimental degeneration in the cerebral cortex". *J. Anat.* 98:47-54 (1964).
- COOK, R.D. y WISNIEWSKI, H.M.: "The role of oligodendroglia and astroglia in wallerian degeneration of the optic nerve ". *Brain Res.* 61:191-206 (1973).
- COTTA-PEREIRA, G., GUERRA RODRIGO, F. y DAVID FERREIRA, J.F.: " The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic and elastic-related fibers". *Stain Technol.* 51: 7-11 (1976).
- COTTA-PEREIRA, G., GUERRA RODRIGO, F. y DAVID FERREIRA, J.F.: " Comparative study between the elastic system fibers in human thin and thick skin". *Biol. Cellulaire* 31:297-302 (1978).
- DAEMS, W.Th y BREDEROO, P.: " Electron microscopical studies on the structure, phagocytic properties and peroxidatic activity of resident and exudate peritoneal macrophages in the Guinea pig". *Z. Zellforsch.* 144:247-297 (1973).

- DAEMS, W. Th., WISSE, E., BREDEROO, P. y EMEIS, J.J.: "Peroxi-datic activity in monocytes and macrophages". En: Van Furth, R. " Mononuclear phagocytes in immunity, infection and pathology". pp. 57-77. London, Blackwell Scientific Publishers (1975).
- DAEMS, W.Th., KOERTEN, H.K. y SORANZO, M.R.: "Differences between monocyte-derived and tissue macrophages". En: REICHARD, S.M., ESCOBAR, M.R. y FRIEDMAN, H. " The reticulo-endothelial system in health and disease: functions and characteristics". pp. 27-40. New York, Plenum Publishing Corporation (1976).
- DAHL, D. y BIGNAMI, A.: " The glial fibrillary acidic protein and astrocytic 10-nanometer filaments". En : LAJTHA, A. "Handbook of Neurochemistry". Vol. 5 pp. 127-151. Plenum Publishing Corporation. (1983).
- DANNENBERG, A.M. Jr., BURSTONE, M.S., WALTER, P.C. y KINSLEY, J.W.: " A histochemical study of phagocytic and enzymatic functions of rabbit mononuclear and polymorphonuclear exudate cells and alveolar macrophages". J. Cell Biol. 17:465-486 (1963).
- DAVID, E., MARX, I. y DAVID, H.: " The ultrastructure of experimentally induced subacute and chronic edema of the brain". Acta Neuropathol. 9:217-232 (1967).
- DODSON, R.F.: " Electron microscopy of microvascular pericytes in the brain". Cytobios 7:183-188 (1973).

- DODSON, R.F., TAGASHIRA, Y. y WAI-FONG GHU, L.: " Acute pericytic response to cerebral ischemia". J. Neurol. Sci. 29: 9-16 (1976).
- DU BOIS, M., BOWMAN, P.D. y GOLDSTEIN, G.W.: " Cell proliferation after ischemic injury in gerbil brain. An immunocytochemical and autoradiographic study". Cell Tissue Res. 242:17-23 (1985).
- DUFFY, P.E.: "Astrocytes: normal, reactive and neoplastic". Raven Press, New York (1983).
- EAGER, R.P. y EAGER, P.R.: " Glial responses to degenerating cerebellar cortico-nuclear pathways in the cat". Science 153:553-555 (1966).
- ESIRI, M.M. y BOOSS, J.: " Comparison of methods to identify microglial cells and macrophages in the human central nervous system". J. Clin. Pathol. 37:150-156 (1984).
- FAHIMI, H.D.: "Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes)". J. Cell Biol. 43:275-288 (1969).
- FEIGIN, I.: " Mesenchymal tissues of the nervous system. The indigenous origin of brain macrophages in hypoxic states and in multiple sclerosis". J. Neuropathol. Exp. Neurol. 28:6-24 (1969).
- FERINGA, E.R., VAHLSING, H.L., y WOODWARD, M.: " Basal lamina at the site of spinal cord transection in the rat: an ultrastructural study". Neurosci. Lett. 51:303-308 (1984).

- FERNANDEZ, B., SUAREZ, I. y GIANONATTI, C.: " Fine structure of astrocytic mitochondria in the hypothalamus of the hamster". J. Anat. 137:483-488 (1983).
- FERNANDO, D.A.: " A third glial cell seen in retrograde degeneration of the hypoglossal nerve". Brain Res.27:365-368 (1971).
- FERNANDO, D.A.: " An electron microscopic study of the neuroglial reaction in the hypoglossal nucleus after transection of the hypoglossal nerve". Acta Anat. 86:1-14 (1973)
- FOG, R. y PAKKENBERG, H.: " Mitotic activity in the mouse brain after cortical and striatal lesions". J. Hirnforsch . 24: 341-343 (1983).
- FUJITA, S.: "Cytogenesis and pathology of neuroglia and microglia". Path. Res. Pract. 168:271-278 (1980).
- FUJITA, S. y KITAMURA, T.: "Origin of brain macrophages and the nature of the so-called microglia". Acta Neuropathol. (Berl.), Suppl. 6, 291-296 (1975).
- FUJITA, S. y KITAMURA, T.: " Origin of brain macrophages and the nature of the microglia". En: ZIMMERMAN, H.M., "Progress in neuropathology". Vol. III. pp. 1-50. New York. (1976).
- FUJITA, S., TSUCHIHASHI, Y. y KITAMURA, T.: "Origin, morphology and function of the microglia". En: FEDOROFF, S., "Glial and neuronal cell biology". pp. 141-169. Alan R. Liss, Inc. New York (1981).

- FULLMER, H.M.: " A comparative study of elastic, pre-elastic and oxytalan connective tissue fibers". J. Histochem. Cytochem. 8:290-295 (1960).
- FULLMER, H.M. y LILLIE, R.D.: " The oxytalan fiber: a previously undescribed connective tissue fiber". J. Histochem. Cytochem. 6:425-430 (1958).
- GAYOSO, M.J., AGUDO, J., ARECHAGA, J., REVELLES, F. y DIAZ-FLORES, L.: " Estudio ultraestructural de la oligodendroglia reactiva en heridas cerebrales". Morfol. Norm. Patol. Secc. A 6:53-64 (1982).
- GLEES, P.: " Neuroglia, morphology and function". Thomas Springfield, Illinois (1955).
- GOLDFISCHER, S., COLTOFF-SCHILLER, B., SCHWARTZ, E. y BLUMENFELD, O.O.: " The infrastructure of aortic elastic fibers ". Tissue & Cell 15:429-435 (1983).
- GONATAS, N.K., ZIMMERMAN, H.M. y LEVINE, S.: " Ultrastructure of inflammation with edema in the rat brain". Amer. J. Path. 42:455-469 (1963).
- GUTH, L. y WATSON, P.K.: " A correlated histochemical and quantitative study on cerebral glycogen after brain injury in the rat". Exp. Neurol. 22:590-602 (1968).
- HAGER, H., LUH, S., RUSCAKOVA, D. y RUSCAK, M.: "Histochemical, electron microscopic and biochemical studies on glycogen storage in reactively altered astrocytes in the cerebral cortex of mammals with traumatic lesions". Z. Zellforsch. 83:295-320 (1967).

- HILDEBRAND, C. y SKOGLUND, S.: " Histochemical studies of adult and developing feline spinal cord white matter". Acta Physiol. Scand. Suppl. 364:145-173 (1971).
- HIMANGO, W.A. y LOW, F.N.: " The fine structure of a lateral recess of the subarachnoid space in the rat". Anat. Rec. 171:1-20 (1971).
- HUNTINGTON, H.W. y TERRY, R.D.: " The origin of the reactive cells in cerebral stab wounds". J.Neuropathol. Exp. Neurol. 25:646-653 (1966).
- IKUTA, F., YOSHIDA, Y., OHAMA, E., OYANAGI, K., TAKEDA, S., YAMAZAKI, K. y WATANABE, K.: " Revised pathophysiology on BBB damage: the edema as an ingeniously provided condition for cell motility and lesion repair". Acta Neuropathol. (Berl.). Suppl. VIII, 103-110 (1983).
- IMAMOTO, K.: " Electron microscopic observations in the trigeminal mesencephalic nucleus following neurotomy of the third division of the trigeminal nerve". Arch. Histol. Jpn. 34:361-374 (1972).
- IMAMOTO, K. y LEBLOND, C.P.: " Presence of labelled monocytes , macrophages and microglia in a stab wound of the brain following an injection of bone marrow cells labelled with <sup>3</sup>H-uridine into rats". J. Comp. Neurol. 174:255-280 (1977).
- IMAMOTO, K. y LEBLOND, C.P.: "Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats.II. Origin of microglial cells".J.Comp.Neurol. 180:139-164 (1978).

- KAWAGUCHI, M.: " Electron microscopic and histochemical studies on the amoeboid microglial cells in the developing chick brain". Acta Anat. Nippon. 53:219-237 (1978).
- KAWAGUCHI, M.: " Electron microscopic study on the amoeboid microglial cells in the roof plate of the early chick embryo brain". Arch. Histol. Jpn. 43:311-317 (1980).
- KING, J.S.: " A light and electron microscopic study of perineuronal glial cells and processes in the rabbit neocortex". Anat. Rec. 161:111-124 (1968).
- KITAMURA, T.: " The origin of brain macrophages. Some considerations on the microglia theory of Del Río-Hortega". Acta Path.Jap. 23:11-26 (1973).
- KITAMURA, T.: " Dynamic aspects of glial reactions in altered brains". Path. Res. Pract. 168:301-343 (1980).
- KITAMURA, T., TSUCHIHASHI, Y., TATEBE, A. y FUJITA, S.: "Electron microscopic features of the resting microglia in the rabbit hippocampus, identified by silver carbonate staining". Acta Neuropath. (Berl.). 38:195-201 (1977).
- KITAMURA, T., MIYAKE, T. y FUJITA, S.: " Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus". J. Comp. Neurol. 226:421-433 (1984).
- KONIGSMARK, S.W. y SIDMAN, R.L.: " Origin of brain macrophages in the mouse". J. Neuropathol. Exp. Neurol. 22:643-676 (1963).



- KRAHN, V.: " Nerve sheaths in the leptomeningeal connective tissue". Acta Anat. 116:84-89 (1983).
- KREUTZBERG, G.W.: " Uber perineuronale mikrogliazellen (autoradiographische untersuchung)". Acta Neuropathol., Suppl. 4, 643-676 (1968).
- KRUGER, L. y MAXWELL, D.S.: " Electron microscopy of oligodendrocytes in normal rat cerebrum". Am.J. Anat. 118:411-436 (1966).
- LAPHAM, L.W.: " Cytologic and cytochemical studies of neuroglia. I.- A study of the problem of amitosis in reactive protoplasmic astrocytes". Am.J. Pathol.41:1-21 (1962).
- LAPHAM, L.W. y JOHNSTONE, M.A.: " Cytologic and cytochemical studies of neuroglia. III.- The DNA content of fibrous astrocytes with implications concerning the nature of these cells". J. Neuropathol. Exp. Neurol. 23:419-430 (1964).
- LATOV, N., NILAVER, J., ZIMMERMAN, E.A., JOHNSON, W.G., SILVERMAN, A.J., DEFENDINI, R. y COTE, L.: " Fibrillary astrocytes proliferate in response to brain injury". Develop. Biol. 72:381-384 (1979).
- LEMKEY-JOHNSTON, N., BUTLER, V. y REYNOLDS, W.A.: "Glial changes in the progress of a chemical lesion. An electron microscopic study". J. Comp. Neurol. 167:481-502 (1976).

- LING, E.A.: " Study in the changes of the proportions and numbers of the various glial cells in the spinal cord of neonatal and young adult rats". Acta Anat. 96:188-195 (1976).
- LING, E.A.: " Light and electron microscopic demonstration of some lysosomal enzymes in the amoeboid microglia in neonatal rat brain". J. Anat. 123:637-648 (1977).
- LING, E.A.: " Brain macrophages in rats following intravenous labelling of mononuclear leukocytes with colloidal carbon". J. Anat. 125:101-106 (1978).
- LING, E.A.: " Transformation of monocytes into amoeboid microglia and into microglia in the corpus callosum of postnatal rats, as shown by labelling monocytes by carbon particles". J. Anat. 128:847-858 (1979).
- LING, E.A.: " The origin and nature of microglia". En: FEDOROFF, S. y HERTZ, L. " Advances in cellular neurobiology". Vol. 2, pp. 33-82. Academic Press. (1981).
- LING, E.A. y LEBLOND, C.P.: " Investigation of glial cells in semithin sections.II.- Variation with age in the numbers of the various glial cell types in rat cortex and corpus callosum". J. Comp. Neurol. 149:73-82 (1973).
- LING, E.A., PATERSON, J.A., PRIVAT, A., MORI, S. y LEBLOND, C.P.: " Investigation of glial cells in semithin sections . I. Identification of glial cells in the brain of young rats". J. Comp. Neurol. 149:43-72 (1973).

- LING, E.A., PENNEY, D. y LEBLOND, C.P.: " Use of carbon labeling to demonstrate the role of blood monocytes as precursors of the " amoeboid cells" present in the corpus callosum of postnatal rats". J. Comp. Neurol. 193:631-657 (1980).
- LUDWIN, S.K.: " Proliferation of mature oligodendrocytes after trauma to the central nervous system". Nature 308/5956: 274-275 ( 1984 ).
- LUSE, S.A.: " Electron microscopic observations on the cerebral nervous system". J. Biophys. Biochem. Cytol. 2:531-542 (1956).
- MAXWELL, D.S. y KRUGER, L.: " The reactive oligodendrocyte. An electron microscopic study of cerebral cortex following alpha particle irradiation". Am. J. Anat. 118:437-460 (1965 a).
- MAXWELL, D.S. y KRUGER, L.: " Small blood vessels and the origin of phagocytes in the rat cerebral cortex following heavy particle irradiation". Exp. Neurol. 12:33-54 (1965 b).
- MAXWELL, W.L., DUANCE, V.A., LEHTO, M., ASHURST, D.E. y BERRY, M.: " The distribution of types I, III, IV and V collagens in penetrant lesions of the central nervous system of the rat". Histochem. J. 16:1219-1229 (1984).

- McKEEVER, P.E. y BALENTINE, J.D.: " Macrophage migration through the brain parenchyma to the perivascular space following particle ingestion". Am. J. Pathol. 93:153-164 (1978).
- McMAHAN, U.J.: " Fine structure of synapses in the dorsal nucleus of the lateral geniculate body of normal and blinded rats". Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat. 76:116-146 (1967).
- MEANS, E.D. y ANDERSON, D.K.: " Neuronophagia by leukocytes in experimental spinal cord injury". J.Neuropathol. Exp. Neurol. 42:707-719 (1983).
- MERCHANT, R.E. y LOW, F.N.: " Scanning electron microscopy of the subarachnoid space in the dog: evidence for a non-hematogenous origin of subarachnoid macrophages". Am.J. Anat. 156:183-206 (1979).
- MILLER, F. y PALADE, G.E.: " Lytic activities in renal protein absorption droplets. An electron microscopical cytochemical study". J. Cell Biol. 23:519-552 (1964).
- MILLER, R.H. y RAFF, M.C.: " Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct". J. Neurosci. 4:585-592 (1984).
- MORALES, R. y DUNCAN, D.: " Prismatic and other unusual arrays of mitochondrial cristae in astrocytes of cats and hamsters". Anat. Rec. 171:545-551 (1971).

- MORI, S.: " Light and electron microscopic features and frequencies of the glial cells present in the cerebral cortex of the rat brain". Arch. Histol. Jpn.34:231-244 (1972 a).
- MORI, S.: " Uptake of <sup>3</sup>H-Thymidine by corpus callosum cells in rat following a stab wound of the brain". Brain Res. 46:177-186 (1972 b).
- MORI, S. y LEBLOND, C.P.: " Identification of microglia in light and electron microscopy". J. Comp. Neurol. 135:57-80 (1969).
- MORSE, D.E. y LOW, F.N.: " The fine structure of the pia mater of the rat". Am. J. Anat. 133:349-368 (1972).
- MUGNAINI, E.: " Helical filaments in astrocytic mitochondria of the corpus striatum in the rat". J. Cell Biol. 23:173-182 (1964).
- MURABE, Y., IBATA, Y. y SANO, Y.: " Morphological studies on neuroglia. II.- Response of glial cells to kainic acid-induced lesions". Cell Tissue Res. 216:569-580 (1981).
- NATHANIEL, E.J.H. y NATHANIEL, D.R.: " The reactive astrocyte" . En : FEDOROFF, S. y HERTZ, L. " Advances in cellular neurobiology". Vol.2. pp. 249-301. Academic Press. (1981)
- NICHOLS, B.A., BAINTON, D.F. y FARQUHAR, M.G.: " Differentiation of monocytes. Origin, nature and fate of their azurophil granules". J. Cell Biol. 50:498-515 (1971).

- ODA, Y. y NAKANISHI, I.: " Ultrastructure of the mouse leptomeninges". J. Comp. Neurol. 225:448-457 (1984).
- OEHMICHEN, M.: " Mononuclear phagocytes in the central nervous system". Springer-Verlag. Berlin. Heidelberg. New York. (1978).
- OEHMICHEN, M.: " Enzyme-histochemical differentiation of neuroglia and microglia: a contribution to the cytochemistry of microglia and globoid cells. Review of the literature". Path. Res. Pract. 168:344-373 (1980).
- OEHMICHEN, M., VIETHOLTER, H. y GREAVES, M.F.: " Immunological analysis of human microglia: lack of monocytic and lymphoid membrane differentiation antigens". J. Neuropathol. Exp. Neurol. 38:99-103 (1979).
- OEHMICHEN, M., VIETHOLTER, H. y GENCIC, M.: " Cytochemical markers for mononuclear phagocytes as demonstrated in reactive microglia and globoid cells". Acta Histochem. 66:243-252 (1980).
- PATERSON, J.A., PRIVAT, A., LING, E.A. y LEBLOND, C.P.: " Investigation of glial cells in semithin sections. III.- Transformation of subependymal cells into glial cells, as shown by radioautography after <sup>3</sup>H-Thymidine injection into the lateral ventricle of the brain of young rats". J. Comp. Neurol. 149:83-102 (1973).

- PENFIELD, W.: " The mechanism of cicatricial contraction in the brain". Brain 50:499-517 (1927).
- PETERS, A., PALAY, S. y WEBSTER, H. de F.: " The fine structure of the nervous system. The neurons and supporting cells". Saunders, Philadelphia, Pennsylvania.(1976).
- RAFF, M.C., ABNEY, E.R., COHEN, J., LINDSAY, R. y NOBLE, M.: " Two types of astrocytes in cultures of developing rat white matter. Differences in morphology, surface gangliosides and growth characteristics". J. Neurosci. 3:1289-1300 (1983).
- RAMON Y CAJAL, S. y DE CASTRO, F.: " Elementos de técnica micrográfica del sistema nervioso". Madrid. (1933). (Reedit . Salvat, 1972).
- RAMSEY, H.: " Fine structure of the surface of the cerebral cortex of human brain". J. Cell Biol. 26:323-333 (1965).
- REESE, T.S. y KARNOVSKY, M.J.: " Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase". J. Cell Biol. 34:207-217 (1967).
- REYNOLDS, E.S.: " The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy". J. Cell Biol. 17:208-212 (1963).
- RIO-HORTEGA, P. Del: " El tercer elemento de los centros nerviosos". Bol. Soc. Esp. Biol. 9:69-120 (1919 a).

- RIO-HORTEGA, P. Del: " Poder fagocitario y movilidad de la microglia". Bol. Soc. Esp. Biol. 9:154-166 (1919 b).
- RIO-HORTEGA, P. Del: " Microglia". En : PENFIELD, W. " Cytology and cellular pathology of the nervous system". Vol. 2. pp. 483-534. Hoeber, New York. (1932).
- RIO-HORTEGA, P. Del y PENFIELD, W.: " Cerebral cicatrix. The reaction of neuroglia and microglia to brain wounds". Bull. John Hopkins Hosp. 41:278-303 (1927).
- RONNEVI, L.- O.: " Spontaneous phagocytosis of boutons on spinal motoneurons during early postnatal development. An electron microscopical study in the cat". J. Neurocytol. 6:487-504 (1977).
- RONNEVI, L.-O.: " Origin of the glial processes responsible for the spontaneous postnatal phagocytosis of boutons on cat spinal motoneurons". Cell Tissue Res. 189:203-217 (1978).
- RYDBERG, E.: " Cerebral injury in newborn children consequent on birth trauma, with an inquiry into the normal and pathological anatomy of the neuroglia". Acta Pathol. Microbiol. Scand. Suppl. 10, 1-247 (1932).
- SAUNDERS, N.R.: " Ontogeny of the blood-brain barrier". En: BITO, L.Z., DAVSON, H. y FENSTERMACHER, J.D. " The ocular and cerebrospinal fluids". pp. 523-550 (1978).

- SCHRÖDER, J.M. y WECHSLER, W.: " Oedema and necrosis of the grey and white matter following experimental brain injuries (studies by light and electron microscopy). Acta Neuropathol. 5:82-111 (1965).
- SCHULTZ, R.L. y PEASE, D.C.: " Cicatrix formation in rat cerebral cortex as revealed by electron microscopy". Am. J. Path. 35:1017-1041 (1959).
- SHEETZ, J.H., FULLMER, H.M. y NARKATES, A.J.: " Oxytalan fibers: identification of the same fiber by light and electron microscopy". J. Oral Pathol. 2:254-258 (1973).
- SIMS, M.R.: " Oxytalan-vascular relationships observed in histologic examination of the periodontal ligaments of man and mouse". Arch. Oral Biol 20:713-716 (1975).
- SIPE, J.C. y MOORE, R.Y.: " Astrocytic gap junctions in the rat lateral hypothalamic area". Anat. Rec. 185:247-252 (1976).
- SJOSTRAND, J.: " Neuroglial proliferation in the hypoglossal nucleus after nerve injury". Exp. Neurol. 30:178-189 (1971).
- SOAMES, J.V. y DAVIES, R.M.: " Ultrastructure of elastic and oxytalan fibres in dog gingivae". J. Periodontal Res. 13:173-176 (1978).
- STENWIG, A.E.: "The origin of brain macrophages in traumatic lesions, wallerian degeneration, and retrograde degeneration". J. Neuropathol. Exp. Neurol. 31:696-704 (1972).

- STURROCK, R.R.: " Light microscopic identification of immature glial cells in semithin sections of the developing mouse corpus callosum". J. Anat. 122:521-537 (1976).
- SUMI, S.M. y HAGER, H.: " Electron microscopic study of the reaction of the newborn rat brain to injury". Acta Neuropathol. 10:324-335 (1968).
- TAKAGI, M., PARMLEY, R.T., YAGASAKI, H. y TODA, Y.: "Ultrastructural cytochemistry of oxytalan fibers in the periodontal ligament and microfibrils in the aorta with the periodic acid-thiocarbohydrazide-silver proteinate method". J. Oral Pathol. 13:671-678 (1984).
- TANI, E., HIRANO, A. y ZIMMERMAN, H.M.: " Glial cells with fibrillar structure in the optic nerve and the white matter". J. Neuropathol. Exp. Neurol. 23:162-163 (1964).
- TORVIK, A.: " The relationship between microglia and brain macrophages". Acta Neuropathol. Suppl. VI, 297-300 (1975)
- TRACHTENBERG, M.C.: " Glial endocytosis of protein in the traumatized brain". J. Neurosci. Res. 9:413-423 (1983).
- TRIARHOU, L.c., CERRO, M. Del y HERNDON, R.M.: " Ultrastructural evidence for phagocytosis by oligodendroglia". Neurosci. Lett. 53:185-189 (1985).
- TSUCHIHASHI, Y., KITAMURA, T. y FUJITA, S.: " Immunofluorescence studies of the monocytes in the injured rat brain". Acta Neuropathol. (Berl.) 53:213-219 (1981).

- VAN FURTH, R., HIRSCH, J.G. y FEDORKO, M.E.: " Morphology and peroxidase cytochemistry of mouse promonocytes, monocytes and macrophages". J. Exp. Med. 132:794-812 (1970).
- WEIL, A. y DAVENPORT, H.A.: " Staining of oligodendroglia and microglia in celloidin sections". Arch. Neurol. Psychiat. 30:175-178 (1933).
- WENDELL-SMITH, C.P., BLUNT, M.J. y BALDWIN, F.: " The ultrastructural characterization of macroglial cell types". J. Comp. Neurol. 127:219-240 (1966).
- WENDER, M., KOZIK, M., GONCERZEWICZ, A. y MULAREK, O.: " Neuroglia of the developing optic nerve in the course of wallerian degeneration". J. Hirnforsch. 21:417-428 (1980).
- WILSON, R.B.: " Brain repair". Arch. Neurol. Psychiat. 15:75-84 (1926).
- WONG-RILEY, M.T.T.: " Terminal degeneration and glial reactions in the lateral geniculate nucleus of the squirrel monkey after eye removal". J. Comp. Neurol. 144:61-92 (1971).
- YANAGIHARA, T., GOLDSTEIN, N.P., SVIEN, H.J. y BAHN, R.C.: " Foreign body reaction of the brain. Enzyme-histochemical study in dogs". Neurology 17:337-344 (1967).

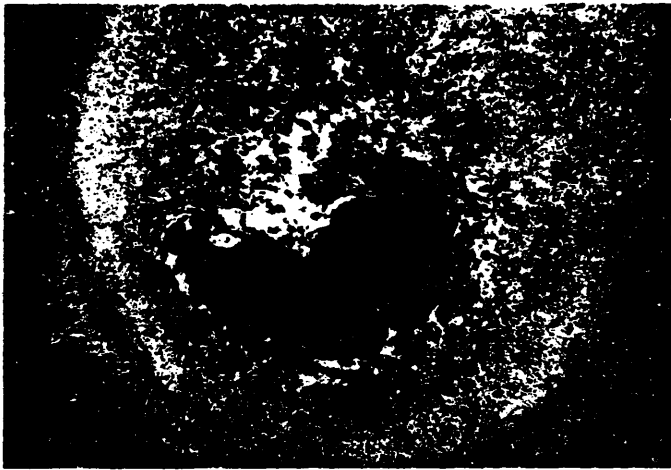


**Fig. 1:**

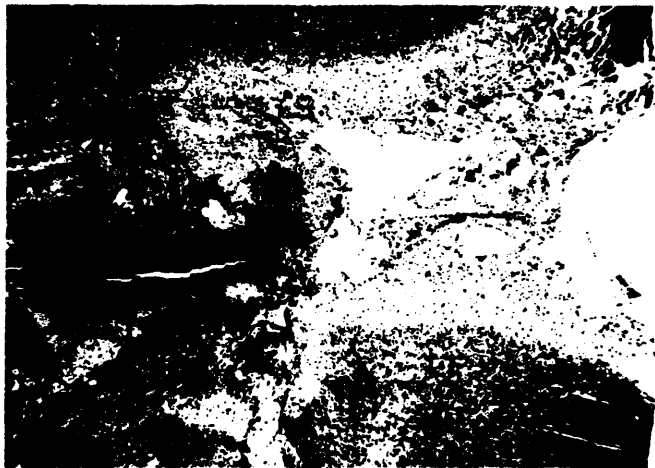
24 horas. H-E. Sección transversal del trayecto de la lesión en el que puede observarse abundante material necrótico que ocupa casi totalmente la luz de ese trayecto. 4 X.

**Fig. 2:**

24 horas. H-E. Foco de lesión seccionado longitudinalmente . 4 X.



1



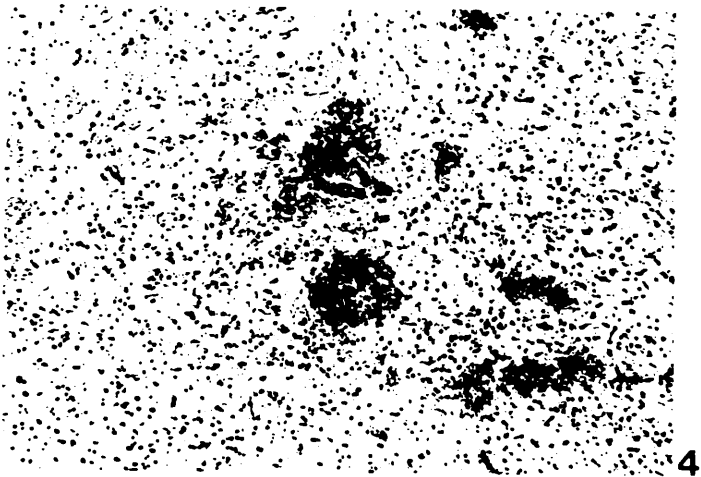
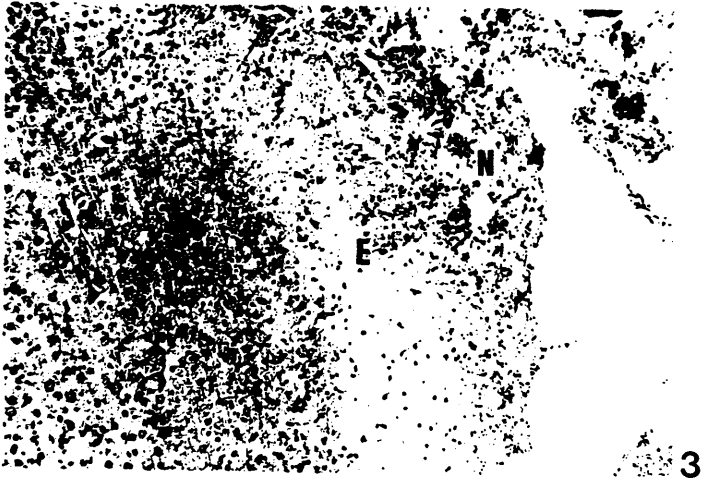
2

**Fig. 3:**

24 horas. H-E. Detalle Fig. 2. Sección longitudinal de la pared del trayecto que muestra una banda de necrosis (N) y de edema (E) en contacto con el parénquima aparentemente conservado. 10 X.

**Fig. 4 :**

24 horas. H-E. Pequeños focos de hemorragia parenquimatosa en la vecindad del trayecto de punción. 10 X.

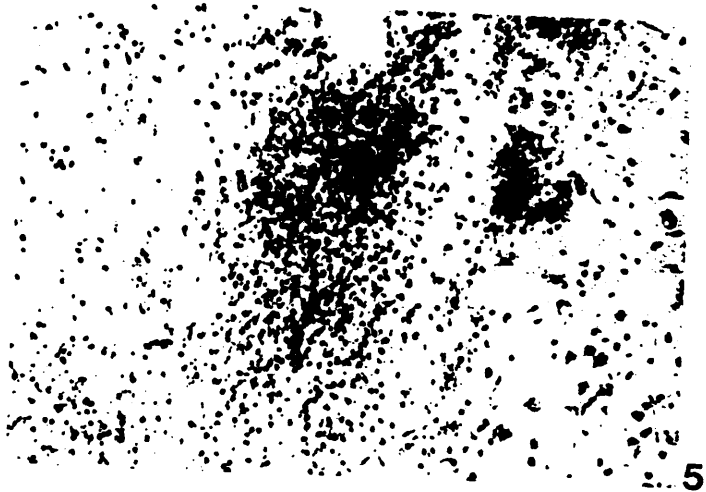


**Fig.5:**

24 horas. H-E. Acúmulo de polimorfonucleares neutrófilos en la pared del trayecto. 20 X.

**Fig. 6:**

24 horas. H-E. Meninge adyacente al foco de lesión. Marñanación leucocitaria. 40 X.



5



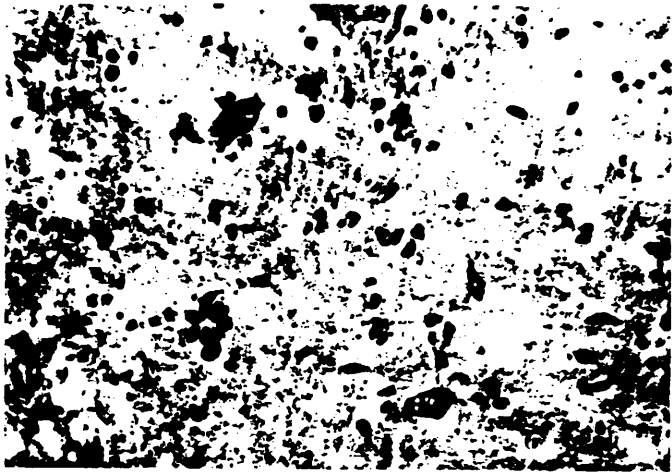
6

**Fig. 7:**

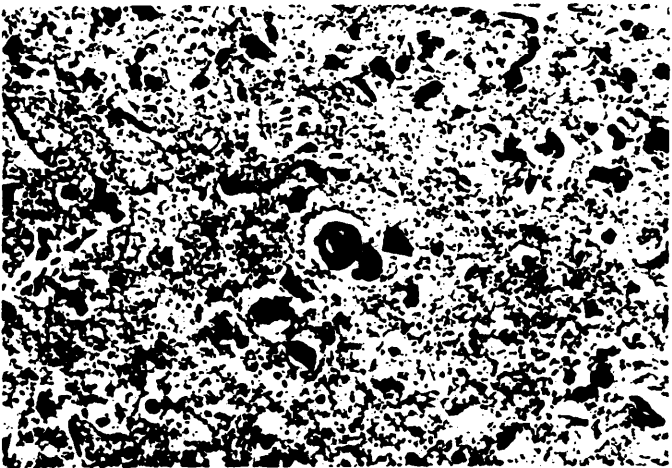
24 horas. H-E. Material necrótico en el fondo de la lesión , en el que se observan fenómenos de cariorrexis. 40 X.

**Fig. 8:**

24 horas. H-E. Parénquima nervioso adyacente al trayecto de la punción, en el que puede observarse aumento del espacio perivascular de Virchow-Robin, y células globulosas de aspecto macrofágico en él (flecha). 40 X.



7



8

**Fig. 9:**

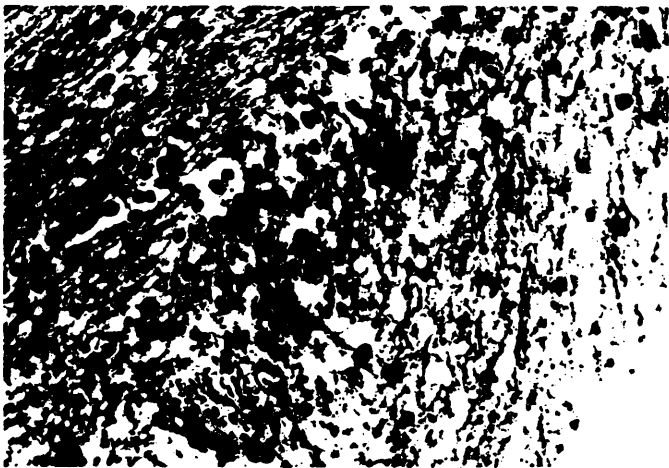
48 horas. H-E. Abundantes corpúsculos gránulo-adiposos en el seno del material necrótico de la lesión. 40 X.

**Fig. 10:**

48 horas. H-E. Figura de mitosis (anafase) (flecha) entre las células inflamatorias que rodean al foco de lesión. 40 X.



9



10

Fig. 11:

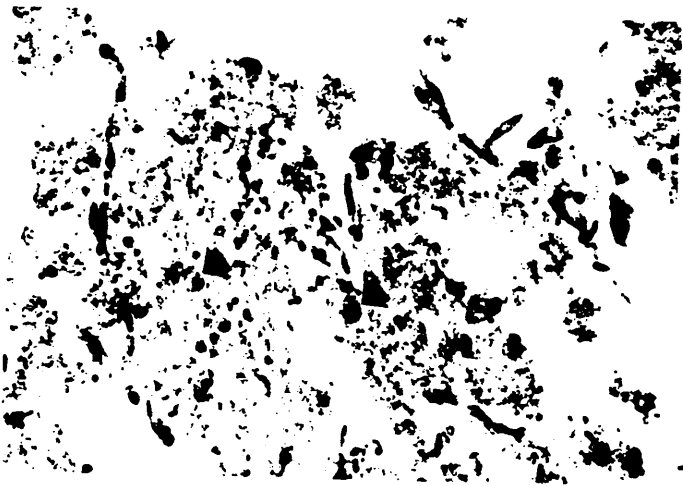
72 horas. H-E. Pared del trayecto con manifiestos fenómenos de necrosis y edema, en la que existen abundantes corpúsculos gránulo-adiposos, algunos de ellos situados en el espacio perivascular de Virchow-Robin (flecha). 20 X.

Fig. 12 :

72 horas. H-E. Material necrótico que ocupa incompletamente la luz del trayecto de punción, en el que se identifican todavía restos de capilares sanguíneos y macrófagos globulosos (flechas). 40 X.



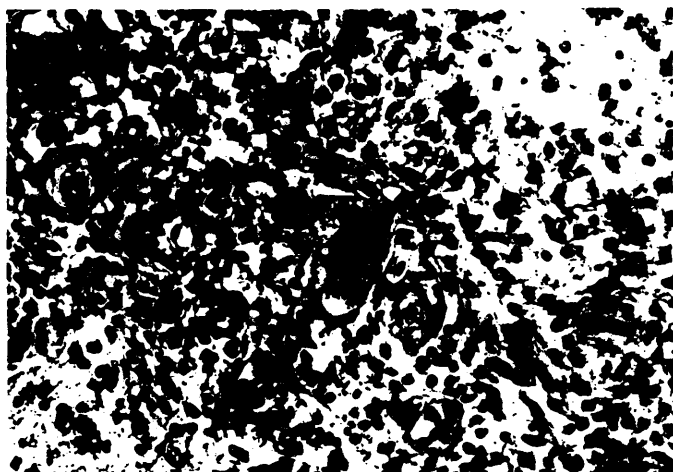
11



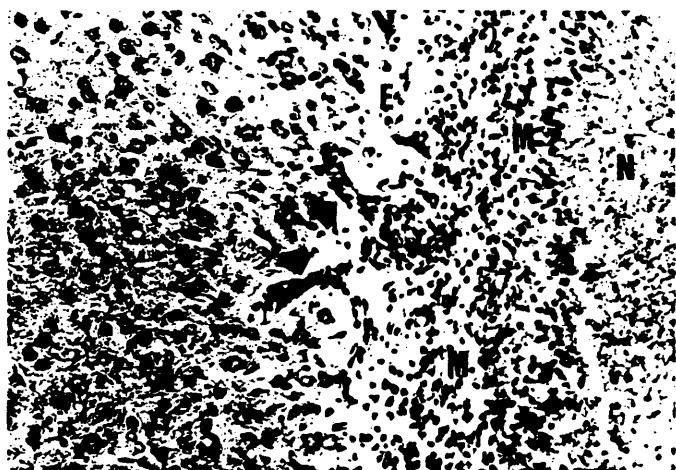
12

**Figs. 13 y 14:**

72 horas. H-E. Reacción meníngea en área adyacente a la lesión. Nótese el aumento del espacio subaracnoideo con clara hipercelularidad y figuras de mitosis (flechas). 40 X.

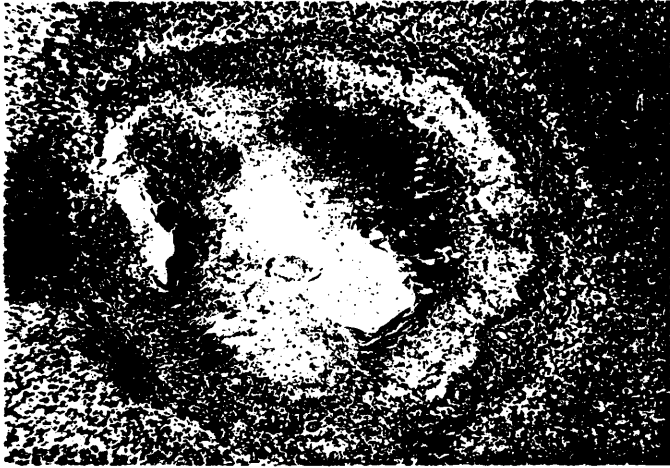


19



20





15



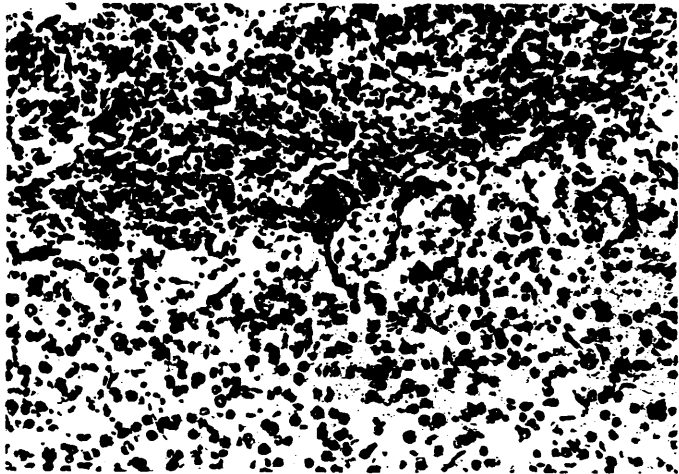
16

**Fig. 17:**

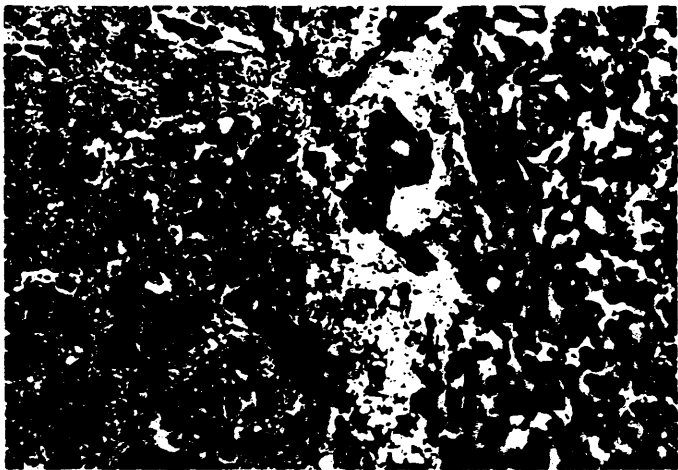
5 días. H-E. Límite entre el parénquima aparentemente conservado y la banda de reacción inflamatoria, en la que el elemento predominante es el corpúsculo gránulo-adiposo. 20 X.

**Fig. 18:**

5 días. H-E. Pared del trayecto, en la que se aprecia reacción celular perivascular. 40 X.



17



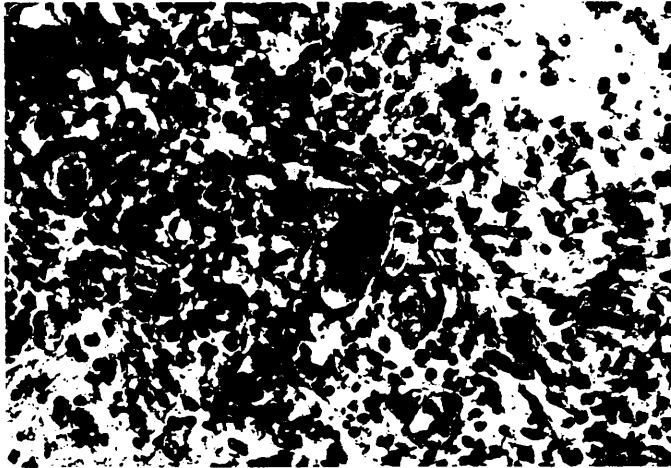
18

Fig. 19:

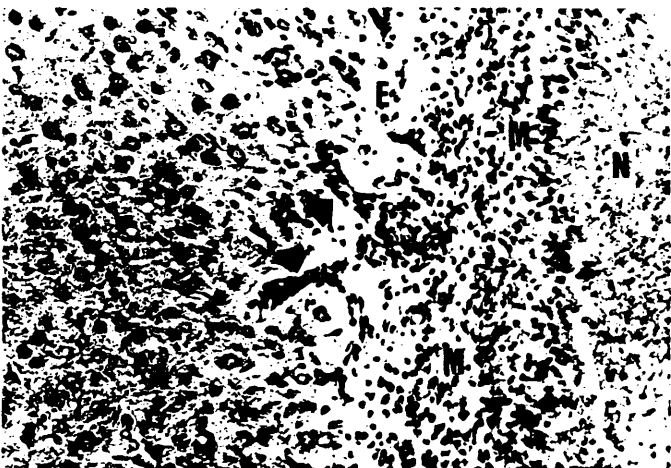
5 días. H-E. Células gigantes multinucleadas en la banda de reacción inflamatoria. 40 X.

Fig. 20:

5 días. H-E. Sección transversal de la pared del trayecto en la que pueden observarse las siguientes capas en disposición concéntrica: necrosis central (N), banda hiper celular muy rica en macrófagos (M), banda de edema (E), y parénquima nervioso (P). Nótese la regeneración vascular (flechas), que desde el parénquima intenta invadir la banda de reacción inflamatoria. 20 X.



19



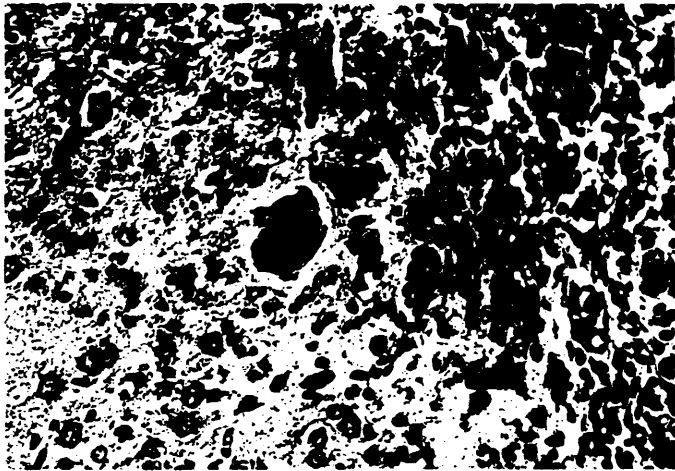
20

**Fig. 21:**

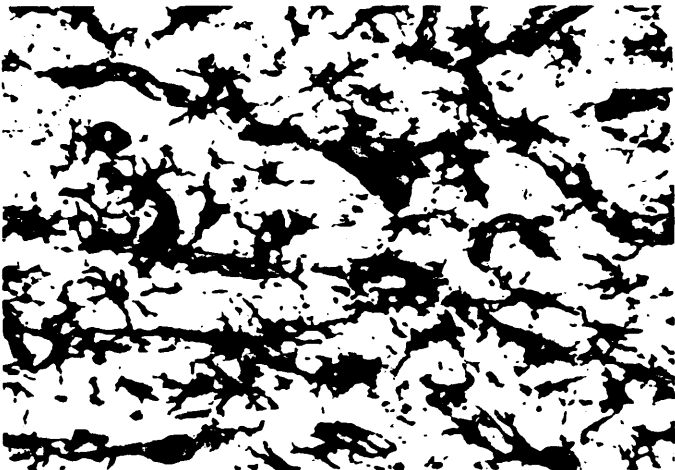
5 días. H-E. Aumento de células perivasculares en los vasos vecinos a la lesión. 40 X.

**Fig. 22:**

5 días. Impregnación argéntica. Hiperplasia microglial en áreas vecinas a la lesión. 40 X.



21



22

Fig. 23:

5 días. Impregnación argéntica. Formas hipertróficas de la microglia en áreas contiguas al foco de lesión. 40 X.

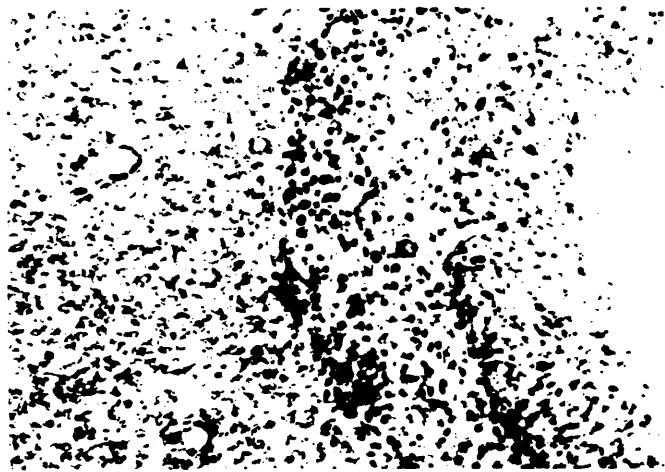
Fig. 24:

5 días. Impregnación argéntica. Formas pseudopódicas y ameboides de la microglia en el foco de lesión. 40 X.



33



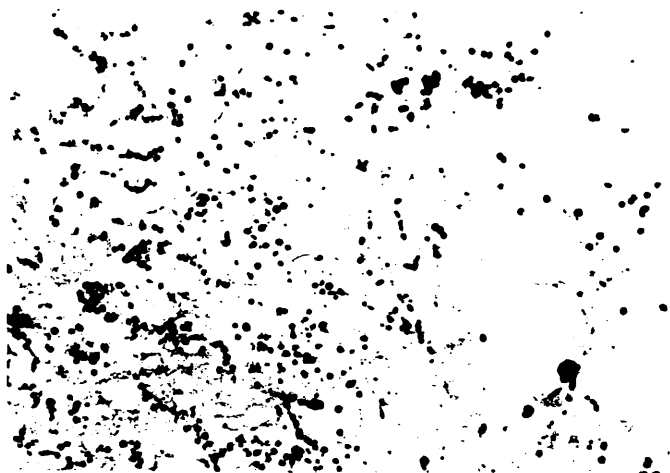


**Fig. 26:**

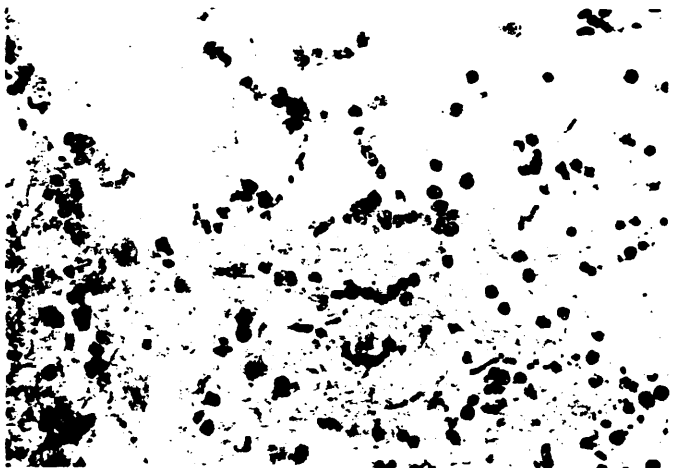
5 días.Peroxidasa. Sección transversal del trayecto de la punción. Existencia de macrófagos peroxidasa-positivos. Nótese la positividad de los abundantes hematíes.  
20 X.

**Fig. 27:**

5 días.Peroxidasa. Detalle de la figura anterior. 40 X.



26



27

**Fig. 28:**

5 días. Imagen degenerativa de gran calibre de probable origen neuronal, en el foco necrótico. X 16352.



Fig. 29:

5 días. Imagen degenerativa de gran calibre de probable origen neuronal, en el foco necrótico. X 23360.



**Fig. 30:**

5 días. Figura de mitosis en una célula de supuesta naturaleza macrofágica, por la presencia de cuerpos densos de probable carácter lisosómico (flecha). X 10877.



**Fig. 31:**

5 días. Telofase en una célula situada en la luz de la  
lesión. X 16352.

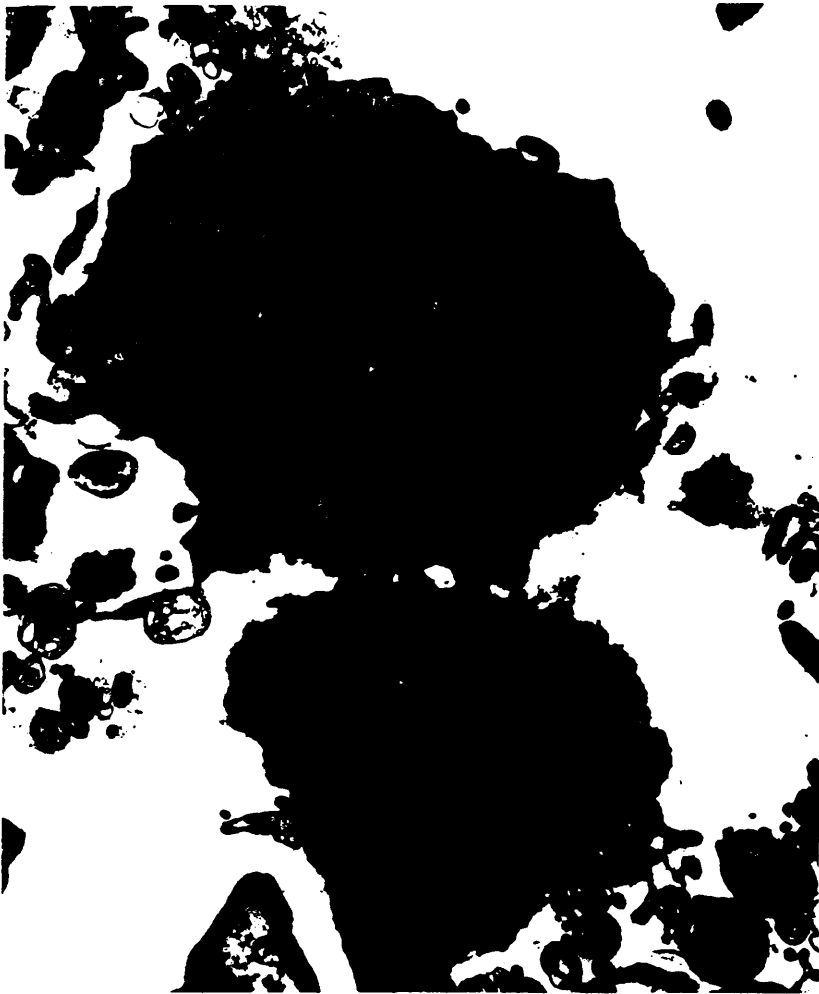


Fig. 32:

5 días. Macrófago, con intensa actividad fagocitaria, en el seno del material necrótico. X 10877.

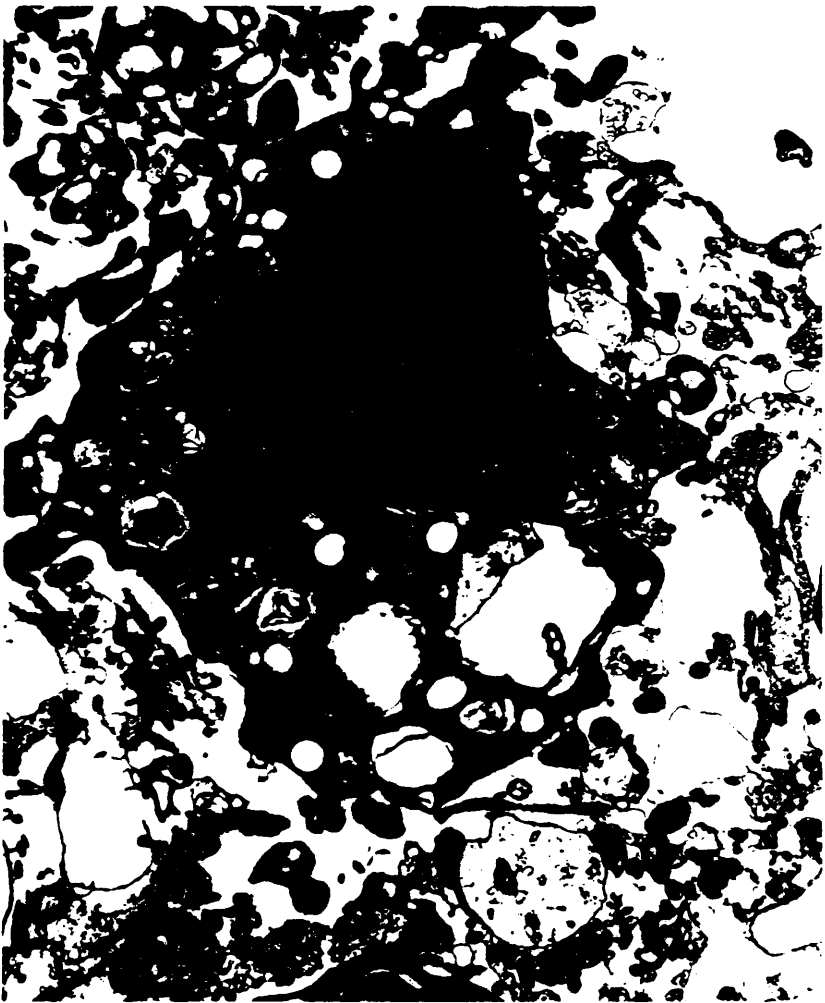


Fig. 33:

5 días. Fosfatasa ácida. Macrófago en el foco de lesión mostrando reacción positiva en los cuerpos densos de su citoplasma. X 10877.



Fig. 34:

5 días. Acúmulo de macrófagos en los que en varios de  
ellos puede observarse signos de eritrofagocitosis. (

7118.



**Fig. 35:**

5 días. Restos de capilares sanguíneos en el foco de lesión, en los que todavía puede evidenciarse endotelio y lámina basal, que están siendo rodeados por prolongaciones de células macrofágicas. X 10877.



Fig. 36:

5 días. Detalle de la figura anterior. Obsérvense los restos de las células endoteliales y la persistencia de la lámina basal (flechas). X 23360.



**Fig. 37:**

5 días. Sección transversal de un vaso arterial en el que existe amplia dilatación del espacio perivascular de Virchow-Robin, que está ocupado por células macrofágicas. Por fuera, aparecen prolongaciones de astrocitos (A), ampliamente dilatadas por el edema, X 7118.



Fig. 38:

5 días. Macrófagos ocupando el espacio perivascular de  
Virchow-Robin. X 10877.

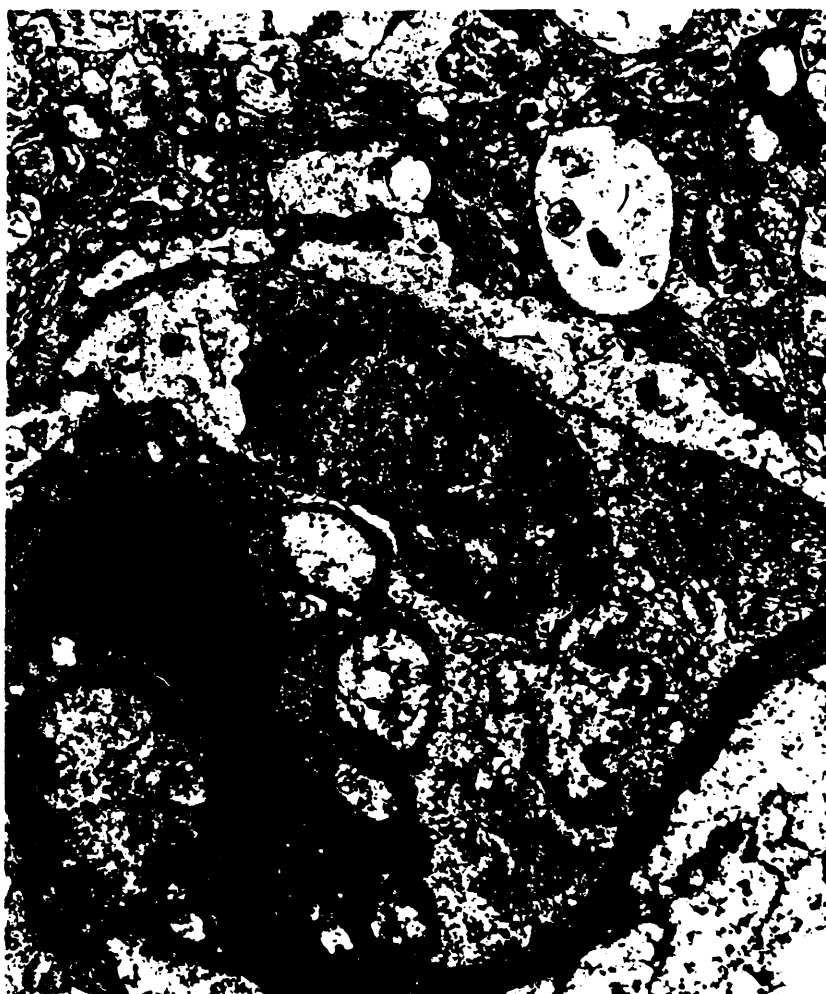
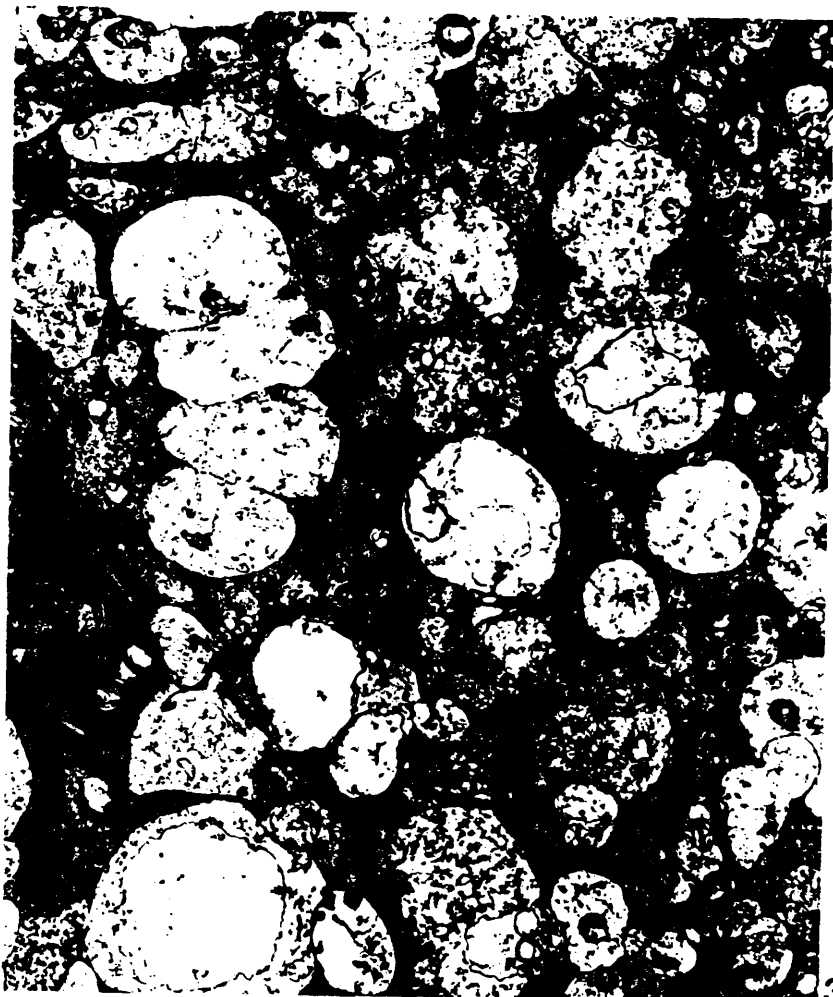


Fig. 39:

5 días. Prolongaciones de astrocitos, en la vecindad de la herida, ampliamente dilatadas por el edema. X 7118.



**Fig. 40:**

5 días. Prolongaciones astrocíticas edematosas con disposición perivascular. X 10877.



**Fig. 41:**

10 días. H-E. Sección longitudinal del trayecto de la lesión. Nótese la franca disminución del material necrótico. 4 X.

**Fig. 42:**

10 días. H-E. Luz del trayecto de la lesión, con existencia de abundantes macrófagos (flechas) en su pared. 10 X .



41



42

**Fig. 43:**

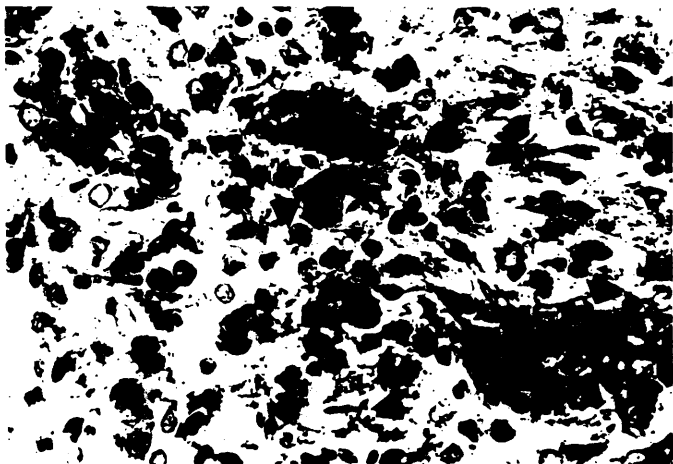
10 días. H-E. Detalle de células macrofágicas en relación con la pared del trayecto de la punción, la cual aparece revestida por células fibroblastoides. 40 X.

**Fig. 44 :**

7 días. Técnica de Perls. Corpúsculos gránulo-férricos (flechas) en el foco de lesión. 40 X.



43



44

Fig. 45:

10 días. H-E. Zona superficial del trayecto de la herida en la que se observa proliferación de elementos fibroblastos-meningocíticos (flechas) que recubren la pared del trayecto. 20 X.

Fig. 46:

10 días. H-E. Parénquima de la pared del trayecto recubierto por elementos fusocelulares. 40 X.





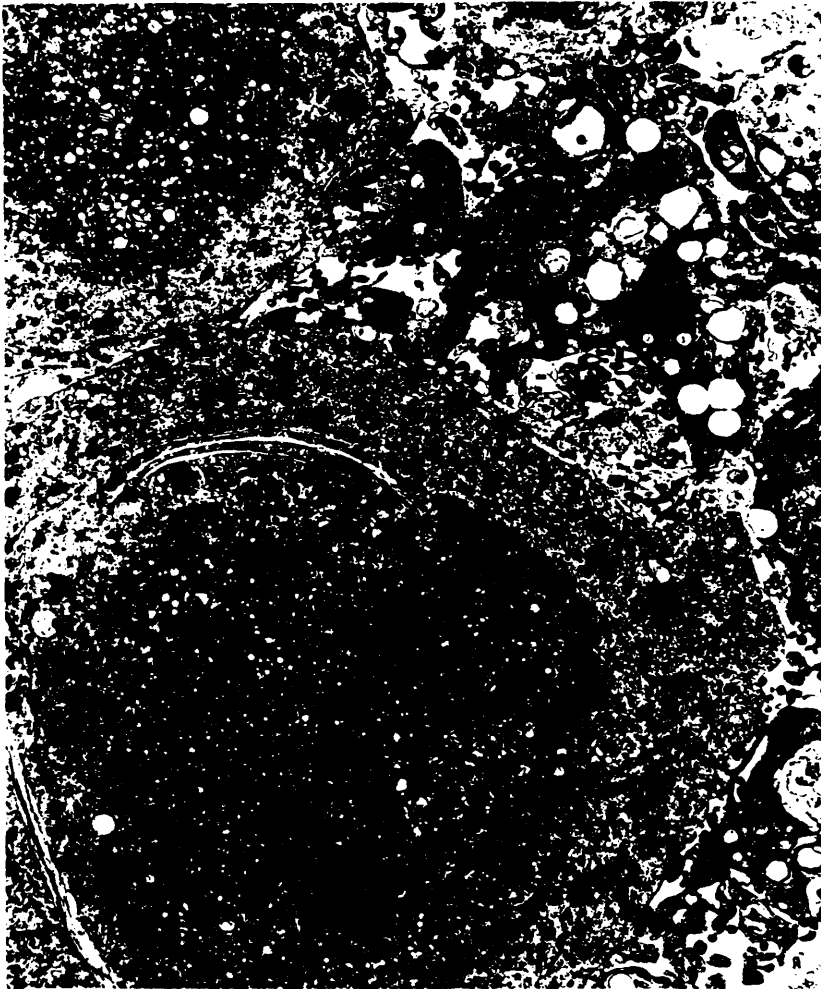


Fig. 48:

10 días. Células macrofágicas en el foco de lesión, que muestran abundantes gotas lipídicas e imágenes de pseudomielina. Nótese la desestructuración existente en la pared del trayecto. X 7118.

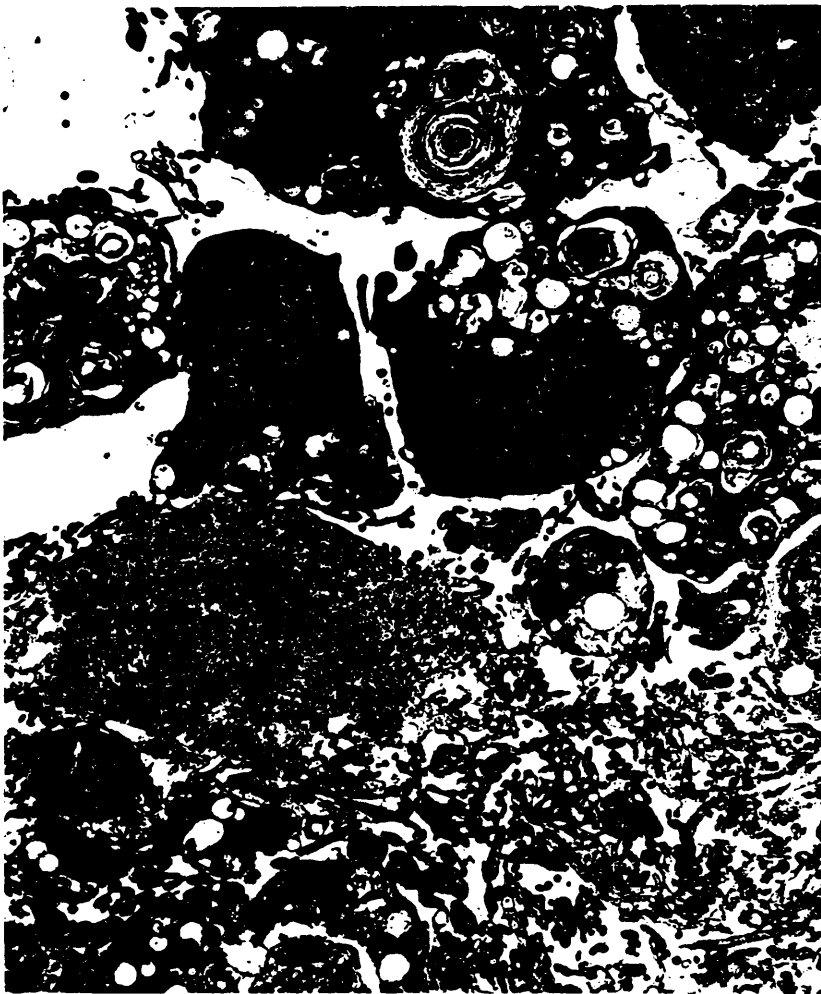


Fig. 49:

10 días. Foco de necrosis, con un capilar en vías de dege  
neración, en el que el endotelio está ya muy fragmentado,  
y sin embargo se conserva continua la lámina basal (fle-  
chas). X 23360.



**Fig. 50:**

10 días. Vaso neoformado, con hipertrofia endotelial, e irregularidades en la lámina basal (flechas). X 31974.



Fig. 51:

10 días. Capilar sanguíneo adyacente al foco de lesión,  
en cuyo endotelio existen abundantes vesículas pinocitós*í*  
cas (flechas). X 31974.

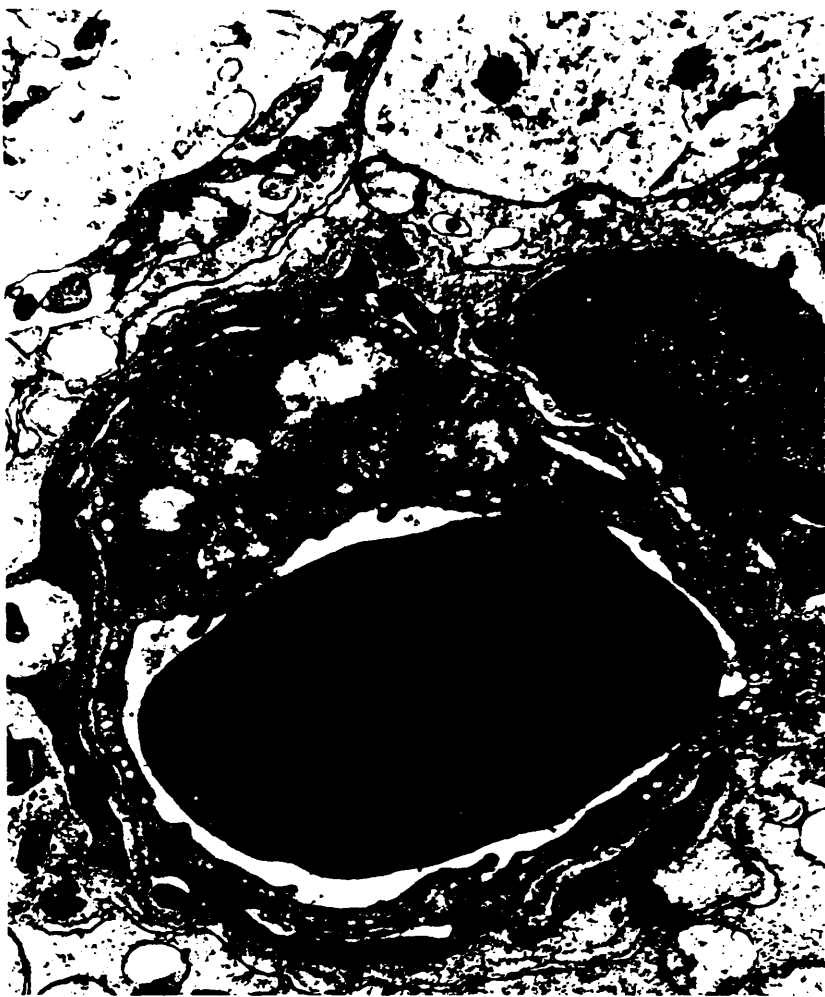


Fig. 52:

10 días. Existencia de vesículas pinocitósicas en endotelios capilares. X 31974.

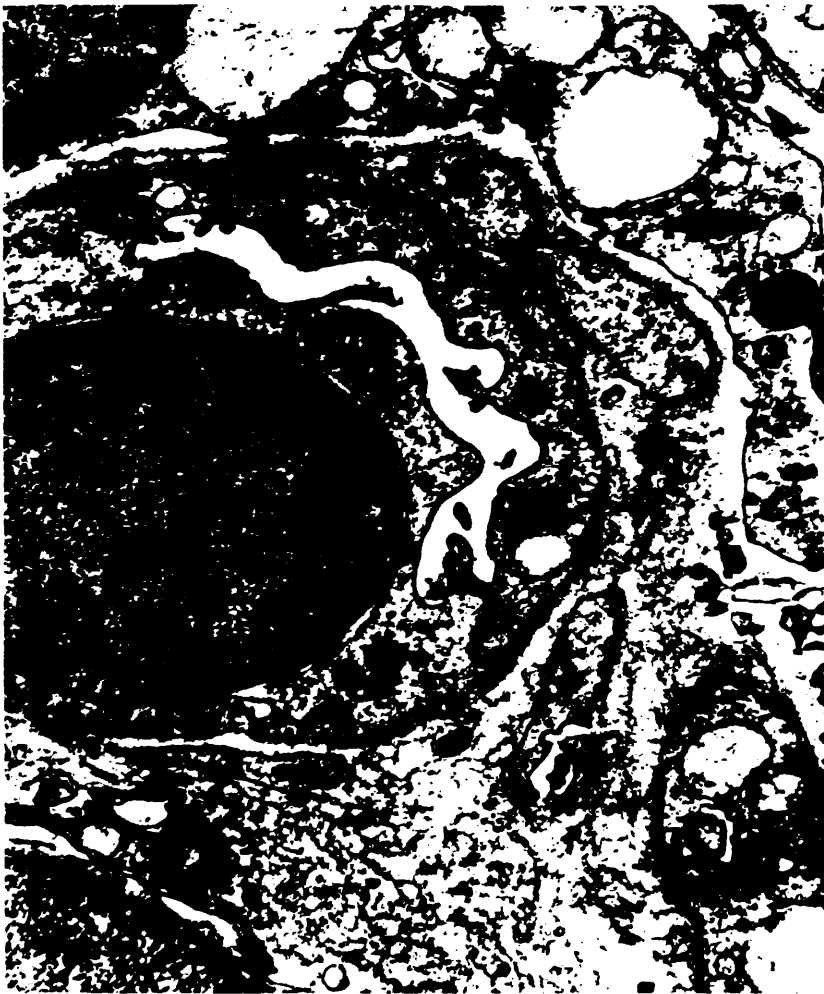


Fig. 53:

7 días. Activación de pericitos con alteración de la lámi  
na basal y puntos de rotura ( flecha ). X 23360.



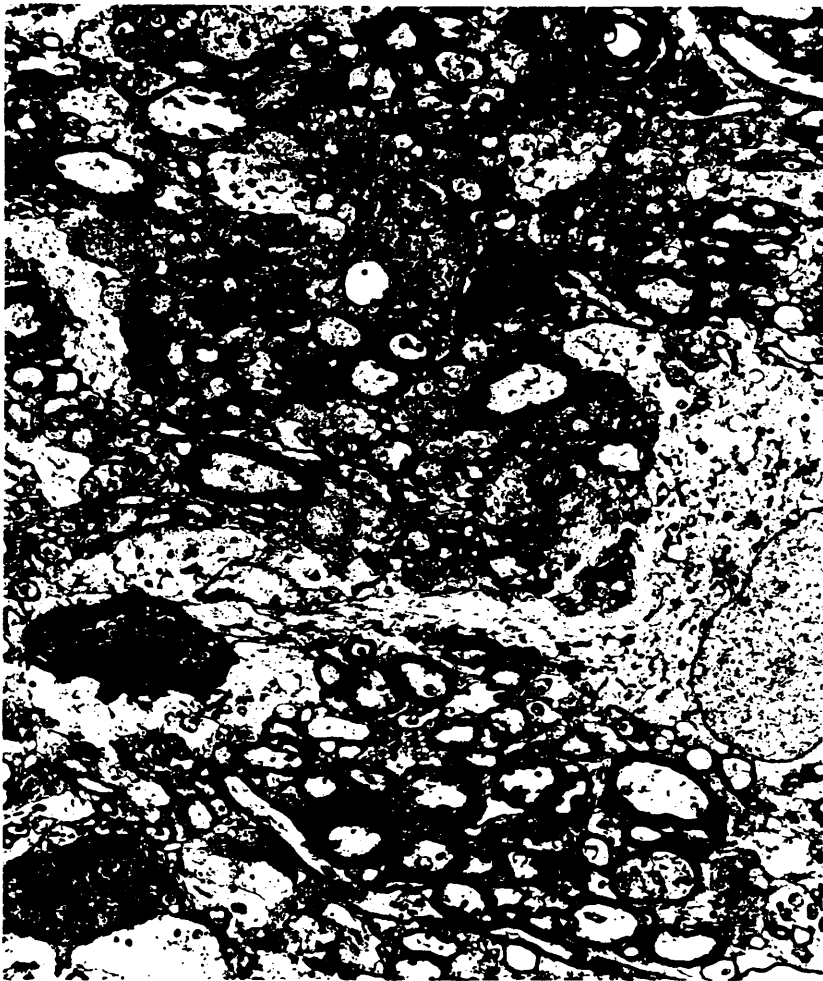
Fig. 54:

7 días. Edema astrocitario. X 7118.



Fig. 55:

10 días. Sección de sustancia blanca adyacente a la lesión, en la que es patente el edema de los astrocitos, tanto en el soma como en las prolongaciones que forman los pies absorbentes. X 4890.



**Fig. 56:**

10 días. Pared de la lesión, que ya aparece revestida por lámina basal. Nótese la persistencia de material necrótico en la luz del trayecto. X 10877.

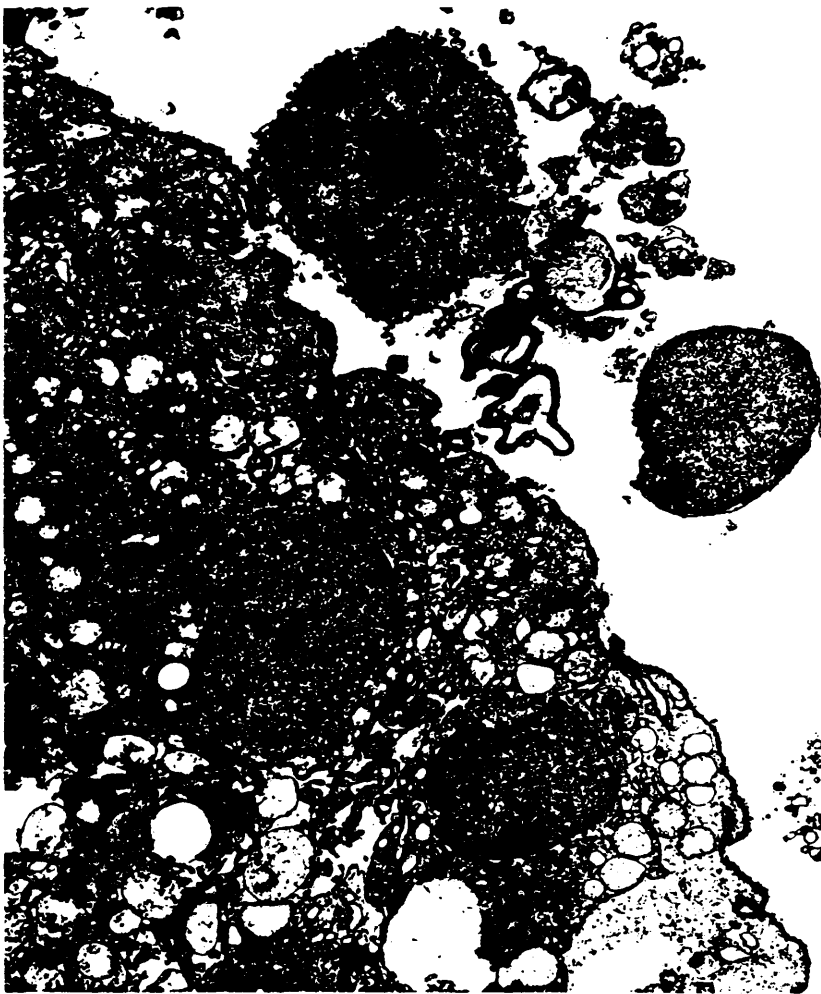


Fig. 57:

10 días. Célula astrocítica formando la pared de la lesión, sobre la que existe ya lámina basal. X 16352.

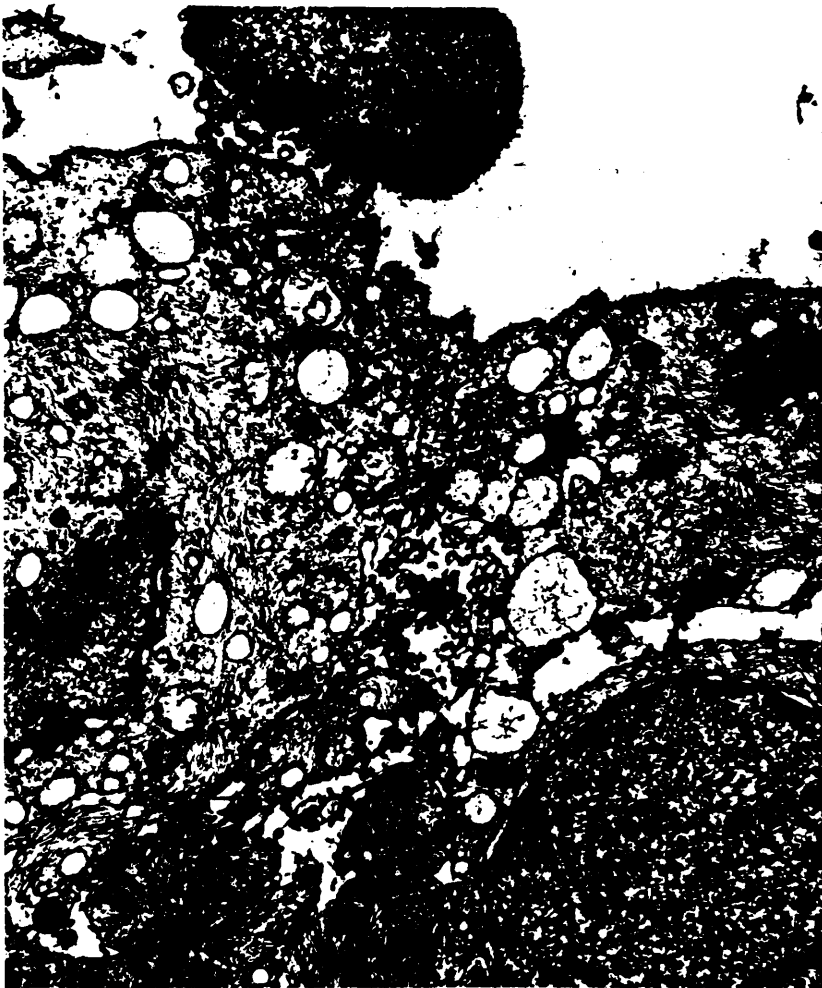


Fig. 58:

10 días. Microfibrillas colágenas ( flechas ) en relación con la lámina basal neoformada en la pared del trayecto de la punción. X 31974.

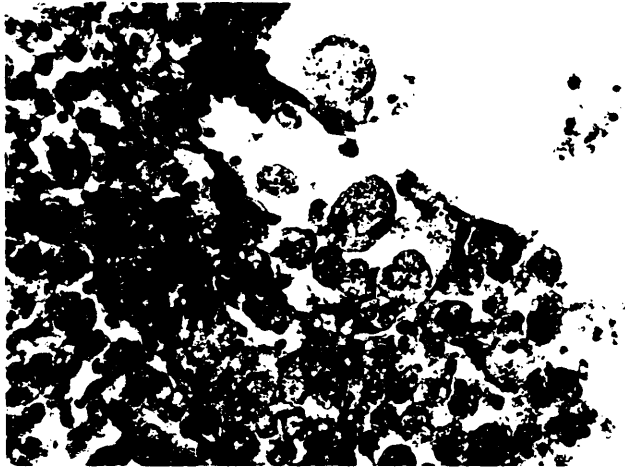


**Fig. 59:**

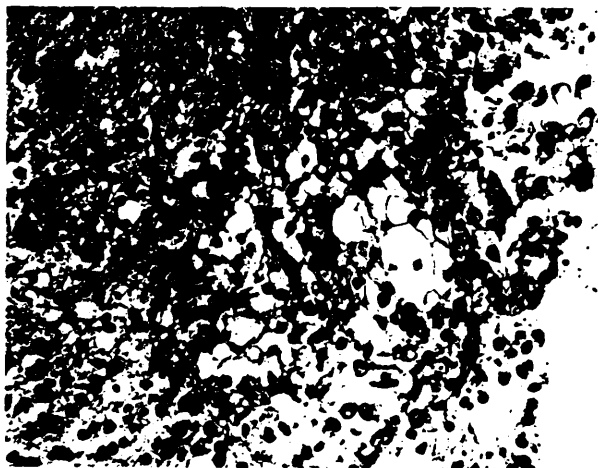
15 días. H-E. Existencia de abundantes corpúsculos gránulo-adiposos en el foco de lesión. 40 X.

**Fig. 60:**

15 días. H-E. Pared del trayecto en la que aparecen incluidos acúmulos de corpúsculos gránulo-adiposos que adoptan aspecto epitelióide, no existiendo un límite neto con la luz de la lesión. 40 X.



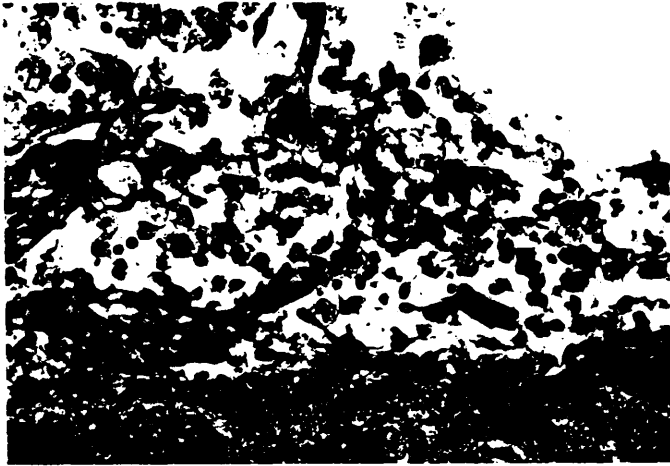
59



60

Figs. 61 y 62:

15 días. H-E. Pared del trayecto revestida por elementos meningo-fibroblastoides, que se disponen de forma reticular en algunas zonas, y entre los que existen abundantes corpúsculos gránulo-adiposos. 40 X.



61



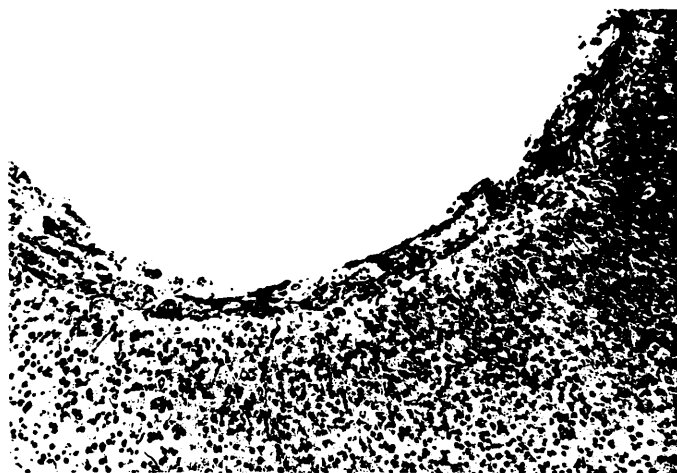
62

**Fig. 63:**

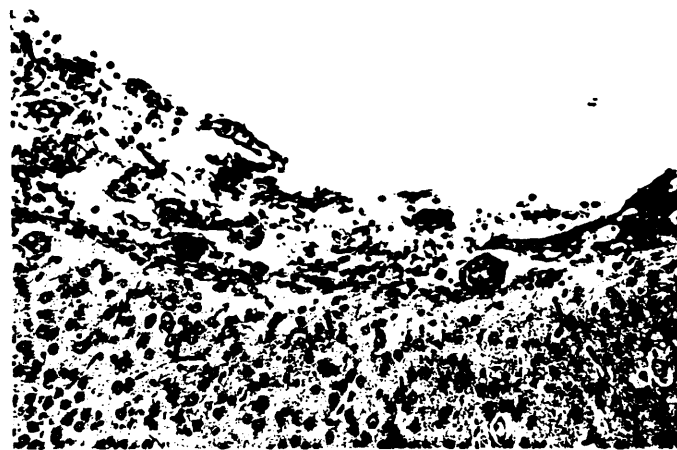
15 días. H-E. Sección transversal del trayecto de punción a nivel superficial. Nótese ya la formación de una delgada lámina meníngea. 10 X.

**Fig. 64:**

15 días. H-E. Detalle de la figura anterior. Lámina meníngea rica en vasos y abundantes elementos fusocelulares agrupados en haces. 20 X.



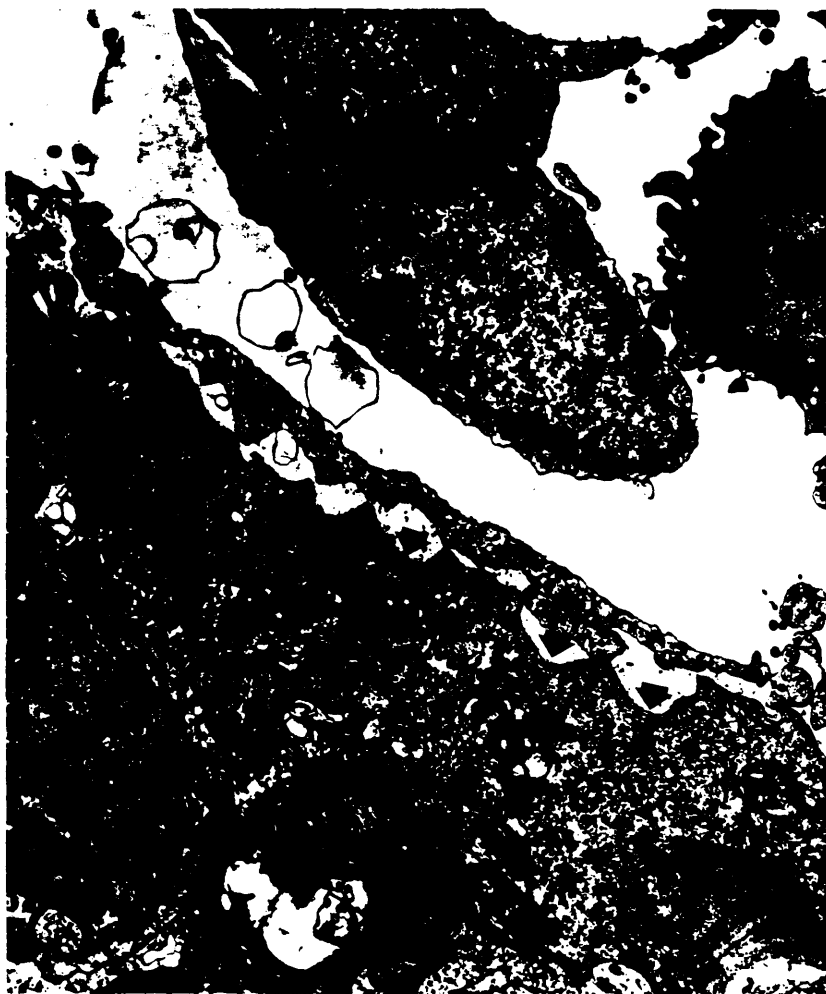
63



64

**Fig. 65:**

15 días. Pared del trayecto revestida completamente por lámina basal (flechas), que se apoya sobre somas y prolongaciones de astrocitos. X 10877.



**Fig. 66:**

15 días. Microfibrillas colágenas en relación con la lámi  
na basal. Nótese la riqueza de microfilamentos en el cito  
plasma del astrocito (A). X 31974.



**Fig. 67:**

15 días. Luz de la lesión ocupada en parte por células de aspecto meningo-fibroblastoide que emiten frecuentes prolongaciones interrelacionadas. X 7118.



**Fig. 68:**

15 días. Sección de prolongaciones de células meningo-fibroblastoides, situadas en la luz de la lesión y en relación con la lámina basal (asterisco), entre las que existen mecanismos de unión (flecha). X 44348.



**Fig. 69:**

15 días. Detalle figura 67. Existencia de prolongaciones astrocíticas revestidas de lámina basal (flecha), que se sitúan entre las prolongaciones de las células meningo-fibroblastoides. X 16352.

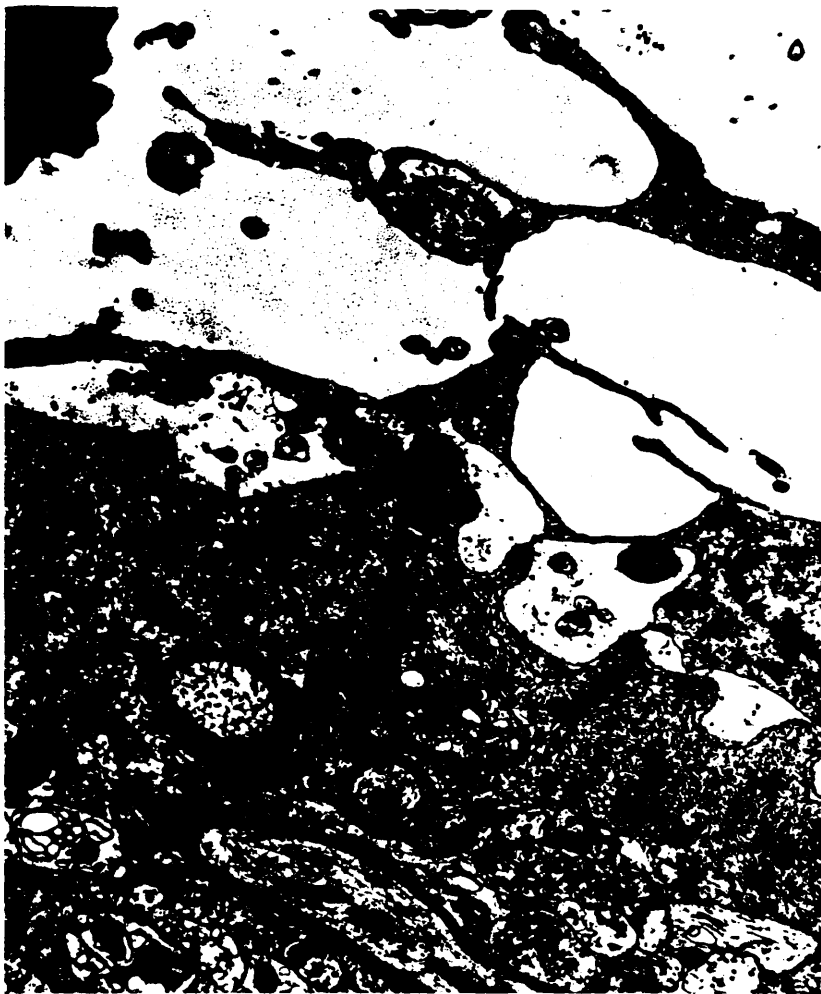
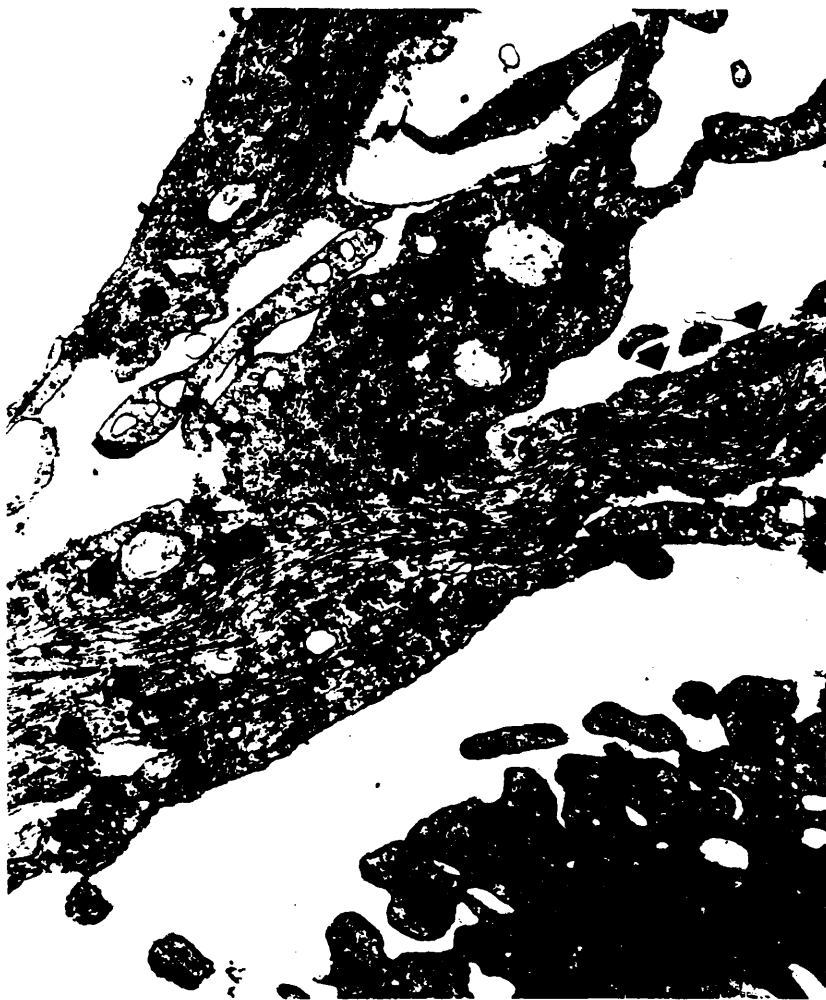


Fig. 70:

15 días. Prolongaciones astrocitarias que no muestran revestimiento completo de lámina basal (flechas). (M): Macrófago. X 23360.



**Fig. 71:**

15 días. Figura de mitosis situada en la lámina meníngea,  
y en relación con prolongaciones astrocitarias revestidas  
de lámina basal. X 10877.



**Fig. 72:**

15 días. Célula microglial en el parénquima cercano a la  
lesión, entre gruesas prolongaciones astrocitarias (A).  
X 16352.



**Fig. 73:**

15 días. Sección longitudinal de un vaso arterial que aparece rodeado por pies absorbentes hipertróficos y con numerosos microfilamentos. X 4890.

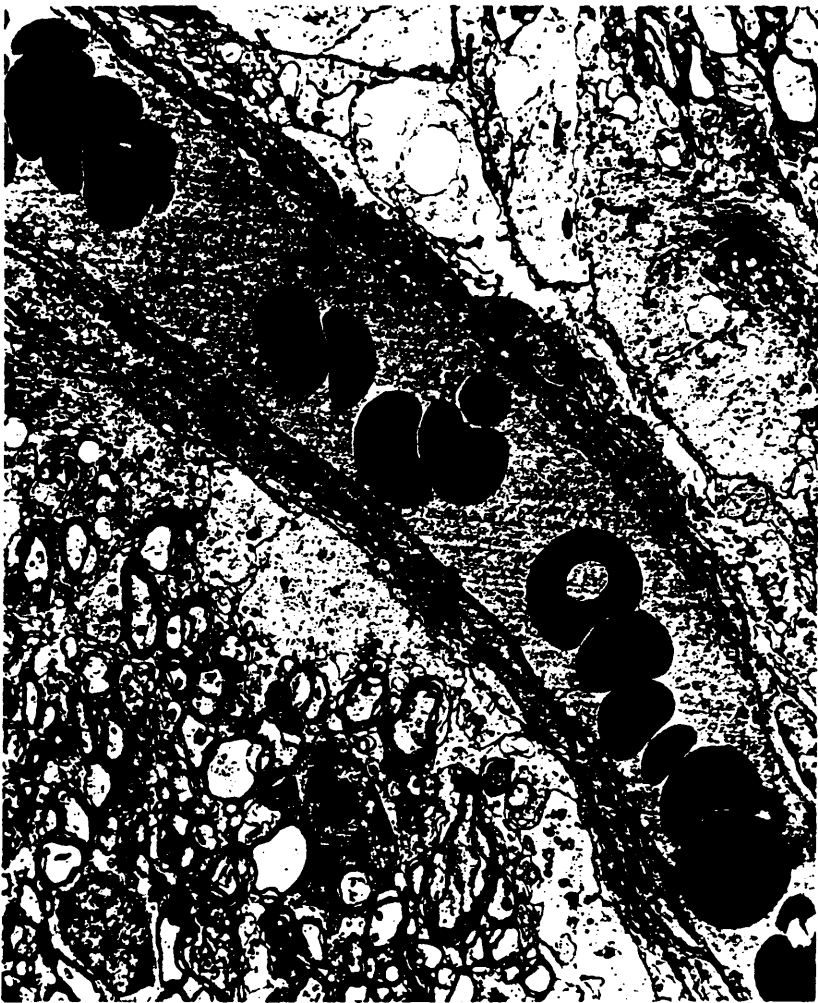


Fig. 74:

15 días. Vasos sanguíneos con franca activación adventi-  
cial. X 16352.

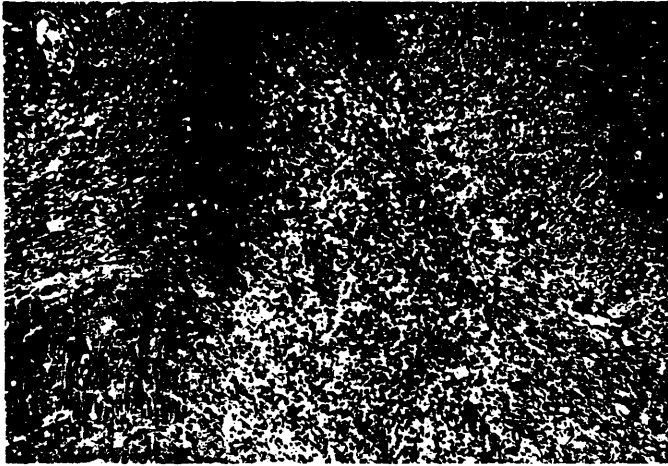


**Fig. 75:**

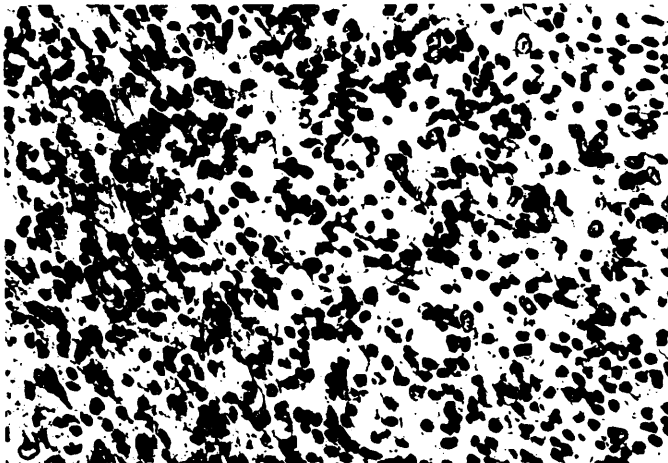
20 días. H-E. Corte tangencial de la lesión, en el que se observa gran hipercelularidad de la pared del trayecto . 10 X.

**Fig. 76:**

20 días. H-E. Corte tangencial del trayecto, en el que se observan todavía corpúsculos gránulo-adiposos. 40 X.



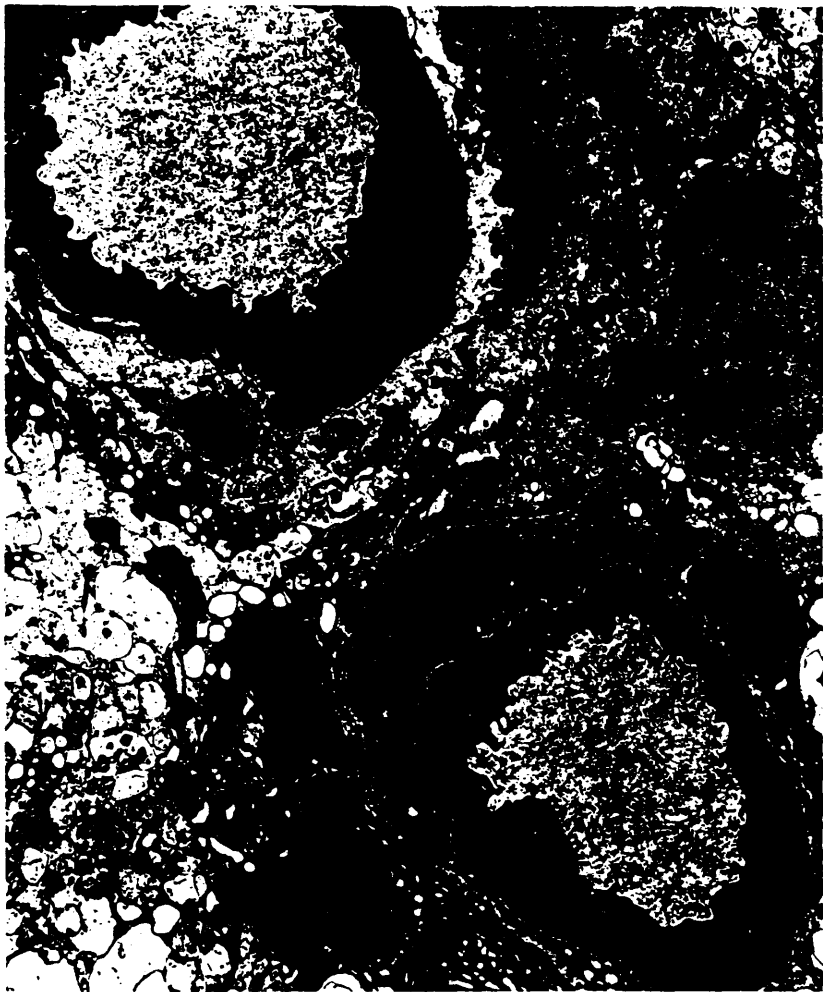
75



76

Fig. 77:

20 días. Intensa reacción perivascular. X 7118.



**Fig. 78:**

20 días. Hueco de la herida con células meningocitarias que emiten finas prolongaciones, y que contactan entre sí estableciendo mecanismos de unión (recuadro).

(M): Macrófagos.

X 4890. Recuadro: X 16352.

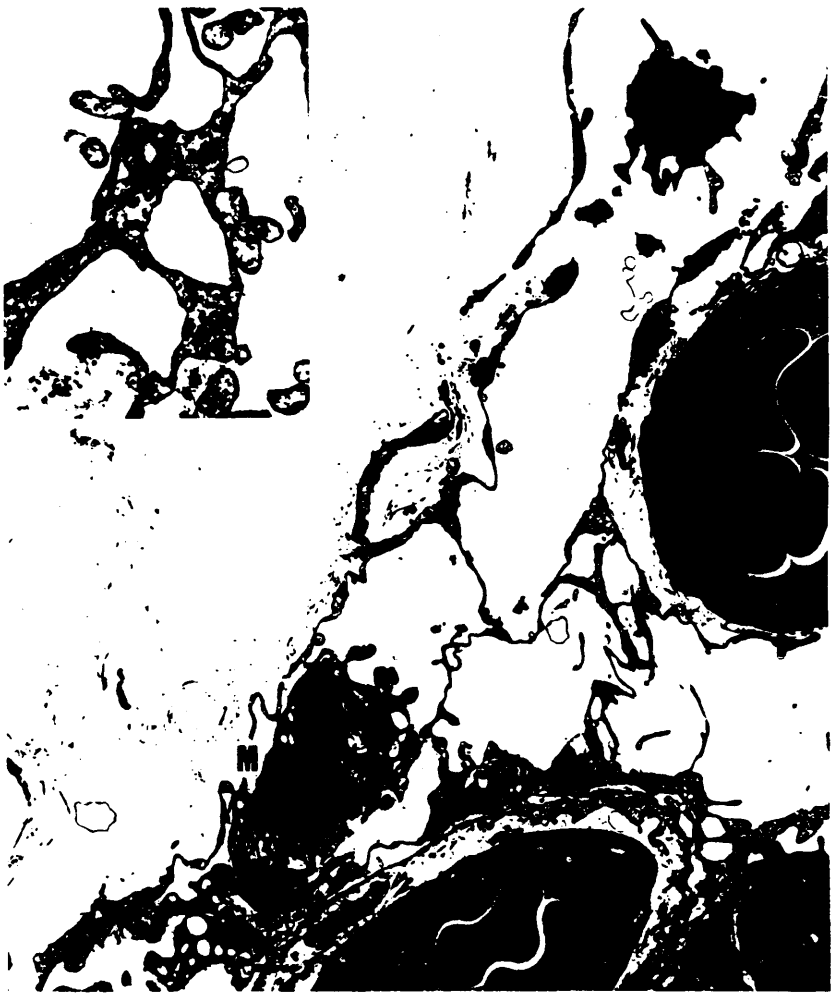


Fig. 79:

20 días. Astrocito en el neuropilo vecino a la lesión,  
en el que se observa un claro aumento de los filamentos.  
X 10877.



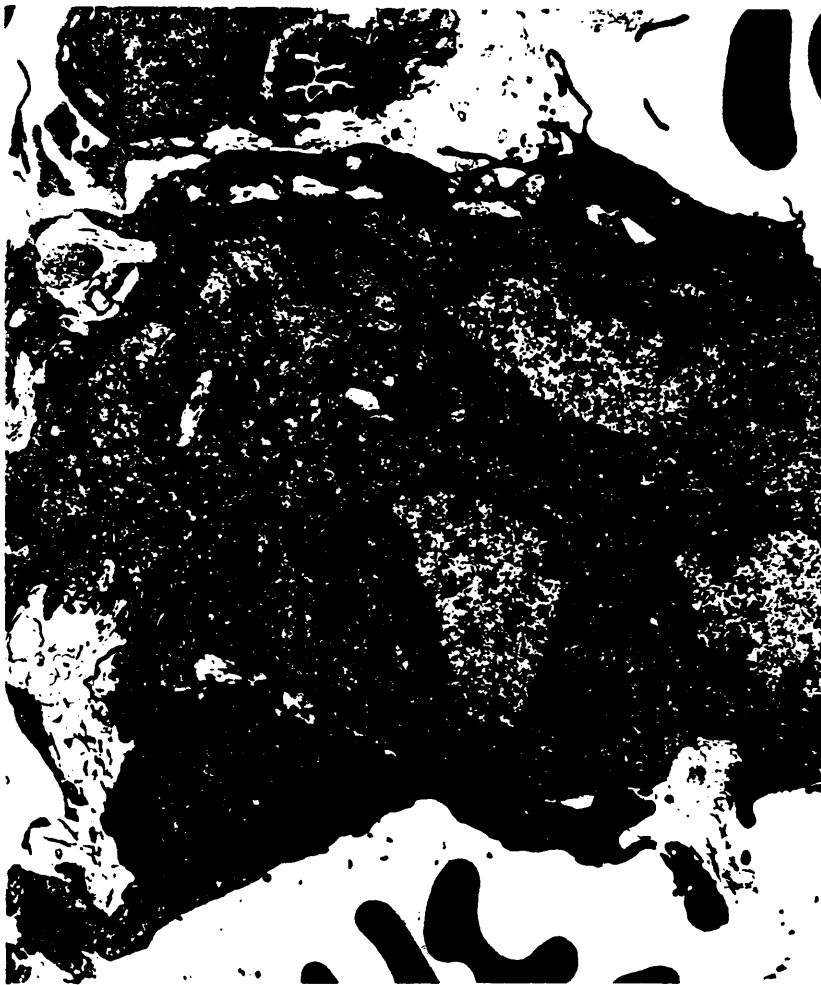
**Fig. 80:**

20 días. Prolongaciones astrocitarias de la glia limitans neoformada, entre las que se observan zonas densas que pueden corresponder a mecanismos de unión (flecha). Todas estas prolongaciones aparecen recubiertas por la lámina basal . X 31974.



Fig. 81:

20 días. Acúmulos celulares sólidos en el espesor de la meninge neoformada. X 7118.

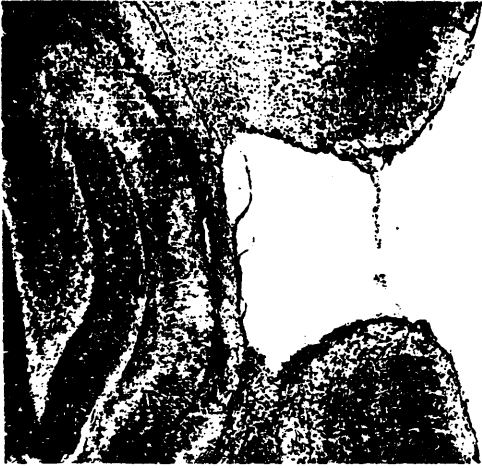


**Fig. 82:**

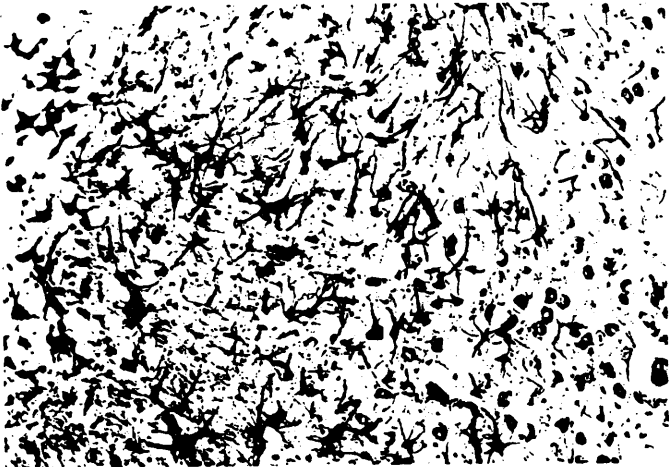
45 días. H-E. Sección longitudinal del trayecto de la lesión, en la que se comprueba la ausencia absoluta de material necrótico, apareciendo los bordes de la cavidad perfectamente delimitados. 4 X.

**Fig. 83:**

30 días. Oro sublimado. Intensa hiperplasia e hipertrofia astrocitaria que forma una importante gliosis en el trayecto de la lesión. 20 X.



82



83

Fig. 84:

30 días. Barrera glial constituida por prolongaciones astrocitarias laminares que forman complejas interdigitaciones. X 16352.

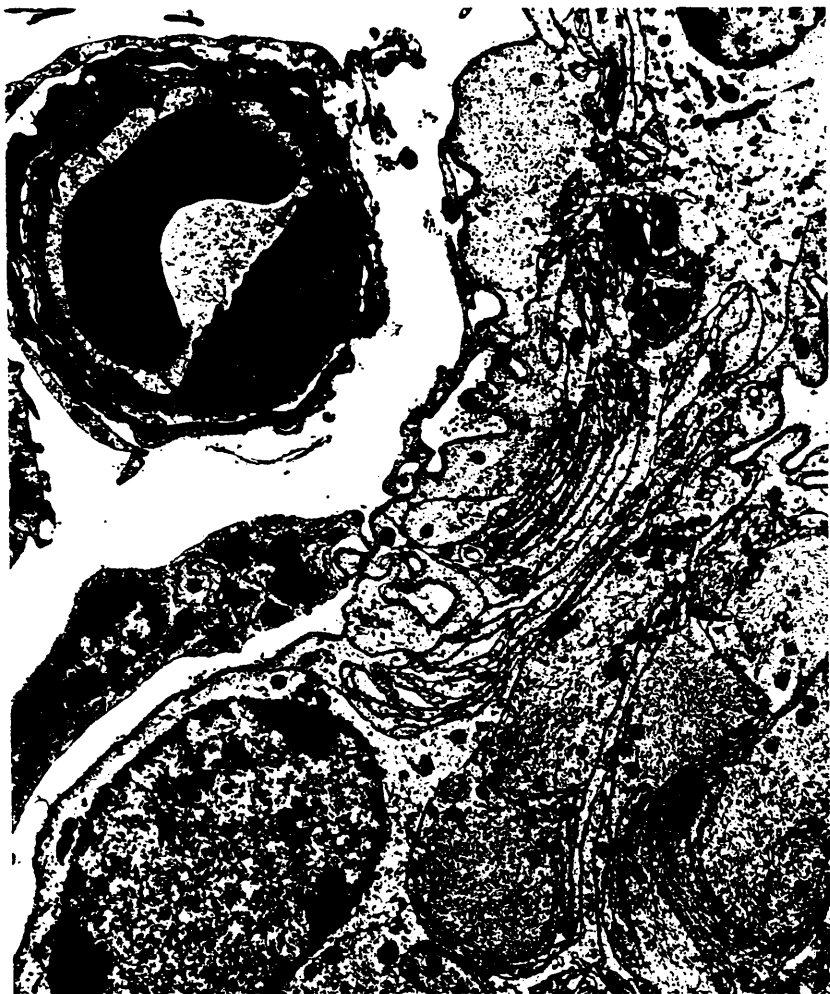


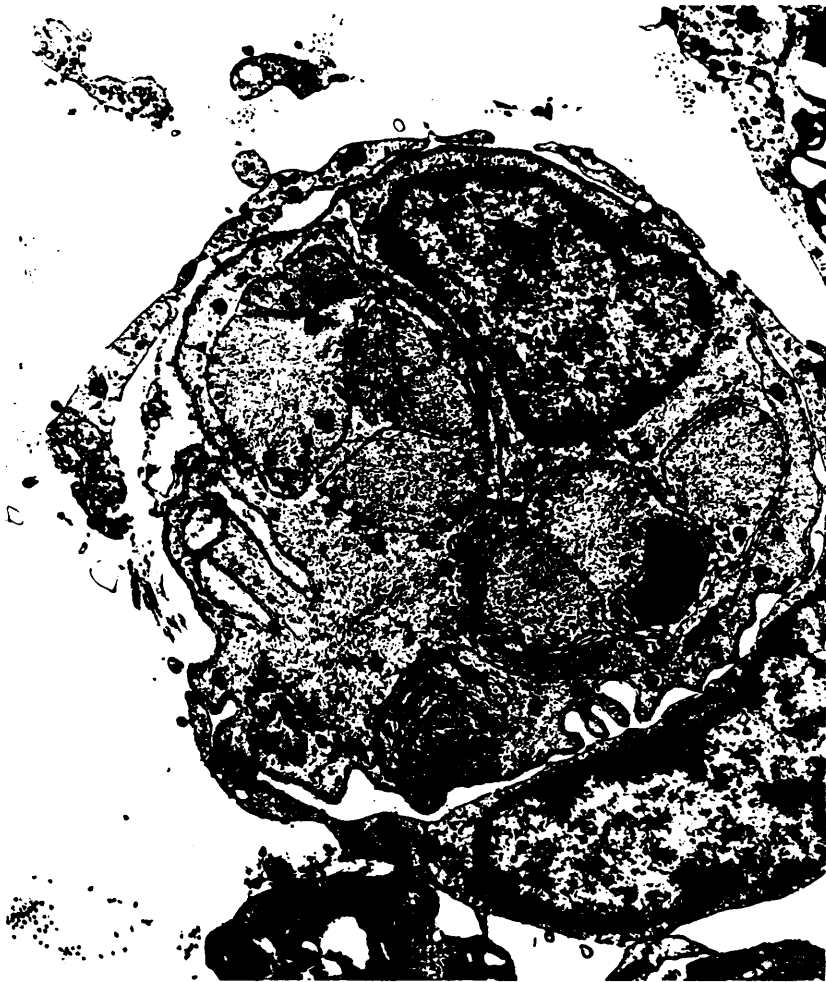
Fig. 85:

30 días. Area con barrera glial limitante de escaso grosor. X 10877.



**Fig. 86:**

45 días. Haces de prolongaciones astrocitarias en el espesor de la meninge, envueltas por su lámina basal. Nótese la riqueza de microfilamentos que poseen estas prolongaciones. X 16352.



**Fig. 87:**

45 días. Haz glial revestido por lámina basal, en relación  
con somas de células meníngeas y capilares sanguíneos.  
X 16352.



**Fig. 88:**

45 días. Vaso sanguíneo en el parénquima cercano a la lesión. Reacción de células adventiciales. Hipertrofia de pies absorbentes. X 10877.



H.88

**Fig. 89:**

45 días. Célula plasmática en espacio meníngeo. X 11920.



**Fig. 90:**

3 meses. Barrera glial limitante formada por prolongaciones gruesas de astrocitos, muy ricas en microfilamentos, y prolongaciones laminares que se interdigitan. X 10877.



**Fig. 91:**

3 meses. Gran complejidad de las interdigitaciones de las prolongaciones astrocitarias laminares que forman parte de la barrera glial limitante. X 16352.



Fig. 92:

3 meses. Haz de prolongaciones astrocitarias en el territorio de la meninge. Algunos meningocitos emiten prolongaciones que se relacionan con él. X 16352.



**Fig. 93:**

3 meses. Cordón formado por prolongaciones de astrocitos, en el territorio meníngeo, que incluye también elementos macrofágicos. X 10877.



Fig. 94:

3 meses. Haces de fibras colágenas situadas en el espacio meníngeo, y en relación con prolongaciones de los menin-  
gocitos. X 23360.



**Fig. 95:**

3 meses. Pequeños fascículos de fibras oxitalanas (flechas), en relación con microfibrillas colágenas de la meninge neoformada. X 44348.



Fig. 96:

3 meses. Célula plasmática con gran actividad, en el espacio meníngeo. X 16352.

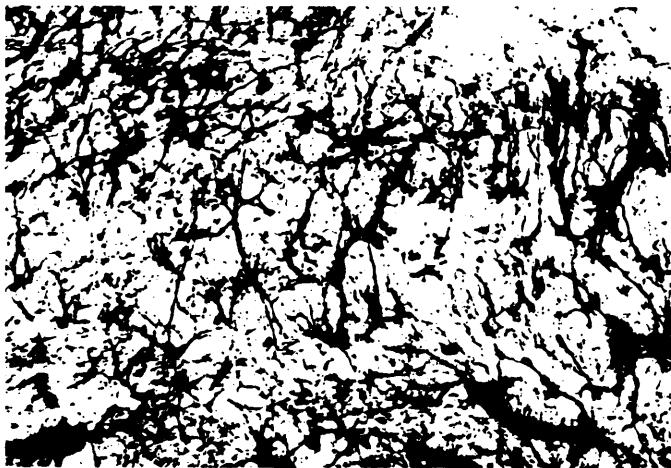


Figs. 97 y 98:

4 meses. Oro sublimado. Marcada gliosis alrededor del trayecto. 10 X y 40 X.



97



98

Fig. 99:

7 meses. Cordones gliales en el territorio meníngeo, que engloban fibras nerviosas mielínicas. Este cordón aparece separado de las células meníngeas por la lámina basal (flechas). X 16352.



Fig. 100:

7 meses. Cordón glial que engloba fibras miélnicas y que presenta varias invaginaciones de la lámina basal, a cuyo nivel se alojan numerosas microfibrillas colágenas. X 23360.



Fig. 101:

10 meses. Célula plasmática en espacio meníngeo, que muestra un retículo endoplasmático muy dilatado y ocupado por material electrodense. X 23360.



Fig. 102:

12 meses. Macrófago en el espacio meníngeo. X 16352.



**Fig. 103:**

12 meses. Zona de meninge neoformada que aparece constituida por acúmulos celulares sólidos, y espacios ocupados incompletamente por microfibrillas colágenas. X 7118.



Fig. 104:

12 meses. Meningocito de meninge neoformada de morfología y ultraestructura normales. X 10877.

