



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS
PUENTES INTERVASCULARES EN LA
CORTEZA CEREBRAL HUMANA.**

TESIS DOCTORAL

MARIA LUISA ORTEGA SÁNCHEZ

2017

UAB



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS PUENTES
INTERVASCULARES EN LA CORTEZA CEREBRAL
HUMANA.**

Memoria elaborada por:

María Luisa Ortega Sánchez

Programa de Doctorado en Cirugía y Ciencias Morfológicas

Para optar al grado de:

Doctora por la Universitat Autònoma de Barcelona

Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del **Dr. Alfonso Rodríguez Baeza**, en el
Departament de Ciències Morfològiques de la Facultat de Medicina, Universitat
Autònoma de Barcelona.

Tutor: Dr. **Alfonso Rodríguez Baeza**.

Bellaterra, diciembre de 2017



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Ciències Morfològiques

ALFONSO RODRÍGUEZ BAEZA, Catedrático de Universidad del Departament de Ciències Morfològiques, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona

HACE CONSTAR,

Que doña **MARÍA LUISA ORTEGA SÁNCHEZ** ha realizado el trabajo de investigación titulado **“ESTUDIO MORFOLÓGICO DE LOS PUENTES INTERVASCULARES EN LA CORTEZA CEREBRAL HUMANA”** bajo mi dirección, en el Departament de Ciències Morfològiques de la Facultat de Medicina de l’Universitat Autònoma de Barcelona.

Que considero el trabajo finalizado y apto para ser presentado y defendido por la doctoranda como memoria para obtener el Grado de doctora por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que conste firmo la presente en Bellaterra (Barcelona) a 27 de noviembre de 2017.

Alfonso Rodríguez Baeza

Catedrático de Universidad
Departament de Ciències Morfològiques
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

AGRADECIMIENTOS

Los años que he dedicado a la realización de esta tesis han sido duros pero a su vez muy enriquecedores. Me resulta difícil sintetizar en pocas palabras el afecto, gratitud y cariño, que he recibido de las personas que me han acompañado durante esta andadura.

Muy especialmente quiero dar las gracias a mi director de tesis, Dr. Alfonso Rodríguez-Baeza, *“el mestre”* a lo largo de mi trayectoria profesional y personal, mi compañero en el día a día. Una persona que considero un ejemplo a seguir, por su sabiduría, profesionalidad, y humildad, que sabe transmitir la pasión por su profesión. Sin su paciencia, ayuda, y confianza, este trabajo nunca hubiera llegado a su fin.

Agradecer al Dr. Jesús Ruberte, la dedicación y apoyo que me ha brindado, gracias por tus conocimientos y dedicación. Gracias, a todo tu equipo, auténticos profesionales, que han conseguido que me sienta una más entre ellos.

Al Dr. Santi Rojas, gracias por ayudarme a resolver esas “dudas”, y por transmitirme tu espíritu científico, por aguantar mi “royos” en momentos de estrés, por tu amabilidad y tus ideas.

Gracias por la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré como Anna Garrit, sin su ayuda la preparación de las muestras hubiera sido un desastre, a Manel Querol por sus consejos informáticos y por esos cafés, a Nat por ayudarme en mi “desorden”, a Silvia y Mar por los momentos robados de charlas y risas para desestresarme.

A los compañeros que han estado y me han acompañado durante mi trayectoria profesional como Alba “corresi” y “coadjunta” y una amiga; Chesco amigo desde que iniciamos, hace muchos, nuestras andaduras en la “uni”; Sergi y Alex, compañeros de “sonda”, Anucha, Ignasi, Dolors... y a los que posiblemente me dejo sin nombrar, gracias por los momentos compartidos, por los ánimos y consejos proporcionados.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral, con sus altos y bajos y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi

corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

No quiero dejar de hacer mención especial a mi familia tanto de la parte “granadina” como de la “chilena”, por su apoyo incondicional. Gracias a mis padres, de los que estoy muy orgullosa por todo lo que han hecho por mí.

Pero, sobre todo, “*hasta el infinito y más allá*” gracias a mi hija Paula y a mi marido por su paciencia, comprensión y solidaridad con este proyecto, por el tiempo que me han concedido, un tiempo robado a la historia familiar. Sin su apoyo este trabajo nunca se habría escrito y, por eso, este trabajo es también el suyo.

Gracias, a todos los que han leído esta tesis y a los que en un futuro la leerán, porque sin ellos, no tendría ningún sentido.

**A mi hija Paula,
y a Poncho
por ellos, este trabajo ha visto la luz.
A mi padre,
porque se que lo estás viendo.**

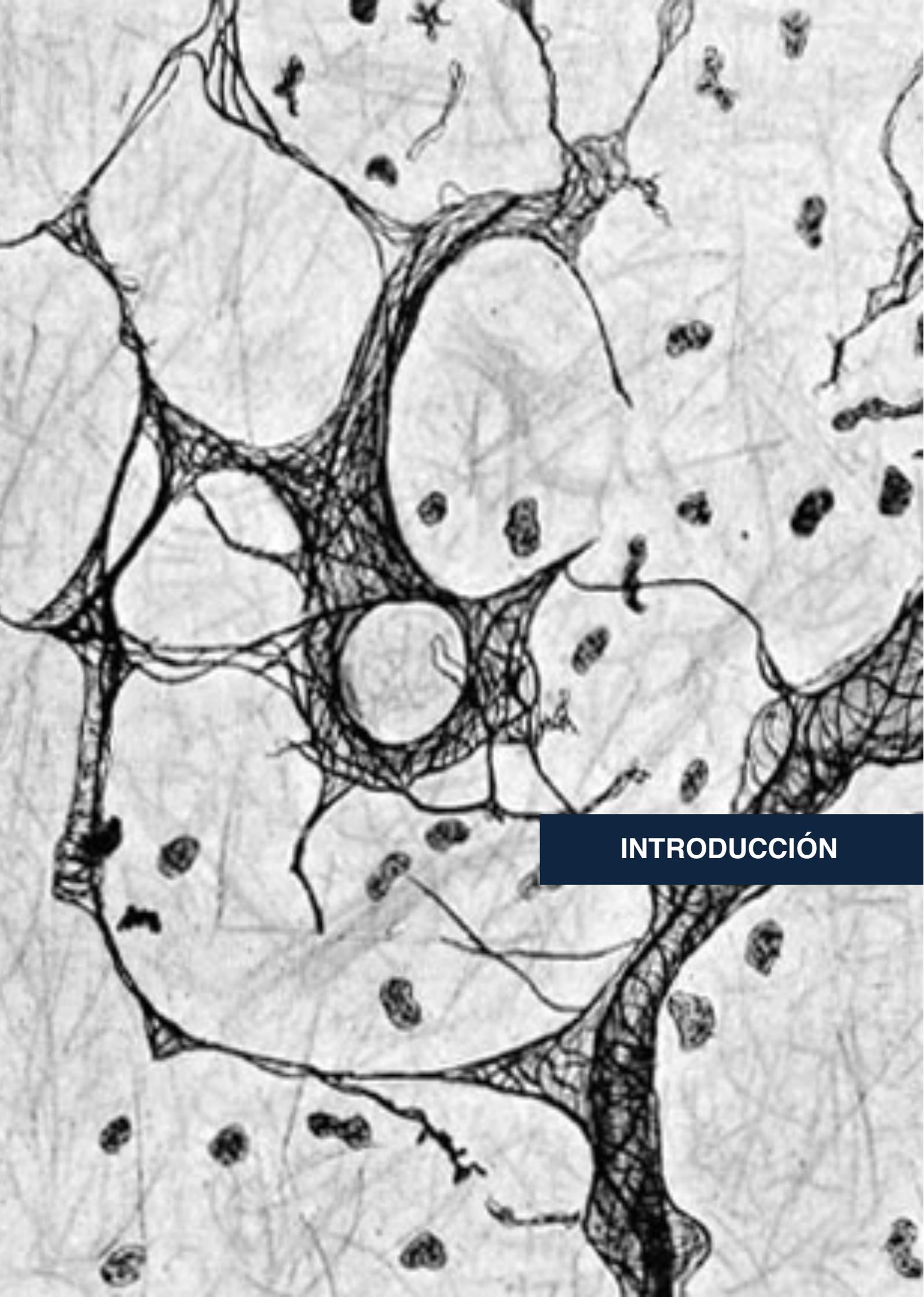
***“Vive como si fueras a morir mañana,
aprende como si fueras a vivir siempre.”***

M. Ghandi.

INTRODUCCIÓN	09
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
1. Estructura de la corteza cerebral	11
2. Patrón vascular arterial de la corteza cerebral	14
2.1. Aspectos morfofuncionales generales de los vasos sanguíneos cerebrales	18
2.2. Aspectos morfoestructurales de las arteriolas cerebrales	21
2.3. Aspectos morfoestructurales de los capilares cerebrales	22
3. Puentes intervasculares (“PIVs”)	28
3.1. Formación y significado de los PIVs	30
3.2. Características morfoestructurales de los PIVs	32
3.3. Características funcionales de los PIVs	35
3.4. Localización de los PIVs	36
3.5. Implicación de los PIVs en la patología cerebral	37
3.6. Clasificaciones propuestas para los PIVs	39
4. Traumatismos craneoencefálicos (TCE)	40
4.1. Factores implicados en las lesiones de los TCE	41
4.2. Repercusión de la isquemia cerebral en el paciente neurotraumático	45
4.3. PIVs en los traumatismos craneoencefálicos	46
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
MATERIAL Y MÉTODOS	55
1. Obtención de las muestras	55
2. Fijación y conservación de las muestras	59
2.1. Fijación para la inclusión en parafina y corte en vibratomo	59
2.2. Fijación para microscopía electrónica de transmisión	60

3. Procesamiento de muestras en bloque de parafina para estudio mediante microscopia óptica	60
4. Procesamiento de muestras seccionadas con vibratomo para estudio mediante microscopia óptica	62
5. Procesamiento de muestras seccionadas con vibratomo para estudio mediante microscopia láser confocal	65
6. Procesamiento de muestras para estudio mediante microscopia electrónica de transmisión	67
7. Análisis descriptivos	68
8. Análisis morfométricos	69
9. Análisis estadístico	71
9.1. Comparación entre lóbulos cerebrales	72
9.2. Comparación entre grupos	72
9.3. Análisis correlacional	73
9.4. Análisis de los patrones de los PIVs según la presencia de células	73
RESULTADOS	77
1. Características de los sujetos de estudio	77
2. Comprobación de la conservación del tejido cerebral	78
2.1. Descripción de las alteraciones del tejido cerebral mediante tinción con hematoxilina-eosina	78
2.2. Descripción morfológica de las alteraciones del tejido cerebral mediante microscopia electrónica de transmisión (TEM)	79
3. Presencia de PIVs en la corteza cerebral	82
3.1. Descripción morfológica	83
3.2. Composición de los PIVs	85
3.3. Posible presencia de células endoteliales, de pericitos y/o de otro tipo de células en los PIVs	88
3.4. Valoración de los PIVs en el grupo Control	90
3.5. Valoración de los PIVs en el grupo de TCE	92
3.6. Comparación de los PIVs entre el grupo Control y el grupo TCE	95

4. Clasificación de los PIVs	98
5. Densidad capilar y lacunaridad en el grupo Control	104
6. Densidad capilar y lacunaridad en el grupo TCE	107
7. Comparación de la densidad capilar y de lacunaridad entre ambos grupos	110
8. Relación entre densidad capilar, PIVs, y lacunaridad	112
8.1. Grupo Control	112
8.2. Grupo TCE	114
9. Otros hallazgos del estudio	116
DISCUSIÓN	121
1. Sobre material y metodología empleados en el estudio	121
2. Sobre las diferentes nomenclaturas utilizadas	125
3. Sobre la caracterización, estructura y localización de los PIVs	126
4. Sobre la formación de los PIVs	129
5. Sobre la clasificación de los PIVs	133
6. Sobre la fisiopatología de los PIVs	134
7. Sobre el papel que desempeñan los PIVs en patología cerebral	137
7.1. Otros hallazgos en relación al grupo TCE	141
8. Sobre el papel de los pericitos en relación a los PIVs	143
9. Sobre alteraciones de la BHE y la membrana basal en TCE	145
CONCLUSIONES	153
BIBLIOGRAFÍA	159
ANEXO	183



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El estudio de la vascularización del sistema nervioso central (SNC) es de especial importancia si tenemos en cuenta que en muchas de las enfermedades que le afectan (procesos neoproliferativos, inflamatorios, traumáticos, degenerativos, etc...) está implicado el sistema vascular. Por este motivo hemos considerado oportuno realizar este trabajo, que versa sobre el estudio morfológico de ciertas estructuras vasculares observadas en el SNC (y representadas gráficamente) por nuestro ilustre premio nobel, don *Santiago Ramón y Cajal en 1907* y que actualmente deben ser revalorizadas. Estas estructuras son conocidas con diferentes nombres, entre ellos, “*intervascular strands*”, “*intercapillary bridges*,” o “*string vessels*” (*Reissenwebwer y Pessacq, 1971; Leibnitz y Bär, 1988; Challa et al., 2002*).

Los “*intervascular bridges*” - “*intervascular strands*” o “*puentes intervasculares*” (PIVs), como preferimos llamarlos, tienen características morfoestructurales comunes con los vasos cerebrales, como son su presencia ubicua en el córtex cerebral, su trayecto irregular y su origen mesodérmico; y por ello se ha propuesto que pueden ser derivados de vasos sanguíneos.

Una de las hipótesis planteadas para su justificación es que el mecanismo fundamental de su formación puede ser la obliteración del lumen vascular, la pérdida del flujo y la atrofia de un vaso preexistente, dejando solamente las fibras de tejido conectivo argirofílicas de su pared (*Achúcarro, 1913; Ramón y Cajal, 1925*).

El significado funcional de los PIVs puede ser similar al de las fibras de tejido conectivo en los tejidos y paredes vasculares, manteniendo la forma y la disposición de los vasos en la corteza. En algunas especies en las que se observan abundantes PIVs, estos podrían ofrecer un anclaje adicional para mantener a los vasos en yuxtaposición con las neuronas. Esta capacidad podría ser importante en tejidos en los cuáles los cuerpos celulares tienen que estar situados a lo largo de los vasos.

A parte de contribuir a la organización tisular, los PIVs también podrían participar en el mantenimiento fisiológico del flujo sanguíneo. En este sentido se ha propuesto que el acortamiento de los PIVs puede deberse a procesos en los cuáles se produce edema de las fibras de tejido conectivo del propio puente, y que el proceso edematoso de la sustancia blanca y de la sustancia gris podría conllevar al estiramiento de los mismos.

En ambas circunstancias, la tracción ejercida sobre la pared vascular podría causar constricción de su lumen.

Según *Brown (2010)*, uno de los problemas encontrados cuando se estudian los PIVs es la nomenclatura. Así, se han descrito con múltiples nombres: “*string vessels*”, “*empty basement membrane tubes*”, “*acellular capillary strands*”, “*intercapillary bridges*”, e “*intervascular connective tissue strands*”, entre otros. Esta variedad de nombres para describir una misma estructura es un indicio más del desconocimiento que aún existe acerca de ellos.

En la literatura consultada se han reportado descripciones de los PIVs en cerebros humanos “normales” de diferentes edades, así como en enfermedades neurodegenerativas, en enfermedades cerebrovasculares y en procesos neoplásicos. También existen estudios en los que se compara la presencia de PIVs entre la sustancia blanca y la sustancia gris encefálica, aunque no hemos encontrado estudios que hagan referencia a la presencia de PIVs en relación con las diferentes áreas corticales y tampoco tenemos constancia de trabajos que hayan evaluado el papel de estas estructuras en individuos que hayan fallecido a consecuencia de un traumatismo craneoencefálico (TCE) grave.

Muchos de los artículos consultados apuntan a que estas estructuras representan la pérdida de capilares. Sin embargo, a pesar de todos los estudios realizados hasta la actualidad, la estructura y el significado de los PIVs es todavía un tema controvertido.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El interés por el conocimiento de las diferentes estructuras que conforman el SNC es para los profesionales dedicados a la neurociencia una finalidad primordial, que permite profundizar y avanzar en el estudio de las diferentes patologías que le afectan.

En el campo de la neuroanatomía es importante identificar, caracterizar y describir, tanto macroscópica como microscópicamente, las diferentes estructuras que conforman el SNC, e intentar dar un significado a las mismas, contribuyendo así al avance de la neurociencia.

1. ESTRUCTURA DE LA CORTEZA CEREBRAL

La corteza cerebral puede estudiarse desde diferentes perspectivas: angioarquitectónica, mieloarquitectónica, citoarquitectónica, etc... ya que es un complejo intrincado de células nerviosas y de fibras, de neuroglia y de vasos sanguíneos (*Standring, 2016*).

Desde la perspectiva citoarquitectónica, la presencia de estratos de neuronas permite clasificar la corteza cerebral en allocórtex y en isocórtex (*Dauber, 2006*). El allocórtex es esencialmente triestratificado y a él pertenecen el paleocórtex (relacionado con el sentido del olfato) y el archicórtex (formado por el hipocampo y la circunvolución dentada del sistema límbico). El isocórtex, o neocórtex, constituye la mayor parte de la corteza cerebral humana y se caracteriza por la presencia de 6 capas o láminas paralelas a la superficie.

El grosor de la corteza cerebral varía de una región a otra, presentando un grosor de entre 1,5 mm (área pericalcarina) y 4,5 mm (área somatomotora). Está constituido fundamentalmente por tres tipos de neuronas: las células piramidales, las más abundantes, y las células estrelladas o granulares subdivididas en tipo espinoso y tipo no espinoso.

La estructura celular neocortical presenta variaciones regionales, distinguiéndose un córtex de tipo agranular (o piramidal), un córtex de tipo granular (o koniocórtex), un córtex de tipo frontal, un córtex de tipo parietal y un córtex de tipo polar (*Mancall y Brock, 2011; Standring, 2016*). Se denomina corteza heterotípica a las de tipo granular y agranular, mientras que se denomina corteza homotípica a los otros tres tipos.

En la organización laminar del neocórtex, las seis capas (o láminas) son (**figuras 1 y 2**):

Capa molecular o plexiforme (capa I): es la capa más superficial. Contiene células horizontales cuyos procesos dan lugar a una malla de fibras tangenciales entremezcladas con fibras procedentes de células de Martinotti y de células piramidales (estría de la capa molecular). Entre las fibras nerviosas hay algunas células de Cajal.

Capa granular externa (capa II): contiene células piramidales y abundantes células estrelladas, además de células neurogliaformes. Las fibras que atraviesan la lámina muestran una disposición principalmente vertical.

Capa piramidal externa (capa III): está formada principalmente por células piramidales de diferentes tamaños, junto a neuronas no piramidales dispersas. Las neuronas piramidales de menor tamaño se encuentran en la parte superficial y las más grandes en la parte profunda de esta lámina. Se ha propuesto una subdivisión de esta lámina en IIIa, IIIb y IIIc, de superficie a profundidad. Las fibras de esta lámina también se disponen verticalmente.

Capa granular interna (capa IV): es habitualmente la más estrecha de las láminas y contiene densos paquetes de pequeñas neuronas no piramidales de cuerpo redondeado, siendo estas neuronas estrelladas de tipo espinoso. Junto a estas neuronas se encuentran algunas células piramidales pequeñas. Las fibras de esta lámina se disponen horizontalmente, formando la banda externa de Baillarger.

Capa piramidal interna o ganglionar (capa V): contiene células piramidales grandes cuyo tamaño varía según las regiones de la corteza cerebral. Así, en el área 4 de Brodmann son neuronas gigantopiramidales de Betz. También contiene algunas células no piramidales entremezcladas. La lámina está atravesada por fibras de disposición vertical, pero también se distingue una banda prominente de fibras horizontales, dando lugar a la banda interna de Baillarger.

Capa multiforme o fusiforme-polimórfica (capa VI): se caracteriza por la presencia de células polimorfas, entre las que se encuentran las neuronas de Martinotti. Las células suelen ser de pequeño y mediano tamaño. Esta lámina se separa gradualmente de la sustancia blanca subcortical, sin un límite preciso entre ambas estructuras.

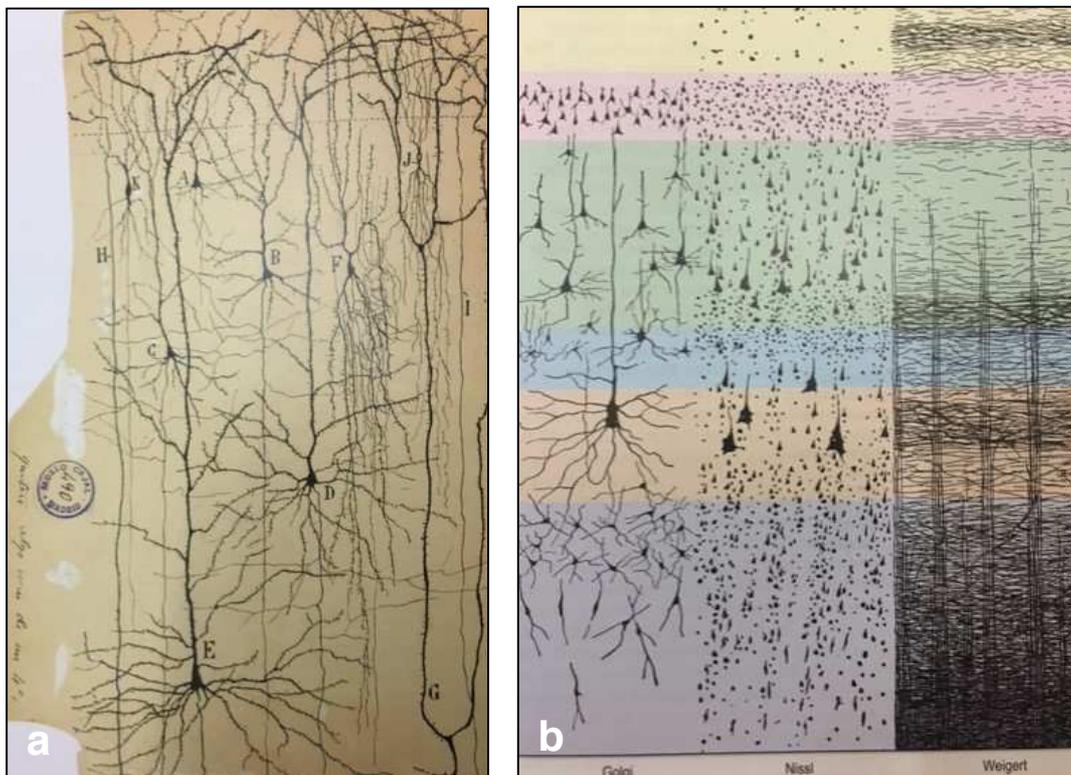


Fig.1. (a) Esquema realizado por Ramón y Cajal (1899) donde se muestran las capas del neocórtex (imagen del libro “Portraits of the Mind”, Schoonover, 2008). (b) Esquema actual de las capas del neocórtex (imagen del libro “Gray’s Anatomy”, Standring, 2016).

Estudios fisiológicos experimentales y de conexiones han demostrado una organización columnar de la corteza cerebral, siendo los primeros en realizar esta propuesta *Mountcastle (1957)* y *Hubel y Wiesel (1962)*. Las columnas o módulos corticales afectan a todas las láminas, presentando un diámetro de 200 a 600 μ m. Cada módulo incluye un número de 2.000 a 8.000 neuronas y se calcula que existen unos 4.000.000 de módulos relacionados funcionalmente entre sí (*García Porrero y Hurle, 2005*).

2. PATRÓN VASCULAR ARTERIAL DE LA CORTEZA CEREBRAL

El encéfalo recibe su irrigación arterial por tres sistemas: dos anteriores o carotídeos, representados por las dos arterias carótidas internas, y uno posterior o vértebro-basilar. En la base del encéfalo, y en relación al rombo optopeduncular, estos tres sistemas se anastomosan formando el círculo arterial del cerebro o polígono de Willis. Cada arteria carótida interna da lugar a una arteria cerebral anterior y a una arteria cerebral media o silviana, además de la arteria coroidea anterior. Del sistema vértebro-basilar salen las arterias cerebrales posteriores, además de arterias pontinas, cerebelosas, bulbares y espinales (anteriores y posteriores) entre otras (**figura 3**).

El círculo arterial del cerebro se forma por la presencia de unas arterias comunicantes: una anterior, que une las arterias cerebrales anteriores, y dos posteriores, que unen las arterias carótidas internas, o las arterias cerebrales medias, con las arterias cerebrales posteriores.

Aunque este círculo está presente en prácticamente el 90% de las personas, una conformación bien desarrollada y simétrica sólo se observa en menos del 50% de la población (*Wolpert, 1997*). Las variaciones son frecuentes, afectando al número y/o al calibre de las arterias que participan (*Puchades-Orts et al., 1976*). Así, en el reciente libro de variaciones anatómicas (*Tubbs et al., 2016*) se hace referencia a variaciones primarias en los vasos del círculo arterial de Willis que incluyen ausencia, hipoplasia, duplicación, triplicación y persistencia de patrones embrionarios. También se han descrito fenestraciones en los vasos que se han asociado a la formación de aneurismas.

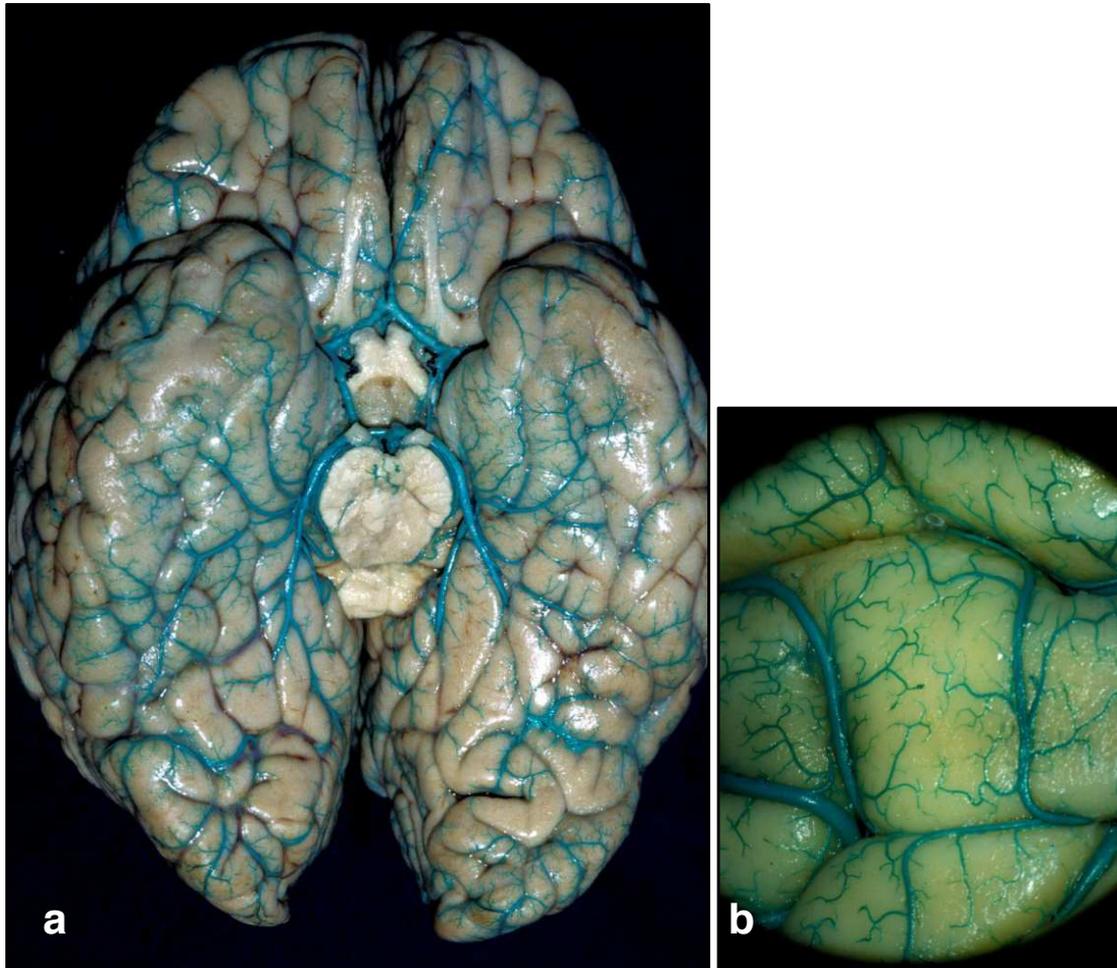


Fig. 3. Inyección arterial de látex natural coloreado. (a) Norma basal dónde se muestra el círculo arterial del cerebro (polígono de Willis). (b) Detalle de una de las circunvoluciones (10x).

La corteza cerebral recibe su irrigación de ramas de las arterias cerebrales, así como de las arterias coroideas anteriores (*Stephens y Stilwell, 1969; Lazorthes et al., 1976*). Cada arteria cerebral tiene un territorio de irrigación cortical, que en el caso de las arterias cerebrales anterior y posterior sobrepasan los bordes periféricos para alcanzar la cara convexa del cerebro, territorio de la arteria cerebral media. Así, entre las ramas terminales de las arterias cerebrales se establecen anastomosis en superficie. Estas anastomosis, descritas por *Lazorthes et al. (1976)*, suelen ser término-terminales, presentando un diámetro de 200 a 500 μm , y son importantes en la fisiopatología cerebrovascular ya que, ante la obstrucción en una arteria, las anastomosis pueden redistribuir cierto flujo sanguíneo a territorios adyacentes.

La disposición que presentan los vasos a nivel de la corteza cerebral, la angioarquitectura, ha sido estudiada por diferentes autores mediante la aplicación de técnicas de inyección vascular y de nuevas técnicas de imagen.

Duvernoy et al., (1981), mediante la inyección intravascular de tinta china gelatinada así como de resinas plásticas de baja densidad, estudiaron la vascularización cortical en 25 cerebros humanos. En su estudio clasificaron las arterias intracorticales en seis grupos, según el grado de penetración en la corteza:

- **Grupo 1 (A1):** compuesto por vasos de 10 μm de diámetro que alcanzan la capa molecular (I), pudiendo extenderse hasta la capa granular externa (II).
- **Grupo 2 (A2):** compuesto por vasos que alcanzan la parte superficial de la capa piramidal (IIIa, b). El diámetro de los vasos oscilaba entre 10 y 25 μm .
- **Grupo 3 (A3):** son más numerosos. Penetran hasta la región media del córtex, que parece ser la más vascularizada. Esta región corresponde a la capa granular interna (IV) y se sobrepone con los segmentos adyacentes de la capa piramidal (IIIc) y ganglionar (Va). El diámetro de los vasos osciló entre 15 y 30 μm .
- **Grupo 4 (A4):** alcanzan la capa multiforme, así como el límite con la sustancia blanca subcortical. El diámetro de los vasos era mayor, oscilando entre 30 y 40 μm .

- **Grupo 5 (A5):** son arteriolas que atraviesan todo el córtex suministrándole irrigación, así como a la sustancia blanca subyacente. El diámetro de los vasos permaneció estable en su trayecto cortical y osciló entre 30 y 75µm. En la zona de transición entre la sustancia gris y la sustancia blanca estos vasos presentaban un trayecto sinuoso y podían disponerse en ovillo.
- **Grupo 6 (A6):** está compuesto por arterias de considerable diámetro (entre 50 y 240µm) que pasaban a través de la sustancia gris, sin ramificarse, para irrigar únicamente la sustancia blanca subcortical.

La densidad vascular en el parénquima nervioso no es uniforme, siendo la sustancia gris la que presenta una mayor densidad vascular respecto a la sustancia blanca (*Coob, 1931; Weiss y Edelman, 1976*). Además, la integridad del sistema vascular tiene gran impacto en la función cerebral.

La vascularización cortical no solamente presenta variaciones angioarquitectónicas entre los distintos estratos celulares, sino que también entre áreas corticales funcionalmente diferentes (*Cragie, 1921; Lazorthes et al., 1968; Orts Llorca, 1986; Duvernoy et al., 1981*). En este sentido *Pfeifer (1928)* describió hasta una docena de disposiciones arteriales y capilares diferentes en las distintas áreas corticales. *Lazorthes et al. (1968)* señalaron que las áreas del archicórtex presentan una vascularización simple, compuesta por arterias largas, de bajo calibre y dispuestas paralelamente entre ellas.

A nivel de paleocórtex, las arterias se ramifican en forma de cáliz o candelabro, estableciéndose dos estratos vasculares: uno superficial y otro profundo. En el neocórtex, las áreas de recepción y de asociación presentan una densidad vascular mayor que las áreas motoras (*Craigie, 1945*).

En función de la densidad capilar, y de su distribución, algunos autores (*Lauwers et al., 2008*) han dividido la corteza cerebral en 4 zonas, de superficie a profundidad:

- la primera zona (1) ocupa el 10% del córtex. Está desprovista de capilares en la parte más superficial; a medida que se profundiza aparece un aumento brusco de la densidad capilar,

- la segunda zona (2) ocupa entre el 10 y el 50% del córtex. La densidad capilar aumenta de forma gradual hasta un máximo,
- la tercera zona (3) ocupa entre el 50 y el 80% del córtex y en ella se produce una disminución de la densidad capilar,
- la cuarta zona (4) ocupa entre el 80 y el 100% del córtex, alcanzando la sustancia blanca subcortical.

Es en las zonas 2 y 3 donde se observa una mayor densidad capilar, mientras que la densidad es menor en la zona subcortical. Este hecho ha sido relacionado con fenómenos neurodegenerativos ya que muchos de estos fenómenos afectan a esta zona (*Lauwers et al., 2008*).

2.1. Aspectos morfofuncionales generales de los vasos sanguíneos cerebrales

Se considera que el flujo sanguíneo cerebral es de 50-60ml/100g/min, permaneciendo constante en condiciones normales, aunque se produzcan variaciones significativas de la presión arterial sistémica.

El SNC tiene unas necesidades metabólicas muy elevadas, como se demuestra en el hecho de que el encéfalo, que representa tan sólo el 2% del peso corporal en el adulto, tenga un consumo de oxígeno equivalente al 20% y que el consumo de glucosa sea aún mayor, representando prácticamente el 25% del consumo total del organismo (*Sahuquillo et al., 1996*).

Existe una manifiesta desproporción entre el flujo sanguíneo que recibe la sustancia gris y la que recibe la sustancia blanca, siendo en el primer caso aproximadamente 4 veces superior (*Nordström et al., 1990*). Además, la activación funcional de determinadas regiones encefálicas provoca variaciones considerables del flujo sanguíneo, y por lo tanto del metabolismo.

La efectividad del sistema cerebrovascular está determinada por la peculiar disposición de sus vasos sanguíneos, siguiendo un patrón de arborización cuyo diseño mantiene un flujo sanguíneo constante con un mínimo coste energético (*Rossitti y Lofgren, 1993*).

Aunque los términos “capilares” y “microvasos” son a menudo utilizados indistintamente, la microvascularización comprende una serie de segmentos anatómicos y funcionales: arteriolas (de 10 a 100 μm), capilares (de 4 a 10 μm) y vénulas (de 10 a 100 μm), cada uno con características propias (*Simionescu y Simionescu, 1977*), que no sólo corresponden a la presencia de células adventiciales adyacentes (pericitos, células musculares lisas), sino también a la naturaleza heterogénea de las propias células endoteliales (*Ge et al., 2005*).

Autores como Reina de la Torre et al., (1998) han estudiado la morfología y la distribución de los microvasos corticales humanos, así como de estructuras perivasculares, en los territorios arteriolar y capilar, posiblemente implicados en la regulación del flujo sanguíneo. Establecieron que las arteriolas corticales humanas tienen un diámetro que oscila entre 20 y 90 μm y que se originan a partir de la red pial. Los capilares, procedentes de estas arteriolas, presentaron un diámetro medio de 7 μm . Así mismo clasificaron las arterias corticales en cortas, medias, largas y transcorticales, según la profundidad que alcanzaban en la corteza cerebral.

Además, establecieron los estratos vasculares subpial, superficial, medio y profundo en la angioarquitectura de la corteza cerebral. Las estructuras perivasculares anexas al lumen vascular (de arteriolas y capilares) observadas por estos autores (*Rodríguez-Baeza et al., 1998*) en moldes de microcorrosión vascular fueron justificadas a partir de uniones mio-endoteliales y pericito-endoteliales. En este sentido se postuló su posible papel regulador en el flujo sanguíneo cerebral cortical (**figura 4**).

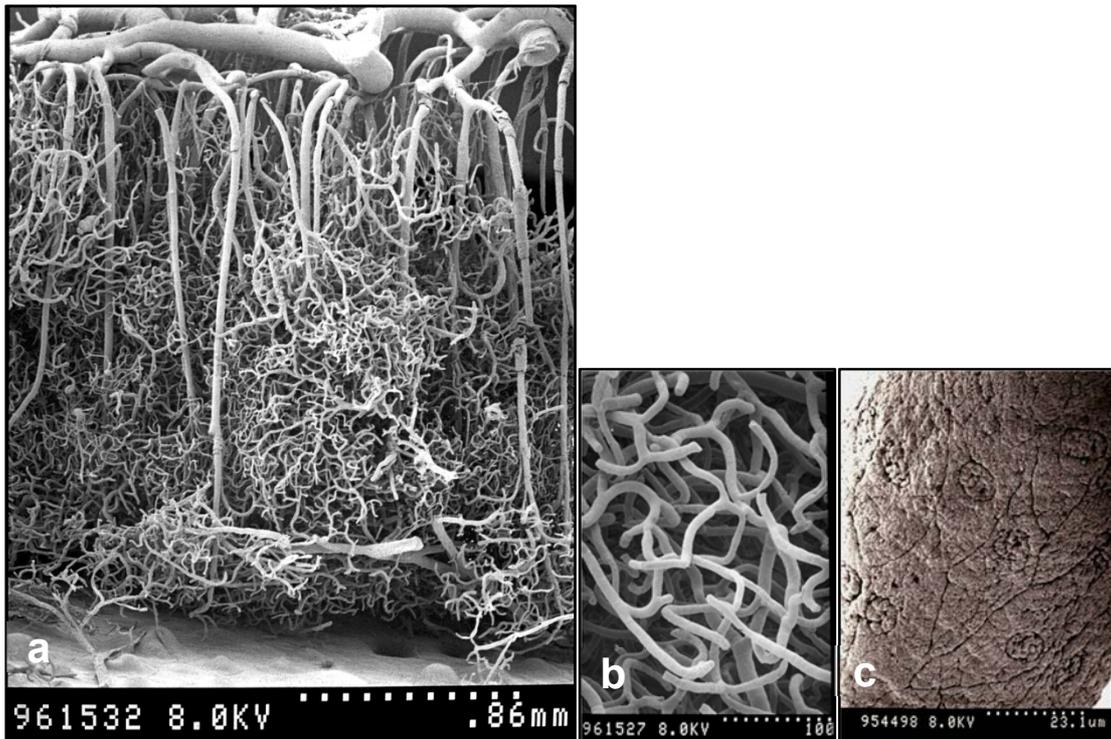


Fig. 4. Moldes de microcorrosión de vasos de la corteza cerebral humana. Inyección intravascular de Mercor[®] y estudio mediante microscopio electrónico de barrido. (a) Imagen de la microvascularización de la corteza cerebral (*Reina-de la Torre et al., 1998*). (b) Detalle de la red capilar (*Rodríguez-Baeza et al., 1998*). (c) Improntas de células endoteliales en los moldes (*Rodríguez-Baeza et al., 2004*).

Estos estudios han permitido profundizar en el patrón morfoestructural de la microvascularización de la corteza cerebral humana, así como disponer de un patrón normal de referencia para ser utilizado comparativamente en otros estudios de situaciones anormales o patológicas.

El conocimiento morfológico de la microvascularización tiene su repercusión en diferentes procesos: regulación del flujo sanguíneo, angiogénesis, remodelación, adaptación estructural aguda o crónica de los lechos vasculares en respuesta a la demanda funcional del tejido (*Carmeliet, 2005; Noble et al., 2005*), así como en la respuesta del flujo sanguíneo a la actividad neuronal (*Pries y Secomb, 2003*).

Las alteraciones vasculares que se asocian a diferentes patologías han sido actualmente revalorizadas (*Lu et al., 2004*), siendo la angiogénesis patológica reconocida actualmente como un sello distintivo de la enfermedad (*Carmeliet, 2000*). En la enfermedad de Alzheimer, por ejemplo, cambios en la red microvascular parecen estar involucrados en la progresión de dicha patología (*de la Torre, 2002; Krucker et al., 2004*).

El flujo sanguíneo de la corteza cerebral pasa de arteriolas a vénulas por una red capilar interpuesta, y cada uno de estos elementos presenta diferencias morfológicas en su pared (*Wise et al., 1971; Saint-Geniez y D'Amore, 2004*).

2.2. Aspectos morfoestructurales de las arteriolas cerebrales

Las arteriolas son vasos sanguíneos constituidos por una túnica íntima, una túnica media y una túnica adventicia.

Las arteriolas corticales presentan una *túnica media* de una o dos capas de células musculares lisas que se orientan transversalmente respecto al eje longitudinal del vaso. Externamente encontramos la *túnica adventicia* que suele ser delgada mientras que internamente encontramos la *túnica íntima* formada por una capa de células endoteliales, separadas de la *túnica media* mediante una gruesa lámina basal formada por colágeno y fibras elásticas (*Lazorthes et al., 1976; Peters et al., 1991*).

En el lugar de entrada de las arteriolas en la corteza cerebral, estos vasos se encuentran rodeados por el denominado espacio perivascular de Virchow-Robin, continuación del espacio subaracnoideo según *Millen y Woollam (1961)*, y del espacio subpial según otros autores (*Hutchings et al., 1986; Lasjunias y Berenstein, 1990*). A medida que el vaso penetra en el córtex, el recubrimiento de las células musculares lisas se hace más delgado y el espacio de Virchow-Robin se estrecha hasta desaparecer (*Peters et al., 1991*). En la zona profunda o terminal de las arteriolas intracerebrales se observa una pérdida del recubrimiento de células musculares lisas. De forma concomitante a esta pérdida aparecen otro tipo de células en la pared de los vasos: los pericitos o células de Rouget. La aparición de estas células en la pared de los vasos nos indica el inicio del territorio capilar (*Jones, 1970*).

2.3. Aspectos morfoestructurales de los capilares cerebrales

Los capilares sanguíneos cerebrales tienen una estructura histológica básica, constituida por células endoteliales, pericitos y membrana basal. Todos estos elementos forman parte de la denominada barrera hematoencefálica (BHE).

La BHE está constituida por una monocapa de células endoteliales que cubre la superficie de la luz capilar y restringe el movimiento de pequeñas moléculas polares y macromoléculas entre la sangre y el líquido intersticial cerebral (*Reese y Karnovsky, 1967*). Esta barrera endotelial está complementada por pericitos capilares, que comparten la membrana basal con las células endoteliales. Y por último se encuentran los pies de los astrocitos, que rodean aproximadamente el 95% de la superficie abluminal de la membrana basal perivascular (*Vorbrodt y Dobrogowska, 2003*).

A continuación, comentaremos algunos de los aspectos morfoestructurales de las estructuras que forman los capilares:

- **Células endoteliales**

Las células endoteliales del segmento capilar cerebral tienen una serie de propiedades morfológicas que le diferencian de otras células endoteliales:

- son alargadas, con un núcleo que suele ser de gran tamaño y que protruye en la luz capilar.
 - forman una capa continua, la capa íntima, sin soluciones de continuidad o fenestraciones, excepto en los órganos circunventriculares. (*Wolff, 1963; Lazorthes et al, 1976; Peters et al., 1991*).
 - las células están unidas mediante *tight junctions*, con alta impedancia eléctrica y baja permeabilidad a solutos polares, dando lugar a una barrera anatómica y electroquímica, la BHE.
 - presentan escasas vesículas de pinocitosis.
 - tienen abundantes mitocondrias (3 a 5 veces más que otras células endoteliales) lo que refleja una demanda energética alta para mantener los mecanismos de transporte dependientes de energía.
 - externamente a las células endoteliales se encuentra la membrana basal, también continua. Esta membrana se desdobra para albergar a los pericitos (*Plenk, 1927; Lange y Halata, 1979*).
 - están envueltas circunferencialmente por procesos de los pies de los astrocitos.
- **Membrana basal capilar**

La membrana basal es una matriz extracelular, acelular, especializada que separa las células endoteliales y los pericitos del espacio extracelular. El grosor de la membrana basal en adultos es de 30-40nm, aunque para otros autores (*Cornford y Hyman, 2005*) es de 150-200nm, pudiendo alcanzar hasta los 400nm. La membrana es sintetizada por astrocitos y por células endoteliales, los cuáles están conectados a la membrana por finos filamentos.

Si las células endoteliales, los pericitos y las células gliales elaboran la membrana basal, la degeneración de estas células también puede inducir la degradación de dicha membrana y su lisis (*Delorme y Grignon, 1978*).

Ultraestructuralmente la membrana basal es trilaminar, distinguiéndose una *lámina interna o lúcida*, brillante y delgada que contiene las glicoproteínas de la superficie membranosa de las células endoteliales o glicocálix. A continuación se encuentra la *lámina densa*, que es la capa más gruesa, formada básicamente por colágeno tipo IV, aunque también contiene glicoproteínas, como la laminina (Timpl et al., 1983), y el heparan-sulfato-proteoglicano (Hassell et al., 1985). La tercera lámina, la *lámina rara*, está compuesta principalmente por microfibrillas y fibrillas de anclaje. Esta composición molecular de la membrana basal es única para cada tejido, confiriendo especificidad a sus vasos capilares. Esta especificidad se logra mediante la expresión de diferentes isoformas de sus componentes.

El colágeno tipo IV forma el esqueleto de la membrana basal y se encuentra principalmente en la *lámina densa*, que es el lugar de unión del material generado por los astrocitos y por las células endoteliales (Copin y Gasche, 2003).

El colágeno tipo IV y la laminina se ensamblan en estructuras tipo hoja. La laminina y el proteoglicano heparan-sulfato se encuentran en la *lámina lúcida*, a nivel de las membranas endoteliales, y en la *lámina rara externa*, a nivel de las membranas de los astrocitos. Los polímeros de laminina se forman en la superficie celular y los polímeros de colágeno tipo IV se asocian con los polímeros de laminina mediante la facilitación por nidógeno/entactina (Kalluri, 2003).

Se considera que la membrana basal forma la segunda línea de la BHE (Reese y Karnovsky, 1967). Muchos estudios basados en datos experimentales y en procesos patológicos han demostrado alteraciones de la membrana basal vascular. Castejón (1988) describió alteraciones ultraestructurales de la membrana basal en capilares corticales de pacientes con edema cerebral perifocal secundario a TCE.

La concepción inicial de que la membrana basal tenía función de barrera selectiva y de soporte físico a las células ha sido revisada para incluir en su rol otras funciones biológicas: regular el crecimiento celular, la diferenciación, la migración y su influencia en el desarrollo y reparación tisular (Copin y Gasche, 2003). Además, regula la liberación de factores de crecimiento y proteasas, jugando un rol en la angiogénesis, en la extravasación de leucocitos y en el anidamiento de células tumorales, entre otros.

Otros estudios morfológicos sobre la membrana basal y su implicación en procesos patológicos (como los tumorales) han demostrado que es incompleta o ausente (Paulus

et al., 1988; Steinberg et al., 1991; Paku y Paweletz, 1991; Paku, 1998) o que, estando presente, muestra alteraciones morfológicas (*Farnoud et al., 1992*). Ejemplos de alteraciones de la membrana basal los encontramos en la degeneración de los vasos del cristalino, cuyas células endoteliales regresan dejando manguitos vacíos de membrana basal (denominados “*intercapillary strands*”), los cuáles persisten varios días. Y también en tumores tratados con inhibidores de angiogénesis, dónde las células endoteliales se despegan de su membrana basal dejando filamentos de esta membrana sin cobertura de células endoteliales (*Baluk et al., 2003*).

El edema cerebral producido por diferentes causas, entre las que se encuentran los TCE moderados y graves, es una condición patológica susceptible de inducir alteraciones ultraestructurales en la membrana basal de los capilares cerebrales (*Castejón y Valero 1980*).

Otros autores han observado engrosamiento de la membrana basal capilar en casos de microangiopatía diabética, de enfermedad de Alzheimer, de esclerodermia y enfermedad de Raynaud, así como en envejecimiento de la retina (*Carson et al., 1980; Johnson et al., 1982*). En ciertas malformaciones congénitas, como anomalías vasculares e hidrocefalia congénita, la membrana basal también presenta alteraciones del tipo engrosamiento y vacuolización (*Castejón, 2014*).

Todos estos datos bibliográficos indican que la membrana basal capilar es, sin lugar a duda, una estructura importante en diferentes patologías que afectan al cerebro (**figura 5**).

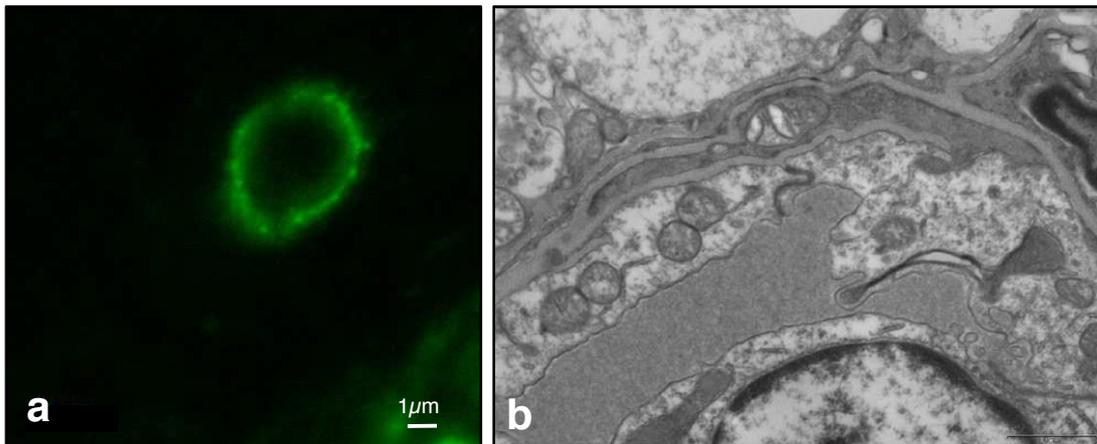


Fig. 5. (a) Marcaje inmunocitoquímico (MAS-336) de membrana de célula endotelial en capilares de corteza cerebral humana (Rodríguez-Baeza, 1998). (b) Membrana basal observada mediante microscopia electrónica de transmisión, en capilares de corteza cerebral humana.

- **Pericitos (células de Rouget)**

Durante mucho tiempo se ha prestado poca atención a la existencia y al papel que desempeñan los pericitos. Sin embargo, en los últimos años, estas células han sido objeto de estudios al considerarlas un componente necesario de los microvasos sanguíneos por su importancia en la regulación del desarrollo vascular así como en la estabilización, maduración y remodelación de los mismos (Armulick *et al.*, 2005).

Los pericitos son células perivasculares que forman una capa discontinua sobre la superficie externa de los capilares y de las vénulas postcapilares. En capilares cerebrales aislados se ha descrito un pericito por cada tres células endoteliales, los cuáles recubren del 20 al 30% de la circunferencia vascular (Copin y Gasche, 2003).

Los pericitos del SNC presentan un cuerpo de morfología ovalada u oblonga que se dispone paralelo al eje mayor del vaso, con un núcleo prominente y una cantidad limitada de citoplasma perinuclear. De este citoplasma se extienden procesos primarios, dispuestos también paralelos al eje vascular, y procesos secundarios, orientados ortogonalmente, los cuáles rodean parcialmente la pared vascular. Los pericitos pueden

ser granulares o agranulares, dependiendo de los lisosomas presentes en su citoplasma. Los pericitos en el ser humano son exclusivamente granulares y ricos en vesículas (Copin y Gasche, 2003).

Según Sims (1986) los pericitos son células contráctiles especializadas, de origen mesodérmico, localizados de forma discontinua en la túnica media capilar y venular, compartiendo lámina basal con las células endoteliales. Están separados del endotelio por la membrana basal, aunque en los capilares humanos hay uniones (*gap*) pericito-endoteliales que realizan los procesos citoplasmáticos (los llamados “*peg-and-socket*” *contacts*) (Tilton et al., 1979; Cuevas et al., 1984; Gerhardt y Betsholtz, 2003). La fibronectina ha sido caracterizada en estas uniones, la cual podría transmitir contracciones del pericito a la célula endotelial, con la consecuente reducción del diámetro vascular.

Se han descrito tres grandes funciones para los pericitos asociados a los microvasos del SNC: contractilidad (regulación del flujo sanguíneo cerebral), regulación de la actividad de la célula endotelial (crecimiento y desarrollo) e inflamación (como macrófagos cerebrales). En este sentido sus lisosomas aumentan en tamaño y en número cuando se abre artificialmente la BHE mediante la administración de proteínas exógenas como la peroxidasa de rábano picante (horseradish peroxidase, HRP) (Graham y Karnovsky, 1966). Se sugiere que constituirían así una segunda línea de defensa celular, fagocitando aquellas moléculas no deseadas que consiguen sobrepasar la barrera endotelial.

Rodríguez-Baeza et al. (1998), han estudiado algunas estructuras perivasculares relacionadas con los capilares de la corteza cerebral humana. Describieron los “*plastic-strips*” como estructuras que se encuentran alrededor de arteriolas, con una morfología similar a las células musculares lisas, formando un manguito continuo alrededor de las arteriolas corticales cerebrales y de la médula espinal. Además describieron estructuras de morfología similar a los pericitos, que presentaban una zona abombada, de 8 a 13 μ m, cuya superficie exterior era convexa y la interior cóncava. Estas estructuras se observaron en los capilares de las zonas media y profunda de la corteza cerebral humana.

Varios autores han observado unas células que quedan anexas a los “PIVs”. Estas células han sido consideradas como un subtipo de pericitos y denominadas de diferentes formas: *bridging cells* (Reissenwebwer y Pessacq, 1971; Leibnitz y Bär, 1988;

Mendes-Jorge et al., 2012), *delta-cells* (Cammermeyer 1965) o *pericite-like cells* (Ando et al., 1999; Pfister et al., 2008).

Las *bridging cells* han sido demostradas en diferentes localizaciones: cerebro (Cammermeyer, 1965; Leibnitz y Bär, 1988), retina (Pfister et al., 2008), músculo esquelético (Gaudio et al., 1990) y piel (Imayama y Urabe, 1984). Los procesos de estas células conectan con 2 ó 3 capilares y se les atribuyen dos funciones principales: una mecánica, de tracción, lo que provocaría la disminución del lumen vascular, y la otra de comunicación intercelular.

3. PUENTES INTERVASCULARES (“PIVs”)

Entre capilares se han observado estructuras de tipo filamentoso que en la bibliografía consultada han tenido diferentes denominaciones. Nosotros hemos optado por utilizar el término de “puentes intervascuales” (PIVs) para referirnos a ellas.

Fueron inicialmente descritas en el ojo por Henle (1838), aunque posteriormente fue Robertson (1899) el que propuso el nombre de “*intervascular connective tissue strands*” en su estudio de tejido nervioso procedente del hombre así como de otras especies (perro y oveja). Estas estructuras fueron también observadas por don Santiago Ramón y Cajal (1907), el cual las denominó inicialmente como “*faisceaux conjonctifs libres*”. Otras denominaciones que se han utilizado en el pasado han sido: “*Verbindungsbrücken*” (Ranke, 1915), “*cordons unitifs*” (Spielmeyer, 1922; Schaltenbrand, 1928; Gellerstedt, 1933), “*bridges of adventicial cytoplasm*” (Wolff, 1938), “*intercapillary bridges*” (Ashton, 1963; Guseo y Gallyas, 1974; Prados y Swank, 1942), “*intervascular reticulin fibers*” (Bölönyi, 1958) e “*intervascular strands*” (Cammermeyer, 1960).

Como se desprende de esta introducción, el estudio de PIVs a nivel cerebral ha tenido una larga pero irregular historia (Henle, 1838; Robertson, 1899 y Ramón y Cajal, 1925), (**figura 6**). En las dos décadas posteriores a la revisión de Cammermeyer, (1960) aparecieron pocos trabajos relacionados con estas estructuras y en ellos no se valoraban los estudios realizados en retina.

Muchos investigadores dedicados al estudio de enfermedades que afectan al cerebro conocen la existencia de los PIVs, pero sin tener un conocimiento profundo de su estructura, de su distribución y de su función (Brown, 2010).

En nuestros días, el estudio del sustrato neuropatológico de ciertas enfermedades neurodegenerativas que afectan a un número considerable de personas, como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson, ha llevado a revalorizar estas estructuras. El objetivo de estos recientes estudios es esclarecer su papel funcional tanto en situaciones de normalidad como en condiciones patológicas (Kalaria y Hereda, 1995; Challa et al., 2002; Brown et al., 2009; Hunter et al., 2012; Yang et al., 2015).

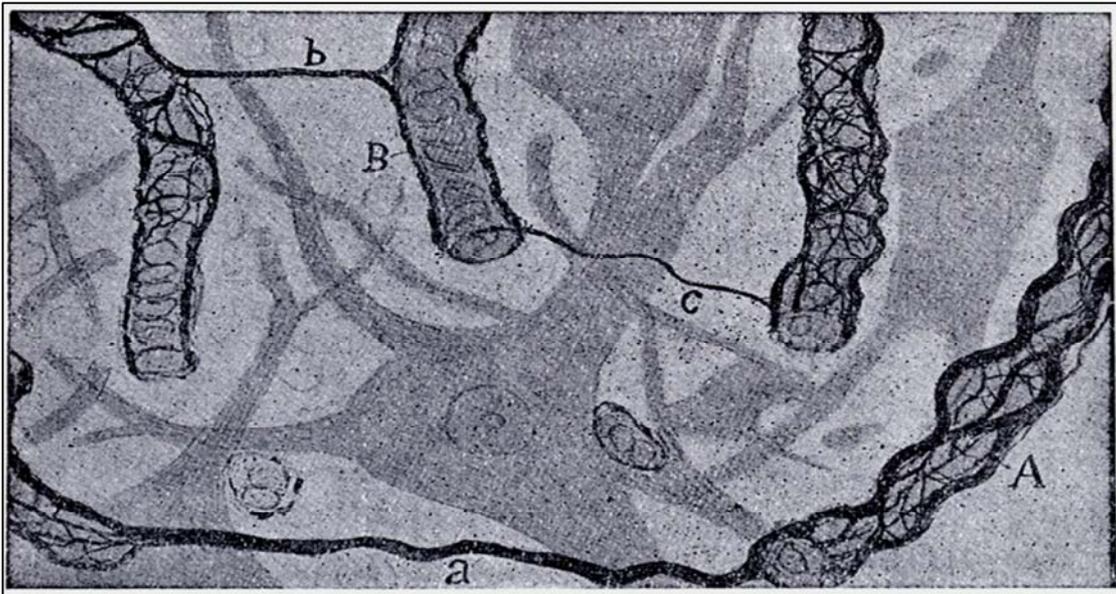


Fig. 6. Tinción de plata. Descripción de los PIVs llamados “cordons unitifs” (b y c), por Ramón y Cajal en la médula espinal de perro. Imagen procedente del libro “Histologie du Système Nerveux de l’Homme et des Vertébres” (Ramón y Cajal 1952).

3.1. Formación y significado de los PIVs

La interpretación que se ha dado para justificar el significado de los PIVs ha sido diversa. Autores como *Ramón y Cajal* los consideraba “fascículos” o “cordones” de unión intervasculares, mientras que para su discípulo *Nicolás Achúcarro*, (1911) eran productos patológicos de procesos inflamatorios, como en la encefalitis (**figura 7**). Otros autores han propuesto otras explicaciones, como son el proceso de envejecimiento (*Spielmeyer*, 1911), el mantenimiento espacial de los vasos sanguíneos (*Cammermeyer*, 1960), el transporte de sustancias entre capilares (*Cammermeyer*, 1965; *Reissenwebwer y Pessacq*, 1971), capilares colapsados (*Guseo y Gallyas*, 1974) e incluso a procesos de células que unirían capilares entre sí (*Zimmermann*, 1923; *Leibnitz*, 1975).

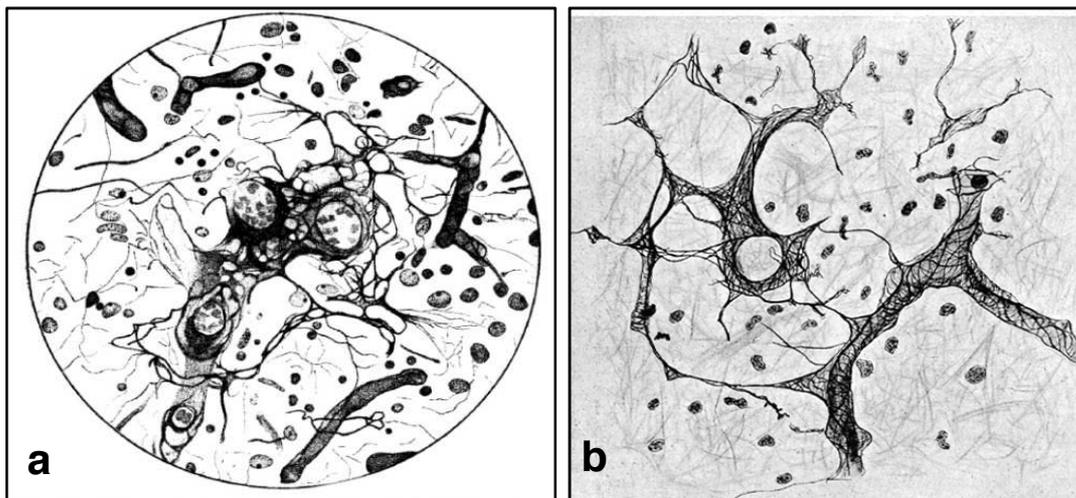


Fig. 7. (a) Tinciones mediante el tanino. (b) Tinción con plata amoniaca. Ambas tinciones fueron utilizadas por N. Achúcarro para visualizar los PIVs, en encéfalos patológicos. Imágenes del trabajo “Histologisches über gefässverödung und über ihre erweichung in der hirnrinde. (N. Achúcarro, 1913).

Ramón y Cajal (1925) sugirió que los PIVs se formaban por estrechamiento de la luz, falta de flujo sanguíneo y atrofia del vaso, dejando así únicamente fibras de tejido conectivo. *Cammermeyer (1960)* era concordante con esta descripción y los interpretó como el resultado de un proceso de atresia vascular.

El concepto de que los PIVs representan el estadio final de una atresia vascular (*Cammermeyer, 1960*) sólo puede ser entendido si se tiene en cuenta una notoria resistencia de las fibras de tejido conectivo argirofílico a procesos patológicos. Sin embargo esta hipótesis no está en consonancia con los conceptos actuales respecto a su presencia en material patológico. Siempre que se demuestra un número excesivo de fibras reticulares en el cerebro, se entiende que es indicativo de una nueva formación de éstas, como sucede en la encefalitis crónica sifilítica (*Achúcarro, 1911; 1913*), en infartos agudos (*Neubürger, 1930*), en la necrosis coagulativa (*Markiewicz, 1937*), en la degeneración pseudolaminar cortical (*Scherer, 1944*), en neoplasias (*Teltscharow y Zulch, 1948; Bölönyi y Földes, 1954; Bölönyi, 1958*) y en enfermedades desmielinizantes (*Pette, 1959; Shiraki, 1959*).

Ciertos hallazgos anatómicos que contradicen esta visión pueden ser enfatizados: las fibras son continuas con las de la pared vascular, el tamaño de las fibras permanece constante y el número de PIVs en un foco no excede al de los vasos atravesando el tejido original.

En el estudio de *Guseo y Gallyas, (1974)* se postula que los PIVs pueden participar en el crecimiento capilar, o que podrían estar involucrados en procesos degenerativos.

Leibnitz y Bär (1988) estudiaron los PIVs en diferentes mamíferos, postulando que eran verdaderas células, considerándolas un subtipo de pericitos. Probablemente lo que observaban eran verdaderos pericitos aún presentes en la membrana basal de capilares destruidos. De hecho, notaron una sorprendente similitud entre los pericitos y los PIVs, considerando que los PIVs estaban implicados en la formación de nuevos capilares.

Pocos estudios han establecido la relación de la edad con la aparición, o la presencia, de PIVs en el cerebro humano, así como su significado. Algunos investigadores (*Challa et al., 2002; Brown et al., 2007*) demuestran la presencia de PIVs en cerebros humanos de todas las edades, observando un mayor número de PIVs en el momento del nacimiento. Otros autores (*Binswanger, 1917*) habían observado una disminución de los PIVs en relación a la edad.

3.2. Características morfoestructurales de los PIVs

El origen mesodérmico de los PIVs se puede deducir de la presencia de fibras de tejido conectivo y de núcleos de fibroblastos idénticos a los encontrados en los vasos sanguíneos. Las fibras tienen las afinidades tincionales propias de las fibras reticulares. Su naturaleza argirofílica ha sido generalmente aceptada (*Robertson, 1899; Ramón y Cajal, 1907, 1909, 1911; Achúcarro, 1911, 1913; Ranke, 1915; Spielmeyer, 1922*), mientras que no se tiñen con el método de van Gieson (*Spielmeyer, 1922; Neubürger, 1930; Biggart, 1936*) o lo hacen solamente cuando se encuentran en relación con cambios vasculares regresivos (*Scholz, 1938; von Braunmühl, 1957*).

Históricamente los PIVs se han puesto de manifiesto mediante diferentes técnicas, como la impregnación con plata o la tinción combinada de PAS/Galocianina, con las cuales adquieren una coloración rojiza. Con este método *Cammermeyer, (1960)* los identificó y definió como filamentos acelulares, carentes de lumen vascular (**figura 8**).

Una importante aportación al estudio de estas estructuras la realizaron *Guseo y Gallyas (1974)* utilizando un método de impregnación argéntica en cerebros humanos normales y patológicos de diferentes edades. Este método tiñe los microvasos cerebrales, incluidos los PIVs más finos. Los estudios realizados con ayuda de microscopia electrónica revelan que este método tiñe la membrana basal endotelial.

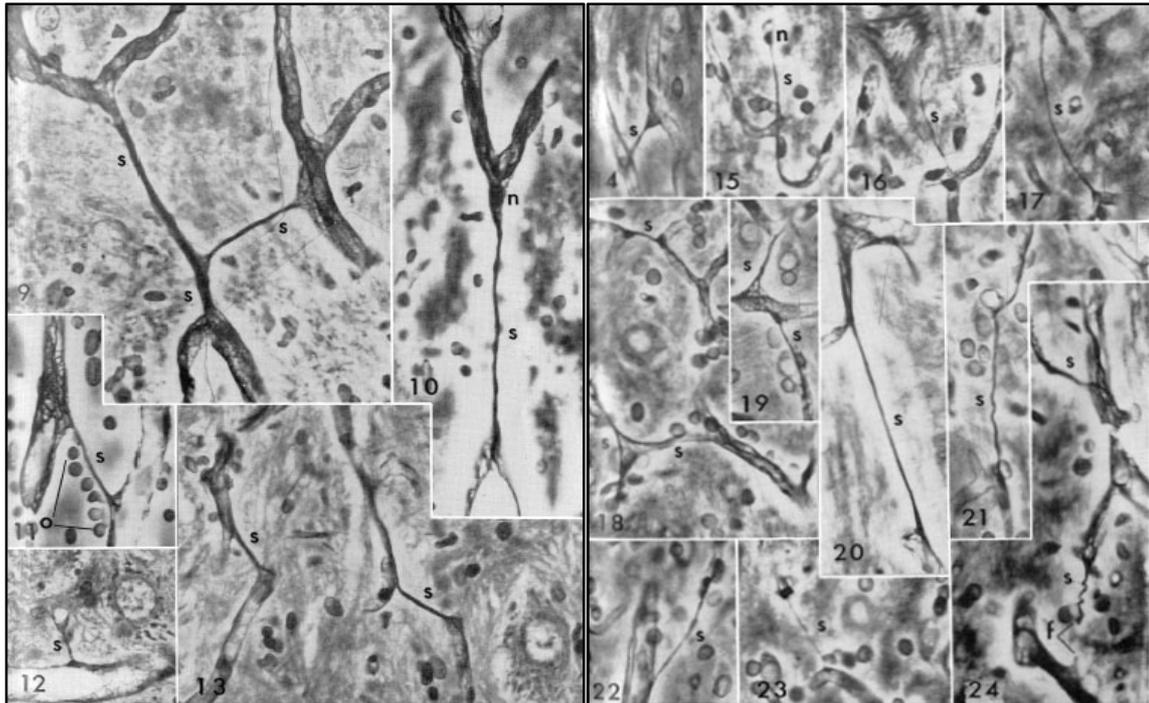


Fig. 8. Imágenes mediante la tinción de PAS-galociano e impregnaciones de plata en cerebro y médula espinal de diferentes especies. Hay fibras argirofílicas. s, i-v strand; o, oligodendrocyte; n, nucleus of i-v strand; f, fractured i-v strand. Imágenes obtenidas del trabajo de “*The Journal of Comparative Neurology*” Cammermeyer (1960).

Belford et al. (1987), estudiaron la localización de la laminina en los vasos de la retina de ratas y de ratones. Después del colágeno IV, la laminina es la glicoproteína mayoritaria de la membrana basal en una gran variedad de tejidos humanos y de animales, incluida la retina. Estos autores demostraron la presencia de esta en los vasos de la retina, en la membrana limitante interna, en finas estructuras que conectaban pequeños vasos, así como en la capa fotorreceptora. En muchos casos las delgadas líneas de laminina que unen vasos salían de células globulares situadas en la superficie externa de pequeños vasos.

A nivel de la retina humana se han descrito PIVs en preparaciones digeridas con tripsina y teñidas con PAS, considerándose remanentes de capilares retraídos (*Ashton y Tripathi, 1975*).

Para *Reisssenweber y Pessacq (1971)* hay varios tipos de elementos intervasculares demostrables mediante técnicas enzimáticas en el SNC. En este detallado trabajo, los autores estudiaron varias especies de animales (gatos, conejos, ratas, sapos) así como humanos. En todos los especímenes encontraron células positivas al método de ATPasa (muestras de criostato incubadas para detección de la actividad de adenosin trifosfatasa). Las células fueron consideradas elementos gliales debido a la imagen negativa central del núcleo y positiva a las ramificaciones citoplasmáticas. Frecuentemente una de las ramificaciones apareció como un pie terminal sobre la pared capilar. La ATPasa fue también positiva para otro tipo de célula que aparecía como un puente entre dos capilares situados bastante lejos uno del otro. Estas células, largas y delgadas, tenían pocas o ninguna ramificación y ocasionalmente un núcleo en posición media. Otra conexión intervascular, a modo de filamento y positiva a la ATPasa (con gránulos de ATPasa), se encontraba en continuidad con los capilares vecinos, siendo el grosor del filamento menor que el del capilar más delgado. La presencia de fosfatasa alcalina después de la perfusión de gelatina-carmín mostró con detalle la arquitectura vascular del cerebro del gato. Un depósito azul, que indicaba actividad enzimática de la tiamina pirofosfatasa (TPPasa), fue más pronunciado en algunos capilares mientras que otros mostraron una tinción muy débil. Sin embargo, incluso en esas preparaciones, delgados filamentos no rellenos de gelatina aparecieron conectando bucles vasculares y fueron identificados sólo por la actividad enzimática. Ocasionalmente estas cortas conexiones aparecieron sin actividad enzimática y fueron reconocidas sólo por una débil birrefringencia.

Similares formaciones fueron observadas después de la incubación con ATPasa. En todos los casos el filamento se localizaba en un punto donde los capilares estaban más juntos y parecían estar unidos por este. Este hecho, así como la ausencia de ramificaciones, les permitió diferenciar los filamentos de las células gliales.

Los vasos conectados fueron generalmente capilares, pero en ocasiones un capilar se conectaba a un vaso mayor. Con la técnica de carbonato de plata (bloques fijados en 10% de formalina y procesados con un método modificado de *del Rio Hortega* para impregnación de plata de capilares), encontraron conexiones similares en todos los animales. Estos autores concluyeron que los “*intervascular strands*” tienen actividad

enzimática ATPasa y TPPasa, pero no nucleotidasa. Estas enzimas fueron también positivas en capilares y en oligodendrocitos. La actividad enzimática podría estar relacionada con las células gliales; sin embargo, la fosfatasa alcalina fue prácticamente negativa en dichas células. Además, la fosfatasa alcalina había mostrado “capilares” muy delgados, sin luz, con la misma distribución que los filamentos aquí descritos (*Bannister y Romanul, 1963*). Esos “capilares” no permitían el paso de gelatina, incluso después del tratamiento con un potente vasodilatador, como el nitrito de sodio. Los capilares sin luz han sido demostrados mediante microscopía electrónica en cerebro de rata, y fueron interpretados como “capilares en crecimiento”. Ya que la fosfatasa alcalina es característica de la célula endotelial, la presencia de una fuerte actividad enzimática en los filamentos sugiere una conexión entre estas formaciones y la producción de “nuevos” capilares o la desaparición de los “viejos”.

En animales con abundantes capilares cerebrales acetilcolinesterasa (AChE) positivos, los PIVs parecen tener esta misma actividad. Este hecho estaría en concordancia con la teoría del origen capilar de los PIVs. Además, la demostración de dicha actividad enzimática en ellos refuerza la hipótesis de una función de transporte, como había propuesto *Cammermeyer (1965)*.

En los estudios actuales que relacionan los PIVs con enfermedades neurodegenerativas se han realizado inmunomarcajes frente a colágeno IV y a laminina, entre otros, para poner de manifiesto la presencia de estos (*Challa et al., 2002, 2004*). Otros estudios (*Brown, et al., 2007; Hunter et al., 2012; Yang et al., 2015*) han realizado también inmunomarcajes mediante GFAP, fibrinógeno y factor von Willebrand, con el objetivo de caracterizar los PIVs y sus elementos celulares.

3.3. Características funcionales de los PIVs

Desde un punto de vista funcional se ha propuesto que los PIVs ayudan a mantener la estructura y la disposición espacial, tanto en vasos cerebrales como en vasos retinianos (*Cammermeyer, 1960; Kuwabara y Cogan, 1960*). No obstante también se ha postulado que a través de los PIVs se pueden comunicar vasos sanguíneos, permitiendo el paso de moléculas por su interior (*Cammermeyer, 1965*). Otros autores les han atribuido un papel en la patogenia de ciertas enfermedades degenerativas (*Brown et al., 2007; Hunter et al., 2012*).

En otros estudios se ha propuesto la hipótesis de que los PIVs podrían transportar sangre o plasma. Sin embargo, no hay evidencia de esta función. Los estudios más relevantes sobre este tema se han realizado en capilares de la retina mediante la combinación de métodos de angiografía por fluoresceína y digestión tisular (*Kohner y Henkind, 1970; De Venecia et al., 1976*).

Otro significado funcional asignado a los PIVs podría ser su similitud con fibras de tejido conectivo en los tejidos y paredes vasculares, manteniendo su configuración tridimensional. En especies con muchos PIVs, estos podrían ofrecer un anclaje adicional para los vasos y dar una seguridad extra para mantenerlos en yuxtaposición con las neuronas (*Kuwabara y Cogan, 1960; Cammermeyer, 1965; Ando et al., 1999*). Esta capacidad también podría ser importante en otros tejidos en los cuáles los cuerpos celulares tienen que estar situados a lo largo de los vasos.

3.4. Localización de los PIVs

Los PIVs son de distribución universal y deberían encontrarse en cualquier tejido donde las células endoteliales de un capilar hayan “muerto”, dejando únicamente “tubos” de membrana basal.

Se han descrito en todas las regiones del SNC (*Leibnitz y Bär, 1988*), siendo más numerosos en la médula espinal, en núcleos del tronco encefálico y en corteza cerebelosa. Son menos frecuentes en corteza cerebral y en ganglios subcorticales; y raros en sustancia blanca (*Ramón y Cajal, 1907, 1909, 1925; Ranke, 1915; Spielmeyer, 1922; Gellerstedt, 1933*). Así mismo han sido observados en la retina, tanto de humanos como de ratones (*Kuwabara y Cogan, 1963; Llombart, 2007*). A parte de su localización en el SNC, se han demostrado en la glándula pineal (*Achúcarro, 1913; Amprino, 1935*), en el timo (*Plenk, 1927*), en la hipófisis (*Romeis, 1940*), en los glomérulos renales (*Bohle y Herfarth, 1958*), en el músculo esquelético (*Williamson et al., 1980*) y en la red capilar subepidérmica (*Imayama y Urabe, 1984*).

3.5. Implicación de los PIVs en la patología cerebral

Hoy en día no se conoce ninguna patología que esté causada de forma directa por una alteración de los PIVs. Sin embargo, numerosos estudios demuestran que existe una

implicación indirecta de estas estructuras en ciertas patologías de la retina y del cerebro.

En la excelente revisión bibliográfica de *Cammermeyer (1960)*, este autor hace referencia a tres grupos de autores: un primer grupo, poco numeroso, que consideran que los PIVs están presentes en condiciones normales y aumentan en número como resultado de cambios reactivos vasculares en el envejecimiento, el infarto, la encefalitis y en trastornos nutricionales (*Obersteiner, 1908; Achúcarro, 1911 y 1913; Ranke, 1915; Spielmeyer, 1922; Ramón y Cajal, 1925; Gellerstedt, 1933; Prados y Swank, 1942*). Un segundo grupo, más numeroso, evitan referirse a su aparición en condiciones normales y consideran que representan un estadio final de fibrosis capilar secundaria al envejecimiento, enfermedad hipertensiva cardiovascular, infarto cerebral, trastornos metabólicos, encefalopatía perinatal, lesión postirradiación y/o cambios cerebrales reumáticos (*Spielmeyer, 1911; Rosenblath, 1927; Hallervorden, 1930; Biggart, 1936; Markiewicz, 1937; Scholz, 1938; Weil, 1945; Scheinker, 1951; Harris, 1955; Adams, 1956; von Braunmühl, 1957*). Y un tercer grupo, que revisan los cambios patológicos de los vasos cerebrales, en los que incluyen fibrosis arteriocapilar, esclerosis o hialinización de las arterias más pequeñas como representativas de algunos cambios vasculares, a parte de los implícitos del grupo anterior, aún sin reconocer la presencia de los PIVs en tejido normal (*Lewy, 1925; Winkelman, 1926; Scholz, 1938; Moschowitz, 1949; Dublín, 1954; Wolff, 1959*).

Los estudios de *Ashton y Tripathi, (1975)*, utilizando secciones de retina teñidas con impregnación de plata de Wilder, o tinción para reticulina de Gomori, muestran una red perivascular argirofílica. En retinas digeridas encontraron dos formas de conexiones intercapilares. La primera corresponde a un capilar atenuado degenerado, normalmente acelular (membrana basal remanente de un capilar, cerrado o parcialmente cerrado por retracción o por degeneración) y algunas veces referido como “un capilar muerto”; la otra corresponde a un delicado filamento interconectando (referido por *Daicker, 1971*, como “*mesodermal strand*”). Ambas estructuras fueron ilustradas por otros autores y se han observado en diferentes tejidos.

A partir de la década de los 90 se han realizado diferentes estudios que evalúan los PIVs en el contexto de diferentes enfermedades neurodegenerativas entre la que destaca la enfermedad de Alzheimer (*Challa et al., 200; Hunter 2012*).

Actualmente se define la enfermedad de Alzheimer como una enfermedad neurodegenerativa, que se caracteriza patológicamente por la acumulación intraneuronal de proteína Tau hiperfosforilada y la acumulación extracelular de amiloide- β (A β). Sin embargo, la importancia de los factores vasculares que contribuyen a su patogénesis son cada vez más relevantes (*Breteler, 2000; Launer, 2002*). Así, los factores de riesgo vasculares adquieren cada vez más importancia en la enfermedad de Alzheimer, como son la hipertensión, la diabetes mellitus y las lesiones cerebrovasculares (*Schneider et al., 2007*).

Las complicaciones macrovasculares, incluyendo el accidente cerebrovascular (lacunar), y las microhemorragias, probablemente no expliquen suficientemente el "componente vascular" de la demencia. También se han observado anomalías microvasculares en pacientes con esta enfermedad, las cuales tienen importancia en su patogénesis (*Buée et al., 1994; Dickstein et al., 2010*), así como cambios estructurales en la red microvascular del parénquima cerebral, incluyendo alteraciones de la BHE y engrosamiento de la membrana basal (*Farkas y Luiten, 2001; Zlokovic, 2005*).

Los cambios morfológicos macroscópicos de la red microvascular se producen en las regiones cerebrales afectadas, e incluyen bucles, aumento de la tortuosidad y la aparición de los PIVs, si bien no se sabe si estas alteraciones representan remanentes de capilares degenerados, neovascularizaciones o vainas de lámina basal vacías, potencialmente disponibles para recanalización. Además de estos cambios morfológicos cualitativos en la red microvascular, se han observado cambios cuantitativos en la red microvascular (*Kalaria y Kroon, 1992; Kalaria y Hedera, 1995; Challa et al., 2004; Richard et al., 2010; Guan et al., 2013*).

Hay estudios que relacionan un incremento de PIVs con diferentes patologías cerebrales, entre las que destacan la esclerosis temporal mesial, (*Mott et al., 2009*), otros, por el contrario, hablan de una disminución de los PIVs en patologías de tipo degenerativo cerebral (*Moody et al., 2004, Brown et al., 2007*).

3.6. Clasificaciones propuestas para los PIVs

En el estudio de *Guseo y Gallyas (1974)* se consideraron tres tipos de PIVs:

- El **tipo I** se originaría en la vecindad del núcleo de una célula endotelial. Parecen adherirse a otro capilar por medio de una estructura en forma de disco. Se

pueden bifurcar o incluso ramificar. Las finas fibras parecen ser compactas mientras que las más gruesas tienen lumen. Se tiñen con plata tan intensamente como los capilares. Este tipo es considerado por los autores como prolongaciones de células endoteliales envueltas por membrana basal.

- El **tipo II** son estructuras de diámetro inconstante, pudiendo variar de 0.5 a 5µm en diferentes puntos. Los puentes tienen límites arrugados y frecuentemente un lumen. Son considerados capilares colapsados.
- El **tipo III** son estructuras con diferentes procesos que abrazan al capilar, o siguen su trayecto. Son probablemente procesos de pericitos (células de Rouget). Algunos de ellos abandonan el capilar y llegan a otro. En casos extremos toda la célula se expande entre dos capilares. En este caso se tiñen con plata más intensamente que los capilares.

Leibnitz y Bär (1988), basándose en la clasificación de Guseo y Gallyas, proponen que son puentes formados por procesos de células endoteliales, por capilares colapsados y por procesos de pericitos. Con relación a su morfología, el tipo I le parece idéntico a los descritos por él, pero difiere de ellos por su origen endotelial. El tipo III (considerado por los autores como un mayor crecimiento de un proceso endotelial y guiado por un proceso pericítico) no muestra ninguna similitud con sus puentes.

Llombart, en su tesis doctoral (*Tesis doctoral, 2007*) sobre la caracterización de los PIVs en la retina de ratones y humanos, propone una clasificación basada en la relación que tienen las “*bridging cells*” con los PIVs.

4. TRAUMATISMOS CRANEOENCEFÁLICOS (TCE)

Los TCE continúan siendo la primera causa de muerte, o de discapacidad, en la población menor a 45 años.

En los pacientes afectados de TCE grave (determinado por la puntuación en la escala de coma de Glasgow ≤ 8) (**Tabla 1**), existen lesiones primarias que se producen como consecuencia del propio impacto, y lesiones secundarias desencadenadas tras un período de tiempo variable desde el accidente, caracterizadas por su progresión y papel determinante en la evolución de dichos pacientes, en cuanto a su morbilidad o mortalidad (*Graham et al., 1987*).

Su elevado índice de mortalidad, las prolongadas hospitalizaciones y las graves secuelas resultantes, hacen que los TCE constituyan uno de los problemas socio-sanitarios más importantes del momento actual en nuestra sociedad.

En la última década se han producido avances muy significativos, tanto en el manejo clínico de los TCE como en el conocimiento de su fisiopatología. Los nuevos descubrimientos morfológicos y fisiopatológicos han permitido individualizar y racionalizar las medidas terapéuticas y han contribuido a mejorar el pronóstico de estos pacientes. Aunque existe un importante desarrollo en las técnicas neuroquímicas, histopatológicas y moleculares para estudiar el TCE en el hombre, aún no disponemos de ninguna terapia específica “neuroprotectora”, y los traumatismos continúan siendo una de las principales causas de discapacidad y muerte de jóvenes en países industrializados (*Launer, 2002*).

Tabla 1.

Tabla 1. Escala de Glasgow					
Apertura ocular		Respuesta motora		Respuesta verbal	
Espontánea	4	Espontánea, normal	6	Orientada	5
A la voz	3	Localiza al tacto	5	Confusa	4
Al dolor	2	Localiza al dolor	4	Palabras inapropiadas	3
Ninguna	1	Decorticación	3	Sonidos incomprensibles	2
		Descerebración	2	Ninguna	1
		Ninguna	1		

Según la puntuación obtenida los TCE son:

Leve: 14-15

Moderado: 9-13

Severo <8, mal pronóstico

Encyclopedia of the Human Brain. Keidel and Stude (2002)

4.1. Factores implicados en las lesiones de los TCE

Existen diversas formas de clasificar las lesiones resultantes de los TCE, siendo una de ellas la que considera su vertiente etiopatogénica. En este sentido, y como hemos señalado anteriormente, se ha diferenciado tradicionalmente entre lesiones primarias, o de impacto, y lesiones secundarias o complicaciones.

Las lesiones primarias abarcan los daños inmediatos que sufre el SNC en el momento del impacto, y estos daños no son tratables (*Launer, 2002*), sólo prevenibles. En cambio, las lesiones secundarias son las que determinan la evolución y el pronóstico del paciente.

La importancia clínica de las lesiones secundarias ha provocado un creciente interés en profundizar en el conocimiento de su fisiopatología con el objetivo de influir terapéuticamente de la forma más certera posible en los mecanismos que las

desarrollan. Parece demostrado que las lesiones cerebrales traumáticas son muy dinámicas y no son simples eventos, sino procesos (*Sahuquillo et al., 2001*).

En este sentido se ha propuesto el concepto de lesiones terciarias (*Pitts y McIntosh, 1990*), que hace referencia a las consecuencias funcionales y estructurales de las lesiones secundarias a través de la aparición de cascadas metabólicas o fisicoquímicas anormales en los pacientes afectados de un TCE grave (*Poca et al., 1996; Lafuente y Zarranz, 1998*).

En el concepto “lesiones secundarias” se incluyen las alteraciones axonales y/o vasculares difusas, las lesiones cerebrales hipóxicas y el edema (*swelling*) cerebral. Las lesiones secundarias de mayor significación en el pronóstico de los pacientes afectados de TCE grave son la isquemia cerebral y el aumento de la presión intracraneal (cuyo valor normal es de 15 a 20mmHg) (*Sahuquillo et al., 1996*).

Desde una perspectiva estructural se ha puesto de relieve que en los TCE hay hemorragias perivasculares, *swelling* astrocítico, cambios en la mielina, infiltración de macrófagos, apoptosis, fagocitosis y atrofia (*Ragaisis, 2002*). La aparición de zonas de hipoperfusión se inicia alrededor de las 3 horas después de la lesión primaria, y la probabilidad de trombosis vascular aumenta significativamente 6 horas más tarde (*Katayama et al., 1998*).

La isquemia cerebral, definida como un flujo sanguíneo cerebral menor a 18ml/100g/min, y áreas cerebrales profundidas a menos de 12ml/100g/min están destinadas a morir y representan el centro isquémico (*Leker y Shohami, 2002*). Este centro se presenta en aproximadamente el 30% de los pacientes afectados de un TCE grave (*Zauner et al., 1996*), habiendo sido demostrado, desde el punto de vista histopatológico, en el 90% de los pacientes fallecidos por esta causa (*Graham et al., 1978, 1989*).

Se conoce que muchas de las lesiones secundarias y terciarias involucran una plétora de eventos bioquímicos (incluyendo alteraciones de la vascularización cerebral) que dejan al parénquima cerebral en riesgo de isquemia e hipertensión intracraneal (*Golding et al., 1999*).

La isquemia cerebral secundaria a un TCE puede deberse a hipertensión intracraneal, a una reducción en la presión de perfusión cerebral o ser secundaria a problemas

sistémicos que ocurren preferentemente en la fase prehospitalaria (hipoxia, hipotensión o anemia). Además, en muchos casos, las lesiones isquémicas desencadenan importantes cascadas bioquímicas: liberación de aminoácidos excitotóxicos, entrada masiva de calcio en la célula, producción de radicales libres derivados del oxígeno y activación de la cascada del ácido araquidónico. Estas cascadas son extremadamente lesivas para las células del SNC y se ha demostrado que tienen una gran relevancia en la fisiopatología del TCE. Son precisamente estas cascadas, y sus consecuencias funcionales y estructurales en el parénquima encefálico, las que han determinado el concepto de lesiones terciarias (*Pitts y McIntosh, 1990*).

En todo órgano, cuando el flujo sanguíneo no aporta el oxígeno suficiente para la correcta función celular aparece la isquemia tisular. Una reducción moderada del flujo sanguíneo cerebral, por debajo de 50ml/100g/min, puede no tener traducción clínica si la reducción del flujo se compensa con un incremento de la extracción tisular de oxígeno. A esta situación se le ha denominado "oliguemia", para diferenciarla de otra situación más severa en que la reducción del flujo sanguíneo se acompaña de síntomas clínicos, apareciendo la isquemia. Cuando la reducción del flujo sanguíneo es tan importante condiciona una alteración tisular estructural que conlleva al infarto. La diferencia fundamental entre los términos isquemia e infarto es la potencial reversibilidad del primero, versus el carácter irreversible del segundo.

Se ha demostrado que en infartos de miocardio y en accidentes vasculares cerebrales existe una zona central de daño estructural irreparable, donde las células mueren por necrosis, y una zona periférica potencialmente viable, pero con riesgo de ser afectada irreversiblemente, denominada *área de penumbra*, donde las células presentan una alteración funcional y metabólica y en la que se puede producir una muerte celular progresiva por mecanismos de apoptosis (*Thompson, 1995; Sánchez-Chávez, 1999*).

La disminución del flujo sanguíneo cerebral a valores de aproximadamente 30ml/100g/min da lugar a manifestaciones clínicas como somnolencia, vértigos, etc.... Cuando la hipoperfusión celular alcanza valores de 16-20ml/100g/min cesa la transmisión sináptica (flujo umbral de transmisión sináptica). Y cuando el flujo sanguíneo cerebral es aún menor ($< 6-8\text{ml}/100\text{g}/\text{min}$) se produce un fallo en el funcionamiento de la membrana celular (flujo umbral de fallo de membrana). En condiciones más precarias, cuando el aporte de oxígeno a la célula no cubre sus requerimientos mínimos, se produce una depleción de moléculas de ATP y, en último término, aparecen alteraciones en la estructura celular (desarrollo de infarto).

El margen entre ambos flujos determina una zona en la cual existe una inactividad funcional, pero el tejido es aún viable, pudiendo recuperar su función si el flujo se restaura, definido como "zona de penumbra" (Keidel y Stude, 2002). Esta "zona de penumbra" resulta de gran interés a la hora de establecer medidas terapéuticas en todos aquellos pacientes que puedan presentar lesiones isquémicas cerebrales (Astrup et al., 1977). A su vez, el espasmo en las arterias cerebrales ha sido postulado por muchos autores como una de las causas de isquemia en los TCE (Clower et al., 1981; Sbarbati et al., 1996) (figura 9).

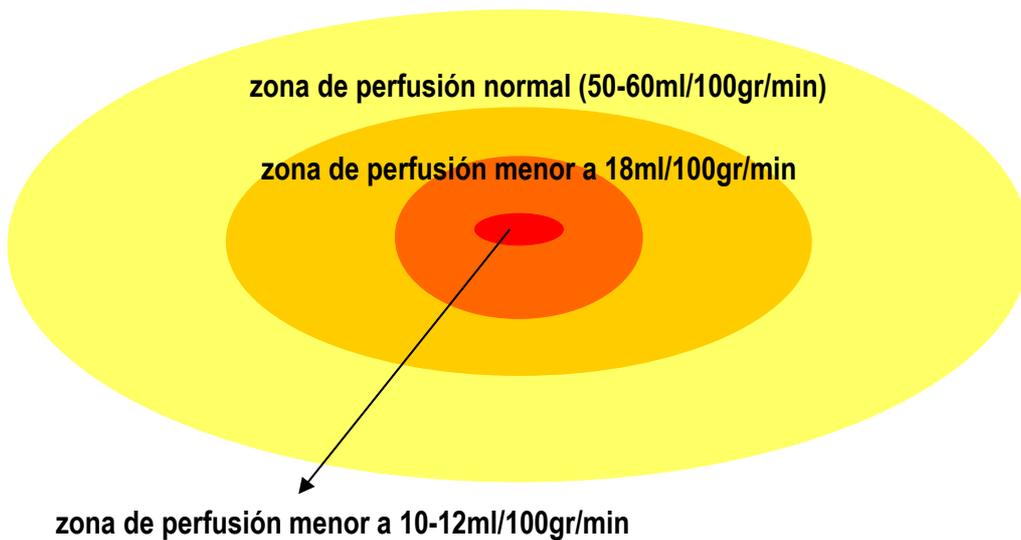


Fig. 9. Lesiones secundarias en el TCE. Esquema adaptado de Leker and Shohami (2002)

4.2. Repercusión de la isquemia cerebral en el paciente neurotraumático

Hasta hace relativamente pocos años se concedía una importancia capital a la hipertensión intracraneal en el manejo terapéutico y en la evolución clínica de los pacientes neurotraumáticos. Esto explica que los protocolos terapéuticos se hayan dirigido tradicionalmente a evitar, o tratar, de forma casi exclusiva la hipertensión intracraneal. No obstante, uno de los avances más significativos que se han producido en el ámbito de esta patología ha sido el reconocimiento de la gran importancia fisiopatológica de otras lesiones secundarias: las lesiones hipóxico-isquémicas cerebrales.

Los estudios necrópsicos realizados por Graham (*Graham et al., 1971, 1978*) objetivaron una elevada prevalencia de lesiones isquémicas en pacientes que fallecieron a consecuencia de un TCE (> 80%). Además, se ha establecido una fase intermedia, reversible en la fisiopatogenia de las lesiones isquémicas, denominada "penumbra isquémica". Si se aplican ciertas medidas terapéuticas en esta fase puede revertirse el proceso que conduce a la necrosis tisular irreversible (*Sahuquillo et al., 1996, 2001*).

Debido a su limitación para almacenar substratos, el encéfalo es un órgano especialmente sensible a los insultos isquémicos. Esta reducida capacidad de almacenamiento lo hace extremadamente dependiente de un aporte continuo y suficiente de oxígeno y de glucosa. La falta de energía se traduce, en cuestión de segundos, en un fallo de la función neuronal, y al cabo de pocos minutos, en una alteración estructural permanente. Las zonas de infarto aparecen con mayor frecuencia en aquellos pacientes que han presentado episodios conocidos de hipotensión arterial, hipoxia o hipertensión intracraneal.

En los últimos años se ha constatado que, además de sus mecanismos lesivos intrínsecos, la isquemia cerebral origina o potencia la aparición de importantes cascadas metabólicas anómalas (liberación incontrolada de neurotransmisores excitatorios, entrada masiva de calcio al interior celular, formación de radicales libres...), que son la causa más importante de alteraciones celulares y de lesiones estructurales irreversibles que presentan los pacientes neurocríticos (*Poca et al., 1996; Lafuente y Zarranz, 1998*).

Se ha sugerido que la patogénesis de las lesiones secundarias resulta de la interacción de múltiples fenómenos que incluyen alteraciones anatómicas y funcionales de la microcirculación cerebral (*Clower et al., 1994; Zhang et al., 1998*).

El daño del endotelio vascular, ya sea de origen isquémico primario o como consecuencia de lesiones secundarias, conduce a la degradación de la lámina basal y al cambio de permeabilidad de los capilares cerebrales (*Preston et al., 1993*). En este proceso tienen un papel relevante las metaloproteinasas de la matriz extracelular (*Asahi et al., 2001*).

4.3. PIVs en los traumatismos craneoencefálicos

En el trabajo de *De Vries et al., (1997)*, el edema cerebral es clasificado en dos tipos en base a sus características morfológicas: vasogénico o edema húmedo (*wet*), resultado de un aumento de la permeabilidad de la BHE, y citotóxico o edema seco (*dry*), resultado de un hinchamiento (*swelling*) de las células del parénquima cerebral.

El edema vasogénico es el tipo de edema observado más frecuentemente después de lesiones inducidas por apoplejía isquémica, tumores cerebrales o lesiones inflamatorias. La BHE expresa cambios morfológicos al inicio del edema vasogénico, tales como apertura de las uniones estrechas (*tight junctions*) y daño en la membrana de la célula endotelial, seguida de migración de leucocitos al parénquima nervioso (*Klatzo, 1987*). Además, el aumento de la permeabilidad detectada durante el edema cerebral vasogénico puede ser el resultado del aumento de la actividad pinocítica de las células endoteliales.

El edema citotóxico es el trastorno clínico más significativo después de los procesos isquémicos en el SNC, y se caracteriza por un aumento del agua que contienen las células, lo cual puede estar causado por un trastorno en los sistemas de transporte de potasio y de sodio, más que por cambios en la permeabilidad de la BHE (*Klatzo, 1987*).

A pesar de los numerosos logros alcanzados en los últimos años respecto del conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos que se suceden en los TCE graves, gracias a distintos métodos de diagnóstico por imagen (tomografía computarizada (TC), resonancia magnética (RM), tomografía por emisión simple de fotones (SPECT) y

tomografía por emisión de positrones, (PET), así como de evaluación metabólica tisular (pO_2 , pCO_2 , microdiálisis, etc.), se mantiene todavía elevado el porcentaje de morbilidad y de mortalidad en estos pacientes, y son controvertidas las pautas terapéuticas que se deben aplicar, siendo por lo tanto un problema socio-sanitario trascendente sobre todo en los países desarrollados.

El edema, en general, implica un aumento del líquido en el espacio intercelular, con el consiguiente aumento de volumen del tejido. En este contexto la isquemia celular podría agravarse por el edema vasogénico debido al aumento de la distancia entre capilares y células. La desestructuración de los PIVs podría deberse a un efecto mecánico del edema, entre otros, y tener una importancia en la isquemia cerebral. Así estas estructuras pasarían a tener una mayor trascendencia clínica de la que se les ha reconocido hasta ahora.

De las consideraciones anteriores se deduce que las alteraciones del flujo sanguíneo cerebral son muy frecuentes en los TCE. Aparecen de forma precoz después del traumatismo y pueden conducir a la isquemia cerebral. De aquí la importancia de valorar la presencia de los PIVs en pacientes fallecidos a consecuencia de las lesiones secundarias (y terciarias) después de sufrir un TCE.



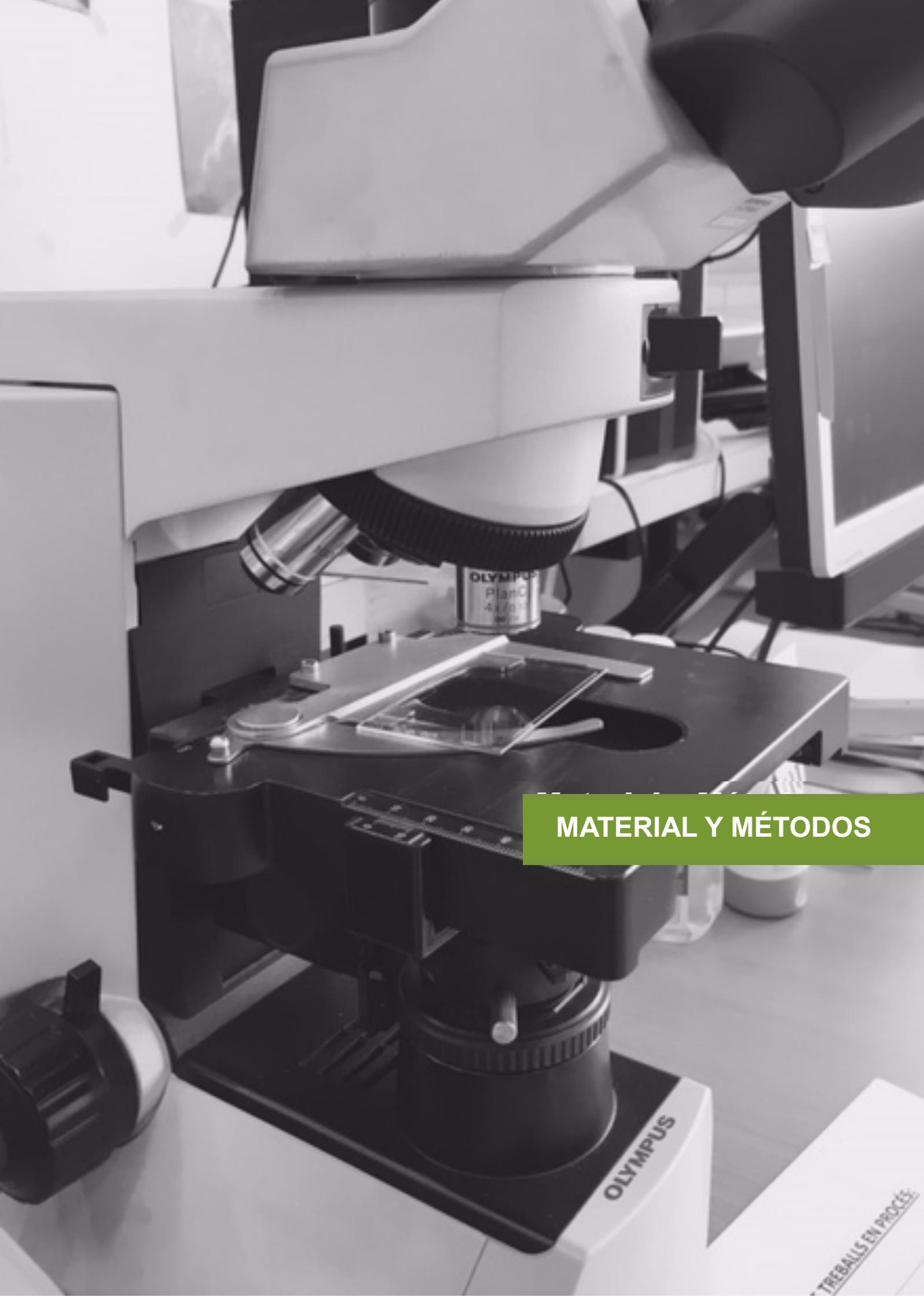
OBJETIVOS

HIPÓTESIS

- Existen puentes intervasculares en la microvascularización de la corteza cerebral humana, especialmente en la red capilar.
- La densidad, la distribución y las características de los puentes intervasculares varía cuando se consideran diferentes regiones y áreas cerebrales y estaría en relación con la angio y con la citoarquitectura de la corteza cerebral humana.
- Los puentes intervasculares pueden estar alterados en diferentes patologías que afectan a la microcirculación de la corteza cerebral humana, como es el traumatismo craneoencefálico grave.

1. OBJETIVOS

1. Identificar y caracterizar la estructura y la composición de los puentes intervasculares en diferentes áreas en la corteza cerebral humana.
2. Establecer, si las hay, diferencias cuantitativas de los puentes intervasculares en las diferentes áreas corticales de la corteza cerebral humana.
3. Establecer una clasificación morfológica de los puentes intervasculares.
4. Establecer, si las hay, diferencias entre los puentes intervasculares en las muestras de corteza cerebral humana de pacientes fallecidos por traumatismo craneoencefálico respecto a pacientes fallecidos por otras causas.



MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para este estudio hemos utilizado muestras de tejido de corteza cerebral pertenecientes a 12 cadáveres humanos. Las muestras fueron obtenidas durante la realización de la preceptiva autopsia médico-legal en el Instituto Anatómico Forense de Barcelona (actualmente Institut de Medicina Legal i Ciències Forenses de Catalunya - IMLCFC) consistente en la apertura y evaluación de las tres cavidades: tórax, abdomen y cráneo.

Todas las muestras fueron obtenidas antes de la entrada en vigor de la Ley de Investigación Biomédica 14/2007 (*BOE 159 de 4 de julio de 2007*) y han sido evaluadas de acuerdo con la segunda disposición transitoria de dicha ley. Además, las muestras fueron anonimizadas, de acuerdo a la Ley de Protección de datos personales (*Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad y la Ley 41/2002, de 14 de noviembre, Básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica*), asignándoles una referencia numérica.

Las muestras encefálicas fueron obtenidas de dos grupos de individuos (**figura 10**):

- Un **Grupo Control (A)** en el cuál se incluyeron 6 individuos cuya causa de muerte no estaba relacionada con un TCE ni presentaban alteraciones craneoencefálicas conocidas.
- Un **Grupo TCE (B)** que consistió en muestras de 6 individuos que habían fallecido de forma diferida, como consecuencia de un TCE grave.

Las muestras obtenidas del grupo Control (**Tabla 2**) consistieron en bloques poligonales de corteza cerebral, de aproximadamente 1cm³. El tamaño de las muestras permitía obtener todo el grosor de la sustancia gris y parte de la sustancia blanca subcortical.

De cada individuo se obtuvieron muestras corticales de los cuatro lóbulos cerebrales, preferiblemente de las siguientes áreas: del lóbulo frontal (A4), del lóbulo parietal (A3,1,2), del lóbulo temporal (giro parahipocampal) y del lóbulo occipital (A17).

En el grupo TCE (**Tabla 3**) se realizó el mismo procedimiento para la toma de muestras, pero con identificación y toma de muestras de la región contusionada y/o de zonas perilesionales. Dependiendo de las lesiones observadas, se tomaron muestras de áreas alternativas a las establecidas en el grupo control. Los individuos de este grupo habían ingresado en un hospital y su fallecimiento se había producido horas más tarde (la evolución postraumática no excedió de las 72 horas hasta su fallecimiento).

El tiempo transcurrido desde el fallecimiento del paciente hasta la obtención de las muestras en el IMLCFC nunca excedió de las 24 horas.

Tablas 2 y 3. Se especifican las características individuales de cada grupo.

Nº	Sexo	Edad	Causa de fallecimiento
C13	M	77	Rotura aneurisma aorta
C14	M	24	Rotura hepática
C15	M	49	Muerte súbita
C16	M	56	Asfixia mecánica
C17	M	40	Muerte súbita
C18	M	40	Asfixia mecánica

a

Lóbulos	C13	C14	C15	C16	C17	C18
Temporal	X	X	X	X	X	X
Parietal	X	X	X	X	X	X
Frontal	X	X	X	X	X	X
Occipital	X	X	X	X	X	X

b

Tabla 2. Grupo Control (A). Características individuales (a). Regiones de estudio de cada individuo (b).

Nº	Sexo	Edad	Causa de fallecimiento
T1	M	69	Contusiones hemorrágicas frontales Edema cerebral
T2	M	69	Contusiones hemorrágicas frontales Edema cerebral.
T3	M	75	Contusiones hemorrágicas fronto-temporales y occipital derechas Edema cerebral
T4	M	70	Estallido temporal derecho Edema cerebral
T5	M	70	Contusión frontal izquierda Edema cerebral
T6	M	16	Contusiones frontales basales Edema cerebral

a

Lóbulos	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Temporal	X	X	X	X	X	X
Parietal	X	X	X	--	X	--
Frontal	X	X	X	X	X	X
Occipital	X	X	X	X	X	X

b

Tabla 3. Grupo TCE (B). Características individuales (a). Regiones de estudio de cada individuo (b).

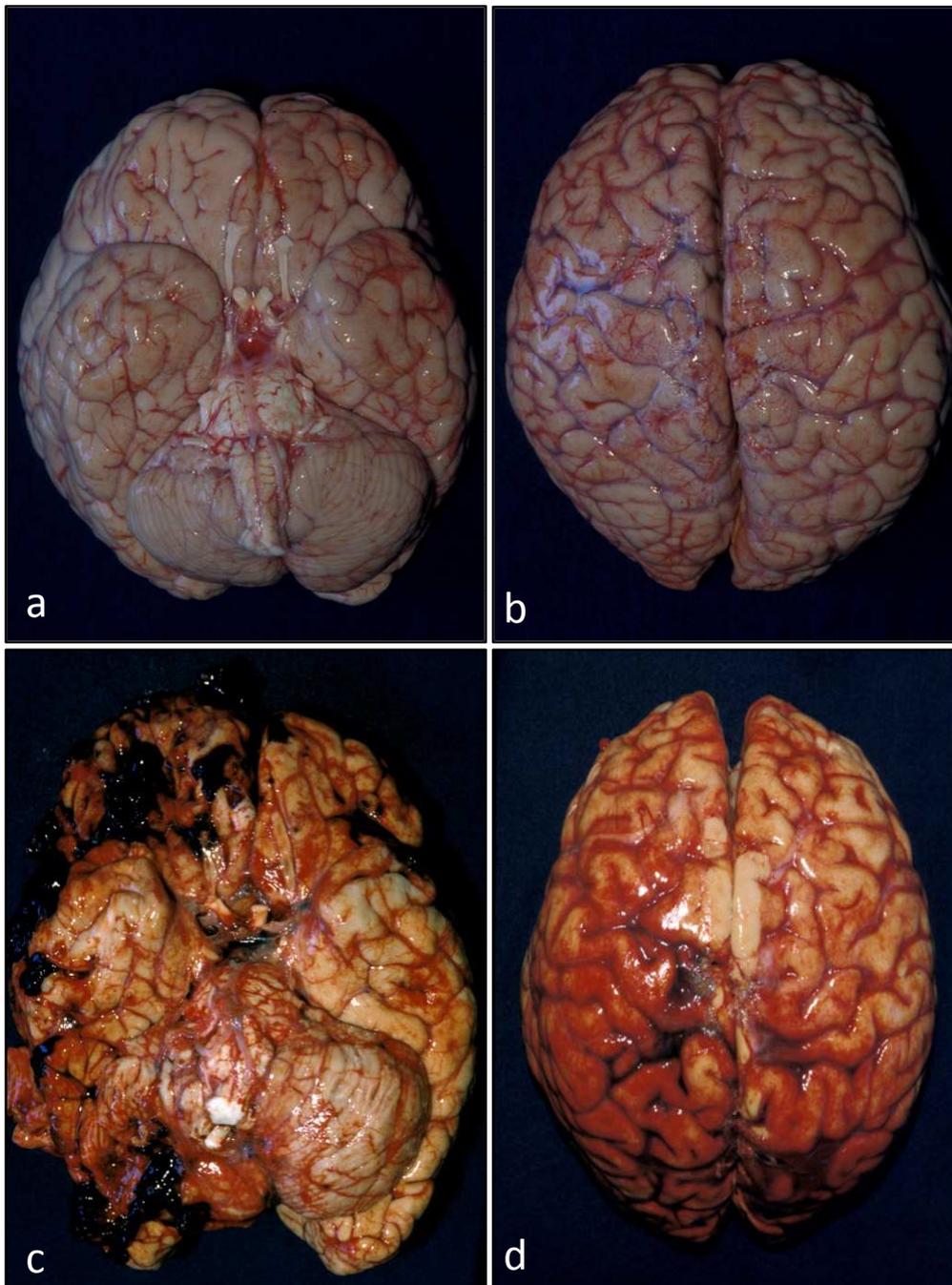


Fig. 10. Imágenes de la norma basal y vertical de encéfalos extraídos en la sala de autopsias. Grupo Control, C16 (a y b). Grupo TCE, T3 (c) y T6 (d), donde se demuestra hemorragia subaracnoidea con destrucción de parénquima de los lóbulos frontal, temporal y occipital derechos y edema cerebral (c) y edema cerebral difuso (d).

2. FIJACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

2.1. Fijación para la inclusión en parafina y corte en vibratomo

Todas las muestras de tejido cerebral obtenidas fueron inmediatamente fijadas en solución de Zamboni¹ a 4°C durante 24 horas. Posteriormente se realizó un lavado en solución PBS² para eliminar los restos de fijador, y las muestras fueron mantenidas en etanol al 70% a 4°C hasta su procesamiento.

Cada una de estas muestras fue dividida en una parte para inclusión en bloque de parafina y otra parte para realizar secciones mediante vibratomo. Estas últimas fueron conservadas a -20°C en solución de criopreservación de Olmos³ hasta su utilización.

Soluciones utilizadas

Solución de Zamboni¹
Para preparar 1 litro de solución:
➤ Calentar 700 ml de agua destilada hasta unos 60-70 °C.
➤ Añadir 40 g de paraformaldehído.
➤ Añadir gotas de NaOH 1M hasta que el paraformaldehído se disuelva por completo.
➤ Añadir 150 ml de solución saturada de ácido pícrico.
➤ Añadir 100 ml de solución de PBS 10X.
➤ Dejar enfriar y ajustar el pH a 7.4.
➤ Enrasar a 1 litro con agua destilada.

Solución PBS²
Para 1 litro de solución:
➤ 76 g NaCl (Mw 58.4425 g/mol, M = 1,3 mol/l).
➤ 9.9 g Na ₂ HPO ₄ (Mw 141.959 g/mol, M = 0,07 mol/l).
➤ 4.1 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (Mw 137.992 g/mol, M = 0,03 mol/l).
➤ Disolver las tres sales en agua destilada, ajustar a pH 7.4 y enrasar a 1 litro.

Solución criopreservante de Olmos³

Para preparar 1 litro de solución:

- Disolver 300 g de sacarosa y 10 g de polivinil-pirrolidona en 700 ml de PBS 1x.
- Añadir 300 ml de polietilenglicol.

2.2. Fijación para microscopia electrónica de transmisión

En 3 casos controles y en 3 casos de TCE se procedió a recoger muestras de 0.5cm³ para ser inmediatamente fijadas en solución de glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato 0,1M pH 7.4. El tiempo de fijación osciló entre 2-4 horas para luego ser procesadas para microscopia electrónica de transmisión (TEM).

3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS EN BLOQUE DE PARAFINA PARA ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA

Las muestras incluidas en bloque de parafina fueron seccionadas a 10µm en microtomo de rotación (Microm HM 325, Thermo Scientific, Germany). Los cortes fueron montados en portaobjetos, previamente tratados con Silane[®] (Sigma-Aldrich[®], St Louis, Missouri, USA) y en ellos se realizó tinción de hematoxilina-eosina (**Protocolo 1**).

El objetivo de este procedimiento era estudiar el estado del parénquima nervioso y evaluar su integridad, tanto del grupo control como del grupo TCE.

Los cortes así obtenidos fueron evaluados mediante microscopia óptica convencional a 200x y 400x.

Protocolo 1***Tinción de hematoxilina-eosina***

Una fracción de cada muestra fijada en solución de Zamboni y preservadas a 4°C en etanol al 70% fue incluida en parafina previo paso por las siguientes disoluciones:

- Etanol 80% 1 hora.
- Etanol 90% 1 hora.
- Etanol 96% 1 hora.
- Etanol absoluto 1 hora.
- Xilol 1 hora.
- Parafina a 55°C 1 hora.
- Montaje del bloque de parafina.

Una vez obtenidos los cortes fueron rehidratados siguiendo los siguientes pasos de lavado:

- Xilol 10 minutos x 2.
- Etanol absoluto 10 minutos x 2.
- Etanol 96% 10 minutos x 2.
- Agua corriente 10 minutos x 2.

El procedimiento de tinción de los cortes fue el siguiente:

- Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich®, ref.: HHS16) 5 minutos.
- Lavado con abundante agua hasta eliminar todo el exceso de colorante.
- Paso rápido por solución alcohol-ácida (0.5% de HCl en etanol 96%).
- Agua corriente 5 minutos.
- Agua destilada 5 minutos.
- Eosina acuosa 3 minutos.
- Paso rápido por agua destilada.

Finalmente se procedió a la deshidratación y montaje de los cortes mediante los siguientes pasos:

- Etanol 70° 3 minutos x 2.
- Etanol 96° 5 minutos x 2.
- Etanol absoluto 5 minutos x 2.
- Xilol 5 minutos x 2.
- Montaje en DPX® (Sigma ref.: 6522).

4. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS SECCIONADAS CON VIBRATOMO PARA ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ÓPTICA

Las muestras obtenidas fueron seccionadas mediante vibratomo (Vibratome Series 1000; TPI Technical Products International, INC, St. Louis MO 63134, USA) a $100\mu\text{m}$. Los cortes, mantenidos en solución criopreservante, fueron utilizados para marcaje inmunohistoquímico en flotación. Para ello se utilizaron los anticuerpos primarios anti-colágeno IV y anti-laminina por ser componentes exclusivos de la membrana basal de los vasos sanguíneos en el tejido nervioso. Estas muestras, reveladas mediante 3',3'-DBA (diaminobenzidina), fueron estudiadas con ayuda del microscopio óptico. El objetivo del estudio de estas muestras era determinar la composición y la estructura de los PIVs (colágeno IV y laminina) (**protocolo 2**). Los núcleos de las células se contratiñeron con hematoxilina de Mayer.

Protocolo 2

Marcaje inmunohistoquímico con revelado mediante DBA y estudio en microscopia óptica de campo claro

El revelado de un marcaje inmunohistoquímico mediante peroxidasa de rábano (HRP) y su substrato DBA produce un precipitado marrón estable a temperatura ambiente y compatible con los métodos de montaje tradicionales. Este tipo de revelado es especialmente útil cuando hay que procesar y evaluar un elevado número de muestras ya que no se deteriora con el tiempo, cosa que si ocurre con frecuencia con los marcajes fluorescentes.

Todos los marcajes inmunohistoquímicos revelados con DBA se realizaron en flotación utilizando secciones de $100\mu\text{m}$ preservadas en solución criopreservante de Olmos a -20°C .

Marcaje de Colágeno IV

- Realizamos 3 lavados de 10 minutos con PBS para eliminar los restos de solución de criopreservación.
- Bloqueo de las peroxidasas endógenas colocando los cortes durante 30 minutos en una solución de metanol 70% y agua oxigenada 2% en PBS.
- Realizamos 2 lavados de 5 minutos cada uno en PBS con 0.1% de Tritón X-100 (Sigma ref.: X-100). El objetivo de estos lavados es permeabilizar el tejido para que los anticuerpos penetren en él.
- Bloqueo de las uniones inespecíficas mediante la incubación de los cortes durante 20 minutos a temperatura ambiente con una solución al 10% de suero de caballo (Serotec ref.: C09SA, Bionova) y 0.1% de Tritón X-100 en PBS.
- Incubación con el anticuerpo primario policlonal anti-colágeno IV hecho en cabra (Chemicon International: Temecula, California, USA y Santa Cruz Biotechnology, Inc) a una dilución 1:200. La incubación se realiza en una solución de 1% de suero de caballo y 0.1% Tritón X-100 en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- Realizamos 3 lavados de 5 minutos en 0.1% Tritón X-100 en PBS.
- Incubación con el anticuerpo secundario anti-cabra hecho en burro y conjugado con biotina (biotinilado) (ref.: sc-2042, Santa Cruz) a una dilución 1:100. La incubación se realiza en una solución de 1% de suero de caballo y 0.1% Tritón X-100 en PBS 1x durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Realizamos 3 lavados de 5 minutos en 0.1% Tritón X-100 en PBS.
- Incubación con estreptavidina conjugada con peroxidasa (Sigma, ref.: S-5512) a una dilución 1:200 en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Realizamos 3 lavados de 5 minutos en PBS.
- Revelado durante 1 minuto utilizando el reactivo basado en diaminobenzidina: Liquid DAB Substrate-Chromogen system (Dako ref.: K 3468).
- Realizamos 3 lavados de 5 minutos en agua destilada.
- Realizamos un paso rápido por una solución de hematoxilina de Mayer para contrastar los núcleos.
- Realizamos 3 lavados de 5 minutos en agua corriente.
- Deshidratamos y montamos siguiendo el procedimiento descrito para la tinción de hematoxilina eosina.

Marcaje de la Laminina

- Realizamos 3 lavados de 10 minutos con PBS para eliminar los restos de solución de criopreservación.
- Tratamiento con solución comercial de Proteinasa K (Dako, ref.:S3020) para desenmascarar los antígenos durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Bloqueo de las peroxidases endógenas mediante la inmersión de los cortes durante 30 minutos en una solución de metanol 70% y agua oxigenada 2% en PBS.
- Realizamos 5 lavados de 10 minutos cada uno con 1% de Tritón X-100 en PBS.
- Bloqueo de las uniones inespecíficas mediante la incubación de los cortes durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución al 10% de suero de caballo y 1% de Tritón X-100 en PBS.
- Incubación con el anticuerpo primario policlonal anti-laminina hecho en conejo; (Dako Cytomation; Glostrup, Dinamarca) a una dilución 1:400. La incubación se realiza en una solución de 1% Tritón X-100 y 3% de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, ref.: A-7638) en PBS durante toda la noche a °4C.
- Realizamos 5 lavados de 10 minutos con 1% en PBS.
- Realizamos 2 lavados de 10 minutos con una solución de 1% Tritón X-100 y 0.3% de albúmina sérica bovina en PBS.
- Incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo unido a HRP (ImmPRESS, Vector, ref.: MP-7401).
- Realizamos 2 lavados de 10 minutos en PBS.
- Revelado durante 1 minuto utilizando el reactivo basado en diaminobenzidina: Liquid DAB Substrate-Chromogen system.
- Realizamos 3 lavados de 5 minutos en agua destilada.
- Paso rápido por una solución de hematoxilina de Mayer para contrastar los núcleos.
- Realizamos 3 lavados de 5 minutos en agua corriente.
- Deshidratamos y montamos siguiendo el procedimiento descrito para la tinción de hematoxilina eosina.

5. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS SECCIONADAS CON VIBRATOMO PARA ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA LÁSER CONFOCAL

Siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente, realizamos el marcaje inmunohistoquímico de anticuerpos anti-colágeno IV, anti-laminina y anti-factor von Willebrand, mediante la fluorescencia emitida por Alexa Fluor 488 y 546 (Molecular Probes, Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA) para estudio mediante microscopio láser confocal (**protocolo 3**). En estas preparaciones se realizó además una tinción de núcleos mediante Ioduro de Propidio o To-Pro-3 iodide (Molecular Probes, Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA) para poner de manifiesto posibles células en relación a los PIVs.

Las técnicas inmunohistoquímicas tienen como fundamento la utilización de anticuerpos que se unen específicamente a determinados epítomos, permitiendo, de este modo, identificar diferentes constituyentes o tipos de células que contengan el epítomo específico.

Para la visualización de la unión antígeno-anticuerpo se utiliza como recurso un anticuerpo secundario biotinilado específico contra el anticuerpo primario. A la biotina que presenta este anticuerpo secundario se le unirá la estreptavidina conjugada con un cromógeno determinado.

En nuestro caso se realizaron técnicas inmunohistoquímicas dobles, utilizando dos anticuerpos en una misma muestra, para poder estudiar la relación estructural entre dos proteínas.

En todos los protocolos de inmunohistoquímica se realizaron controles negativos de las técnicas, omitiendo la incubación del anticuerpo primario. Además se realizaron controles positivos en tejido renal y de intestino grueso de humanos, donde está perfectamente establecida la presencia de los epítomos buscados en el cerebro, con la incubación del anticuerpo primario.

Protocolo 3

Marcaje inmunohistoquímico de fluorescencia para estudio mediante microscopia láser confocal

La tinción se realizó con las secciones en flotación siguiendo el siguiente protocolo:

- Lavado de la solución de Olmos 10 minutos en PBS 1x (3 lavados).
- Permeabilización del tejido en una solución 0.1% de Triton X-100 en PBS 1x durante 2 horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C.
- Lavados de 15 minutos (4 lavados) en solución PBI (1000µl Igepal+1000ml PBS).
- Incubación con los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente, y toda la noche siguiente a 4°C. La incubación se realizó en un tampón consistente en 0.1% Igepal, 0.3% de albúmina sérica bovina en PBS suplementado con un 10% de suero de caballo. Los anticuerpos primarios utilizados fueron un anti-von Willebrand monoclonal hecho en ratón (Clone F8/86; DAKO Cytomation) a una concentración de 1:100 y un anticuerpo anti-Colágeno IV policlonal hecho en conejo a una concentración de 1:200.
- Lavados de 15 minutos en solución PBI (5 lavados).
- Incubación con los anticuerpos secundarios siguiendo las mismas condiciones utilizadas para los anticuerpos primarios. En este caso se utilizaron un anticuerpo anti-ratón biotinilizado (Vector, Invitrogen™) a una concentración de 1:250 y un anti-cuerpo anti-conejo hecho en caballo unido a Alexa Fluor 488 a una concentración de 1:100.
- Incubación con el fluorocromo estreptavidina- Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA) a una concentración de 1:100 en las mismas condiciones que los anticuerpos.
- Lavados de 15 minutos en solución PBS (5 lavados).
- Contratinción de los núcleos con TO-PRO-3 iodide diluido 1:100 en PBS 1x durante 5 minutos.
- Lavados de 15 minutos en solución PBS (5 lavados) seguidos de un último lavado con PBS 1x estéril.

Se montan las secciones con unas gotas de medio acuoso para fluorescencia Fluoromount (F4680; Sigma-Aldrich®), para su visualización en microscopio láser confocal.

6. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA ESTUDIO MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Las muestras que se obtuvieron para el estudio mediante TEM fueron procesadas según el protocolo descrito a continuación (**protocolo 4**).

Protocolo 4

Muestras destinadas a estudio mediante microscopia electrónica de transmisión

- Fijación con glutaraldehído (2.5% en tampón fosfato (cacodilato sódico) 0.1M, 2 horas a 4°C) (Sigma-Aldrich®)

A continuación se procedió a su deshidratación e infiltración mediante la inmersión de las muestras en una serie de acetonas a concentración creciente a la que se añadió gradualmente la resina.

- Acetona 70%, toda la noche.
- Acetona 80%, 2 x 10 minutos.
- Acetona 90%, 2 x 10 minutos.
- Acetona 96%, 3 x 10 minutos.
- Acetona 100%, 3 x 10 minutos.
- Acetona-Resina Spurr 2:2, durante toda la noche.
- Acetona- Resina Spurr 1:3, durante 5 horas.
- Resina Spurr 100%, durante 2 días.

Polimerización: se realizaron los bloques de resina Spurr y se endurecieron a 60°C durante un mínimo de 48 horas. A partir de estos bloques se cortaron secciones ultrafinas de 60-80µm de grosor.

Los cortes ultrafinos se contrastaron con citrato de plomo (1.33g Pb (NO₃)₂+1.76 g Na₃ (C₆H₅O₇)·2H₂O+30ml H₂O hervida. La mezcla se mantuvo durante 30 minutos para luego añadir 8 ml de NaOH 1N. Enrasar a 50ml con H₂O hervida) y 2% de acetato de uranilo acuoso.

Los cortes se examinaron mediante TEM (Hitachi H-7000).

De cada rejilla se analizó un mínimo de 10 vasos, obteniéndose imágenes digitales a diferentes aumentos para observar el tejido adyacente al vaso y los componentes de la BHE: los pies de los astrocitos, la membrana basal, los pericitos, la célula endotelial y las uniones entre ellas. En las muestras también se estudió la integridad del tejido nervioso.

7. ANÁLISIS DESCRIPTIVOS

El análisis descriptivo se basó en la observación de los PIVs mediante inmunomarcajes frente a colágeno IV, laminina y factor von Willebrand. Además, se utilizaron tinciones de hematoxilina-eosina para valorar el mantenimiento estructural del parénquima. La visualización de las muestras se realizó mediante microscopia óptica convencional de campo claro (Microscopio óptico con sistema de epifluorescencia: Nikon Eclipse E-800 (Nikon Corp., Tokyo, Japón), microscopia laser confocal (microscopio confocal Leica TCS-SP2 AOBS, Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Alemania) y microscopia electrónica de transmisión (TEM Hitachi H-7000).

El análisis del marcaje inmunohistoquímico nos permitió determinar la estructura de los PIVs, las células anexas, el endotelio vascular y la membrana basal. Las muestras procesadas para tinción con hematoxilina-eosina y las de microscopia electrónica de transmisión permitieron valorar la integridad del parénquima nervioso en ambo grupos de estudio.

Los resultados obtenidos nos han permitido establecer una clasificación de los PIVs. Posteriormente esta clasificación ha sido utilizada para realizar el análisis morfométrico.

8. ANÁLISIS MORFOMÉTRICOS

Los resultados morfométricos de este estudio se obtuvieron a partir de los marcajes inmunohistoquímicos frente a colágeno IV revelados con DAB y cuantificados mediante microscopia óptica convencional de campo claro.

De cada muestra se estudiaron 8 campos, a una magnificación de 100x y 200x, realizando microfotografías para su análisis posterior. El número de campos que era necesario estudiar se determinó mediante el método de media progresiva con una significación del 95% (*Renau y Megías, 1998*).

Los parámetros evaluados, tanto en el grupo control como en el grupo TCE, fueron: densidad capilar y lacunaridad mediante microfotografías obtenidas a 100x, y la densidad y diámetro de los PIVs, mediante microfotografías obtenidas a 200x, así como el porcentaje de los diferentes tipos de PIVs.

Para la clasificación de los PIVs se utilizó la siguiente nomenclatura, basada en la presencia o no de células adyacentes a los PIVs, clasificación modificada a partir del trabajo de *Llombart (2007)*, así como su localización e integridad de los mismos:

PIVs Tipo A: sin células.

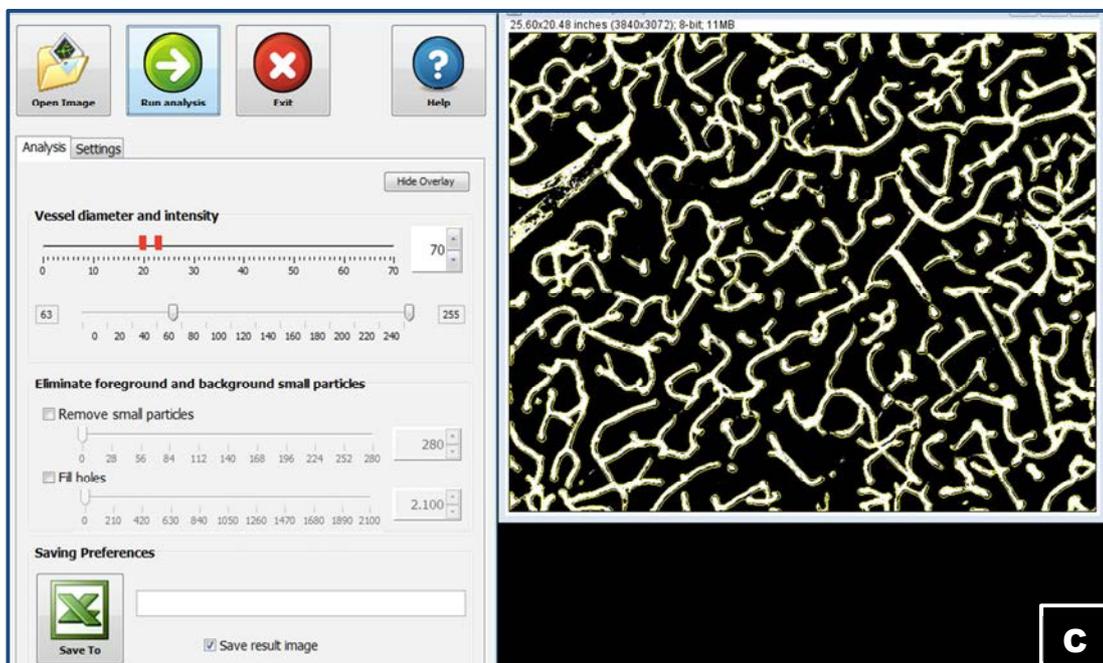
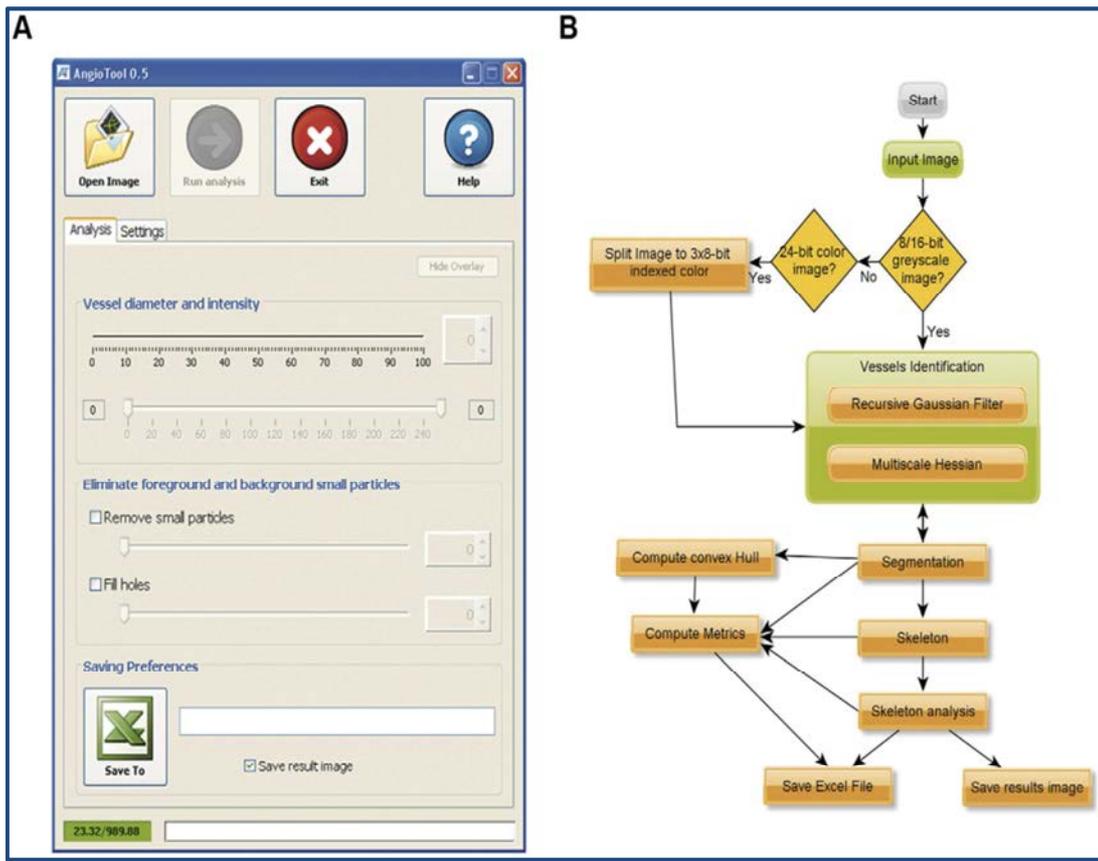
PIVs Tipo B: presencia de 1 célula en uno de sus extremos.

PIVs Tipo C: presencia de 2 células, una en cada extremo.

PIVs Tipo D: presencia de una célula en el centro.

PIVs Tipo E: rotos (desestructurados).

La cuantificación de los PIVs se realizó manualmente mediante conteo por campos, en el microscopio óptico a 200x. Así mismo se analizaron los capilares mediante el programa Angio Tool (*Zudaire, 2011*) (**figura 11**).



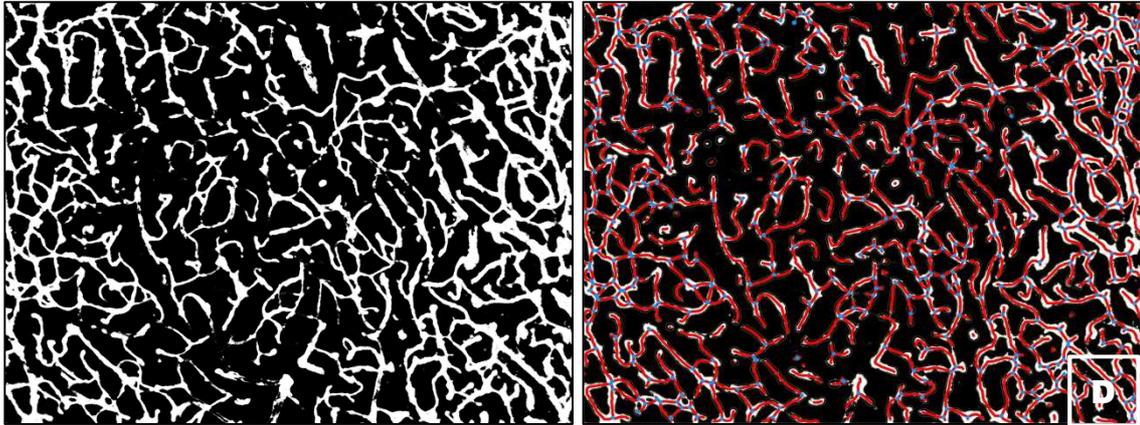


Fig. 11. AngioTool's GUI y análisis de flujo. (A) AngioTool's GUI para análisis de las redes capilares. (B) Representación del flujo de análisis lógico realizado por AngioTool. (C) Programa angio-tool. (D) Imagen de los capilares, donde se muestra en color rojo el esqueleto de los mismos, y en color azul los puntos de bifurcación (Zudaire, 2011).

Los parámetros obtenidos mediante este programa fueron:

- a.- área ocupada por los vasos (*Vessels area*)
- b.- porcentaje de área ocupada por los vasos (*Vessels density*)
- c.- espacio intercapilar expresado en porcentaje (*Lacunarity*)

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo en el Servicio de Estadística de la UAB. En primer lugar se realizó una validación de la consistencia interna de las variables de la base de datos, así como de los valores fuera de rango y de los valores perdidos.

En total se incluyeron las muestras de los 6 casos controles y las muestras de los 6 pacientes fallecidos por TCE. De cada encéfalo se analizaron 8 microfotografías de cada una de las regiones de donde se habían extraído las muestras.

El análisis estadístico se realizó con el software: SAS v9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. En todos los casos se ha considerado un valor de $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

9.1. Comparación entre lóbulos cerebrales

Para evaluar las diferencias entre las regiones estudiadas se compararon, dentro de un mismo grupo de pacientes, los valores de 'Densidad capilar', 'Lacunaridad' y "Densidad de PIVs", de acuerdo con las variables explicativas "Hemisferio" y "Lóbulo".

Para cada una de las variables se obtuvieron tablas resumen en función de las variables explicativas con los estadísticos de resumen: Número de observaciones (N), Número de datos perdidos (NMiss), Media, Mediana, Desviación estándar, y los valores Mínimo y Máximo. Los resultados obtenidos se representaron mediante diagramas de cajas.

A continuación se realizaron pruebas bivariantes con el objetivo de valorar si existían diferencias entre los diferentes lóbulos cerebrales, mediante modelos lineales para medidas repetidas. En caso de obtener un resultado significativo, se realizaron contrastes 2 a 2 a posteriori. Para evitar el error de tipo I se aplicó la corrección de Tukey para comparaciones múltiples.

9.2. Comparación entre grupos

En primer lugar se compararon las edades entre los dos grupos mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney-Wilcoxon. Posteriormente se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior para comparar cada una de las variables en función del grupo.

Este análisis se complementó con un análisis por zonas, comparando los resultados entre grupos según el "hemisferio" y según el "lóbulo". Para ello se ha utilizado un modelo lineal para medidas repetidas donde se evalúa el efecto de la interacción entre

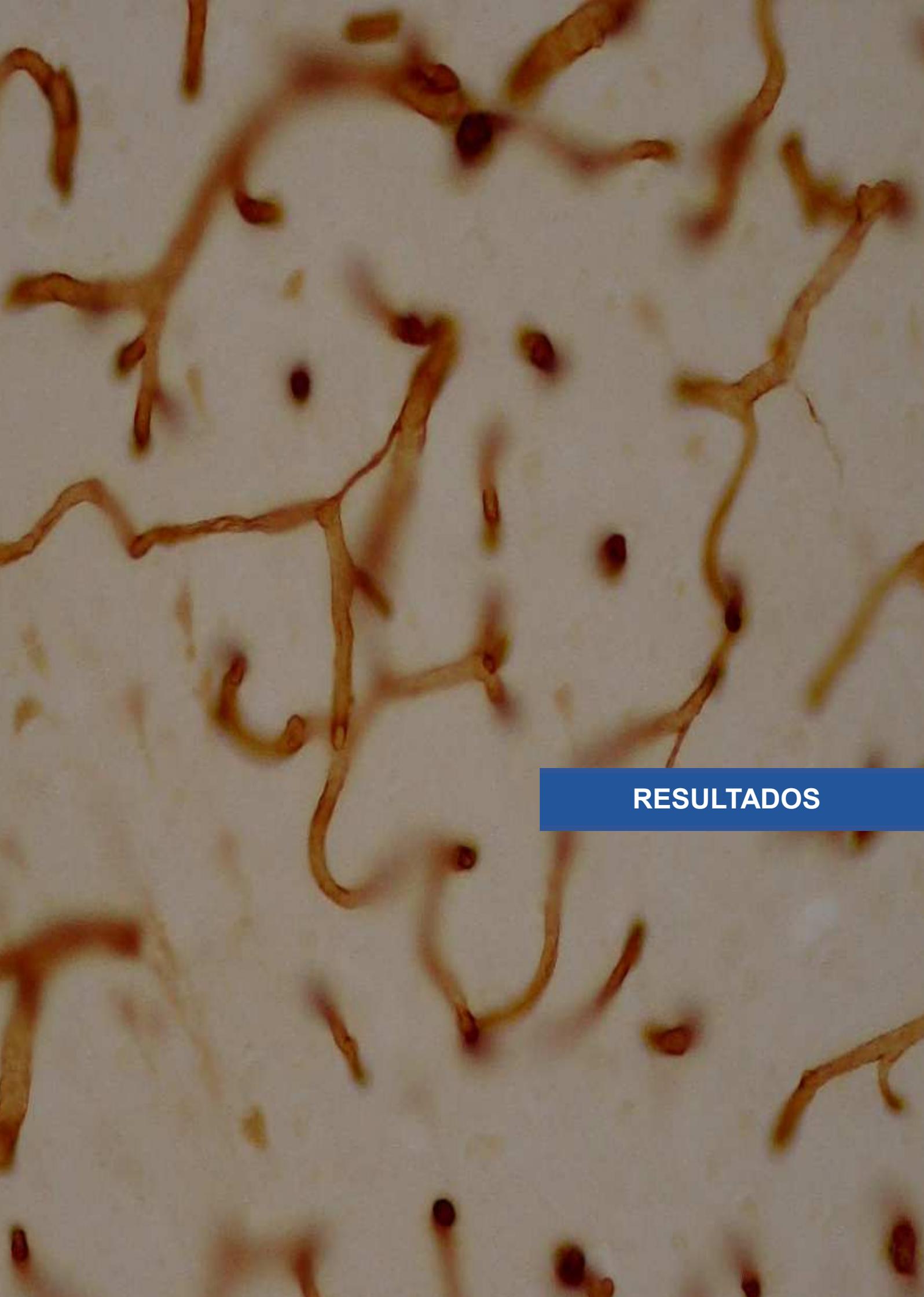
“grupo” y “hemisferio” y entre “grupo” y “lóbulo”. Finalmente se ajustó un nuevo modelo para evaluar el efecto de la edad en cada una de las variables respuesta.

9.3. Análisis correlacional

Se realizó un análisis correlacional entre las variables ‘Densidad capilar’, ‘Lacunaridad’ y ‘número de PIVs’ mediante gráficos de dispersión y el estadístico de correlación de Pearson, tanto en el grupo control como en el grupo TCE por separado.

9.4. Análisis de los patrones de los PIVs según la presencia de células

Se llevó a cabo un análisis para cada tipo de patrón de PIVs (A, B, C, D y E), comparándose la frecuencia absoluta de cada tipo (N) y la frecuencia relativa (% respecto al total de células), así como la densidad en cada uno de ellos. Para ello se utilizaron modelos lineales generalizados mixtos (distribución de Poisson, utilizada para modelizar recuentos).



RESULTADOS

RESULTADOS

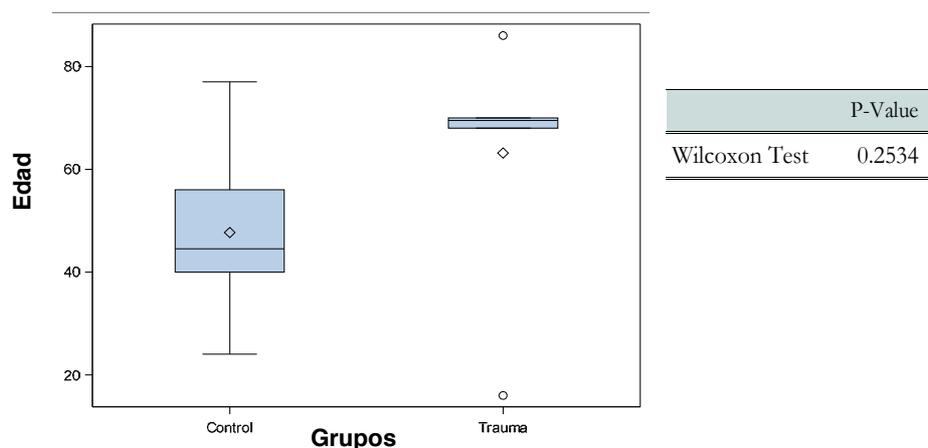
1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS DE ESTUDIO

Las muestras obtenidas de la corteza cerebral para este estudio procedían de 12 sujetos varones: 6 pertenecían al grupo Control y 6 pertenecían al grupo TCE. Las edades oscilaron entre los 24 y los 77 años en el grupo Control (media de edad de 47.6 años) y entre los 16 y los 86 años en el grupo TCE (media de edad de 63.1 años).

Aunque existan diferencias en la edad de cada grupo, con una tendencia de edad mayor en el grupo TCE respecto al grupo Control, estas no fueron estadísticamente significativas (p-valor=0.253) (tabla 4 y gráfica 1).

Group	Nobs	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	6	47.67	44.50	17.94	24.00	77.00
Trauma	6	63.17	69.50	24.07	16.00	86.00
Total	12	55.42	62.00	21.80	16.00	86.00

Tabla 4. Cálculo de la media, mediana y desviación estándar de las edades de los dos grupos de estudio.



Gráfica 1. Se muestra que no existen diferencias significativas en las edades de los grupos Control y grupo TCE.

2. COMPROBACIÓN DE LA CONSERVACIÓN DEL TEJIDO CEREBRAL

El estudio macroscópico de los encéfalos del grupo TCE mostró la presencia de lesiones primarias bilaterales en tres individuos, mientras que en uno las lesiones primarias afectaban al hemisferio izquierdo y en los otros dos afectaban al hemisferio derecho. Estas lesiones primarias fueron del tipo contusivo con hemorragias subaracnoideas. Destacamos que todos los individuos del grupo TCE presentaron como lesión secundaria edema cerebral.

2.1. Descripción de las alteraciones del tejido cerebral mediante tinción con hematoxilina-eosina

La evaluación histológica del parénquima cerebral mediante tinción con hematoxilina-eosina no mostró diferencias aparentes entre ambos grupos.

Destacamos que en los dos grupos se objetivó la presencia de áreas de vacuolización alrededor de las neuronas. También observamos la presencia de numerosas neuronas con elevada eosinofilia. Ambos hallazgos son típicos de las muestras de tejido cerebral humano obtenidas durante necropsias y se relacionan con los inevitables cambios que se producen post-mortem.

Tampoco se observaron otras alteraciones que fueran sugestivas de artefactos debido al procesado de las muestras, o a las técnicas de conservación, que pudieran haber afectado significativamente a uno de los dos grupos (**figura 12**).

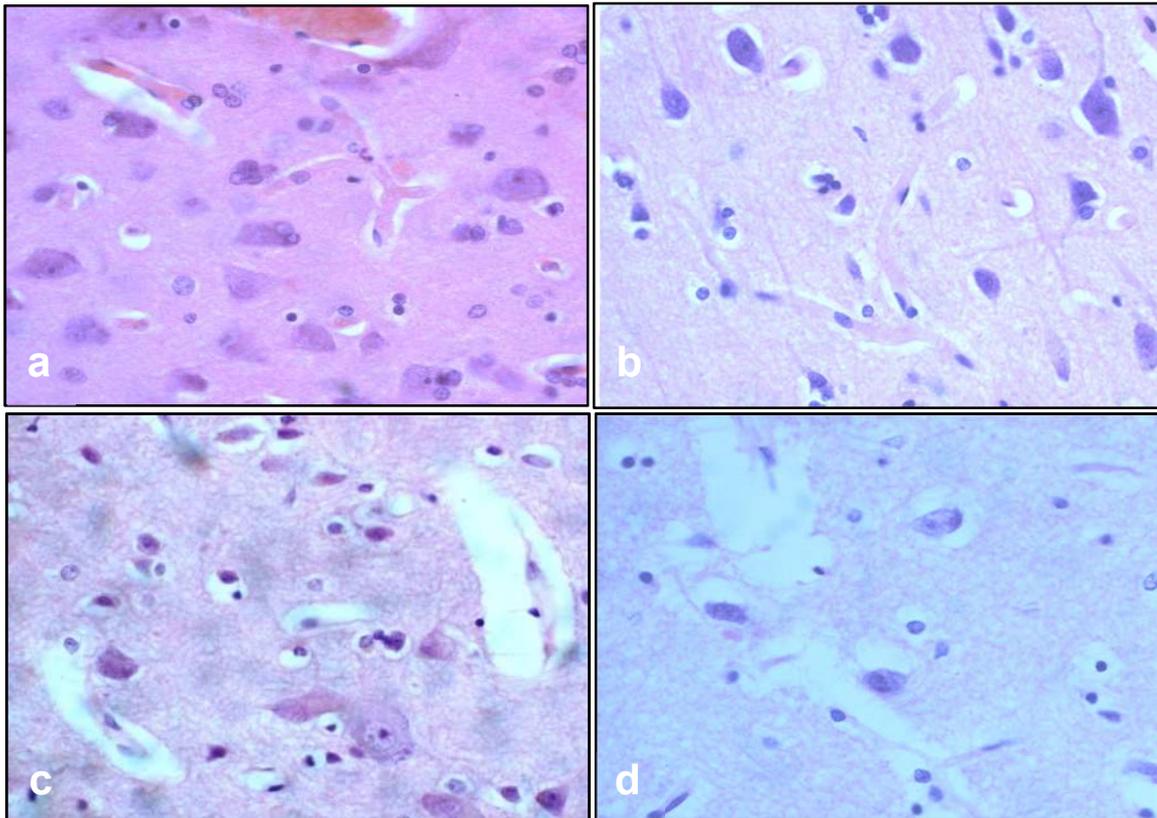


Fig. 12. Tinción hematoxilina-eosina (400x). Visualización del parénquima cerebral en una muestra del grupo Control (a) y en una del grupo TCE (b) en las cuáles no hay alteraciones significativas. Vacuolización atribuible a fenómenos post-mortem en una muestra del grupo Control (c) y en una muestra del grupo TCE (d).

2.2. Descripción morfológica de las alteraciones del tejido cerebral mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Realizamos una descripción morfológica, mediante TEM, de las alteraciones observadas en el tejido cerebral en los individuos del grupo TCE comparándolas con las del grupo Control. El objetivo era valorar las alteraciones que podían ser atribuidas a los fenómenos post-mortem que se producen en el tejido.

En las muestras Control se observó, en grado variable, edema citotóxico tanto a nivel del neurópilo como del endotelio y de los pericitos. En algunos casos la afectación del neurópilo llegaba a la pérdida de contacto glio-basal en ciertos segmentos del capilar. Todas estas alteraciones han sido también observadas en mayor o menor medida en las muestras de pacientes fallecidos por TCE. La observación de estas alteraciones,

tanto en el grupo Control como en el grupo TCE, son indicativas de los procesos post-mortem.

La estructura que aparentemente presenta alteraciones más específicas en las muestras del grupo TCE, y que se ve menos alterada por los procesos post-mortem, es posiblemente la membrana basal. En efecto, las muestras de TCE presentaron con frecuencia alteraciones muy marcadas de la membrana basal, con desdoblamientos de la misma, que a menudo contenían algunos restos celulares. Estos cambios eran raros en las muestras de sujetos control, y aunque eventualmente podían presentar vesículas en el interior de la membrana, estos no llegaban a presentar el nivel de desestructuración hallado con frecuencia en las muestras de TCE. En algunas de estas muestras se observaron verdaderas discontinuidades por donde se extendía material de la célula endotelial.

Además se objetivaron alteraciones graves en la zona de la lesión en los individuos del grupo TCE, con presencia de edema perivascular y perineuronal, hemorragias y alteraciones de diferente grado en zonas alejadas de la lesión. Entre estas alteraciones destacamos cierto grado de degradación del tejido adyacente a los vasos, engrosamiento y desestructuración de los pies de los astrocitos, engrosamiento y desorganización de la lámina basal, alteraciones en los orgánulos de los pericitos y de las células endoteliales, con vacuolización y engrosamiento, así como rotura de las células endoteliales y alteraciones en las uniones estrechas que sellan la pared vascular. De estas observaciones podemos concluir que en las muestras del grupo TCE hubo alteraciones a nivel de la membrana basal que no se objetivaron en el grupo Control (**figura 13**).

Por lo que se refiere a los PIVs, estos no han podido ser observados mediante TEM. Su reducido diámetro así como su trayecto hacen altamente improbable su visualización en secciones longitudinales en cortes ultrafinos. Además se debe considerar que los cambios post-mortem dificultan especialmente la identificación de una porción de un puente en el interior del neurópilo si este no tiene una continuidad clara con la membrana basal.

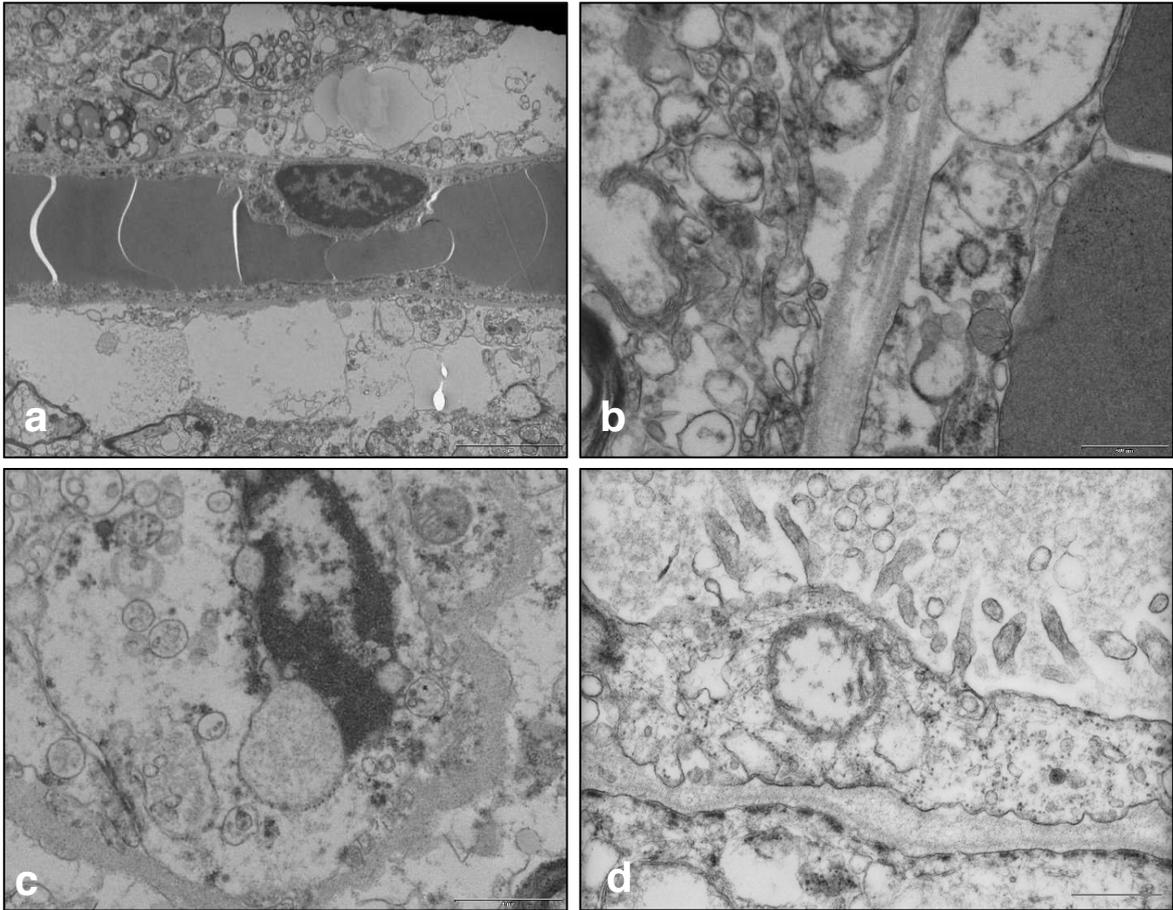


Fig. 13. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión.

Corte longitudinal de un capilar en el que se observa edema perivascular y desorganización de los pies de astrocitos (a). Detalle de la desorganización de la membrana basal de un vaso así como vacuolización de la célula endotelial (b). Detalle de una célula endotelial en la que podemos observar la alteración de la membrana nuclear y de la unión estrecha con la célula endotelial adyacente (c). Detalle de una célula endotelial con numerosos microvilli y una mitocondria alterada (d).

3. PRESENCIA DE PIVs EN LA CORTEZA CEREBRAL

En nuestro estudio hemos confirmado la presencia de PIVs, tanto en las observaciones realizadas con microscopio óptico y con microscopio láser confocal, no así en microscopía electrónica de transmisión.

Estas estructuras fueron observadas en las muestras de corteza cerebral humana de sujetos del grupo Control y del grupo TCE. Además se objetivaron prácticamente en todas las muestras de los lóbulos cerebrales (**figura 14**).

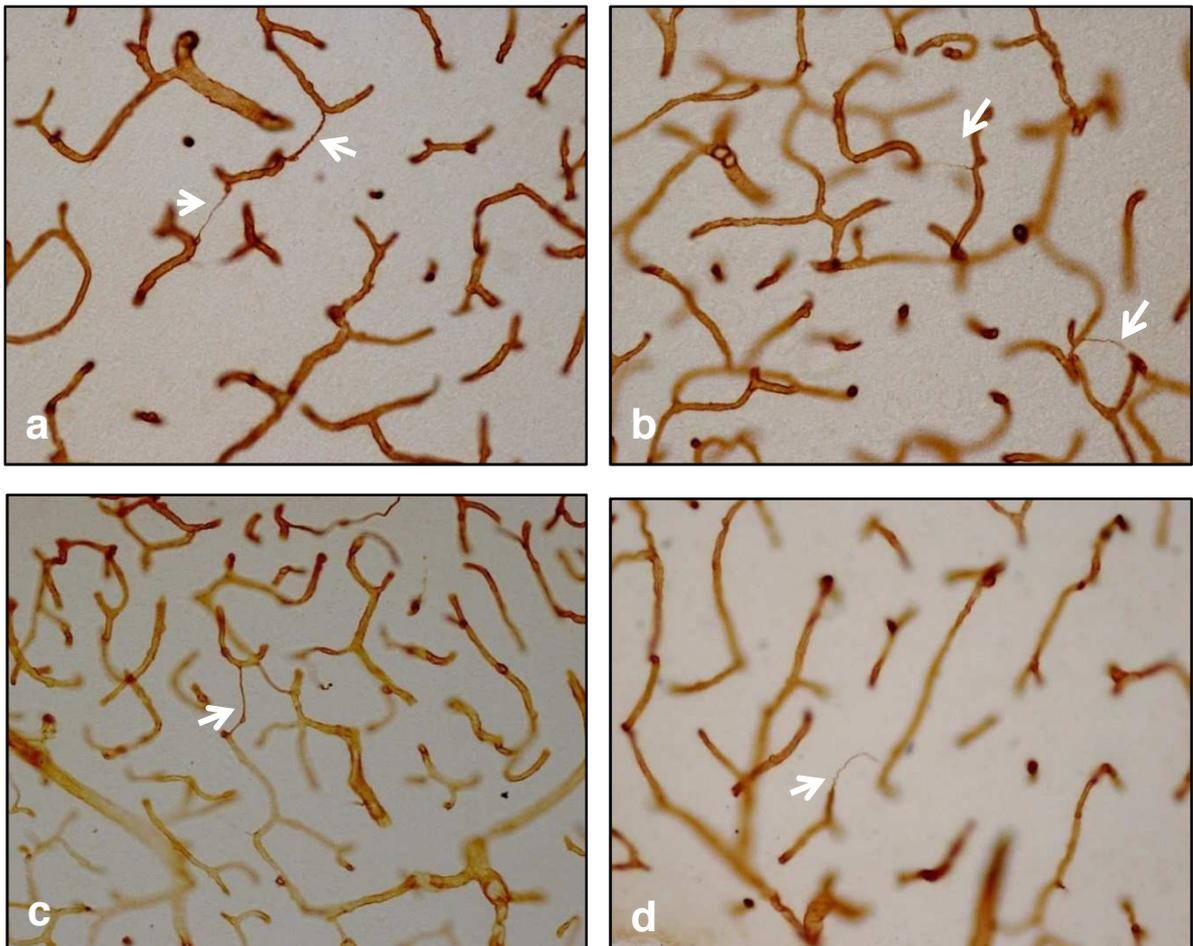


Fig. 14. Imágenes de marcaje inmunohistoquímico anti-colágeno IV (200x) donde se visualizan los PIVs en muestras del grupo Control (C17, C18) (a y c), y en muestras del grupo TCE (T5 y T6) (b y d). Las flechas señalan PIVs.

3.1. Descripción morfológica

Los PIVs se presentaban como filamentos que unen diferentes estructuras vasculares, frecuentemente capilares, aunque no fue inusual encontrarlos uniendo vasos de mayor calibre, como arteriolas y vénulas.

La morfología de los PIVs observados en ambos grupos del estudio fue muy similar. El rango del diámetro de los PIVs fue entre 1-2 μm y no presentaban lumen. Esta característica morfológica puede ser un criterio de clasificación de los PIVs. Así, desde una perspectiva cualitativa, esta variabilidad en el diámetro de los PIVs determina una agrupación en gruesos y delgados (**figura 15**).

También hemos observado en ocasiones que los PIVs podían bifurcarse (**figura 16**); en otras ocasiones se manifestaban como una prolongación de un capilar y en otros casos formaban bucles.

Algunos de los PIVs observados en ambos grupos del estudio presentaban soluciones de continuidad en su trayecto. Este hecho lo hemos considerado como PIVs rotos o desestructurados y fueron observados en mayor proporción en el grupo de TCE (**figura 17**).

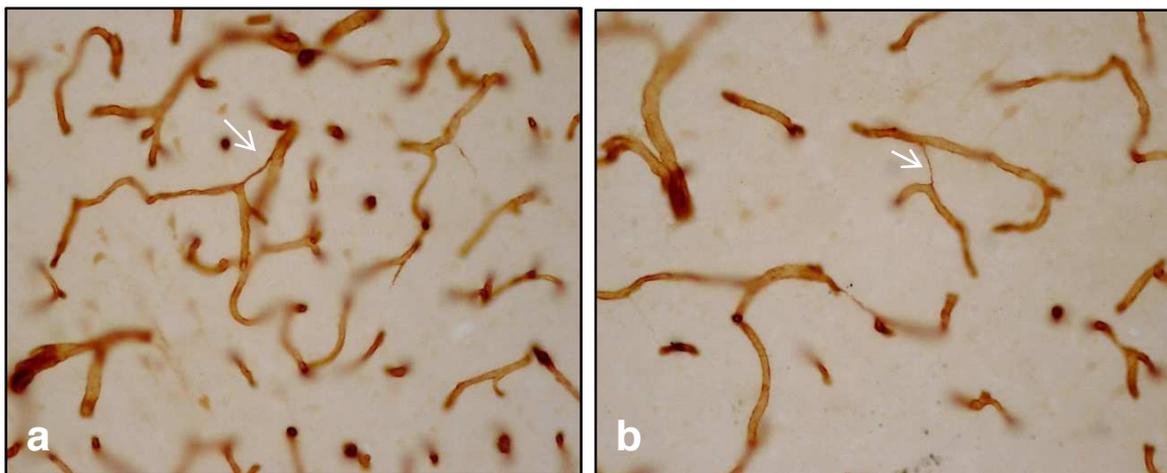


Fig. 15. Imágenes de marcaje inmunohistoquímico anti-colágeno IV (200x). PIVs gruesos (a) y PIVs delgados (b).

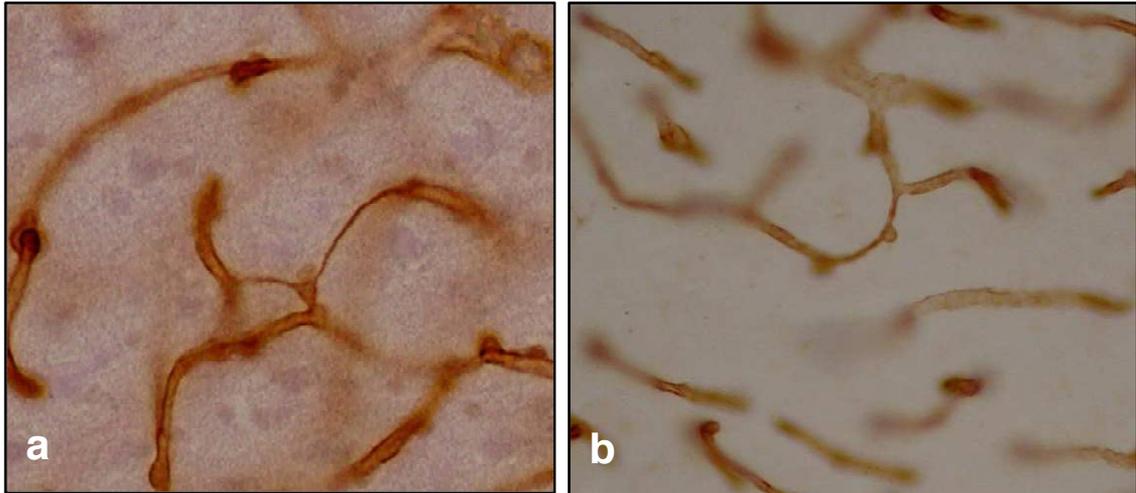


Fig. 16. Imágenes de marcaje inmunohistoquímico anti-colágeno IV, (200x). PIVs bifurcándose (a) y PIVs que se forman como continuidad de un capilar (b).

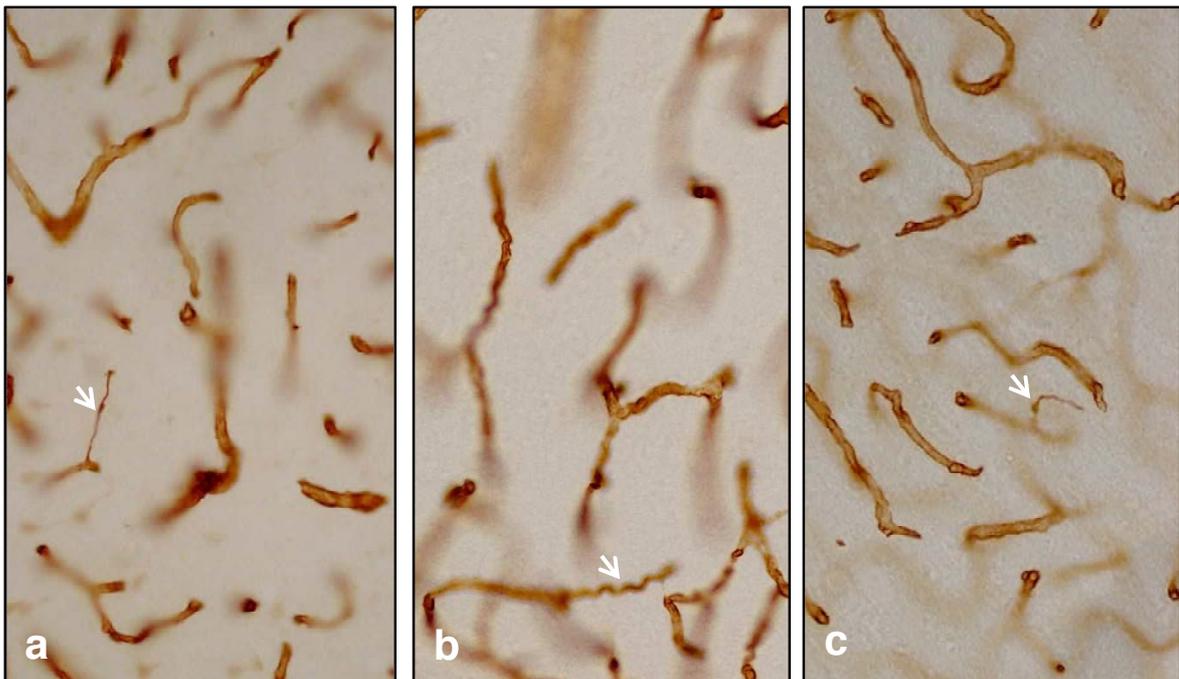


Fig. 17. Imágenes de marcaje inmunohistoquímico anti-colágeno IV (200x). PIVs rotos (flechas) en las diferentes muestras de corteza cerebral del grupo TCE (T4, T5) (a,b y c).

3.2. Composición de los PIVs

En los estudios realizados mediante microscopía óptica de campo claro y microscopía láser confocal, hemos comprobado que los PIVs se tiñen intensamente con anticuerpos anti-colágeno IV y anti-laminina. Esta reacción es prácticamente igual a la reacción que muestran estos anticuerpos en la membrana basal que rodea a los vasos sanguíneos. La presencia de estos dos componentes, colágeno tipo IV y laminina, induce a considerarlos como estructuras con características similares a los capilares (**figuras 18 y 19**).

Estos componentes son mayoritarios en la *lámina densa* de la membrana basal de los vasos sanguíneos.

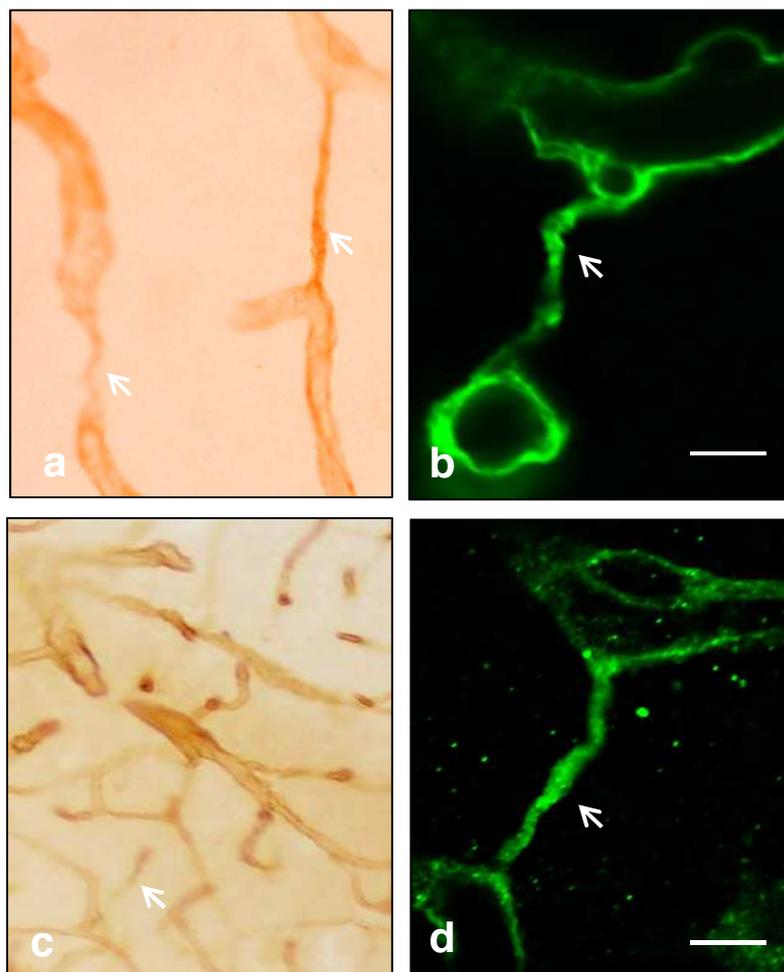


Fig. 18. Membrana basal de capilares y de PIVs (flechas), marcaje inmunohistoquímico anti-colágeno IV (a y b) y anti-laminina (c y d). Imágenes de microscopía óptica (400x) (a y c). Imágenes de microscopía láser confocal (b y d). Barras: 4,69 μm (b) y 6,90 μm (d).

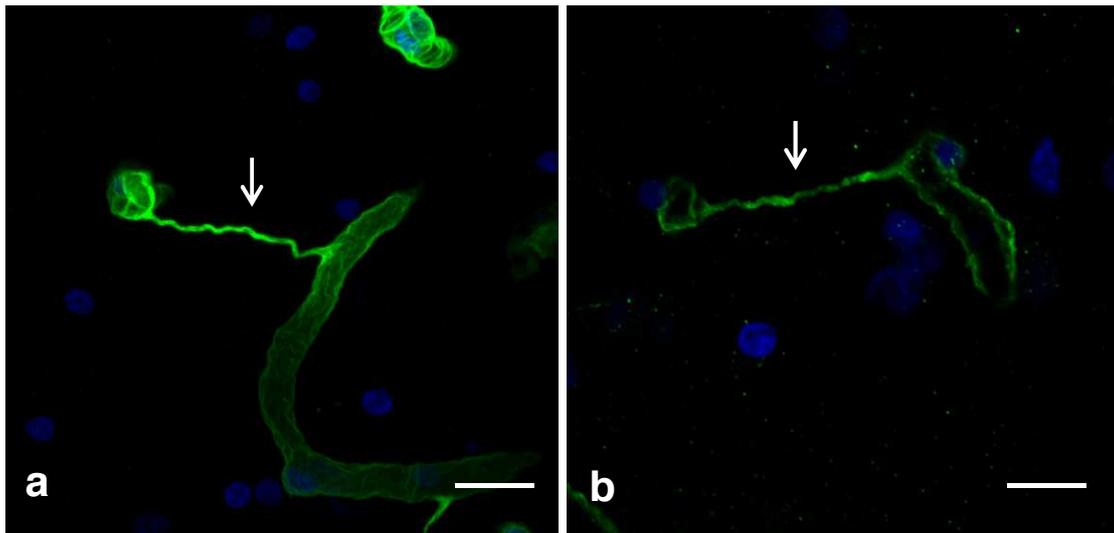


Fig. 19. Imágenes de membrana basal de capilares y de PIVs (flechas) mediante inmunomarcaje con anti-colágeno IV (verde) (a) y anti-laminina (verde) (b). Tinciones nucleares con To-Pro-3 iodine (azul). Barras: 12,20 μm (a) y 13,54 μm (b).

Aunque muchos de los PIVs mostraron un aspecto filiforme, en algunos de ellos se observaron “dilataciones” situadas en diferentes partes de su trayecto. La localización de estas dilataciones era en uno de sus extremos, en ambos extremos o incluso en la parte central del mismo.

Para caracterizar estas dilataciones, y debido a su posible contenido celular, realizamos tinción de núcleos con To-Pro3 iodine así como marcaje con anti-factor von Willebrand. El objetivo era identificar si los PIVs contenían algún tipo celular y, de ser así, si estas podían corresponder a células endoteliales, a pericitos o a otro tipo de células (**figura 20**).

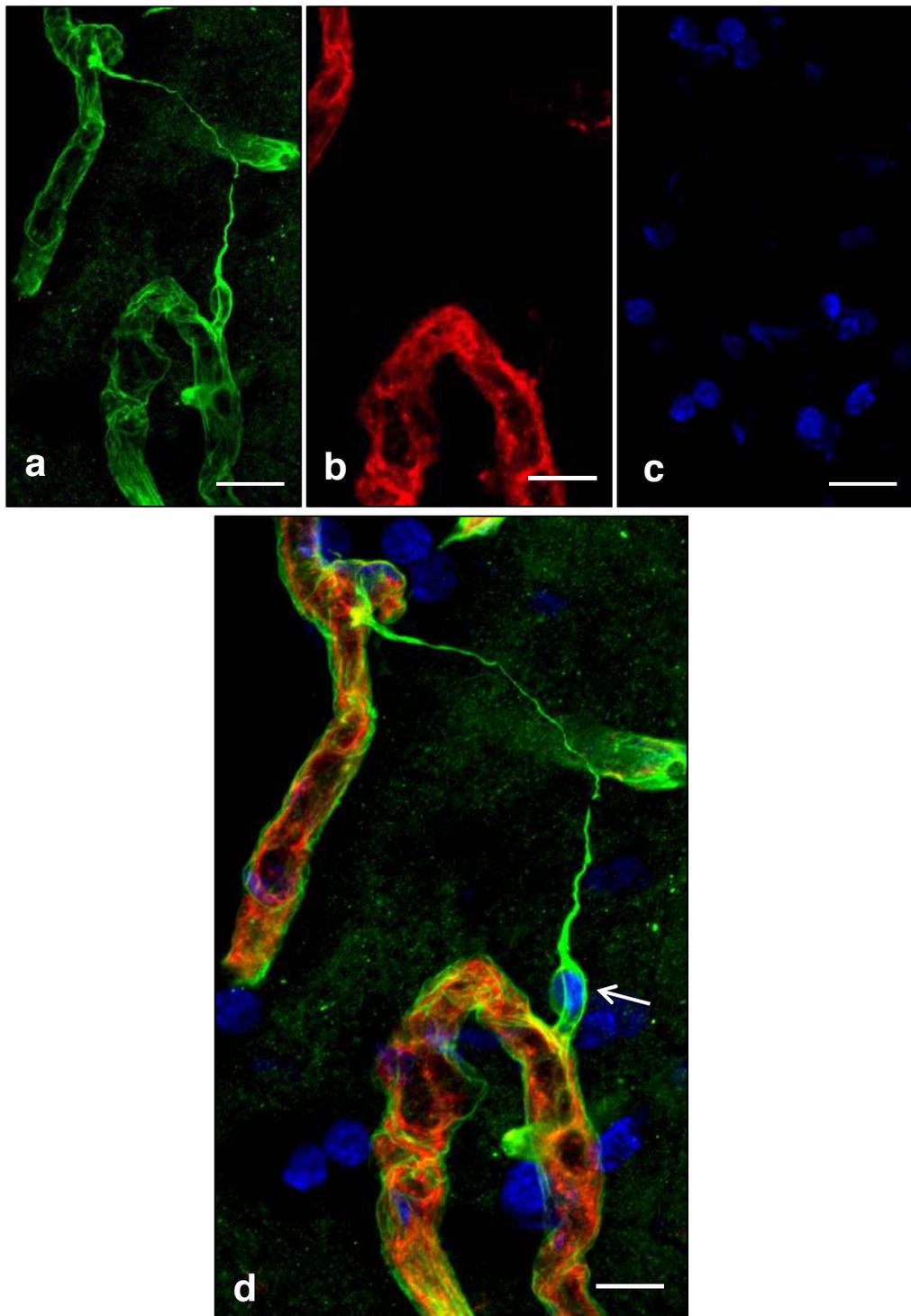


Fig. 20. Imágenes de membrana basal de capilares y de PIVs. Inmunomarcaje anti-colágeno IV (a), anti-factor von Willebrand (b) y tinción nuclear con To-Pro-3 iodine (c). Fusión de las 3 imágenes, donde se observa la relación del PIVs con célula en extremo (flecha) (d). Barras: 17,43 μm (a), 14,53 μm (b), 17,42 μm c y 10, 89 μm (d).

3.3 Posible presencia de células endoteliales, de pericitos y/o de otro tipo de células en los PIVs

El marcaje para ver componentes celulares en relación con los PIVs, ya sea en su interior o en sus proximidades, fue realizado en ambos grupos del estudio.

Los marcajes frente al anti-factor von Willebrand y el contraste con el colorante nuclear To-Pro-3 iodine demostraron que no había marcaje de núcleos celulares en el interior de los PIVs. Sin embargo, en capilares aparentemente colapsados se podían observar prolongaciones de células endoteliales (**figura 21**), mientras que los PIVs no presentaron estas prolongaciones en su interior (**figura 22**).

En relación al lado abluminal de los PIVs, y mediante tinción positiva para To-Pro-3 iodine y negativa para anti-factor von Willebrand, si hemos observado con cierta frecuencia células, las cuáles eran similares a pericitos (células de Rouget) o a un subtipo de estas. En otras ocasiones observamos este tipo de células en uno de los extremos de un PIVs o en la zona central del mismo. Este hecho nos permitió identificar a los PIVs en función de la presencia o no de estas células, asociada a PIVs íntegros y a PIVs rotos.

También hemos observado que la conexión de los PIVs con la pared vascular se realizaba habitualmente en la parte convexa de una curva, o en la proximidad de la misma.

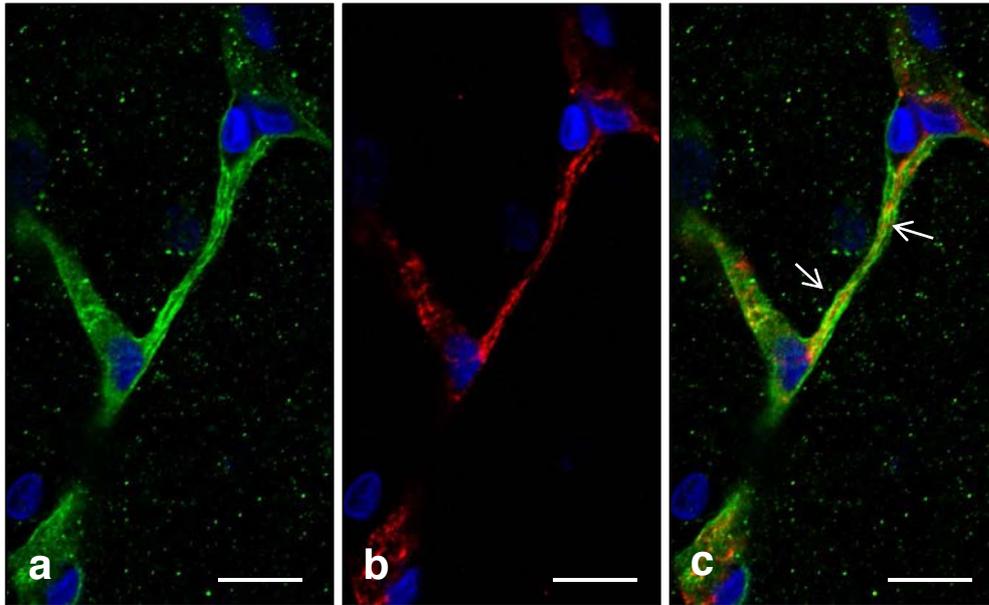


Fig. 21. Capilares observados mediante microscopia láser confocal. Inmunomarcaje anti-colageno IV (verde) (a). Inmunomarcaje anti-factor von Willebrand (rojo) (b). En todas las imágenes hay contraste nuclear con To-Pro-3 iodine (azul). Fusión de las imágenes dónde se observan prolongaciones de células endoteliales en una región del capilar colapsado (flechas) (c). Barra: 12,77 μm .

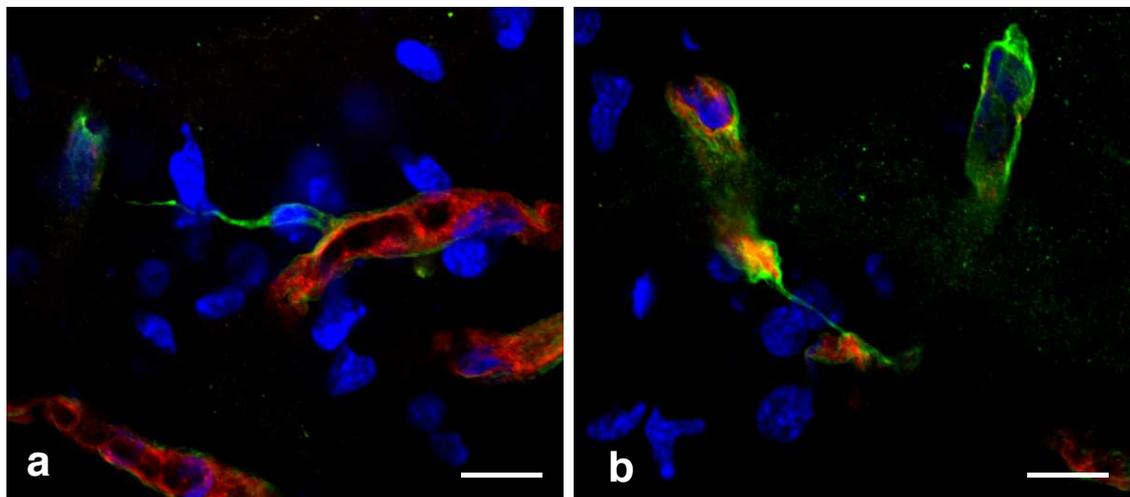


Fig. 22. Inmunomarcajes anti-colágeno IV (verde), anti-factor von Willebrand (rojo) y tinción nuclear con To-Pro-3 iodine (azul). Se observa que los PIVs no tienen marcaje de célula endotelial y tampoco marcaje de células en su interior (a y b). Barras: 11,25 μm (a) y 10,05 μm (b).

3.4. Valoración de los PIVs en el grupo Control

En el grupo Control no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos hemisferios en cuanto a la densidad de PIVs. De forma general los contajes obtenidos en ambos hemisferios fueron muy similares en función del área (p -valor=0.871) (**figura 23 y gráfica 2**), (ver anexo apartado 1.3).

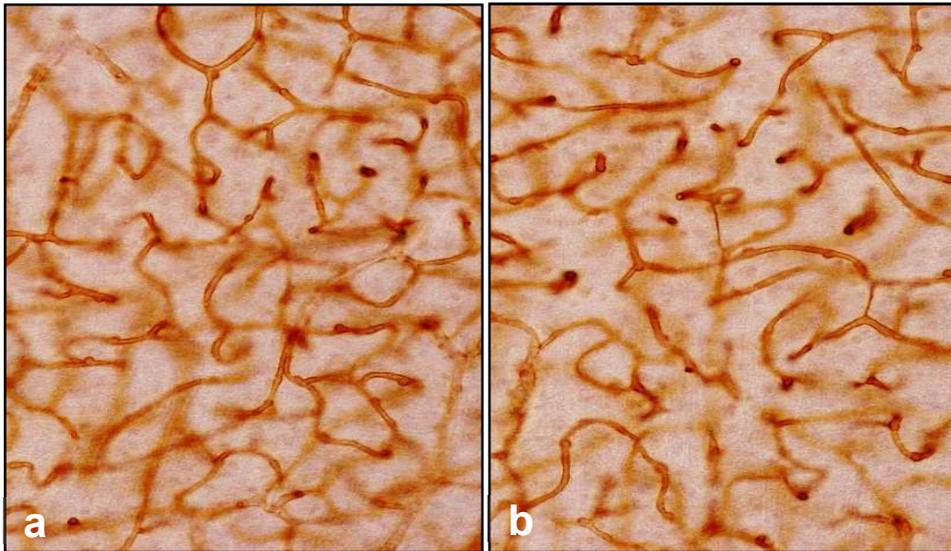
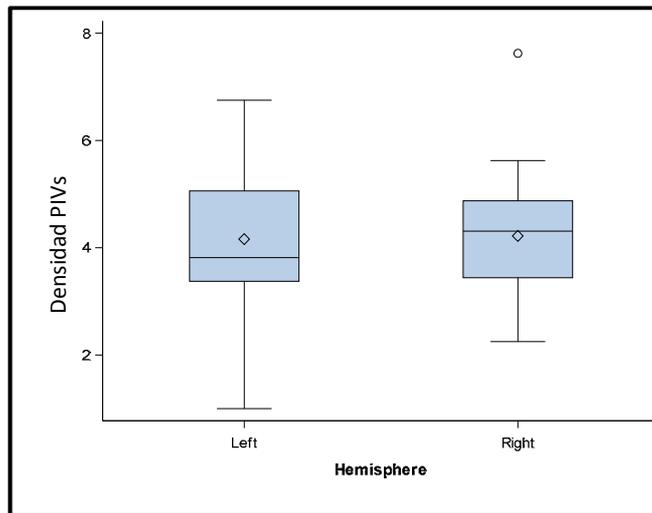


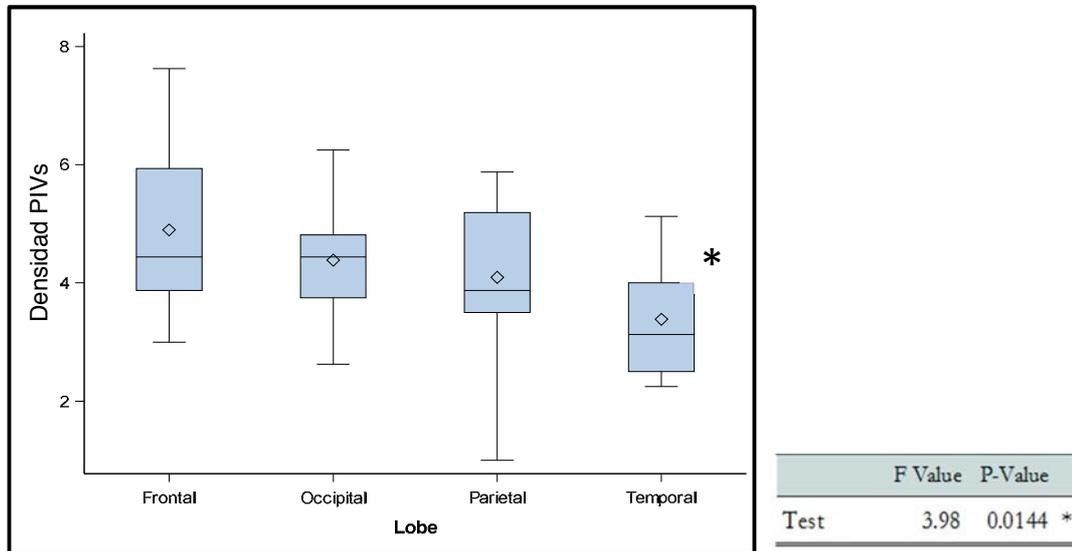
Fig. 23. Marcaje anti-colágeno IV de muestras del grupo Control (100x), hemisferio derecho (a) e izquierdo (b).



Hemisphere	Mean	Std	F Value	P-Value
Left	4.16	1.37	Test	0.03 0.8715
Right	4.22	1.23		

Gráfica 2. No se observan diferencias significativas en la densidad de PIVs entre los hemisferios del grupo Control.

En contraposición, cuando realizamos la comparación de la densidad de PIVs entre los diferentes lóbulos del grupo Control, si se observaron diferencias estadísticamente significativas (p -valor=0.0144) (**gráfica 3**).



Gráfica 3. Se observan diferencias significativas en la densidad de PIVs entre los hemisferios del grupo Control.

El lóbulo que presentó una menor densidad de PIVs respecto a los otros lóbulos, fue el temporal.

Es importante destacar que las muestras que se obtuvieron del lóbulo temporal procedían de la región parahipocampal, siendo esta región diferente en cuanto a su cito y angioarquitectura respecto del resto de regiones estudiadas. En proporción, el lóbulo frontal, seguido del occipital fue el que presentó una mayor densidad de PIVs, aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas (**tabla 5**).

Lobe	Mean	Std
Frontal	4.90	1.42
Occipital	4.39	0.95
Parietal	4.09	1.34
Temporal	3.39	1.02

Tabla 5. Se muestran la media de densidad de PIVs en los lóbulos del grupo Control

Así, podemos concluir que la densidad de PIVs fue similar en la corteza cerebral de las muestras obtenidas de los lóbulos que están estructurados en 6 capas (isocórtex) mientras que la región del parahipocampo, de estructura transicional, presenta una menor densidad de PIVs.

El número de PIVs en las diferentes áreas estudiadas de la corteza cerebral del grupo control se muestra homogéneo, a excepción de las áreas temporales.

3.5 Valoración de los PIVs en el grupo de TCE

La densidad de los PIVs observada en el grupo TCE no mostró diferencias estadísticamente significativas entre ambos hemisferios (p -valor=0.287). En nuestro estudio, las lesiones traumáticas primarias se presentaron con afectación de ambos hemisferios en la mitad de los casos (**figura 24 y gráfica 4**) (ver anexo apartado 2.3).

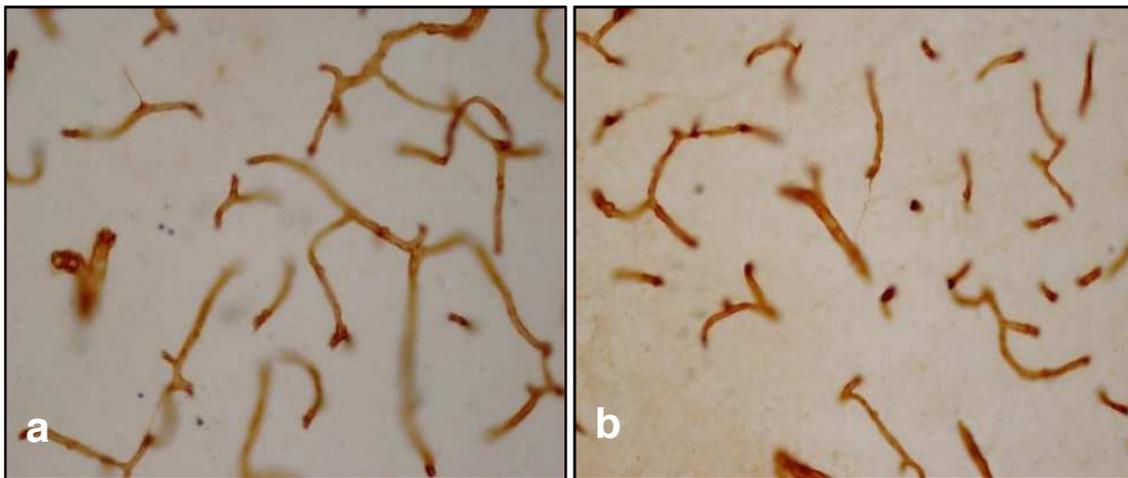
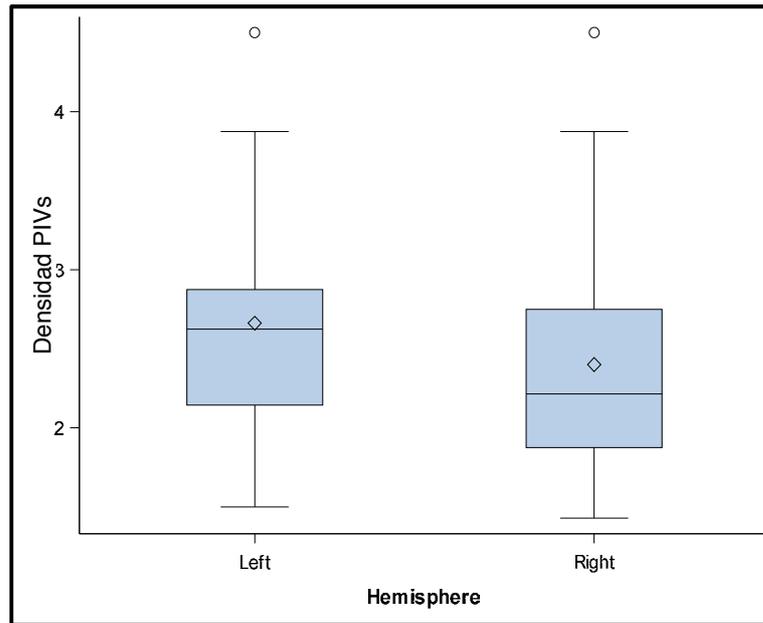


Fig. 24. Marcaje anti-colágeno IV de muestras del grupo TCE (200x). Hemisferio izquierdo (a) y hemisferio derecho (b).



Hemisphere	Mean	Std	F Value	P-Value
Left	2.66	0.80	Test	1.17 0.2875
Right	2.40	0.81		

Gráfica 4. No se observan diferencias significativas en la densidad de PIVs entre los hemisferios en el grupo TCE.

Cuando realizamos el estudio de la densidad de los PIVs por lóbulos, tampoco se mostraron diferencias estadísticamente significativas (p -valor=0.183) entre ellos, presentando una menor densidad de PIVs los lóbulos afectados por la lesión primaria, que en nuestro estudio fueron las regiones temporal y frontal, seguidas por el lóbulo parietal. El lóbulo occipital fue el que presentó menos lesiones primarias (**figura 25, gráfica 5**).

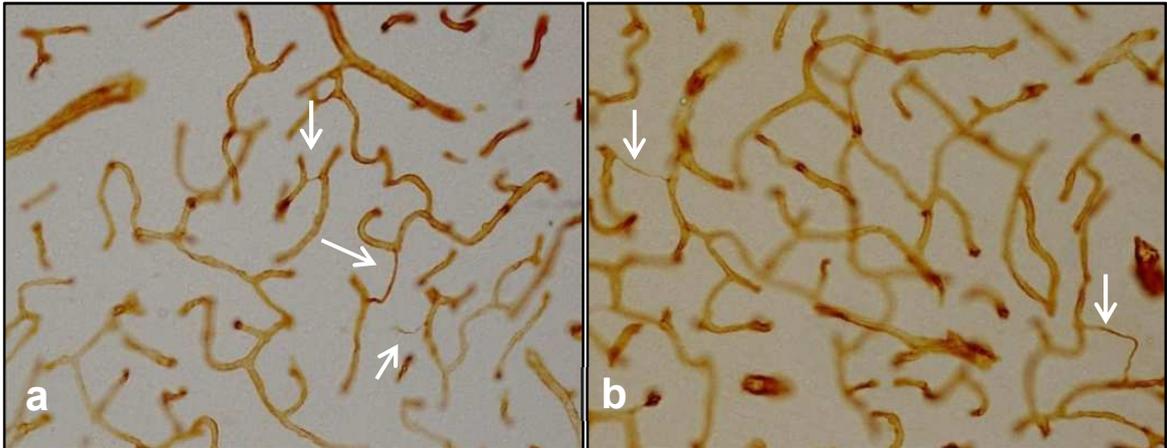
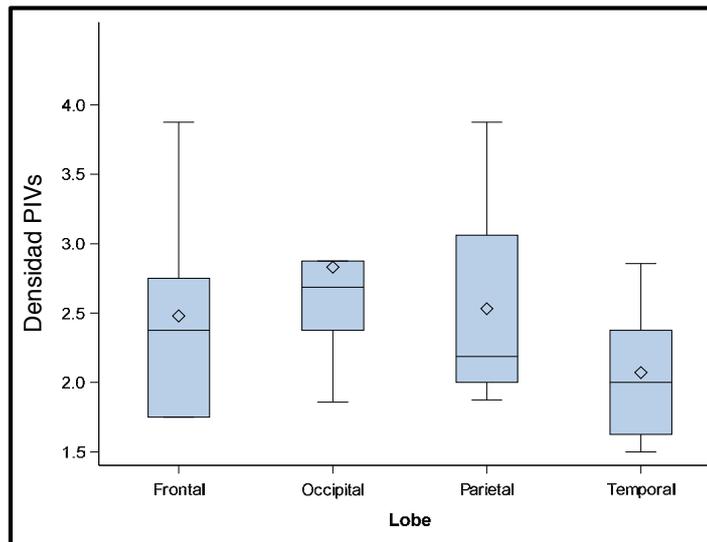


Fig. 25. Marcaje anti-colágeno IV (200x). PIVs en el grupo TCE: en región parietal (a) y en región occipital (b).



Lobe	Mean	Std	F Value P-Value	
Frontal	2.50	0.78	Test	1.72 0.1833
Occipital	2.83	0.95		
Parietal	2.57	0.85		
Temporal	2.10	0.50		

Gráfica 5. No se muestran diferencias estadísticamente significativas en la densidad de PIVs entre lóbulos en el grupo TCE.

3.6. Comparación de los PIVs entre el grupo control y el grupo TCE

En los dos grupos del estudio se demostró la presencia de PIVs, aunque se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en la densidad de los PIVs (p -valor <0.0001), siendo mayor en el grupo Control (**figura 26 y gráfica 6**) (ver anexo apartado 3.4).

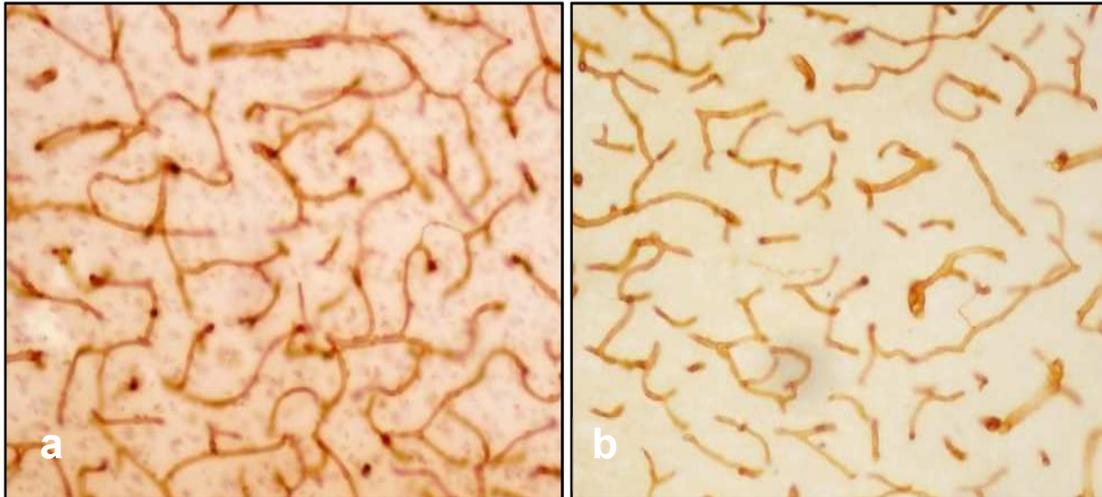
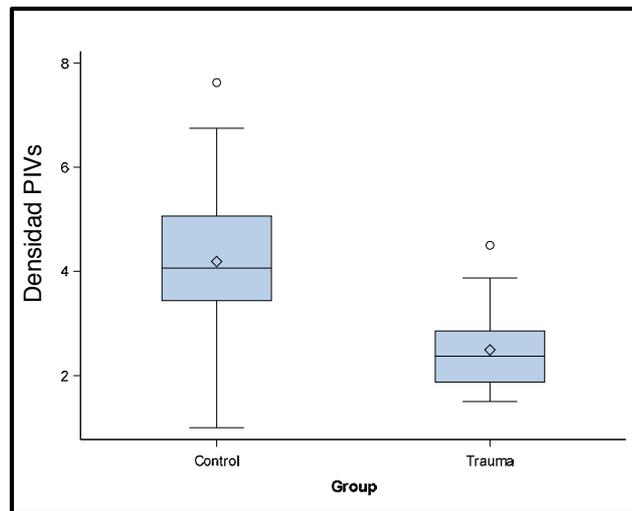


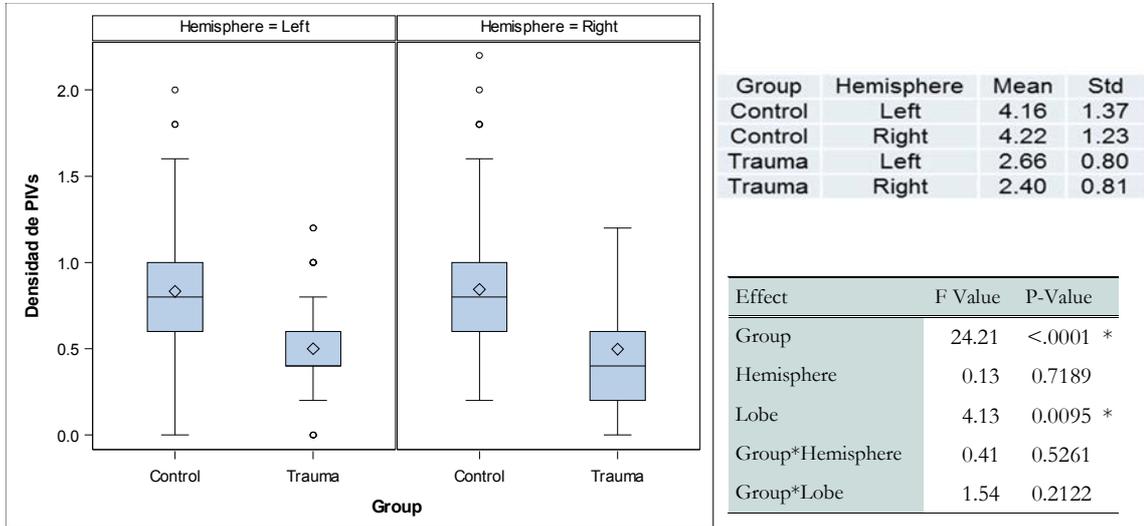
Fig. 26. Imágenes con marcaje anti-colágeno IV, (100x). Se observan diferencias en la densidad capilar y en la densidad de PIVs entre el grupo Control (C13) (a) y el grupo TCE (T4) (b).



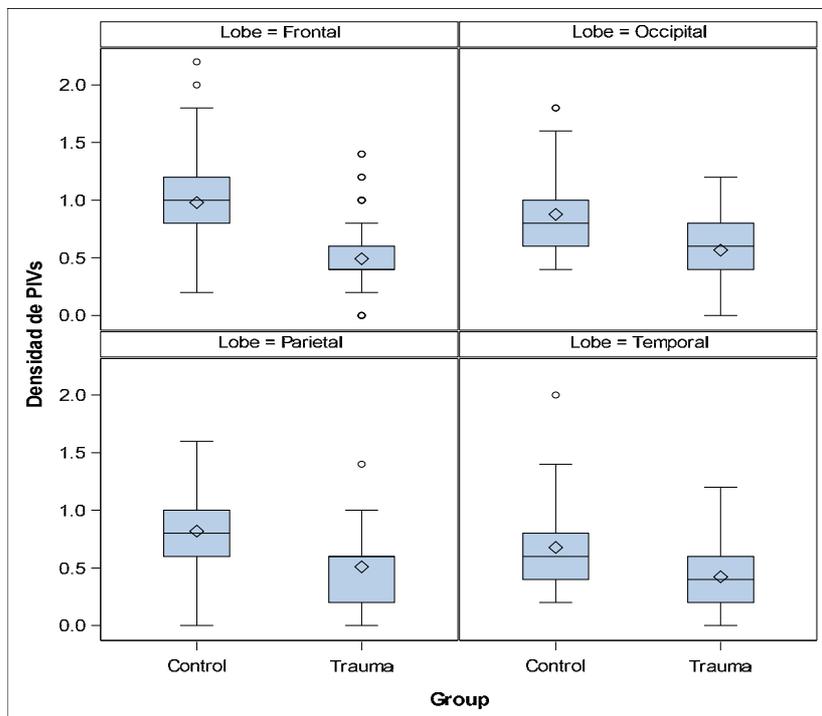
Group	Mean	Std	F Value	P-Value
Control	4.19	1.29	Test	24.16 <.0001 *
Trauma	2.51	0.81		
Total	3.44	1.38		

Gráfica 6. Se muestran las diferencias estadísticamente significativas en la densidad de PIVs entre el grupo Control y el grupo TCE.

Las diferencias entre los dos grupos se mantienen en los dos hemisferios y también según el lóbulo (**gráficas 7 y 8**).



Gráfica 7. Se observa que las diferencias se mantienen cuando se consideran los dos hemisferios en los dos grupos.



Gráfica 8. Se demuestran diferencias si comparamos por lóbulos entre los dos grupos ($p < 0.0095$)

En el estudio obtuvimos que las mayores diferencias observadas en los lóbulos frontal, parietal y temporal del grupo TCE, respecto al grupo Control, se correspondían con los lóbulos que sufrieron más lesiones primarias, es decir con más alteraciones estructurales del tejido cerebral de los pacientes (p-valor=0.0095).

Para valorar si la edad podía ser un factor a tener en cuenta cuando se realizaba el recuento de los PIVs, se realizó un estudio ajustado a edad. Este estudio no demostró una relación estadísticamente significativa entre el número de PIVs y la edad (p-valor=0.974) en ninguno de los dos grupos de estudio (**tabla 6**).

Effect	F Value	P-Value	
Group	19.20	0.0001	*
Hemisphere	0.00	0.9514	
Lobe	5.26	0.0026	*
Age	0.00	0.9741	
Group*Hemisphere	0.04	0.834	
Group*Lobe	1.09	0.3585	*

Tabla 6. La diferencia de edad no es estadísticamente significativa entre ambos grupos de estudio.

4. CLASIFICACIÓN DE LOS PIVs

De forma cualitativa se puede establecer una clasificación según el grosor de los PIVs. Así realizamos una primera clasificación de los PIVs en delgados o tipo I y en gruesos o tipo II (**figura 27**). Esta clasificación fue realizada en el grupo Control, ya que al obtener un mayor número de PIVs, fue más fácil clasificarlos, si bien también lo observamos en el grupo TCE.

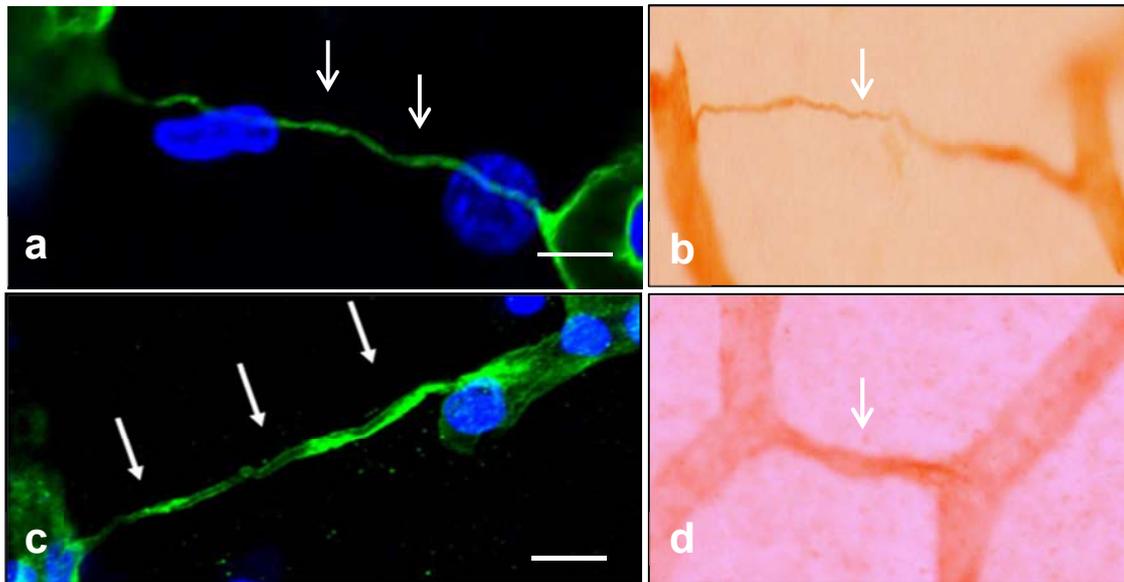


Fig. 27. Imágenes de PIVs mediante inmunomarcajes anti-colágeno IV (a, b y d) y anti-laminina (c). PIVs delgados, tipo I (a y b) y PIVs gruesos, tipo II (c y d). Microscopio óptico (b y d) (400x). Microscopio láser confocal (a y c). Barras: 7,89 μm (a) y 6,58 μm (c).

Esta clasificación inicial que asumimos nos dejaba morfologías que no podíamos incluir en la clasificación, como eran PIVs rotos (con soluciones de continuidad y desestructurados), así como la presencia de dilataciones con células en diferentes localizaciones de los mismos (**figuras 28, 29 y 30**).

Por estos motivos optamos por realizar una clasificación de los PIVs que tuviera en cuenta estas observaciones. La clasificación es:

Tipo A: PIVs sin células

Tipo B: PIVs con una célula en uno de sus extremos

Tipo C: PIVs con dos células, una en cada extremo

Tipo D: PIVs con una célula en la zona central

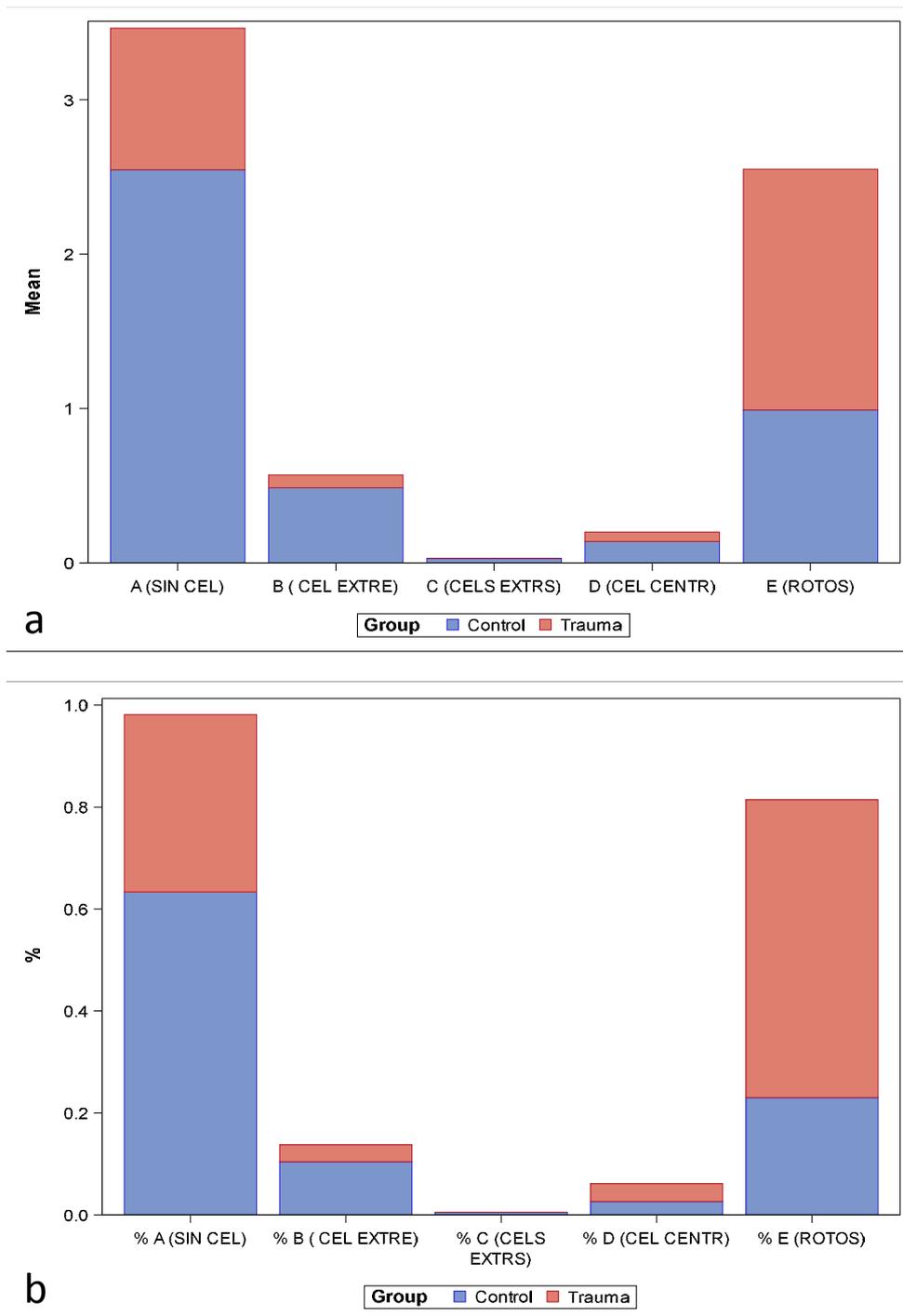
Tipo E: PIVs rotos (desestructurados)

En los siguientes gráficos mostramos los resultados de esta clasificación, la cual fue realizada inicialmente en muestras del grupo Control y posteriormente en el grupo TCE, para comprobar si también era aplicable.

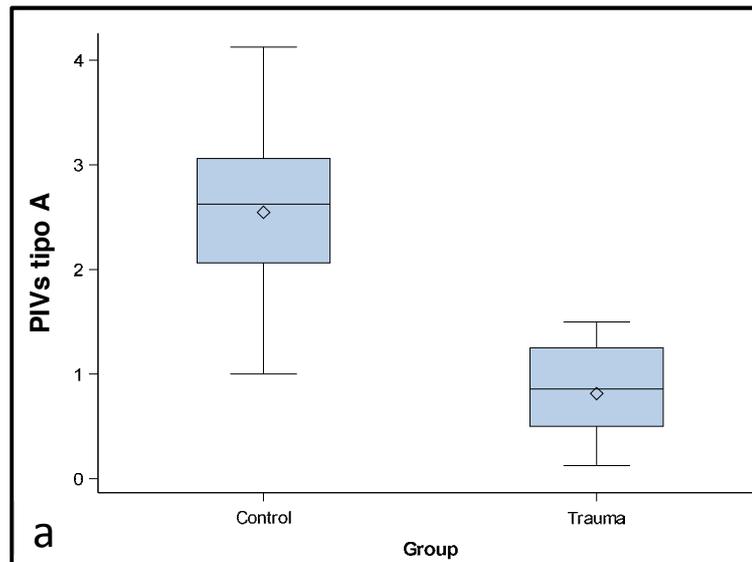
Así, los resultados obtenidos de la aplicación de esta clasificación demostraron que en el grupo Control eran más abundantes los PIVs del tipo A (63%) mientras que en el grupo TCE, este tipo representaba 35%. En contraposición, el tipo mayoritario en el grupo TCE fue el de los PIVs del grupo E, rotos (56%), frente a un 23% de PIVs del grupo E en el grupo Control.

En el grupo Control, la media de conteo del número de PIVs del tipo A fue de 2 ó 3 PIVs por campo, mientras que la media del número de PIVs de los tipos B, C, D y E fue de 0 ó 1 por campo. En cambio en el grupo TCE la media de conteo de PIVs tipo A, B, C y D fue de 0 ó 1, y del tipo E fue de 1 ó 2.

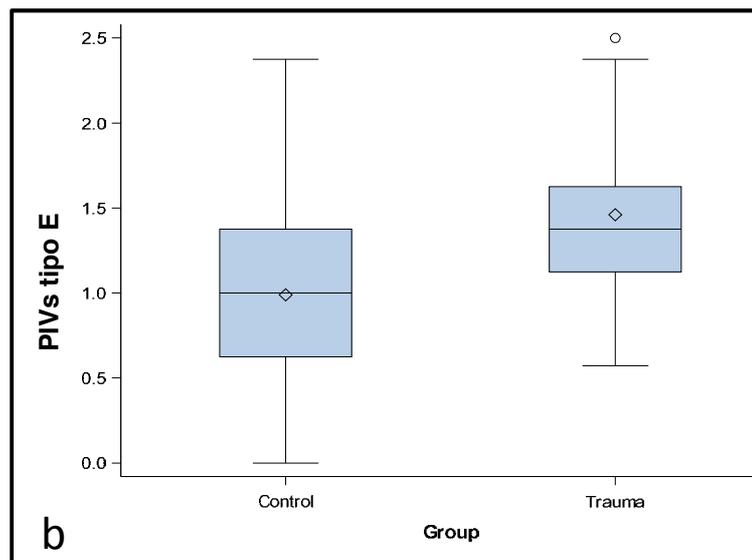
Respecto a los PIVs del tipo E (rotos), hemos observado diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos ($p=0.027$): en el grupo de TCE hubo mayor porcentaje de PIVs de este tipo por campo estudiado (**gráficas 9 y 10**), (ver anexo apartados 5 y 6).



Gráfica 9. Media (a) y porcentaje (b) del número de PIVs en función de su clasificación. El porcentaje de PIVs del tipo A en el grupo Control era mayor, con significación estadística ($p < 0.0001$), y también había significación estadística en la media ($p < 0.0001$). El porcentaje de PIVs de tipo E fue significativamente más alto en el grupo TCE ($p < 0.0001$), lo cual también se observó para la media ($p = 0.017$).



Group	Mean	Std	F-Value	P-Value
Control	2.55	0.69	Test	76.23 <.0001 *
Trauma	0.90	0.45		
Total	1.81	1.01		



Group	Mean	Std	F-Value	P-Value
Control	0.99	0.53	Test	5.04 0.0277 *
Trauma	1.41	0.46		
Total	1.18	0.54		

Gráfica 10. Diferencias de densidad de PIVs entre ambos grupos, según la clasificación. El grupo Control presenta mayor densidad de PIVs tipo A (a) y el grupo TCE presenta mayor densidad de PIVs tipo E (b).

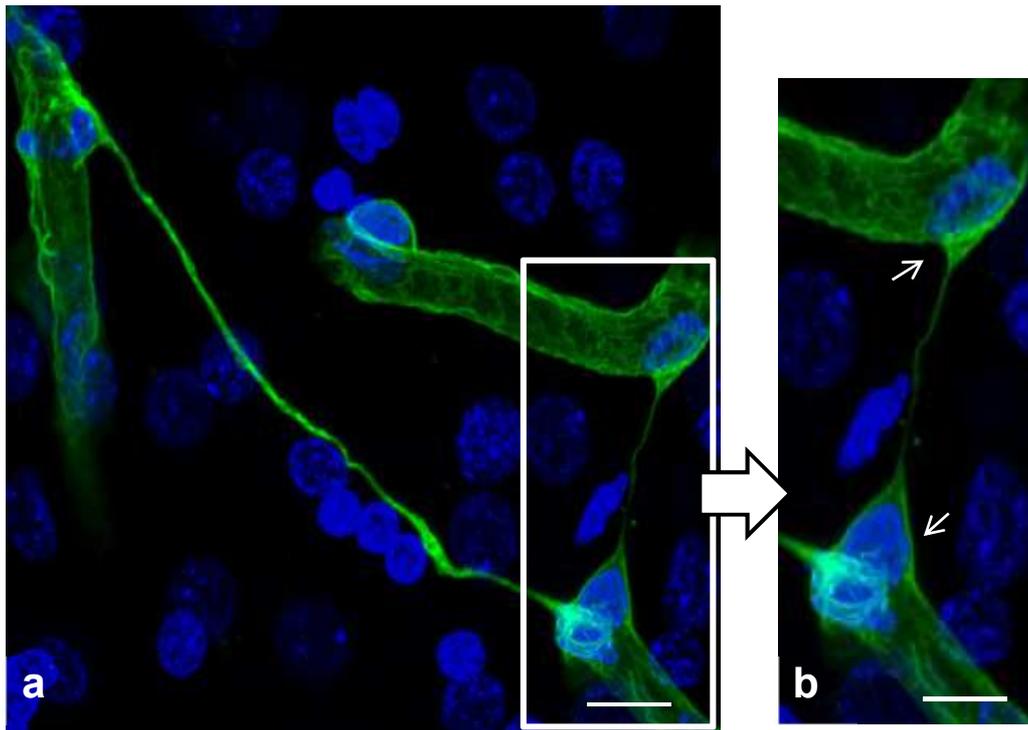


Fig. 28. Imágenes de PIVs mediante inmunomarcaje anti-colágeno IV (verde) y tinción nuclear con To-Pro-3 iodine (azul). PIVs (a) y detalle (b) dónde se observan células en ambos extremos (b). Barras: 14,44 μm (a) y 11,07 μm (b).

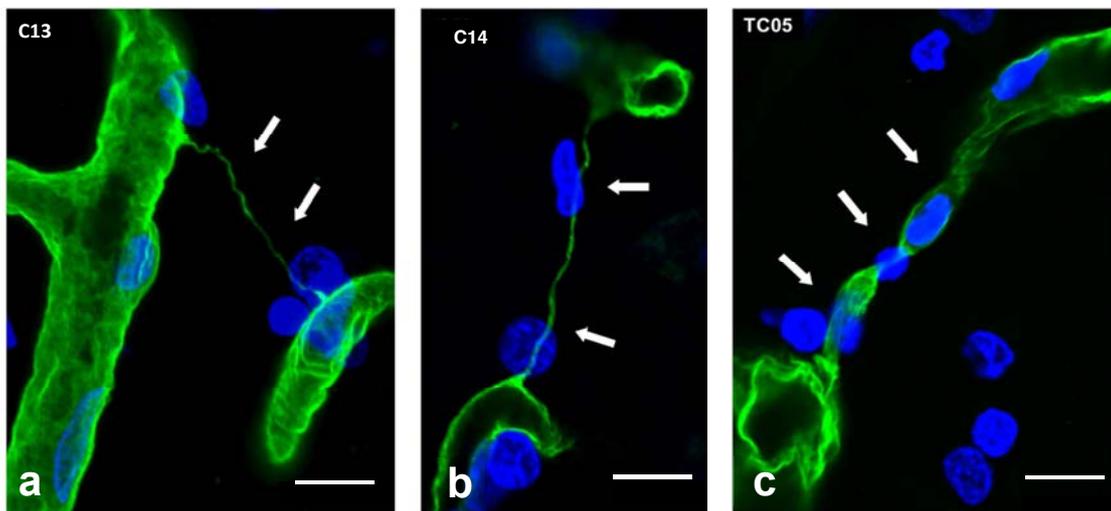


Fig. 29. Imágenes de PIVs mediante inmunomarcaje anti-colágeno IV (verde) y tinción nuclear con To-Ppro-3 iodine (azul). Visualización con microscopio láser confocal. PIVs en muestras del grupo Control (a y b) y del grupo TCE (c). Barras: 9,13 μm (a), 8,97 μm (b) y 9,20 μm (c).

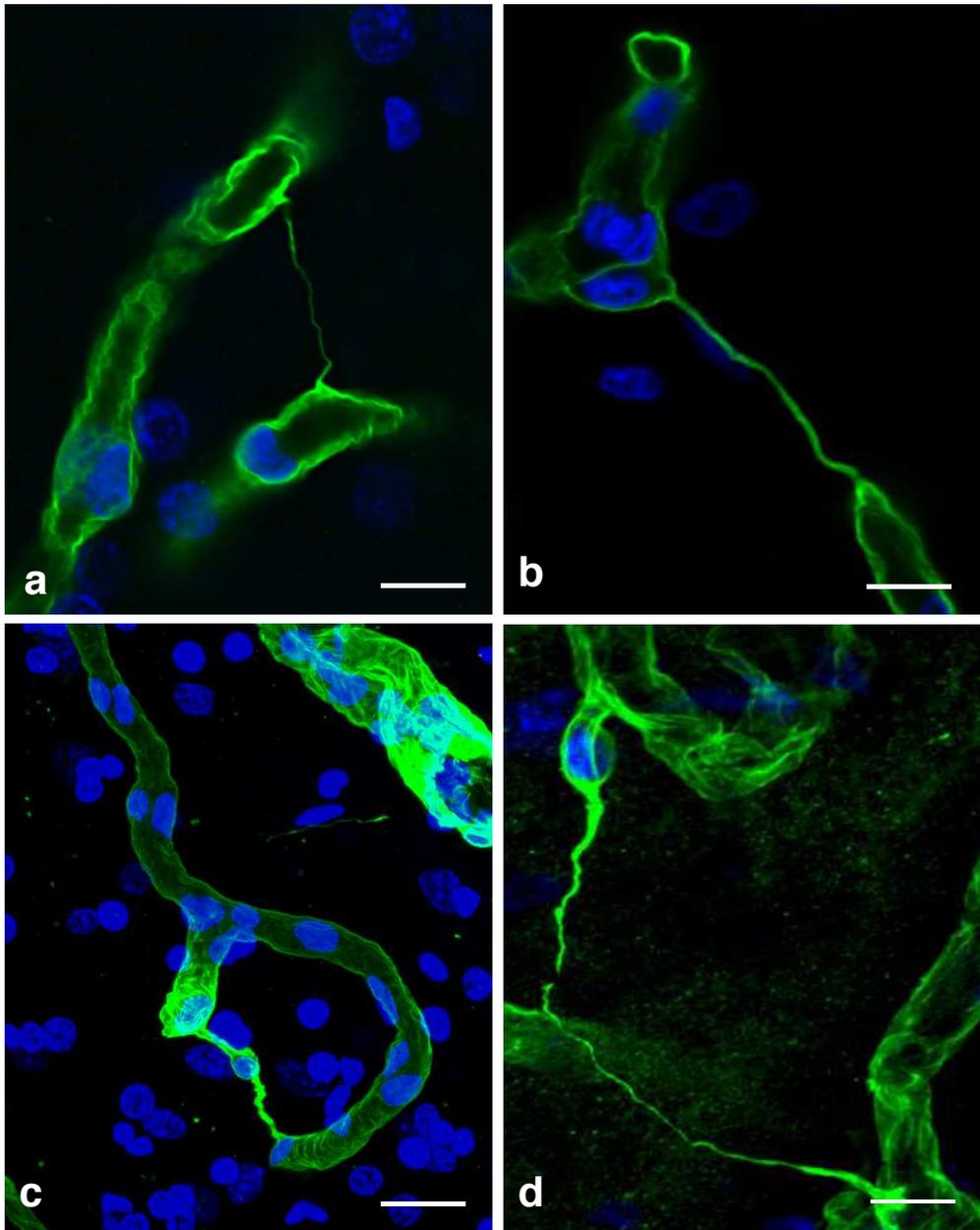
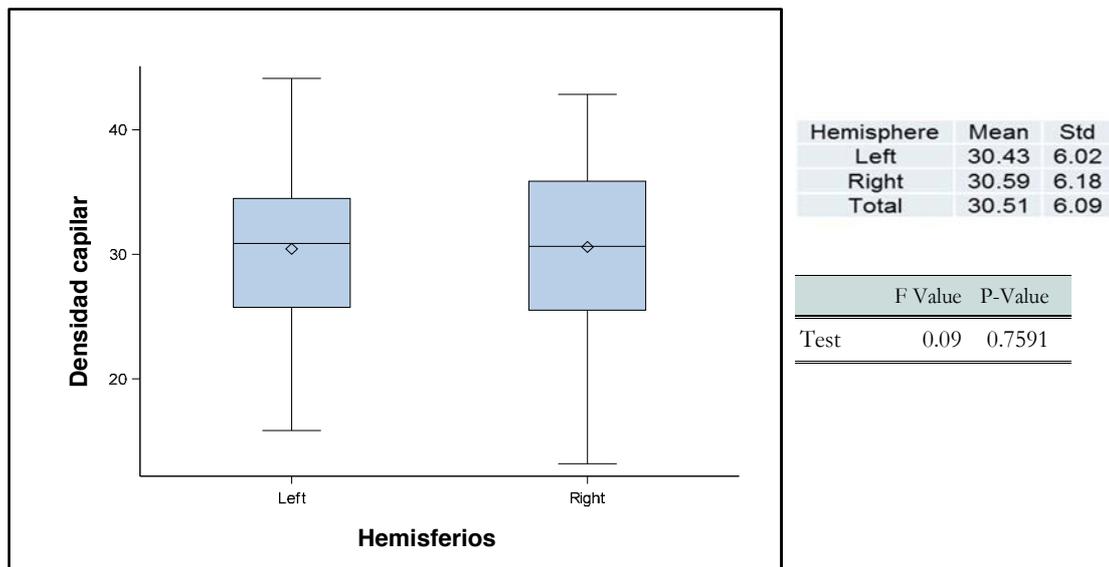


Fig. 30. Imágenes de PIVs mediante inmunomarcaje anti-colágeno IV (verde) y tinción nuclear con To-Pro-3 iodine (azul). Visualización con microscopio láser confocal. PIVs sin células (a), PIVs con célula en un extremo (b), PIVs con célula central (c) y PIVs rotos (d). Barras: 19,25 μm (a), 21,38 μm (b), 27,68 μm (c) y 18,95 μm (d).

5. DENSIDAD CAPILAR Y LACUNARIDAD EN EL GRUPO CONTROL

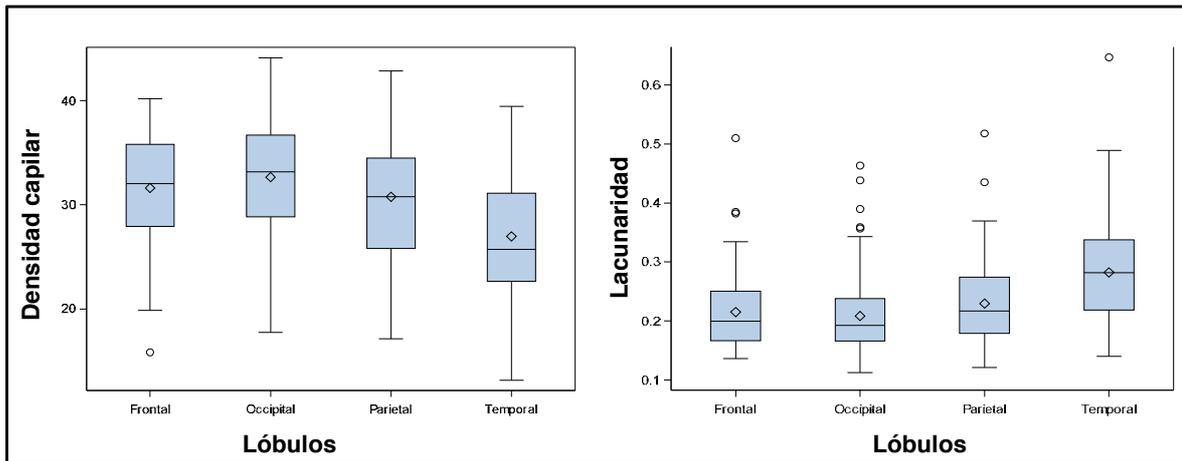
Mediante el programa Angiotool's se cuantificó la densidad vascular y la lacunaridad. Hemos considerado la variable "lacunaridad" como el espacio NO ocupado por vasos sanguíneos, siendo esta una medida indirecta de la organización espacial del lecho vascular.

En las muestras analizadas del grupo Control no hemos observado diferencias estadísticamente significativas entre los hemisferios en cuanto a densidad capilar (p-valor=0.759) (**gráfica 11**), ni a lacunaridad (p-valor=0.953) (ver anexo apartados 1.1 y 1.2).



Gráfica 11. Se demuestra que no hay diferencias en la densidad capilar entre ambos hemisferios en el grupo Control.

El estudio comparativo entre lóbulos mostró diferencias estadísticamente significativas de la densidad capilar y de la lacunaridad, presentando el mismo comportamiento que en los PIVs, es decir, con diferencias en el lóbulo temporal (región parahipocampal) *versus* el resto de lóbulos. De ello se desprende una propuesta: a mayor densidad capilar, mayor número de PIVs (**gráfica 12**).



	F Value	P-Value
Test	26.53	<.0001 *

	F Value	P-Value
Test	25.67	<.0001 *

Gráfica 12. Comportamiento inversamente proporcional observado entre la lacunaridad y la densidad capilar del grupo Control.

El lóbulo temporal del grupo Control mostró una menor densidad capilar (p -valor<0.001) y una mayor lacunaridad que el resto de lóbulos, mientras que no hubo diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon entre sí los otros lóbulos (p -valor>0.05) (**figura 31**). Entre el lóbulo frontal y los lóbulos occipital y parietal las diferencias no fueron significativas (p -valor=0.414 y 0.607 respectivamente) (**tabla 7**).

Lobe	Lobe	Mean difference	t Value	P-Value	
Frontal	Occipital	-1.0477	-1.54	0.4147	
Frontal	Parietal	0.8376	1.23	0.6076	
Frontal	Temporal	4.6403	6.82	<.0001	*
Occipital	Parietal	1.8853	2.77	0.0298	*
Occipital	Temporal	5.6881	8.36	<.0001	*
Parietal	Temporal	3.8027	5.59	<.0001	*

Tabla 7. Comparación de la densidad capilar entre los lóbulos del grupo Control.

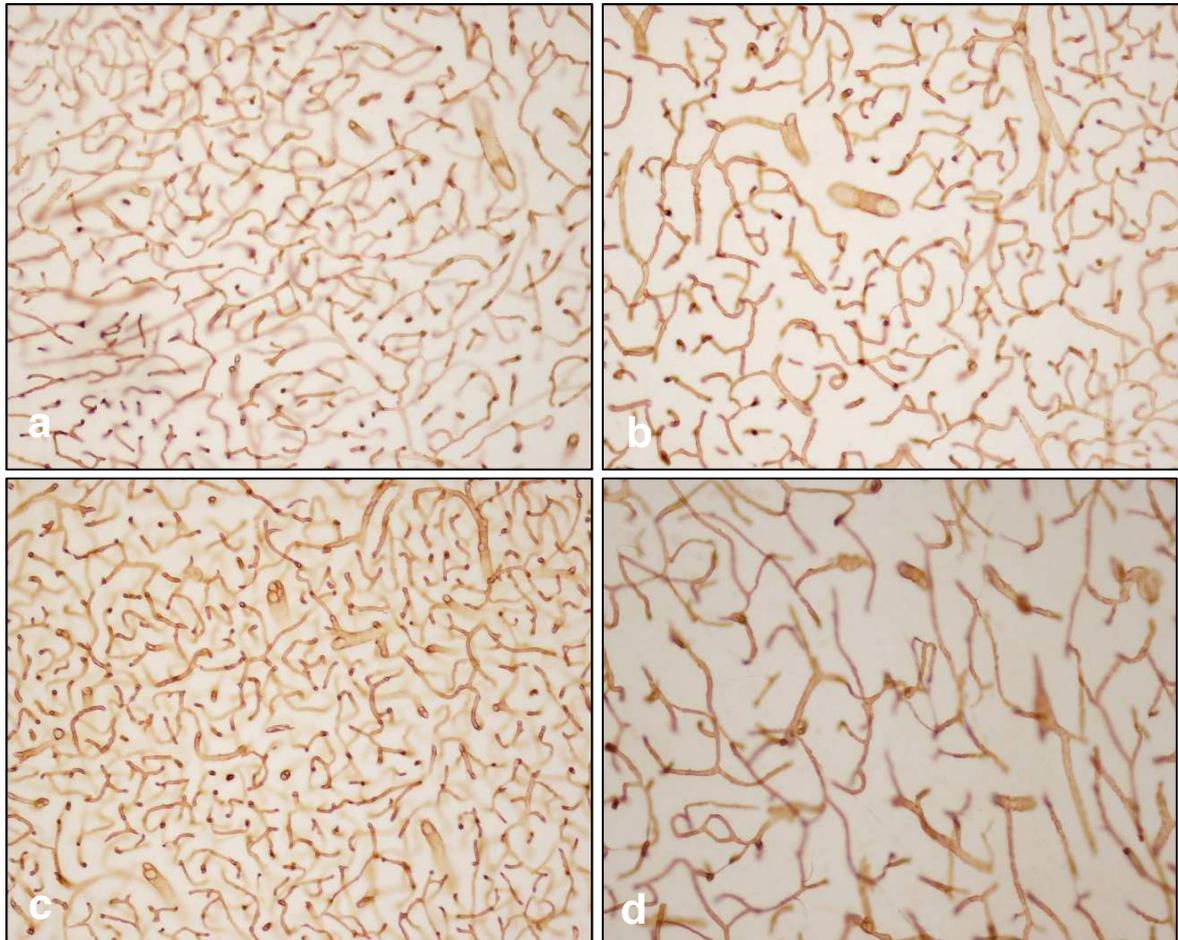


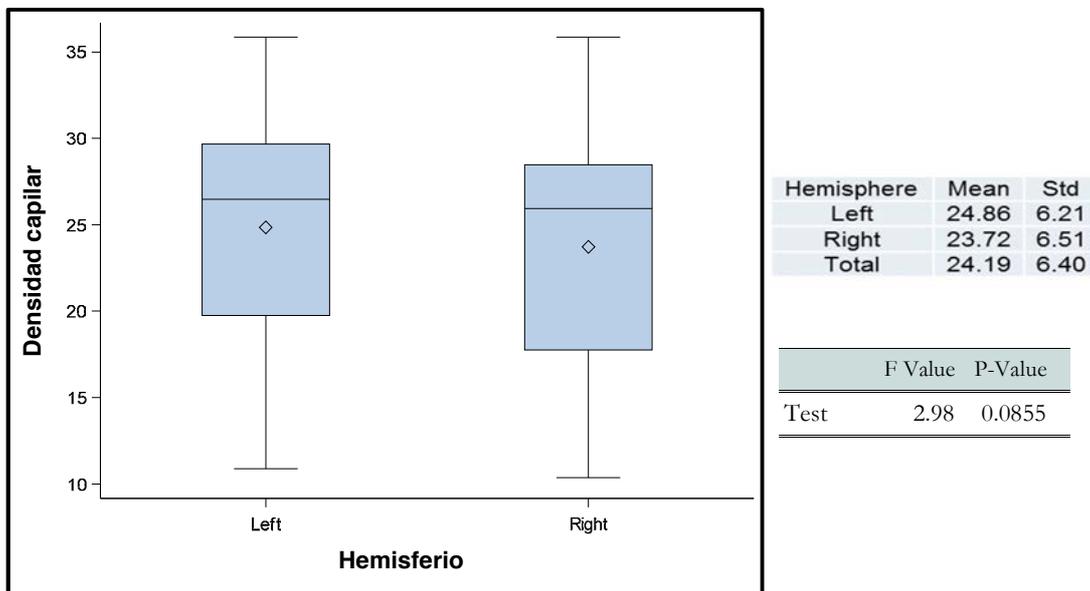
Fig. 31. Imágenes de microscopía óptica de muestras del grupo Control marcadas con anti-colágeno IV (100x). Se observan diferencias en la densidad capilar entre los diferentes lóbulos. Región frontal (a), región parietal (b), región occipital (c) y región temporal (d).

6. DENSIDAD CAPILAR Y LACUNARIDAD EN EL GRUPO TCE

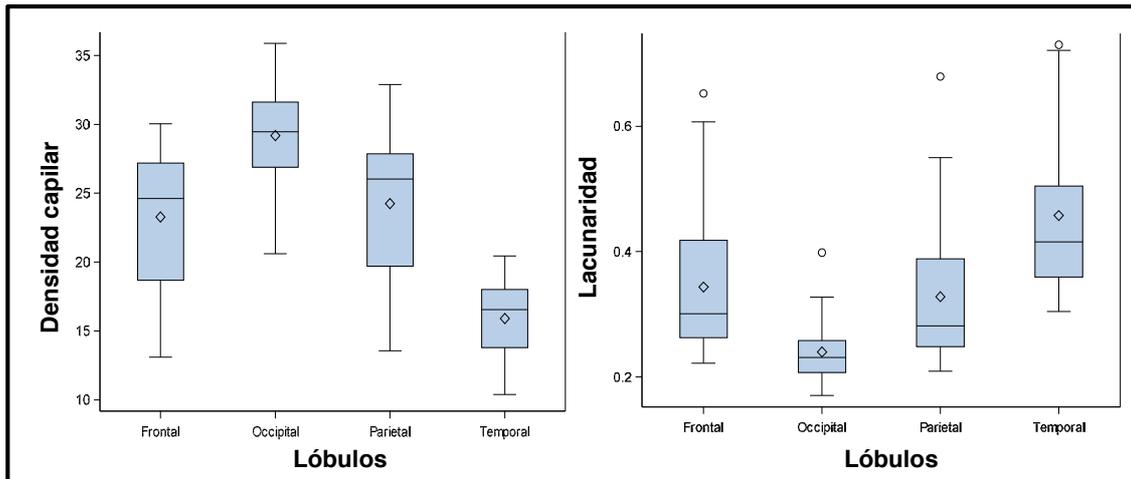
En este grupo, los resultados obtenidos respecto a la densidad capilar y a la lacunaridad entre ambos hemisferios no mostraron significación estadística (p-valor=0.085 y p-valor=0.106 respectivamente) (**gráfica 13**) (ver anexo apartados 2.1 y 2.2).

Un hecho que ponemos de manifiesto en este estudio es que la densidad capilar puede verse afectada por las lesiones primarias, pero también por el edema cerebral que se presentó en todos los individuos del grupo TCE. En este sentido es posible que el grado de afectación de ambos hemisferios fuera mayor y por eso presentaron una menor densidad capilar, con un aumento importante en la lacunaridad. Sin embargo, si hubo diferencias significativas entre los diferentes lóbulos (p-valor<0.0001) (**gráfica 14**).

El comportamiento respecto a los PIVs fue similar, es decir, no obtuvimos diferencias significativas en la densidad de PIVs entre hemisferios.



Gráfica 13. No se muestran diferencias de densidad capilar entre ambos hemisferios en el grupo TCE.



	F Value	P-Value
T-Test	110.27	<.0001 *

	F Value	P-Value
T-Test	55.98	<.0001 *

Gráfica 14. Comportamiento inversamente proporcional observado entre la lacunaridad y la densidad capilar del grupo TCE.

En el estudio comparativo entre los lóbulos observamos que se mantienen las diferencias estadísticamente significativas entre el lóbulo temporal y el resto de lóbulos, presentando este lóbulo una menor densidad capilar (p-valor<0.0001). Destacamos que el lóbulo occipital fue el que presentó una mayor densidad capilar respecto a los otros lóbulos estudiados (**figura 32**), teniendo en cuenta que los lóbulos más afectados en el grupo TCE fueron los lóbulos frontal, parietal y temporal.

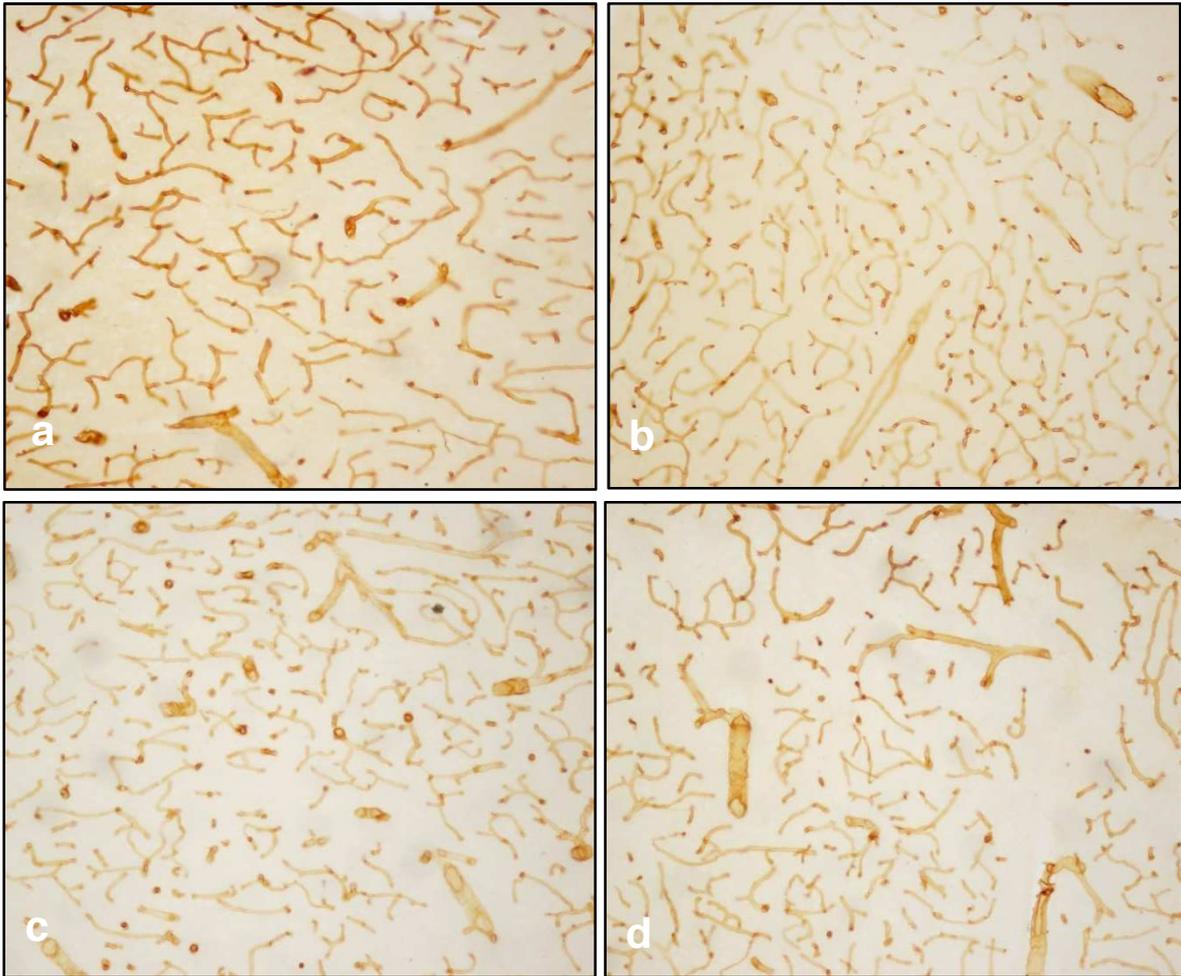


Fig. 32. Imágenes de microscopía óptica de muestras del grupo TCE mediante marcaje inmunohistoquímico anti-colágeno IV (100x). Se observan las diferencias en la densidad capilar entre los diferentes lóbulos. Región frontal (a), región occipital (b), región parietal (c) y región temporal (d).

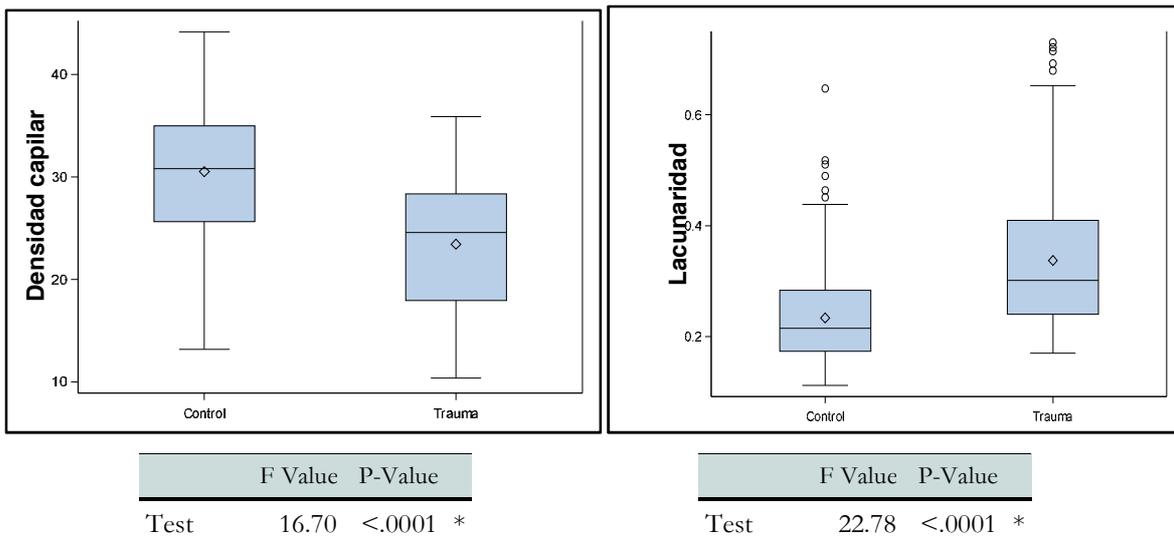
7. COMPARACIÓN DENSIDAD CAPILAR Y LACUNARIDAD ENTRE AMBOS GRUPOS

Las diferencias de densidad capilar y lacunaridad entre ambos grupos fueron evidentes. Respecto a la densidad capilar, el grupo Control presentó una mayor densidad, con significación estadística ($p\text{-valor}<0.0001$), mientras que la lacunaridad fue mayor en el grupo TCE ($p\text{-valor}<0.0001$) (**gráfica 15**) (ver anexo apartado 3).

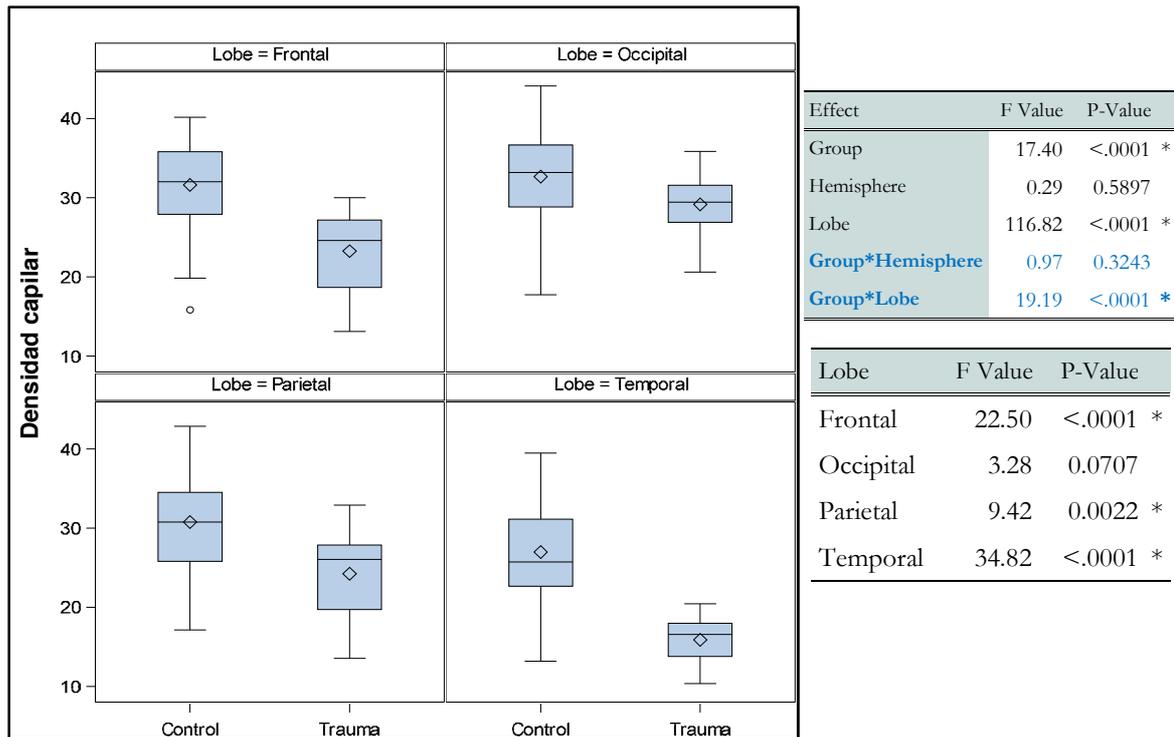
Estas diferencias se mantuvieron entre los dos hemisferios de ambos grupos ($p\text{-valor}=0.324$), pero no fue así en la comparación entre lóbulos, donde algunos lóbulos presentaron diferencias muy marcadas. Así, las mayores diferencias se observaron a nivel de los lóbulos frontal, parietal y temporal ($p\text{-valor}<0.0001$) (**gráfica 16**).

El hecho de que no existieran diferencias significativas en el lóbulo occipital cuando lo comparamos entre grupos, puede deberse a que fue el que presentó menos lesiones en el grupo TCE.

De estos resultados podemos concluir que la lacunaridad se comporta de forma inversamente proporcional a la densidad capilar, manteniendo las mismas diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.



Gráfica 15. Diferencias en la densidad capilar y en la lacunaridad entre ambos grupos.



Gráfica 16. Existen diferencias entre los lóbulos frontal, parietal y temporal de ambos grupos.

Cuando realizamos el análisis ajustado por edad para valorar si esta variable influía en los resultados obtenidos comparativos, comprobamos que no había relación de este parámetro respecto a la densidad capilar y a la lacunaridad (p-valor=0.5876) (**tabla 8**).

Effect	F Value	P-Value	
Group	12.45	0.0004	*
Hemisphere	0.28	0.5940	
Lobe	116.89	<.0001	*
Age	0.29	0.5876	
Group*Hemisphere	0.96	0.3273	
Group*Lobe	19.23	<.0001	*

Tabla 8. No existe relación entre las diferencias observadas entre ambos grupos y la edad.

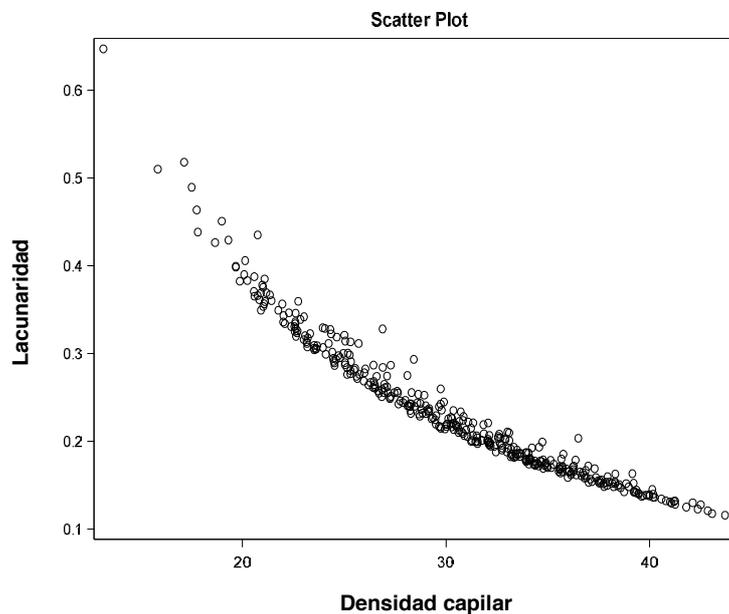
8. RELACIÓN ENTRE DENSIDAD CAPILAR, PIVs Y LACUNARIDAD

Una vez realizado el estudio estadístico de los PIVs y de la densidad capilar en los dos grupos, hemos considerado oportuno realizar un análisis de correlaciones con el objetivo de valorar si existe o no una relación entre los diferentes parámetros estudiados; y de ser así, cuál sería su significado en este estudio.

8.1. Grupo Control:

a. Densidad capilar *versus* lacunaridad

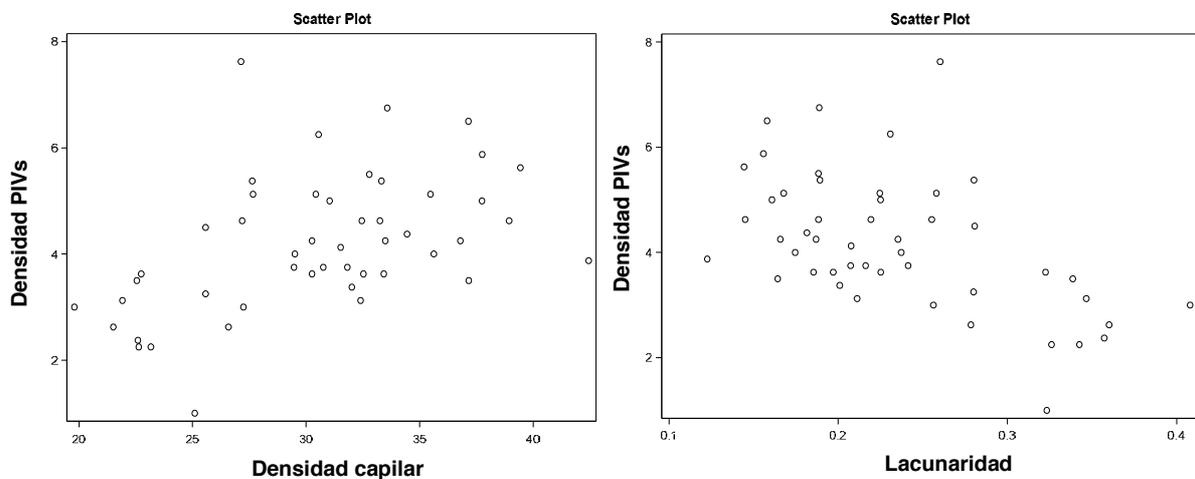
Como era de esperar, por los resultados obtenidos previamente, se observa una fuerte correlación negativa entre la densidad capilar y la lacunaridad ($r=-0,96$), es decir, a mayor densidad capilar, menor lacunaridad. Esta correlación se mantiene entre hemisferios ($r=-0.96$ y -0.95 para izquierdo y derecho respectivamente) y entre lóbulos (**gráfica 17**) (ver anexo apartado 4.1).



Gráfica 17. Se observa una fuerte correlación negativa entre la densidad capilar y la lacunaridad ($r=-0.96$).

b. Densidad capilar versus densidad PIVs y densidad PIVs versus lacunaridad

Observamos una moderada correlación positiva entre la densidad capilar y la densidad de PIVs ($r=0.48$, $p\text{-valor}<0.001$), estadísticamente significativa. Es decir, a mayor densidad capilar, mayor densidad de PIVs. La correlación entre densidad de PIVs y lacunaridad fue moderadamente negativa ($r=-0.529$, $p\text{-valor}<0.001$) (**gráfica 18**).

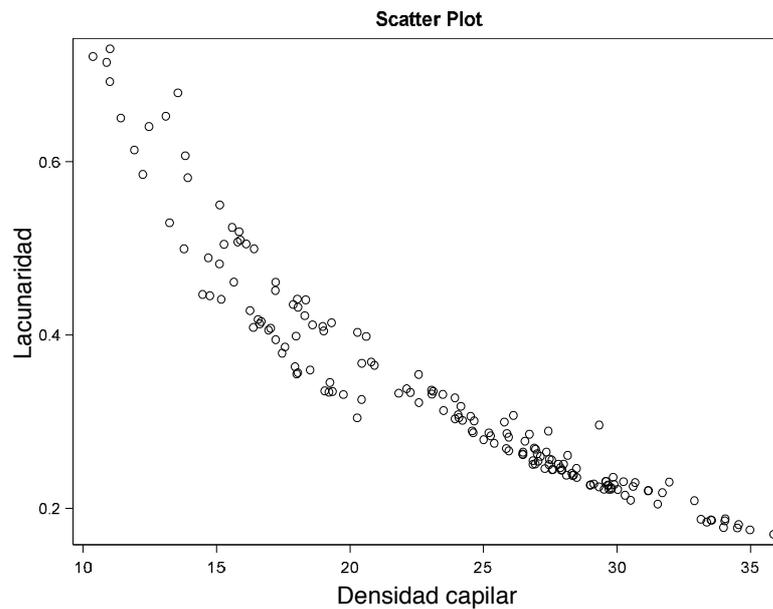


Gráfica 18. La correlación entre la densidad capilar y la densidad de PIVs y entre la densidad de PIVs y lacunaridad son moderadas: $r=0.48$, y $r=-0.52$, respectivamente y significativas ($p\text{-valor}<0.001$).

8.2. Grupo TCE:

a. Densidad capilar *versus* lacunaridad

La correlación entre la densidad capilar y la lacunaridad en este grupo también presentó una fuerte correlación negativa ($r=-0.94$), es decir que a mayor densidad capilar, menor lacunaridad (**gráfica 19**).

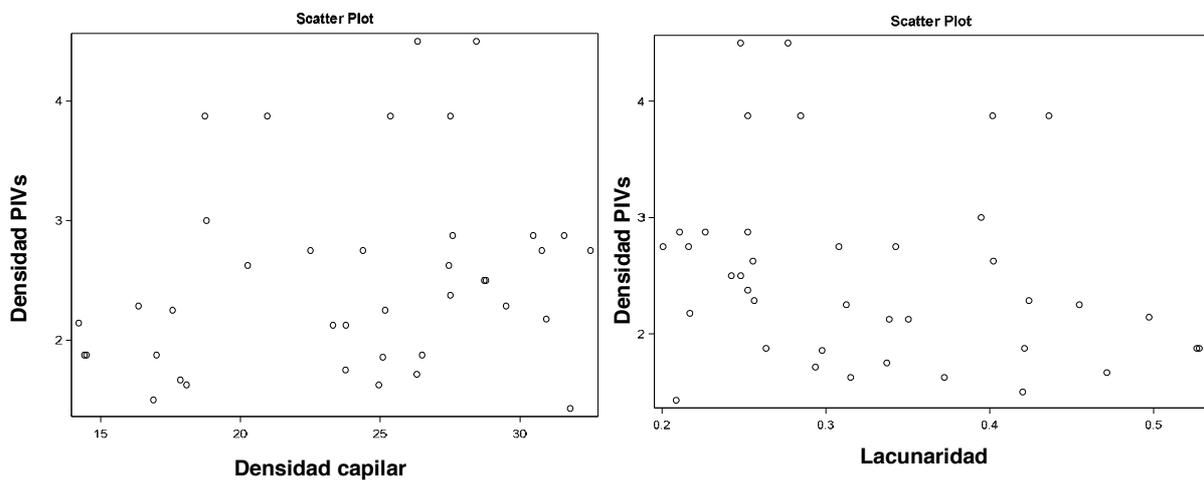


Gráfica 19. Se observa una fuerte correlación negativa entre la densidad capilar y la lacunaridad ($r=-0,94$). A mayor densidad capilar, menor lacunaridad.

b. Densidad capilar versus densidad PIVs y densidad PIVs versus lacunaridad

Se observó en este grupo una discreta correlación positiva entre la densidad capilar y la densidad de PIVs ($r=0.23$), aunque estadísticamente no significativa (p -valor= 0.143). La correlación entre la lacunaridad y la densidad de PIVs fue discretamente negativa ($r=-2.46$) y no significativa (p -valor= 0.132).

Atribuimos los resultados de esta correlación a que en el grupo TCE había lesiones primarias que comprometían el parénquima cerebral, así como edema cerebral (gráfica 20).



Gráfica 20. La correlación entre la densidad capilar y la densidad de PIVs y entre la densidad de PIVs y lacunaridad son bajas: $r=0.23$ (p -valor= 0.143), y $r=-0.24$ (p -valor= 0.132), respectivamente.

9. OTROS HALLAZGOS DEL ESTUDIO

Aunque no fue uno de los objetivos del trabajo, durante el estudio cualitativo de las muestras, especialmente en las del grupo Control, observamos que en la corteza cerebral había una mayor densidad capilar en las capas medias. En este sentido destacamos que las muestras que se obtuvieron para visualizar y estudiar mediante microscopio fueron escogidas al azar, por lo que se estudiaron de forma aleatoria diferentes capas de la corteza cerebral, evitando así el sesgo de densidad capilar (figura 33).

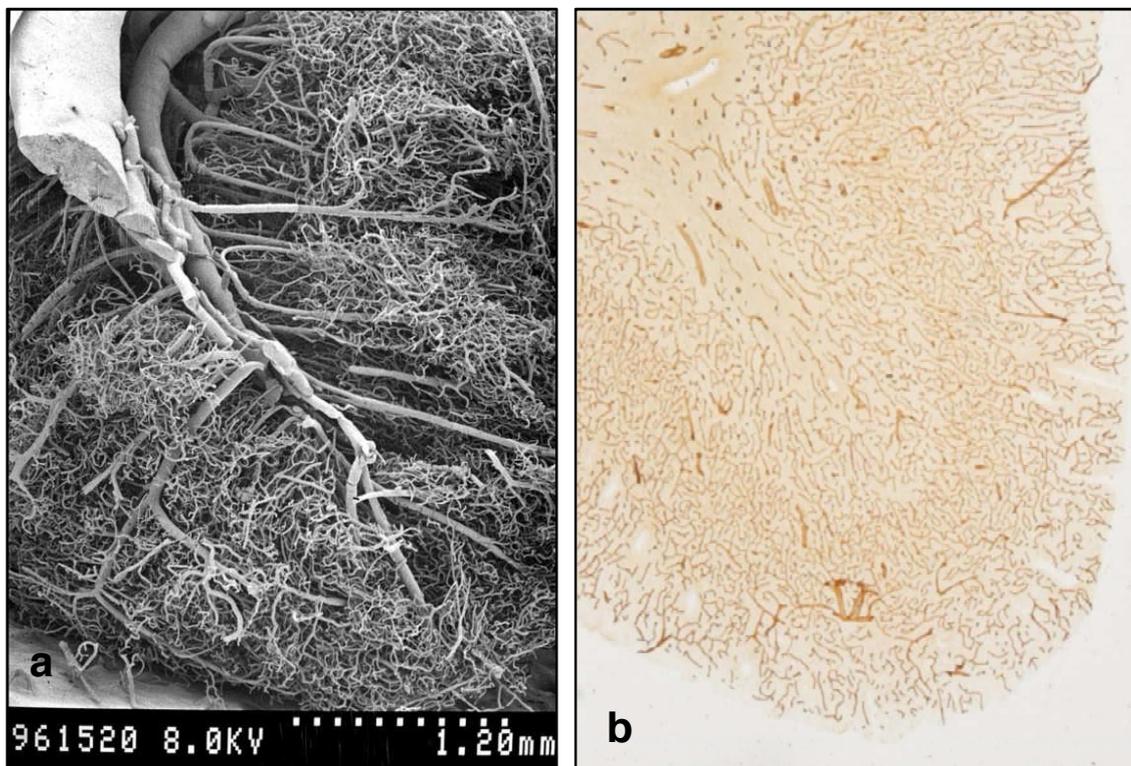


Fig. 33. Imagen de la vascularización de una circunvolución cerebral del lóbulo occipital. Molde de microcorrosión y visualización mediante microscopio electrónico de barrido. (Rodríguez- Baeza, 2004) (a). Marcaje anti-colágeno IV (b) (40x). Las imágenes muestran la mayor densidad capilar del córtex respecto a la sustancia blanca.

Además hemos observado ciertas estructuras que nos han llamado la atención y aunque no hemos podido cuantificarlas, consideramos de interés exponerlas.

Una de ellas fue la presencia de dilataciones en la pared de los capilares, sin contenido celular en su interior. Se presentaban como un aumento localizado del diámetro del vaso, en continuidad con la membrana basal. De forma cualitativa fueron observadas con menor frecuencia en el grupo control, y dado su aspecto así como lo referido en otros trabajos (grupo del Dr. Ruberte en *Mendes-Luppo et al., 2017*), se podrían corresponder con formaciones del tipo aneurismáticas (**figura 34**).

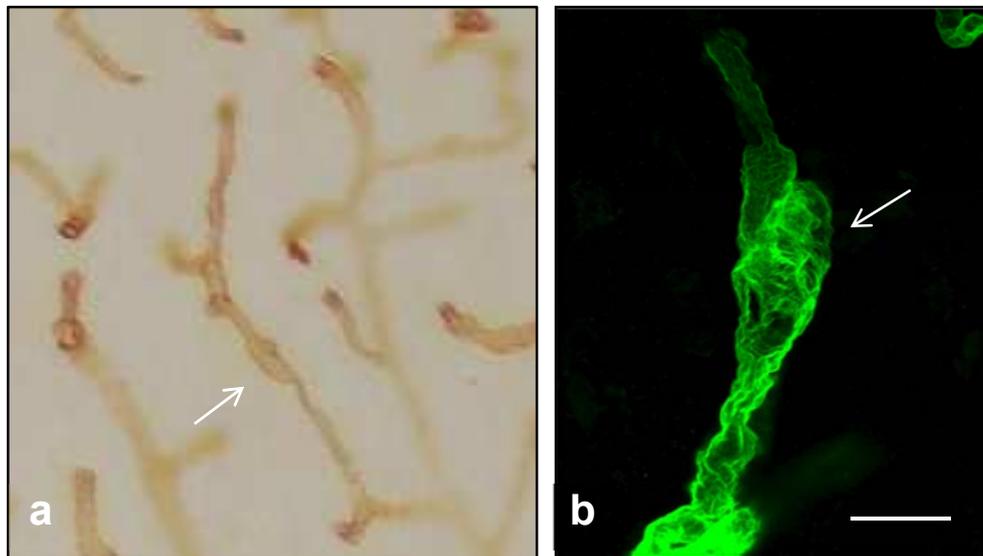


Fig. 34. Imagen de marcaje inmunohistoquímico con anti-colágeno IV (200x). Se observa una dilatación compatible con formación microaneurismática en un capilar (a). Imagen de microscopia láser confocal con inmunomarcaje anti-colágeno IV, donde se observa una formación compatible con microaneurisma en un capilar. Barra: 11,25 μ m (b).

También hemos observado capilares de superficie irregular, que dan el aspecto de un vaso “corrugado” en el eje longitudinal del mismo. Esta morfología fue observada con mayor frecuencia en el grupo TCE y sin relación con la región lesionada por el traumatismo. Debido a que los pacientes de este grupo tenían en nuestro trabajo una edad mayor (aunque no estadísticamente significativa), estos vasos podrían ser vasos desestructurados o vasos envejecidos (**figura 35**).

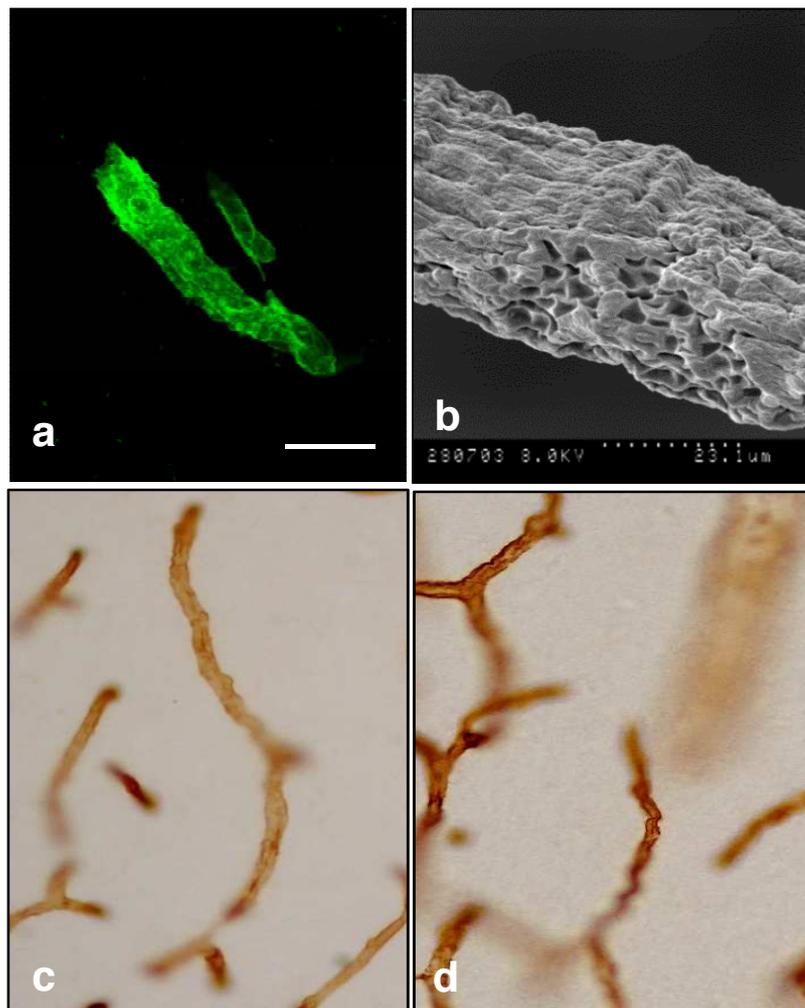
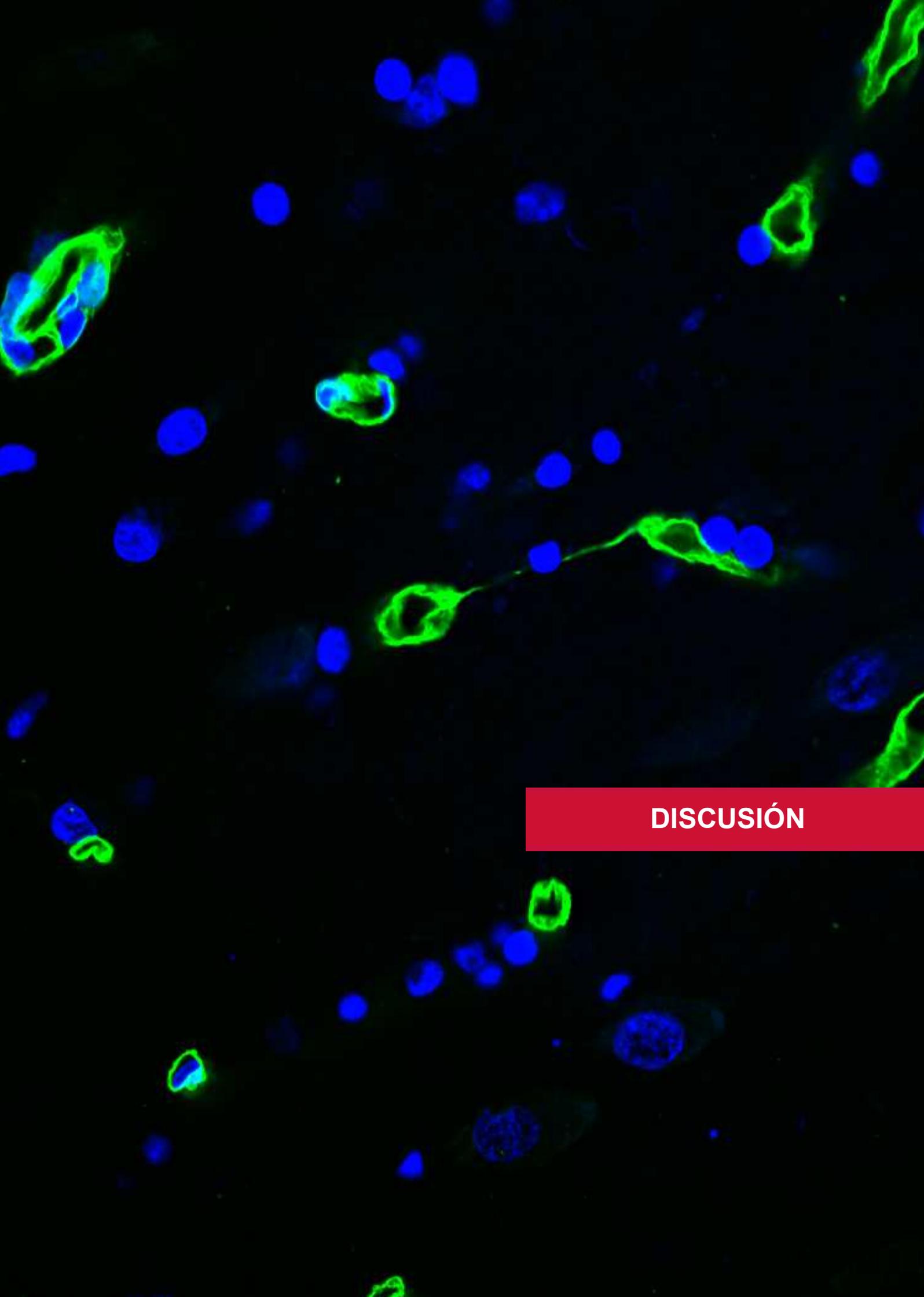


Fig. 35. Imagen de microscopia láser confocal con inmunomarcaje anti-colágeno IV. Se observa un capilar con corrugación de la membrana basal, barra: 11,25 μ m (a). Imagen de microscopia de barrido, donde se observa el molde de un microvaso de corteza cerebral con corrugación (Rodríguez-Baeza, 2003) (b). Imágenes de microscopia óptica con marcaje inmunohistoquímico de anti-colágeno IV (200x). Se visualizan fenómenos de corrugación que afectan a la membrana basal de capilares del grupo TCE (c y d).



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. SOBRE EL MATERIAL Y LA METODOLOGÍA EMPLEADOS EN EL ESTUDIO

En este estudio nos hemos propuesto valorar si las estructuras descritas en la literatura, los PIVs, se encuentran en la microvascularización de la corteza cerebral humana e intentar caracterizarlos morfo-estructuralmente. Hemos valorado, además, su posible implicación en individuos fallecidos a consecuencia de la evolución de un TCE grave.

Con este objetivo obtuvimos muestras de corteza cerebral humana procedentes de autopsias médico-legales realizadas en el instituto anatómico forense de Barcelona (actualmente IMLCFC). Aunque el número de la muestra no es elevado, otros estudios que utilizan muestras humanas no difieren considerablemente del nuestro. Sirvan de ejemplo algunos trabajos publicados sobre PIVs en cerebros humanos: *Buée et al. (1994)* obtienen resultados mediante el estudio de muestras encefálicas en 7 individuos afectados de enfermedad de Alzheimer, haciendo una valoración de los denominados “vasos atróficos”. *Challa et al. (2002)* obtienen resultados mediante el estudio de muestras encefálicas de 8 individuos de diferentes edades, con el objetivo de valorar si existía un incremento o no de PIVs en función de la edad. *Büttner et al. (2005)* estudiaron la densidad capilar en una muestra de 12 encéfalos de individuos politoxicómanos y de 8 individuos control. *Richard et al. (2010)* utilizaron muestras de encéfalo de 10 individuos con enfermedad de Alzheimer, valorando la modificación de la densidad capilar en esta enfermedad, así como la presencia de PIVs.

De estos datos concluimos que nuestra muestra (6 casos control y 6 casos de TCE) puede aportar resultados analizables estadísticamente que permitan establecer la base para llevar a cabo nuevas investigaciones relacionadas con estas estructuras.

En nuestro estudio hemos utilizado microscopia óptica, previa tinción con hematoxilina-eosina, y microscopia electrónica de transmisión (TEM), para la valoración del estado del parénquima cerebral, teniendo en cuenta que las muestras de tejido

cerebral humano para este tipo de estudio están muy condicionadas por las horas post-mortem así como por las condiciones de conservación y de fijación de los tejidos.

Es evidente que cuando se trabaja con muestras de parénquima cerebral humano obtenidas durante una necropsia, existen cambios estructurales propios de la fase de sufrimiento por muerte cerebral en muchos de los pacientes, al que se añade el tiempo post-mortem hasta que se produce la extracción y la fijación del tejido. Estos cambios son inevitables y por lo tanto inherentes a este tipo de estudios. Sin embargo, y a pesar de estos inconvenientes, trabajar con muestras de tejido humano tiene ventajas de aplicación respecto a estudios experimentales en animales, los cuales no siempre tienen la correspondiente correlación al humano.

En este contexto es necesario considerar que en el periodo post-mortem se producen alteraciones morfo-estructurales de los tejidos que deben ser consideradas en la interpretación de los resultados, teniendo así la capacidad de diferenciar estas alteraciones de las que produce el proceso patológico *per se*.

Para realizar una valoración general de estos cambios, podemos recurrir a técnicas histológicas clásicas, como es la tinción del tejido con hematoxilina-eosina y estudio mediante microscopia óptica convencional. En nuestras muestras de corteza cerebral humana obtenidas en necropsias y estudiadas con esta metodología, se han evidenciado estos cambios a través de una elevada eosinofilia neuronal, condensación de su núcleo, vacuolización del tejido, formación de espacios pericelulares, contracción de los cuerpos celulares (especialmente de las neuronas piramidales), entre otros (*Bullock et al., 1991; Vaz et al., 1997*).

No cabe duda que la utilización de la microscopia electrónica de transmisión (TEM) es la mejor herramienta para valorar los cambios ultraestructurales del tejido. En este sentido se han publicado trabajos evaluando el parénquima cerebral de pacientes con diferentes patologías, entre ellas el TCE. Las muestras de estos estudios se obtuvieron *in vivo* en el transcurso de procedimientos quirúrgicos indicados para su tratamiento (*Castejón et al., 2001; Pais et al., 2013*). Este tipo de muestras tienen la ventaja de asegurar la inmediata fijación del tejido mediante una solución de glutaraldehído, cuando aún no se ha producido la muerte celular. Sin embargo, esta estrategia no está exenta de inconvenientes, entre ellas la adaptación a las normativas y legislaciones vigentes así como la dificultad para disponer de muestras controles.

Así, los trabajos previamente realizados en muestras de parénquima cerebral humano procedentes de intervenciones en pacientes con diferentes procesos patológicos deben entenderse como trabajos básicamente descriptivos ya que la falta de muestras control limita en gran medida la realización de comparativas intergrupales, en especial si se consideran variables cuantitativas.

Nuestro estudio, basado en muestras de corteza cerebral humana de pacientes fallecidos, nos ha permitido disponer de muestras controles y de muestras de TCE, intentando discernir, con diferentes metodologías, las alteraciones propias del TCE respecto a los controles.

Para el estudio morfo-estructural de los PIVs, objetivo fundamental de nuestro trabajo, hemos utilizado técnicas de laboratorio más actualizadas y novedosas que las utilizadas por nuestros antecesores del siglo pasado. No obstante, debemos hacer un reconocimiento expreso al trabajo realizado por ellos, que aunque escasos en número, observaron y describieron con bastante precisión estas estructuras. En este sentido cabe destacar a *Ramón y Cajal (1907)*, a su discípulo *Achúcarro (1913)* o a *Cammermeyer (1960)* entre otros.

El avance tecnológico de nuestros días, tanto en marcadores como en sistemas de visualización, captación y análisis de las muestras, como es la microscopia láser confocal, nos ha permitido realizar inmunomarcajes de colágeno IV y de laminina, dos de los componentes principales de la membrana basal, con el objetivo de caracterizar los PIVs, tal y como lo han hecho otros autores (*Challa et al., 2002; Moody et al., 2004; Llombart, 2007; Richard et al., 2010*).

Para poner en evidencia las células endoteliales así como otras células anexas, especialmente células similares a pericitos o *bridging-cells (Mendes-Jorge et al., 2012)* hemos utilizado técnicas de inmunohistoquímica para endotelio y tinciones de núcleos celulares. En nuestro estudio, estas técnicas tenían como objetivo valorar la relación de células con los PIVs y no caracterizar propiamente a dichas células. Para ello hemos realizado el inmunomarcaje anti-factor von Willebrand, anticuerpo específico de células endoteliales, y el To-Pro-3 iodine, que es una tinción no específica para poner de manifiesto núcleos celulares.

El fenotipado de las células que describimos como similares a pericitos se realizó en base a los siguientes criterios: histoquímico, mediante el marcaje de sus núcleos con

To-Pro-3 iodine; de localización, ya que los pericitos se encuentran en el lado abluminal de los capilares (y posiblemente de los PIVs); y a un criterio morfoestructural, presentando estas células una morfología ligeramente ovalada y con prolongaciones citoplasmáticas (Armulik et al., 2005).

En un trabajo realizado recientemente en nuestro laboratorio (Velázquez et al., 2015) habíamos utilizado un marcador de células endoteliales, el MAS-336 (un anticuerpo monoclonal contra el endotelio humano, siendo una inmunoglobulina del tipo IgG1 obtenida en ratón que se une de forma específica a la superficie de las células endoteliales de todos los tipos de vasos en el hombre, incluyendo los de la microcirculación cerebral), pero en este estudio comprobamos que la utilización de dicho marcador no aportaba información relevante para los objetivos que nos habíamos propuesto estudiar.

Aunque existen marcadores para poner de manifiesto el endotelio vascular cerebral, como son la *Glucosa transporter-1*, la *γ-glutamyl transpeptidasa*, la *Neurothelin/HT7 protein* y las *Tight junction proteins (ZO-1 y Occludina)* y marcadores comunes a todos los endotelios (Nag, 2003), la disponibilidad y la experiencia en nuestro laboratorio de investigación con el anti-factor von Willebrand, demostrado como marcador específico de célula endotelial (Weibel y Palade, 1964) nos llevó a considerarlo como el marcador que utilizaríamos para este objetivo.

Respecto a marcadores específicos para la caracterización o fenotipado de los pericitos utilizados en varios estudios, nosotros no los hemos incorporado en este trabajo, aunque consideramos que pueden ser útiles para nuevas investigaciones. Entre estos marcadores están la actina de músculo liso (SMA), la desmina, el *neuro/glial antígeno-2 (NG-2)*, el receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), entre otros. Sin embargo, ninguno de estos marcadores es absolutamente específico para identificar pericitos y tampoco son capaces de reconocerlos a todos (Gerhardt y Betsholtz, 2003; Hugues y Chan-Ling, 2004; Armulik et al., 2011).

La utilización que hemos realizado de marcadores inmunofluorescentes combinándolos de dos en dos (anti-colágeno IV, anti-laminina, y anti-factor von Willebrand), así como la tinción nuclear mediante To-Pro-3 iodine y su posterior visualización mediante microscopio láser confocal de los PIVs es una de las aportaciones que consideramos relevante de nuestro trabajo. Esto se debe a que

estudios previos referidos en la literatura consultada, aunque realizaban inmunohistoquímica para describir la presencia de los PIVs, lo hacían sólo mediante la observación con microscopía óptica o frente a un inmunomarcaje (*Brown et al., 2007, Richard et al., 2010; Guan et al., 2013*).

2. SOBRE LA NOMENCLATURA UTILIZADA PARA LOS PIVs

En la introducción ya hemos hecho referencia a la diversidad de nomenclatura utilizada en la bibliografía consultada para referirse a los PIVs.

De forma relevante, por lo que ha representado en la evolución del conocimiento del sistema nervioso, destacamos a nuestro insigne premio nobel, don Santiago Ramón y Cajal, el cuál identificó estas estructuras, que unían capilares adyacentes, denominándoles inicialmente como “fascículos conjuntivos libres” (*Ramón y Cajal, 1925*).

Durante el siglo pasado también han habido autores que se han referido a ellas con diversas denominaciones: “*cordons unitifs*” (*Spielmeyer, 1922, Schaltenbrand, 1928; Gellerstedt, 1933*), “*bridges of adventitial cytoplasm*” (*Wolff, 1938*), “*intercapillary bridges*” (*Prados y Swank, 1942*), “*intervascular reticulin fibers*” (*Bölönyi, 1958*) e incluso “*vasa vasorum*” (*Cammermeyer, 1965*).

Esta diversidad de nombres utilizados para describir una misma estructura ha sido una de las limitaciones que hemos tenido en la búsqueda bibliográfica. Y de acuerdo con *Brown (2010)* este es un indicio más del desconocimiento que existe acerca de estas estructuras, tanto de su naturaleza, de su origen, de su significado funcional y de su relevancia en ciertas patologías.

Más recientemente estas estructuras han sido referidas como “*string vessels*” (*Challa et al., 2002; Brown et al., 2009; Hunter et al., 2012; Yang et al. 2015*). En varios estudios se ha demostrado que los PIVs son “tubos” de membrana basal vacíos, consecuencia de la destrucción de células endoteliales. En relación a este hecho se han propuesto los diferentes nombres utilizados en la literatura, lo cual debería reconsiderarse para intentar unificar un término.

En este sentido, y a través de una excelente revisión bibliográfica realizada por *Brown (2010)*, el autor propone el término “*string vessels*” como la mejor opción. Otros nombres pueden llevar a confusión, debido a que el término de “tubo vacío” también se ha utilizado para describir los tubos que dejan los axones de las neuronas cuando estas desaparecen.

Nosotros hemos optado por utilizar el término en español de “Puentes intervasculares” (PIVs) en concordancia con la denominación propuesta por nuestro colega, el Prof. Dr. Jesús Ruberte, en un trabajo sobre vasos y PIVs de la retina (*Llombart, 2007*) dónde considera que esta denominación es más precisa para describir estas estructuras que conectan capilares entre sí.

3. SOBRE LA CARACTERIZACIÓN, ESTRUCTURA Y LOCALIZACIÓN DE LOS PIVs

A pesar de la diversidad de nomenclaturas utilizadas, actualmente existe cierto consenso sobre la composición y la estructura de los PIVs. Una consideración ampliamente aceptada es que estas estructuras tienen ciertas características morfoestructurales comunes, destacando: que están constituidos por fibras de tejido conectivo, posiblemente remanentes de capilares, que no tienen células endoteliales en su interior, que no tienen luz, y que básicamente están constituidos por componentes de la membrana basal. Por estas características se considera que son estructuras por las que no pasa flujo sanguíneo (*Cammermeyer, 1960; Challa et al., 2004; Rodríguez-Baeza, 2010*).

Estas características, que han sido descritas en diferentes tejidos y órganos, tanto en animales como en humanos, las hemos observado también en nuestro trabajo. Pero consideramos que, a diferencia de los trabajos previos, estas estructuras no habían sido suficientemente estudiadas en muestras de corteza cerebral humana, y especialmente en muestras procedentes de pacientes fallecidos a consecuencia de un TCE grave.

Así, en nuestras muestras de corteza cerebral humana, los PIVs fueron claramente identificados. Presentaron un aspecto filiforme, de constitución fundamentalmente de tejido conectivo, y conectaban vasos de la microvascularización cortical,

especialmente capilares entre sí. Otra de las características observadas fue la ausencia de células endoteliales en su interior así como su composición, que correspondía a los principales componentes de la membrana basal, es decir el colágeno IV y la laminina.

En un estudio pormenorizado realizado por *Cammermeyer (1960)* se concluía que los PIVs eran positivos a la tinción PAS y a la eosina. El método PAS permite marcar carbohidratos y glucoproteínas, los cuáles son constituyentes de la membrana basal (*Leblond et al., 1957*). Sin embargo, estos autores no correlacionaron la composición de la membrana basal con la de los PIVs, cosa que sí se ha hecho en estudios más recientes (*Llombart, 2007, Rodríguez-Baeza, 2010*). De ello se deduce que autores que en los años 60 utilizaban la tinción de PAS, habían puesto en evidencia la presencia de glicoproteínas en los PIVs, aunque no se refirieran a ellos de forma explícita.

En nuestras muestras, los PIVs se marcaron intensamente con métodos inmunohistoquímicos frente a componentes de la membrana basal, tales como el colágeno IV y la laminina, siendo el colágeno IV el componente mayoritario. Los marcajes con anticuerpos frente al factor von Willebrand, no lo hemos observado en el interior de los PIVs, lo que demuestra que las células endoteliales, o sus prolongaciones, no forman parte de los componentes de estas estructuras. Sin embargo, en algunas ocasiones hemos observado marcaje de célula endotelial en el interior de componentes de la membrana basal, pero este hallazgo no sucedía en las estructuras que habíamos identificado como PIVs. En estos casos, el inmunomarcaje de célula endotelial era en estructuras que valoramos como capilares colapsados, algunos de ellos con aspecto corrugado, fenómeno que no hemos encontrado en los PIVs y sí en los capilares (*Rodríguez-Baeza, 2004*). Este hecho puede dar soporte a la hipótesis de que los PIVs podrían formarse por degeneración de las células endoteliales, las cuales van desapareciendo en un proceso de atresia vascular (*Cammermeyer, 1960; Brown, 2010*).

Otra observación ha sido la presencia de unas células de morfología ovalada, que a veces presentaban proyecciones citoplasmáticas, localizadas en el lado abluminal de los PIVs. Estas células, similares a pericitos, las relacionamos con las denominadas “*bridging cells*” descritas recientemente por el grupo del profesor Ruberte y que son consideradas como un subtipo de éstos (*Mendes-Jorge et al., 2012*).

En el estudio de *Challa et al. (2002)*, se realizó la caracterización morfológica de los PIVs. Según estos autores, los PIVs presentaban un diámetro de 1-2 μ m, a menudo conectando dos capilares entre sí y se podían observar tanto en la sustancia gris de la corteza cerebral como en la sustancia blanca. Curiosamente los autores observaron la continuidad de estas estructuras con algunos capilares. Describieron PIVs bifurcados y ocasionalmente formando bucles sobre sí mismos. En concordancia con estas observaciones, nosotros también hemos encontrado PIVs que se bifurcaban, que formaban bucles, que presentaban continuidad con los capilares, y otros que finalizaban de una forma desestructurada, dando la apariencia de terminaciones “deshilachadas”. Esta morfología la hemos valorado como PIVs desestructurados o “rotos”. También hemos observado algunas terminaciones de PIVs sin ninguna continuidad, es decir, terminaciones ciegas. Si bien, en la mayoría de los casos, hemos observado que los PIVs interconectan capilares entre sí, en ocasiones conectaban un capilar con un vaso sanguíneo de mayor calibre, correspondiendo a una arteriola.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto la presencia de PIVs en la sustancia blanca y en la sustancia gris encefálica, siendo más abundantes en esta última (*Challa et al, 2004; Moody et al., 2004; Brown et al., 2007*). Pero no hemos encontrado estudios que hayan establecido diferencias en cuanto al número o a la densidad de los PIVs en los diferentes lóbulos cerebrales en individuos sin patología cerebral. Por este motivo hemos realizado el análisis comparativo entre muestras de diferentes lóbulos cerebrales del grupo control, poniendo de manifiesto que existe una proporción bastante constante de PIVs en los lóbulos frontal, parietal y occipital, mientras que el número de PIVs en el lóbulo temporal era menor. Esta observación puede justificarse en que las muestras del lóbulo temporal se obtuvieron de la circunvolución parahipocampal, zona de transición entre el neocórtex y el allocórtex, y por lo tanto de estructura citoarquitectónica variable (*Standring, 2016*).

Muchos de los autores que han estudiado la corteza cerebral humana desde una perspectiva angioarquitectónica, en relación a las diferentes capas celulares (citoarquitectura) y/o fibrilares (mieloarquitectura) de la corteza cerebral (*Duvernoy et al., 1981; Reina-de la Torre et al., 1998; Lauwers et al., 2008; Cassot et al., 2010*) definen habitualmente diferentes áreas vasculares, haciendo mención especial a la densidad capilar relacionada con la citoarquitectura. Aunque no ha sido uno de los objetivos de nuestro estudio, si hemos apreciado que la variación, ya sea en la densidad capilar o en la densidad de PIVs, tenía una cierta correlación con la

citoarquitectura, y que en la circunvolución parahipocampal de nuestras muestras del grupo control había una menor densidad capilar y una menor densidad de PIVs.

Estudios como los de *Buée y Delacourte (1997)* relacionan la densidad capilar, que se modifica en la enfermedad de Alzheimer, en función de las diferentes capas del neocórtex.

Está descrito por el grupo de Duvernoy (*Lauwers et al., 2008*) que la mayor densidad capilar se encuentra en las capas medias del neocórtex (capas de la III a la IV). Nosotros hemos obtenido una correlación estadísticamente significativa entre la densidad capilar y la densidad de los PIVs, por lo que es probable que sea en estas capas donde se localice un número mayor de PIVs. Sin embargo, esta apreciación no debe ser extrapolada al grupo de TCE, donde las lesiones encefálicas pueden modificar los resultados.

Consideramos relevante que la densidad capilar y la densidad de PIVs difiera entre las muestras del grupo Control respecto a las muestras del grupo TCE, siendo mayor estas densidades en el grupo Control. Por el contrario en el grupo TCE observamos un aumento de lacunaridad respecto al grupo Control. Este hallazgo puede justificarse en la desestructuración del neurópilo en el parénquima cerebral de las muestras del grupo TCE, determinando un aumento de las distancias intercapilares. Así, por área estudiada, la densidad capilar y la densidad de PIVs fue menor en el grupo TCE, mientras que el número de PIVs desestructurados o “rotos” fue mayor que en el grupo Control.

4. SOBRE LA FORMACIÓN DE LOS PIVs

En cuanto al proceso que da lugar a los PIVs, *Ramón y Cajal* sugirió en 1925 que pueden formarse por estrechamiento del lumen, por falta de flujo sanguíneo y por atrofia del vaso, dejando solamente el tejido conectivo que constituye su membrana basal. *Cammermeyer (1960)* coincidió con esta propuesta, describiendo el proceso de “*atresia vascular*”.

En los primeros estudios de observación directa de redes capilares en desarrollo, así como en estudios posteriores de capilares retinianos irradiados e isquémicos, se han

obtenido datos que pueden aportar información sobre el proceso de formación de los PIVs.

Así, *Clark (1918)*, observó que la formación de nuevos capilares se produce por el crecimiento de “*brotos*” de células endoteliales desde capilares existentes. El brote comienza como un proceso sólido que puede tener más de un hilo conductor. Si un proceso encuentra otro brote, se formará una unión; y el lumen se extenderá a través del nuevo brote y se ensanchará. Este proceso de formación del lumen ha sido descrito recientemente por *Kamei et al. (2006)*, haciendo referencia a que la “*lumenización*” se produce a través de la formación de vacuolas y su posterior fusión intercelular.

Otra observación de *Clark (1918)* fue que los brotes de células endoteliales de los capilares se pueden desarrollar a corta distancia para luego retraerse. Estudios posteriores han encontrado hallazgos similares, describiendo las “*delgadas hebras*” de membrana basal que se interconectan con los vasos supervivientes (*McDonald y Choyke, 2003*), mientras que otros autores los consideraron como el “*registro*” de la ubicación de un vaso original (*Kamba et al., 2006*).

En su revisión, *Cammermeyer* acepta que los PIVs son simples remanentes que surgen de la destrucción de un capilar. Aunque posteriormente argumentó que los PIVs podrían transportar gránulos liberados por mastocitos (*Cammermeyer, 1965*). Esta propuesta actualmente parece poco probable ya que estudios más recientes han investigado si los PIVs pueden o no transportar sangre o plasma, llegando a la conclusión que no lo hacen.

Los trabajos más relevantes en este sentido se han llevado a cabo en capilares acelulares de la retina. La no perfusión de estos capilares acelulares se demostró mediante estudios combinados de angiogramas de fluoresceína y de preparaciones de digestión enzimática de muestras de retina humana (*Kohner y Henkind, 1970; De Venecia et al., 1976; Mendes-Jorge et al., 2012*).

Como es evidente, nuestro estudio se realizó sobre muestras procedentes de cadáveres humanos, y por lo tanto no es posible realizar este tipo de estudios dinámicos experimentales. Pero la ausencia de células en el interior de los PIVs indicaría que estos no tendrían flujo de sangre o de plasma en su interior. Para profundizar en este hecho, y debido al tipo de material utilizado, procedimos a valorar

la posible presencia de células en el interior de los PIVs, mediante tinciones de núcleos con To-Pro-3 iodine, comprobando que no había núcleos de células en su interior.

Se han descrito procesos de retracción de las células endoteliales en un vaso después de cesar la circulación por él. En estudios realizados en capilares retinianos, se observó la aparición de capilares acelulares (*Reinecke et al., 1962; Archer et al., 1991; 1993*), postulándose que estos capilares estarían en fase de regresión, para transformarse en PIVs. En este estadio, los vasos habrían perdido sus células endoteliales, pero aún no se habría producido el colapso de su luz.

Así, los denominados capilares acelulares tienen un diámetro ligeramente inferior a los capilares con células endoteliales, y aparentemente no presentan flujo sanguíneo. *Kuwabara y Cogan (1963)* han propuesto que son precisamente los capilares acelulares los que se transformarían en PIVs. *Archer et al. (1991)* describieron los capilares acelulares en la retina como precursores de los PIVs, observando que en ocasiones pueden llegar a albergar un pericito durante un periodo de tiempo desde la pérdida de sus células endoteliales.

Nuestro estudio no permite determinar el origen exacto de los PIVs en la microvascularización de la corteza cerebral humana. Sin embargo, por su morfología, por su estrecha relación con otros elementos vasculares (como los capilares), así como por su composición, es posible que sean argumentos en favor de la hipótesis de su formación a partir de la degeneración y atresia capilar. Esto resultaría en una estructura sin lumen y sin células endoteliales.

Algunos autores (*Reissenweber y Pessacq, 1971; Guseo y Gallyas, 1974*) han hecho referencia a que los PIVs se relacionan con procesos de proliferación vascular y con el desarrollo de nuevos vasos, siendo más abundantes en cerebros de recién nacidos y en cerebros afectados de patologías. Este estudio pone de manifiesto que los PIVs no presentan células en su interior y en cambio sí están compuestos por los principales componentes de la membrana basal, lo que podría considerarse un hecho a favor del proceso de proliferación vascular. En este sentido estaríamos más de acuerdo con los autores que sugieren que los PIVs forman parte de un proceso de atresia vascular que se produce en ciertas enfermedades neurodegenerativas o durante el envejecimiento (*Ashton, 1963; Belford et al., 1987*).

Más recientemente se ha descrito un mayor número de PIVs en el hipocampo de pacientes afectados de esclerosis temporal mesial (*Mott et al., 2009*). En contraste con los hallazgos observados en la enfermedad de Alzheimer y en la esclerosis temporal mesial, los PIVs parecen disminuir en la sustancia blanca cerebral de sujetos con leucoaraiosis. En la sustancia blanca profunda, que es la localización de la mayoría de las lesiones de leucoaraiosis, se observó una disminución de PIVs en relación con la edad. Este hecho estaba en concordancia con una menor densidad de capilares intactos en la sustancia blanca profunda (*Moody et al., 2004; Brown et al., 2007*). Sin embargo, la disminución de PIVs fue mayor que la disminución de capilares. Este hallazgo podía deberse a que la pérdida temprana de los capilares en la leucoaraiosis estaría seguida por la desaparición de los PIVs. La interpretación dada es que la leucoaraiosis comienza en la edad media de la vida, de forma gradual, con la pérdida de capilares en la sustancia blanca profunda y el aumento concomitante de PIVs. A través de los años habría cada vez menos capilares y por lo tanto se formarían menos PIVs.

Otros autores (*Hunter et al., 2012; Guan et al., 2013*) han relacionado la pérdida de densidad capilar con la formación de PIVs. Han visto que existe una relación positiva entre la pérdida de densidad capilar y la pérdida de PIVs, hipotetizando que existe un nivel mínimo de densidad capilar el cual no se sobrepasa, por más que evolucione la patología cerebral, lo que determinaría una disminución de los PIVs. Además, con el paso del tiempo, estos también tienden a desaparecer, asociando así la presencia de PIVs a la presencia de patología cerebral (*Hunter et al., 2012*).

Otros autores como *Büttner et al. (2005)* han relacionado las alteraciones morfológicas que se producen en la microvascularización en cerebros de toxicómanos, demostrando que existía una pérdida de intensidad de marcaje de colágeno IV de la membrana basal capilar, relacionándolo con una pérdida de densidad capilar.

Un aspecto de la pérdida de densidad capilar, que puede ser de especial interés en enfermedades neurodegenerativas, es que su disminución puede estar relacionada con la edad, dónde habría una menor capacidad de angiogénesis en el parénquima nervioso. En este sentido podría haber un fracaso relacionado con la edad en lo que se refiere a la recuperación después de episodios de hipoxia/isquemia que llevarían a la pérdida capilar en algunas enfermedades de tipo neurodegenerativo, o simplemente en el envejecimiento. Tal fracaso de la regeneración capilar podría favorecer la pérdida neuronal, o su disfunción, y podrían ser factores relevantes en la disminución de la

función cerebral que se produce en edades avanzadas. Así mismo, esta disminución capilar, y consecuente formación de PIVs, podría producir una desestabilización de la angioarquitectura cerebral.

Estudios previos realizados en muestras procedentes de autopsia, han reportado resultados contradictorios con respecto a la densidad capilar cortical en la enfermedad de Alzheimer (*Fischer et al., 1990; Kalaria y Hereda, 1995; Buée et al., 1997*). Varias razones metodológicas podrían haber desempeñado un papel en estos resultados contradictorios. En primer lugar, el número de sujetos utilizados en estos estudios fue pequeño y los criterios de selección de los pacientes no bien establecidos. En segundo lugar, las distintas regiones analizadas en los diferentes estudios (frontal, parietal, hipocampo) podrían contribuir a esta discrepancia. Como se ilustra en el estudio de *Richard et al. (2010)*, y que nosotros también hemos observado, existen diferencias regionales, tanto en la densidad de los PIVs como de la densidad capilar. En tercer lugar, en algunos de los estudios sólo han utilizado marcadores endoteliales, mientras que en otros estudios sólo utilizaron marcadores de la membrana basal. En este sentido consideramos que estudios que incorporen ambos tipos de marcadores, endoteliales y de membrana basal, aportan una mayor información y contribuyen a homogeneizar los resultados.

Cabe destacar también otra propuesta realizada por otros autores, que han observado que la inhibición del factor de crecimiento endotelial (VEGF) inducía la reducción de los vasos tumorales, dejando estructuras tubulares formadas solamente por membrana basal y por pericitos (*Mancuso et al., 2006*). Este proceso describe lo que se correspondería con la atresia vascular.

5. SOBRE LA CLASIFICACIÓN DE LOS PIVs

Guseo y Gallyas (1974) consideraron tres tipos de PIVs, de acuerdo a su morfología y relación con las células endoteliales. Posteriormente *Leibnitz y Bär (1988)* se basaron en la clasificación de los PIVs de Guseo y Gallyas, señalando que son puentes formados por procesos de células endoteliales, por capilares colapsados y por procesos de pericitos.

Nosotros hemos realizado una primera clasificación de los PIVs de acuerdo a su grosor, clasificándolos en delgados y en gruesos (tipo I y tipo II respectivamente). Sin embargo esta clasificación nos pareció demasiado sencilla, a lo que se unía que en ocasiones era difícil cuantificar exactamente el diámetro de algunos PIVs para considerarlos en uno u otro grupo. Por este motivo nos propusimos establecer otra clasificación, en la que se tuviera en cuenta la relación de estas estructuras con células adyacentes. Así, se propuso una clasificación teniendo en cuenta si había o no célula, y si había, en que localización se encontraba (en uno o en los dos extremos, o en el centro), además de considerar PIVs desestructurados o “rotos”. Respecto a las células, estas presentaron características morfológicas similares a los pericitos, y por ello las hemos considerado como pericitos o un subtipo de estos. Así, la clasificación propuesta nos parece que describe de forma más objetiva los PIVs, y está basada en la clasificación utilizada en la tesis doctoral de *C. Llombart (2007)*, realizada en el grupo de trabajo que dirige el Prof. Ruberte, y que nosotros hemos adaptado y modificado. Cabe destacar que en la literatura que hemos consultado, no hemos encontrado otras clasificaciones en relación a los PIVs.

6. SOBRE LA FISIOPATOLOGÍA DE LOS PIVs

En referencia al papel fisiopatológico de los PIVs, hay autores que hipotetizan que son restos de capilares que perdieron su endotelio (*Hunter et al., 2012*). Estos hallazgos han sido descritos habitualmente en tejidos humanos (cerebro, médula espinal, ojo) así como en tejidos procedentes de otras especies (*Cammermeyer, 1960*) y aumentando su número en situaciones patológicas como es la isquemia cerebral (*Reinecke et al., 1962*), la enfermedad de Alzheimer (*McGeer et al., 1990; Perlmutter et al., 1990; Kalaria, 1992; Kalaria y Hereda, 1995, Buée et al., 1994; Challa et al., 2004*) o incluso en tejidos que han sido irradiados (*Archer et al., 1991; Archer, 1993, Archambeau et al., 2000; Mao et al., 2003*).

Otra característica de los PIVs podría ser su potencial capacidad para facilitar la reconstitución del capilar destruido, proporcionando un “*andamio*” estructural, repleto de moléculas de señalización, que sería relevante en la recuperación de la pérdida capilar en diferentes patologías del SNC. Por lo tanto, los PIVs podrían ser susceptibles a manipulaciones terapéuticas para el tratamiento de ciertas patologías del SNC. Sin embargo, este extremo debe ser evaluado con otros estudios, aunque

esta propuesta estaría en contradicción con el hecho de que los PIVs no presentan luz, por la cual pudieran avanzar de nuevo las células endoteliales (*Vracko 1974; Ide et al., 1983*).

También se ha postulado que la interrupción del flujo sanguíneo capilar durante un período crítico, podría resultar en la pérdida del capilar y la posterior formación de un puente. Los autores que sostienen esta hipótesis describen la presencia de PIVs en cerebros normales de diferentes edades, desde prematuros hasta ancianos (*Challa et al., 2002*). Debido a que el número de PIVs fue menor en edades más avanzadas, su conclusión es que desaparecen de forma más o menos progresiva a lo largo de la vida (*Brown et al., 2007*).

En nuestro estudio, la evaluación de la densidad de PIVs en muestras de cerebros del grupo control no presentó variaciones respecto a la edad de los pacientes. Este resultado estaría en concordancia con los estudios de *Challa et al. (2002)* donde se concluía que los PIVs se podían observar en todas las edades, incluyendo el periodo fetal, y que persistirían en las diferentes etapas de la vida. Sin embargo, este mismo autor observó una mayor densidad de estas estructuras en muestras de tejido de recién nacidos. Este hallazgo indica que la densidad de los PIVs puede estar relacionada con las diferentes fases del desarrollo cerebral. En este mismo sentido, otros autores clásicos (*Binswanger, 1917*) ya habían observado un gran número de PIVs en recién nacidos; y en el libro de *Biggart (1936)* se describieron estas estructuras en la especie humana, desde la infancia hasta la vejez.

Debido a la disponibilidad de las muestras de nuestro estudio (sujetos adultos), nosotros no podemos posicionarnos en este hecho, aunque lo consideramos de interés para otras investigaciones.

Si consideramos las patologías con las que se ha relacionado un incremento en el número de PIVs, éstas son en general de tipo crónico, con un largo periodo de evolución entre el diagnóstico y el fallecimiento del paciente. Este lapso de tiempo conlleva una disminución crónica del flujo sanguíneo capilar cerebral, con el consiguiente colapso de algunos de estos vasos, y posterior pérdida de sus células endoteliales.

La densidad de PIVs en nuestras muestras de corteza cerebral de sujetos fallecidos a consecuencia de un TCE, fue menor respecto a las del grupo Control. Este hecho

contrasta con los trabajos que han evaluado la densidad de PIVs en otras situaciones patológicas, donde se ha observado, de forma general, un incremento en el número de estas estructuras (*Brown et al., 2007 y 2009; Hunter et al., 2012; Yang et al., 2015*).

En contraposición con la patología crónica, los pacientes del grupo TCE tuvieron una evolución de sus lesiones, desde el traumatismo hasta el *exitus*, de horas a pocos días. Por este motivo, a diferencia de los procesos crónicos, estos pacientes pueden ser considerados agudos, donde hay una lesión primaria (en el momento del traumatismo), con contusión y destrucción más o menos importante del parénquima cerebral, que posteriormente desencadena una plétora de procesos fisiopatológicos, denominados lesiones secundarias, como son el edema cerebral y la isquemia, que conllevan a una situación de estrés oxidativo, de inflamación, de activación microglial, de activación de proteasas y de lipasas, entre otros (*Velázquez et al, 2015*). En este contexto es posible que los PIVs presentes en el tejido cerebral de estos individuos sufran distensiones, e incluso roturas, por el aumento de las distancias intercapilares que produce el edema (vasogénico o citotóxico). Así, hemos observado un aumento del número de PIVs rotos (PIVs del tipo E) en este grupo, en comparación con el grupo Control. Por el contrario, no se observó un incremento en la densidad de estas estructuras como ocurre en patologías crónicas. Esto hecho probablemente sea debido a la naturaleza inherentemente aguda del TCE y a la rapidez con la que progresan los mecanismos fisiopatológicos en estos pacientes.

Es razonable suponer que si en lugar de haber evaluado a sujetos fallecidos de forma aguda tras un TCE (pocas horas o días) se hubieran evaluado pacientes con lesiones post-traumáticas de larga evolución, probablemente se hubiera encontrado incrementada la densidad de PIVs, algo similar a lo descrito en otras patologías de carácter crónico.

Además, consideramos resaltable que el número de PIVs rotos no se debía a la manipulación y al procesamiento de las muestras. Si esto fuera así, en ambos grupos se debería haber obtenido un número similar de PIVs, y en cambio los resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas. Por ello concluimos que los PIVs rotos, del grupo E, no pueden ser atribuidos al procesado de las muestras.

Uno de los parámetros evaluados en nuestro estudio ha sido la lacunaridad, que se describe como una medida de la relación entre la ocupación de espacio por parte de los vasos en relación con el resto de tejido; es decir, que es una medida indirecta de la

distancia existente entre los microvasos cerebrales. Un incremento de la lacunaridad indica un incremento de la distancia entre capilares y una consecuente disminución de la densidad relativa de estos por unidad de área de la muestra. Este hecho es consecuente con el aumento de los PIVs rotos y podría ser secundario, entre otras causas, a la formación de edema tisular, ya sea citotóxico o vasogénico.

A parte de la diferencia en la densidad relativa entre ambos grupos también se constataron diferencias en la abundancia relativa de cada tipo de PIVs. Así pues, las muestras del grupo Control presentaban más PIVs tipo A, mientras que las muestras obtenidas del grupo de pacientes con TCE presentaban más PIVs tipo E (rotos).

Al igual que ocurre con la lacunaridad, estas diferencias podrían ser secundarias a las alteraciones que se producen en el tejido cerebral tras un TCE, especialmente las que conllevan un incremento de la distancia intercapilar, con el consiguiente estiramiento de los PIVs y su eventual rotura.

Los resultados obtenidos en las muestras procedentes del grupo TCE están en concordancia con los estudios realizados por el grupo del Prof. Ruberte (*Llombart, 2007*) en retinas humanas. Estos autores observaron diferentes alteraciones vasculares ligadas a la retinopatía diabética, destacando el hallazgo de PIVs rotos y el incremento significativo de los espacios intercapilares. Nos parece interesante recalcar que en la retinopatía diabética, al igual que ocurre en los pacientes afectados de TCE, el edema tisular secundario al incremento de la permeabilidad vascular y a las alteraciones de la BHE juega un rol central en la patología de la enfermedad. No debemos olvidar que la retina es una prolongación del sistema nervioso central y por lo tanto refleja situaciones del mismo.

7. SOBRE EL PAPEL QUE DESEMPEÑAN LOS PIVS EN PATOLOGIA CEREBRAL

Desde su descripción inicial, hace más de 100 años, el interés por el conocimiento de estas estructuras disminuyó, y durante un largo periodo de tiempo se han publicado pocos trabajos que hagan referencia a los PIVs.

No obstante, en los últimos años se ha visto un resurgimiento en el estudio de estas estructuras, especialmente en el contexto de enfermedades neurodegenerativas como son la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson.

Estos trabajos han postulado que los PIVs podrían tener un rol en la fisiopatología de estas enfermedades y que podrían verse alterados durante la evolución de las mismas (*Brown et al., 2009; Yang et al., 2015*).

Este interés se ha trasladado al estudio mediante métodos experimentales con el fin de valorar su papel en la fisiología normal del sistema nervioso central, así como en los cambios que se producen en las diferentes fases del desarrollo y durante el envejecimiento (*Challa et al., 2004; Hunter et al., 2012; Yang et al., 2015*). En nuestra revisión bibliográfica, no hemos encontrado trabajos que evalúen el papel fisiopatológico de los PIVs en enfermedades agudas y tampoco en muestras de pacientes que hayan sufrido un TCE grave.

Estudios de la red vascular retiniana han constituido una de las principales fuentes de información en referencia a los PIVs. Esta red vascular es especialmente adecuada, debido a que es una parte del sistema nervioso central, y los vasos retinianos pueden verse con gran detalle mediante la técnica de digestión enzimática con tripsina (*Kuwabara y Cogan, 1960*). Este método permite poner de manifiesto las células endoteliales y los pericitos en relación con la membrana basal vascular.

En sus estudios sobre la retinopatía diabética en muestras humanas, *Ashton y Pedler (1962)* consideraron que se producía una disminución del flujo sanguíneo en el lecho capilar con la consecuente atrofia y desaparición del vaso. Las estructuras remanentes de este proceso serían los PIVs (*Ashton y Pedler, 1962; Kornzweig et al., 1964*). Además, estos autores sugirieron que durante la formación de los PIVs en la retina, las células endoteliales podrían separarse de la membrana basal y deslizarse a lo largo del lumen capilar hasta otros capilares adyacentes. Este concepto fue revisado *a posteriori* y actualmente se considera erróneo. En el mismo sentido *Wolter (1957)* describió conexiones entre vasos de muestras de retina y en vasos de muestras de encéfalo, sugiriendo que estas conexiones eran remanentes de capilares desaparecidos. En el mismo sentido *Kuwabara y Cogan (1960)* observaron que los PIVs no presentaban lumen y por lo tanto no podían ser vasos obliterados con posibilidad de repermeabilizarse.

Otros estudios han demostrado que, en el contexto de isquemia cerebral, se produce una pérdida de células endoteliales en el territorio afectado, a los 3-5 días post-lesión, con el consiguiente aumento progresivo de capilares acelulares (*Reinecke et al., 1962*). Posteriormente, alrededor del octavo día, estos capilares acelulares disminuirían en diámetro para convertirse en los PIVs. *Kuwabara y Cogan (1963)* observaron que la membrana basal de los capilares acelulares presentaba un mayor grosor.

Este hecho también fue observado por *Cogan (1963)*, en capilares retinianos, dónde la membrana basal presentaba mayor grosor a medida que aumentaba la edad, y se plegaba a modo de “acordeón” cuando perdía su celularidad. Estos autores también describieron estos hallazgos en cerebro (*Cogan y Kuwabara, 1984*).

La cuestión de si los capilares pueden permanecer cerrados por un período de tiempo es importante en el estudio de los PIVs, debido a que estudios modernos sugieren que el cese del flujo sanguíneo conlleva la regresión del capilar y la formación de los PIVs (*Hunter et al., 2012*).

El cierre y reapertura de capilares, como medida para regular el flujo sanguíneo, fue propuesto por primera vez por *Krogh (1919)*. Este concepto ha sido retomado en la década de los 80 (*Weiss, 1988*). Sin embargo, *Villringer et al. (1994)*, utilizando microscopía confocal en muestras de cerebro de rata, observaron que los capilares, en este tejido y especie, no se cerraban ni abrían, sino que todos los observados presentaban flujo sanguíneo. Otros estudios tampoco han observado la existencia de una “reserva” de capilares no perfundidos a nivel cerebral que pudieran ser eventualmente reclutados para incrementar la perfusión del tejido (*Pawlik et al., 1981; Gobel et al., 1990; Vetterlein et al., 1990; Williams et al., 1993; Zoccoli et al., 2000*). Estos hallazgos confirmarían las descripciones realizadas por *Clark (1918)* referentes a la desaparición de los capilares en ausencia de circulación.

En el grupo de TCE estudiados hemos visto que existe un aumento de la distancia intercapilar, una disminución de la densidad vascular y una disminución de la densidad de PIVs. La consecuencia de todo ello podría ser el incremento de las distancias entre las neuronas y los capilares, con la consecuente dificultad de llegada de nutrientes a estas células. Esto podría facilitar, o agravar, el desarrollo de lesiones secundarias de tipo isquémico que están descritas en los individuos afectos de TCE (*Castejón, 1998*).

El incremento de la lacunaridad sería secundario a la edematización del tejido que, a su vez, provocaría tensión vascular con rotura de los PIVs. Esta tracción entre los vasos podría también facilitar la aparición de otras alteraciones vasculares, como pueden ser los microaneurismas.

La pérdida capilar, que puede ser de particular interés en la enfermedad de Alzheimer y en otras enfermedades neurodegenerativas, se ha relacionado con la edad y la consecuente disminución de la capacidad de angiogénesis en el cerebro. Se ha demostrado que la respuesta de *HIF-1* (*Hypoxia-inducible factor-1*) a la hipoxia disminuye con la edad (*Frenkel-Denkberg et al., 1999; Rivard et al., 2000*). También hay un defecto dependiente de la edad en la expresión de VEGF (factor de crecimiento endotelial) asociada con la reducción de la actividad HIF-1 (*Rivard et al., 2000*). Estos defectos pueden ser responsables de la disminución de la capacidad angiogénica cerebral relacionada con la edad (*Black et al., 1989; Rivard et al., 1999*). Además, los cambios relacionados con la edad en la función HIF-1 se ha asociado a pérdida neuronal en el cerebro de rata (*Rapino et al., 2005*). Por lo tanto, la pérdida capilar puede deberse a un fracaso relacionado con la edad, al fallo en la recuperación de episodios inducidos por hipoxia, a enfermedades neurodegenerativas o simplemente al envejecimiento. Tal fracaso de la regeneración capilar podría conducir a la pérdida de neuronas o disfunción y podría ser una parte importante de la llamada “pérdida de cerebro” que se ha propuesto se produce con el envejecimiento.

La evidencia actual sugiere que hay una disminución relacionada con la edad en la estructura microvascular. La disminución en la capacidad de la angiogénesis cerebrovascular puede dar como resultado un fallo vascular en la recuperación de episodios de pérdida capilar inducidos por la hipoxia en el envejecimiento, enfermedad de Alzheimer y leucoaraiosis (*Brown, 2011*).

Podemos decir, de forma general, que los PIVs ilustran cuándo y dónde hay destrucción o regresión capilar. Los mecanismos fisiopatológicos específicos que conducen a la pérdida capilar en los diferentes procesos neurodegenerativos varían con cada enfermedad en particular. Así, por ejemplo, en patologías crónicas es típico el aumento de PIVs debido a la pérdida de capilares funcionales, cosa que no se observa en nuestras muestras de TCE. Por el contrario, hemos detectado una disminución de su densidad acompañada de un incremento de los PIVs rotos, hecho que probablemente esté relacionado con el edema tisular.

Los PIVs podrían estar relacionados con el mantenimiento de la distancia intercapilar, independientemente de cuál sea su origen. Si esto se plantea así, los capilares aportan sus nutrientes a células inmersas en el espacio intercelular que quedan a una distancia determinada. En los TCE (como en otras patologías) existe isquemia (la principal causa de lesión secundaria, que determina la evolución y el pronóstico del traumático) y edema. Este último puede desestabilizar la angioarquitectura del córtex y producir así, más isquemia del tejido.

7.1. Otros hallazgos en relación al grupo TCE

Otras alteraciones encontradas en los capilares de las muestras de corteza cerebral obtenidas de individuos con TCE fue la presencia de dilataciones en el trayecto de los capilares, las cuales no presentaban células en su interior. Estas dilataciones han sido referidas por otros autores (*Ashton, 1951*) como fundamento de los microaneurismas, abogando en la teoría que el edema producido en la retinopatía diabética, así como el aumento de las distancias intercapilares, hacen que los PIVs ejerzan tracción sobre los capilares, deformándolos y produciendo estas dilataciones.

Es interesante el estudio de *Wolter y Arbor (1962)* en el que se postula que los PIVs están relacionados con la formación de microaneurismas observados durante la evolución de una retinopatía diabética. Así, los autores postularon que los microaneurismas se formaban por la tracción que producían los PIVs, determinada por el edema de la retina que tiene lugar durante este proceso patológico.

Algunos autores (*Challa et al., 2002, Moody et al 2004*) han observado dilataciones en el trayecto de algunos PIVs, las cuáles presentaban un diámetro de hasta 3-5 μ m. Los autores sugirieron que estas dilataciones podían ser consecuencia del núcleo de alguna célula, y no lo relacionaron con la posible formación de microaneurismas.

Nos parece muy importante destacar que existen trabajos en los cuáles se relaciona la formación de microaneurismas que aparecen en ciertas patologías, como la retinopatía diabética, con los PIVs. Si bien no se puede asegurar que los microaneurismas sean patognomónicos de esta patología, han sido descritos en retinas humanas de pacientes diabéticos (*Ashton, 1951*). También estudios más recientes los han relacionado con la edad (*López-Luppo et al., 2017*). Por estos motivos podemos

hipotetizar que pueda existir una relación entre estas dilataciones observadas, especialmente en el grupo de TCE, ya que la edad fue mayor en este grupo, así como la formación de microaneurismas, aunque para ello se requieran estudios complementarios que no han sido considerados en este trabajo.

Existen diferentes mecanismos involucrados en el desarrollo de microaneurismas. Entre los posibles contribuyentes se incluyen la muerte de pericitos y la proliferación endotelial (Cogan, 1963), la angiogénesis alterada y el daño a la membrana basal vascular (Little, 1981).

En la actualidad, todavía se debate sobre el mecanismo para la formación de microaneurismas y el conocimiento sobre el papel de la membrana basal de los vasos sanguíneos en el desarrollo de estas anomalías vasculares. El trabajo del grupo del profesor Ruberte (López-Luppo et al., 2017) nos acerca un poco más al conocimiento y la implicación que tienen ciertas estructuras vasculares en la producción de microaneurismas, ya sean en patologías como la retinopatía diabética o relacionados con la edad.

Mediante la técnica de moldes vasculares, utilizada por varios autores en el estudio de la microvascularización cerebral, tanto en humanos como en otras especies (Sbarbati et al., 1996; Rodríguez-Baeza et al., 1998), se han descrito otras alteraciones de la microvascularización cerebral.

En el estudio realizado por Rodríguez-Baeza et al. (2003) de los vasos de la corteza cerebral humana en pacientes fallecidos a consecuencia de la evolución de las lesiones secundarias después de sufrir un TCE grave, también se describieron una serie de alteraciones en la microvascularización que afectaban tanto a los capilares como a las arteriolas. Entre estas alteraciones morfológicas se encontraban los denominados “*vasos corrugados*”, que presentaban una evidente disminución del lumen. Estas alteraciones fueron observadas en ambos hemisferios cerebrales de forma difusa, y sin relación con la zona del traumatismo directo (lesión primaria).

En concordancia con estos datos, nosotros también hemos observado, mediante microscopía óptica de campo claro, y microscopía láser confocal, vasos de aspecto “*corrugado*”, siendo más frecuentes en las muestras del grupo TCE y sin relación directa con la zona del traumatismo, lo cual es coincidente con los hallazgos observados por Rodríguez-Baeza et al. (2003). Si tenemos en cuenta que en este

grupo la media de edad fue mayor respecto al grupo control, aunque no hubo una significación estadística, no podemos descartar que este parámetro, la edad, también esté relacionado con la formación de estas alteraciones en los capilares.

El fenómeno de “corrugación”, que lleva implícito una disminución del lumen vascular (*Rickels y Zumkeller, 1992*), ha sido justificado por la actividad de las células musculares lisas, cuya contracción sostenida en el vasoespasmo provoca la aparición de pliegues en la lámina elástica interna que afectan secundariamente al endotelio subyacente de los microvasos (*Kapp et al., 1982; Clower et al., 1994; Zhang et al., 1998*). Algunos autores apuntan que se deben a un vasoespasmo continuado después de la producción de hemorragias subaracnoideas (*Clower, 1994*) probablemente en relación a la presencia de sustancias vasoactivas.

Para *Wisniewski et al. (1995)*, la disposición y la contracción de las células musculares lisas determinan tres tipos morfológicos de vasoespasmo, los cuáles se manifiestan en la superficie endotelial. Sin embargo, con nuestras técnicas de estudio no hemos podido constatar que en las células musculares lisas de la pared microvascular existan signos de contracción, o incluso de degeneración y necrosis, de estas células como habían señalado otros autores (*Fein et al., 1974; Hall y Traystman, 1993*).

8. SOBRE EL PAPEL DE LOS PERICITOS EN RELACIÓN A LOS PIVS

Otra discusión relacionada con el cierre capilar es si estos vasos tienen tono o pueden contraerse. *Zweifach (1961)* sugirió que las células endoteliales presentan cierta actividad contráctil. Otros autores (*Tilton et al., 1979*) observaron que los pericitos de los capilares del músculo esquelético eran capaces de contraerse y reducir la luz vascular.

Los estudios *in vitro* de *Kelley et al., (1987)* apoyan la teoría de que los pericitos son células contráctiles y que las células endoteliales también pueden contribuir al tono microvascular. A su vez, en el trabajo de *Das et al. (1988)*, se observó que el ATP induce la contracción de los pericitos retinianos *in vitro*. *Tilton et al. (1979)*, también concluyeron que los pericitos son contráctiles. Sin embargo, ninguno de estos estudios demuestra que el tono capilar pueda determinar el cierre completo de estos vasos, produciendo la atresia vascular y formación de PIVs.

Los pericitos tienen un papel importante en la estabilización de los capilares. Kuwabara y Cogan (1963) observaron que la presencia de células murales (pericitos) parecía inhibir la angiogénesis. Y en el trabajo de Benjamin et al., (1998) se describe que, durante el desarrollo vascular retiniano, hay un retraso de varios días entre la formación de tubos endoteliales y la cobertura pericitica. Estos autores observaron que el VEGF aceleraba el recubrimiento de pericitos de los nuevos vasos.

Baluk et al. (2004) mostraron que después de la expresión de VEGF en el epitelio de las vías respiratorias, las células endoteliales brotaban de vénulas en un día, siendo estos brotes abundantes a los 3 a 5 días. A los 7 días tenían una capa de pericitos y una membrana basal delgada. Sorprendentemente unos pocos pericitos “puentearon” capilares adyacentes a través de largos procesos celulares. En los primeros 3 días de retirada del VEGF, la mitad de los nuevos vasos habían desaparecido. Los autores observaron inmovilización temprana del flujo sanguíneo, oclusión luminal, afluencia de células inflamatorias, retracción y apoptosis de células endoteliales y pericitos. Estos fenómenos dejaban abundantes PIVs.

Saint-Geniez y D'Amore (2004) describieron que las células endoteliales reclutaban pericitos por secreción de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor que estimula la proliferación de células mesenquimales y su quimiotaxis hacia células endoteliales. Esas células mesenquimales se diferenciaron en pericitos.

En el trabajo de Armulik et al. (2005), se hace referencia a que los pericitos son células que estabilizan la formación de la microvascularización, y que la cobertura de pericitos es más alta en el SNC donde pueden contribuir a la formación de la BHE. Sin embargo, la sola presencia de pericitos *per se* no es suficiente para dicha estabilización. Concluyen además que probablemente los pericitos influyan en la estabilidad de los vasos mediante la formación y organización de la matriz extracelular, así como en la promoción de la diferenciación y la quiescencia de las células endoteliales.

Parece demostrado que en ausencia de pericitos, las células endoteliales fracasan en la formación de las uniones estrechas, y los capilares se vuelven permeables. Además la superficie endotelial luminal se vuelve altamente irregular, con múltiples procesos y pliegues que pueden perjudicar el flujo sanguíneo (von Tell et al., 2006).

Estudios más actuales (*López-Luppo et al., 2017*) han puesto de manifiesto el papel de los pericitos, de la membrana basal, de la apoptosis y de diferentes rutas de señalización moleculares entre los distintos tipos celulares implicados en la génesis, mantenimiento formación de microaneurismas y regresión de la red capilar en retina.

En nuestro estudio hemos demostrado la presencia de células en la proximidad de los PIVs, similares a pericitos o derivados de los mismos. De hecho, la presencia de estas células en relación a los PIVs ha sido utilizada para realizar la clasificación de PIVs que hemos utilizado. Sin embargo, y debido a la naturaleza del estudio realizado y de la muestra evaluada, no hemos podido abordar la cuestión de si estas células, anexas a los PIVs, tienen o no una función contráctil. Para este fin sería necesaria la realización de estudios experimentales, como se ha hecho en retina de animales de experimentación.

9. SOBRE ALTERACIONES DE LA BHE Y LA MEMBRANA BASAL EN TCE

En estudios sobre corteza cerebral se señala que muchas situaciones patológicas del cerebro se asocian con anomalías estructurales y funcionales de su microvascularización. Muchas enfermedades manifiestan un proceso inflamatorio microvascular que afecta la permeabilidad y estructura de la BHE. Actualmente se ha prestado especial atención a la actividad inflamatoria de las células gliales en esas enfermedades, y a la secreción de mediadores inflamatorios por esas células. Sin embargo, el rol del endotelio en estos procesos no debe ser ignorado.

Hay autores que sugieren que la membrana basal mantiene un plano espacial, manteniendo la polaridad de forma específica, siendo así el sustrato para el crecimiento y la orientación. Además, podría tener un efecto de inducción y de restricción en la proliferación celular (*Ide et al., 1983*).

Denekamp (1993) señaló que la formación de un brote capilar implica la disolución localizada de la membrana basal, la migración de células endoteliales hacia el estímulo angiogénico y la proliferación de células endoteliales. Otros autores (*Inai et al., 2004*) describieron que la membrana basal, después de la pérdida capilar, podía proporcionar un andamio potencial para el rebrote de los vasos. Así mismo observaron que el cierre de los vasos precedía a la degeneración de las células endoteliales y

concluyeron que la pérdida de flujo sanguíneo podía conducir a la muerte de las células endoteliales del vaso afectado. *Kalluri, (2003)*, en su revisión, la describió como un apoyo estructural que dividiría los tejidos en compartimentos y contribuiría a la regulación del comportamiento celular. También observó que la membrana basal vascular actúa como sensor microambiental de las células endoteliales y de los pericitos. En lo que se refiere al proceso de angiogénesis, este mismo autor ha observado que los brotes endoteliales estarían cubiertos por membrana basal desde el principio, y se ha interpretado que los pericitos, cubiertos de membrana basal, pueden guiar el crecimiento de estos brotes.

En nuestro estudio y mediante TEM se ha puesto de manifiesto la presencia de alteraciones morfo-estructurales en la pared de los vasos de la microcirculación de la corteza cerebral humana de pacientes fallecidos a consecuencia de un TCE grave. También en las muestras de tejido de los sujetos controles se han observado alteraciones en todas las muestras evaluadas. Estas alteraciones estarían relacionadas con el proceso de degradación tisular post-mortem. Sin embargo, el grado de estas alteraciones ha sido variable en función de la degradación tisular producida desde la muerte hasta la fijación de la muestra. La estructura que aparentemente presenta alteraciones más específicas en los casos de TCE, y que se ve menos alterada por el proceso post-mortem, es posiblemente la membrana basal.

En efecto, las muestras de TCE presentaron con frecuencia alteraciones muy marcadas de la membrana basal, con desdoblamientos de esta que a menudo contenían elementos o restos celulares. Estos cambios eran menos frecuentes en las muestras de sujetos control, y aunque eventualmente presentaban vesículas en su interior, la membrana no llegaba a presentar el nivel de desestructuración observado en las muestras de TCE. Destacamos que en algunas de las muestras de TCE se observaron verdaderas soluciones de continuidad por las cuales se extendía material de la célula endotelial.

Los componentes vasculares de la membrana basal intervienen en la angiogénesis, tanto con factores pro- y anti-angiogénicos. Durante la degradación por metaloproteinasas de matriz, la membrana basal libera factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento endotelial (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Se ha demostrado que en presencia de VEGF, se inicia la angiogénesis, y en ausencia de VEGF, los capilares experimentarán una regresión apoptótica (*La Manna et al., 2003*).

Las alteraciones de la membrana basal probablemente estén relacionadas con procesos de degradación activa por parte de proteasas específicas, como son la MMP-9 o la MMP-2 (metaloproteinasas 9 o 2) (*Vajtr et al. 2009*), siendo estos procesos mucho menos susceptibles de darse por la simple degradación post-mortem.

La alteración de la membrana basal puede guardar relación con el aumento de la permeabilidad vascular y con la formación de edema vasogénico, que a su vez puede contribuir al incremento de la presión intracraneal y/o a la disminución del flujo a nivel capilar.

En relación al incremento de permeabilidad vascular se ha descrito que las células endoteliales incrementarían el número de vacuolas en su citoplasma y que parte del incremento de permeabilidad de la BHE se debería a un incremento de la trancitosis y no tanto a una apertura de las uniones estrechas (*Castejón 1984, 1985, 2013*). En nuestras muestras no es posible evaluar si hay un incremento de la trancitosis endotelial ya que el propio proceso post-mortem conlleva a la desestructuración del citoplasma y del componente endomembranoso.

Las uniones estrechas parecen ser resistentes a los cambios post-mortem y pueden ser evaluadas. En este sentido hemos podido observar, mediante TEM, uniones estrechas claramente abiertas en algunas muestras de TCE.

La valoración preliminar de las alteraciones morfológicas observadas pone de relieve el papel que éstas pueden jugar en la progresión de las temidas lesiones secundarias (isquemia cerebral, hipertensión intracraneal), que determinarían la evolución clínica de los pacientes con el resultado final de muerte neuronal (*Poca et al., 1996; Golding et al., 1999; Garcia-Salman y Córdoba-Ramos, 1999*).

Se ha postulado que en la fisiopatología de las lesiones secundarias del TCE está implicado el lecho vascular, ya sea por disfunciones a nivel del endotelio capilar y de la propia BHE (*Cervós-Navarro y Lafuente, 1991; Lafuente y Zarranz, 1998*), por vasoespasmo (*Bouma y Muizelaar, 1995*), o por la propia compresión mecánica (*Cervós-Navarro y Lafuente, 1991; Castejón, 1998*). En cualquier caso, estos mecanismos, todavía no bien conocidos, serían responsables de producir una alteración de la homeostasis, dejando a las neuronas en situación vulnerable respecto de sus requerimientos energéticos (*Maxwell et al., 1988*).

En los pacientes que sufren un TCE existen una serie de lesiones primarias que no son controlables. Sin embargo, son las lesiones que se desencadenan y evolucionan a partir del momento del impacto las que tienen una mayor significación para el diagnóstico, el pronóstico y la terapéutica (*Hall y Traystman, 1993*). Si la progresión de la muerte neuronal en el área de penumbra está directamente relacionada con la isquemia, cabe preguntarse el papel que juega la BHE, y en especial las células endoteliales, en este mecanismo.

En estudios experimentales en ratas a las que se les ha provocado un TCE (*Higashida et al., 2011*), se ha determinado el papel fundamental que desempeñan el HIF-1 α (*Hypoxia-inducible factor-1*) en la formación del edema cerebral y la alteración de la BHE a través de una cascada de vías moleculares que implican a AQP-4 (acuaporinas 4) y MMP-9, en la producción de las lesiones secundarias en el TCE. Se ha propuesto que el bloqueo farmacológico de esta vía en pacientes con TCE puede proporcionar una nueva estrategia terapéutica.

Esta alteración de la barrera se podría iniciar en las células endoteliales debido a estímulos no bien establecidos todavía, aunque se hayan identificado activadores de cascadas bioquímicas relacionadas con la apoptosis (aminoácidos excitotóxicos, radicales libres de O₂, óxido nítrico, mediadores inflamatorios) que son también relevantes en la fisiopatología de los TCE (*Poca et al., 1996; Eker et al., 1998*).

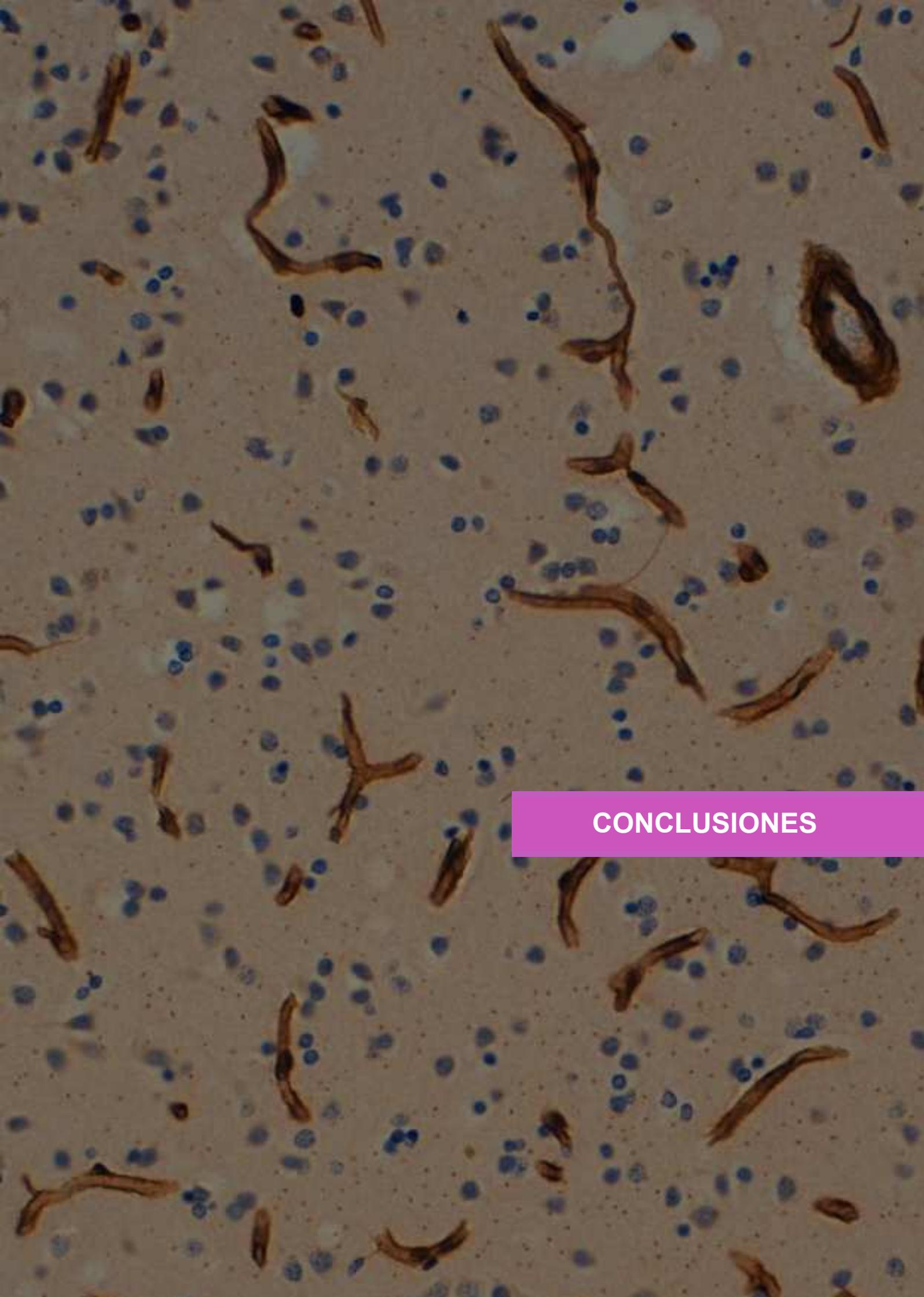
En este sentido se ha propuesto que la propia disminución del flujo sanguíneo cerebral puede producir daño anóxico local del endotelio, lo cual haría aumentar la permeabilidad de la BHE, y por lo tanto el edema local (*Cervós-Navarro y Lafuente, 1991; Lafuente y Zarranz, 1998*).

Para estos mismos autores, cualquier alteración de la BHE tiene como consecuencia la acumulación de líquido más o menos rico en proteínas en el espacio extravascular, el cuál ejerce un efecto masa que puede llegar a afectar la perfusión vascular regional produciendo isquemia secundaria, que a su vez incrementa el edema.

Los estudios realizados acerca del TCE en animales de experimentación demuestran cada vez más la implicación de las estructuras que conforman la BHE, y en especial de las células endoteliales, en la fisiopatología de las lesiones secundarias (*Maxwell et al., 1988; Vaz et al., 1998*).

La naturaleza y composición de los PIVs en la corteza cerebral humana ha sido el principal objetivo de este trabajo de investigación. Así, hemos descrito las variaciones en su densidad relativa entre los distintos lóbulos cerebrales, se ha propuesto una nueva clasificación y se ha establecido su relación con la densidad capilar y la lacunaridad del tejido. También se ha estudiado estas estructuras en muestras de pacientes fallecidos a consecuencia de un TCE, sugiriendo su implicación en la desestructuración de la microvascularización y evolución de las temidas lesiones secundarias.

Sin embargo, y con el propósito de profundizar en la implicación de estas estructuras en la fisiopatología del TCE, o en otras situaciones patológicas, puede ser de interés realizar estudios experimentales, los cuáles están fuera de los objetivos de este trabajo y que, por razones obvias, no son realizables en muestras de corteza cerebral humana.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En la corteza cerebral humana existen estructuras que, a modo de puente, se extienden entre vasos de la microcirculación, especialmente capilares. Hemos propuesto denominarlas en este trabajo “puentes intervasculares” (PIVs).
2. En la constitución de los PIVs participan el colágeno tipo IV y la laminina, principales componentes de la membrana basal vascular. Esta constitución nos permite considerarlos en continuidad con la membrana basal de los vasos de la microcirculación cerebral, pero carentes de luz.
3. La morfología, la localización y la constitución observada en los PIVs nos permite considerarlos como componentes normales de la anatomía microvascular de la corteza cerebral humana. Sin embargo, más estudios serán necesarios para conocer su origen y significado.
4. En ocasiones se observa uno o más desdoblamientos de la membrana en el trayecto de los PIVs, los cuáles pueden contener núcleos celulares. En estos casos las células pueden relacionarse con pericitos.
5. De acuerdo a la morfología observada en los PIVs, estos pueden clasificarse en “delgados” (tipo I) y “gruesos” (tipo II). Sin embargo, hemos preferido proponer una clasificación basada en la presencia de células anexas a los PIVs y a la integridad de los mismos. Esta clasificación considera 5 tipos de PIVs: tipo A, sin relación con células; de tipo B, con una célula en uno de sus extremos; de tipo C, con dos células, una en cada extremo; tipo D, con una célula situada en su parte central; y tipo E, que corresponden a puentes rotos o desestructurados.
6. El estudio estadístico realizado demostró diferencias en la densidad capilar y en la densidad de PIVs, siendo mayor ambas densidades en el grupo control. En contraposición, hubo mayor lacunaridad en el grupo TCE, y mayor proporción de PIVs del tipo E, lo cual sería indicativo de aumento del espacio intercapilar.

- 7.** La densidad capilar y la densidad de PIVs observados en el grupo control presentó una distribución homogénea entre los dos hemisferios y en los diferentes lóbulos cerebrales, con excepción del lóbulo temporal (región parahipocampal) en que era menor. Esta diferencia probablemente sea debida a la diferente citoarquitectura y angioarquitectura de esta región.
- 8.** La densidad de PIVs observada en el grupo TCE fue menor respecto al grupo control de forma significativa. Esta diferencia se mantuvo entre hemisferios y entre los diferentes lóbulos, a excepción del lóbulo occipital. Fue precisamente este lóbulo el que presentó menos lesiones en el grupo TCE.
- 9.** El estudio de correlación entre la densidad capilar y la densidad de PIVs en el grupo control mostró una correlación estadísticamente significativa, es decir, a mayor densidad capilar, mayor número de PIVs. Esta correlación, no fue tan evidente ni estadísticamente significativa en el grupo TCE.
- 10.** Las células anexas a los PIVs han sido consideradas similares a pericitos por sus características morfoestructurales y de localización, y pueden corresponderse a las denominadas *bridging cells* por otros autores.
- 11.** Al no haber observado una mayor densidad de PIVs en el grupo de TCE, podría indicar que los puentes forman parte de la estructura normal de la microvascularización de la corteza cerebral humana.
- 12.** En el grupo TCE, el aumento de la lacunaridad y la mayor proporción de PIVs del tipo E, lo relacionamos con una desestructuración de la microvascularización del parénquima cerebral lo cual favorecería la isquemia tisular.
- 13.** En el grupo TCE se observaron otras alteraciones vasculares, como fueron la presencia de dilataciones en las paredes de algunos microvasos que podrían corresponder a la formación de microaneurismas, así como la presencia de vasos de aspecto corrugado, compatible con vasos desestructurados.

14. Las alteraciones morfoestructurales observadas en la membrana basal vascular de la microvascularización en el grupo TCE, pueden justificar alguna de las lesiones secundarias que determinan la evolución de los pacientes neurotraumáticos.

15. Este estudio puede contribuir al conocimiento del rol que pueden tener los PIVs en patologías de tipo neurodegenerativas, como se ha propuesto recientemente en la enfermedad de Alzheimer entre otras.

PRINCIPIOS DE NEUROCIENCIA
Aplicaciones básicas y clínicas

CUARTA
EDICION

ELSEVIER
SAUNDERS

GRAY'S Anatomy

Henry Gray

FORTY-FIRST
EDITION

ELSEVIER

GRAY'S Clinical Neuroanatomy The Anatomic Basis for Clinical Neuroscience

SCHOONOVER

PORTRAITS OF THE MIND

Tubbs, Shoja,
and Loukas

Bergman's Comprehensive Encyclopedia of

HUMAN
ANATOMOMIC VARIATION

ARCÍA-PORRERO
HURLÉ

ANATOMÍA

H

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

Achúcarro, N. (1911). Darstellung von neugebildeten fäsern des gefäßbindegewebea in der hirnrinde eines falls von progressive paralyse, durch eine neue tannin-silbermethode. Zeitschrift fuer dies gestamte. Neurologie und Psychiatrie. 7: 375-383.

Achúcarro, N. (1913). Histologisches über gefässverödung und über ihre erweichung in der hirnrinde. Trabajos en laboratorio de Investigaciones Biológicas de la Universidad de Madrid. 11: 19-28.

Adams. (1956). Citado por Cammermeyer 1960.

Amprino, R. (1935). Transformazione della ghiandola pineale dell'uomo e degli animali nell'accrescimento e nella senescenza. Arch. Ital. Anat. Embriol. 34: 446-485.

Ando, M., Kakigi, A., Takeuchi, S. (1999). Elongated pericyte-like cells connect discrete capillaries in the cochlear stria vascularis of gerbils and rats. Cell Tissue Res. 296 (3):673-6.

Archambeau, J.O., Mao, X.W., McMillan, P.J., Gouloumet, V.L., Oeinck, S.C., Grove, R., Yonemoto, L.T., Slater, J.D., Slater, J.M. (2000). Dose response of rat retinal microvessels to proton dose schedules used clinically: a pilot study. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 48: 1155-1166.

Archer, D.B. (1993). Doyne Lecture. Responses of retinal and choroidal vessels to ionising radiation. Eye (Lond). 7 (Pt 1):1-13.

Archer, D.B., Amoaku, W.M., Gardiner, T.A. (1991). Radiation retinopathy-clinical, histopathological, ultrastructural and experimental correlations. Eye (Lond). 5 (Pt 2): 239-251.

Armulik, A., Abramsson, A., Betsholtz, C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. Circ. Res. 97: 512-523.

Armulik, A., Genové, G., Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. Dev. Cell. 21(2):193-215.

Asahi, M., Wang, X., Mori, T., Sumii, T., Jung, J.C., Moskowitz, M.A., Fini, M.E., Lo, E.H. (2001). Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. J. Neurosci. 21 (19): 7724-7732.

- Ashton, N. (1951). Retinal micro-aneurysms in the non-diabetic subject. *Br. J. Ophthalmol.* 35: 189-212.
- Ashton, N. (1953). Arteriolar involvement in diabetic retinopathy. *Br. J. Ophthalmol.* 37: 282-292.
- Ashton, N. (1963). Studies of the retinal capillaries in relation to diabetic and other retinopathies. *Br. J. Ophthalmol.* 47: 521-538.
- Ashton, N., Pedler, C. (1962). Studies on developing retinal vessels: IX. Reaction of endothelial cells to oxygen. *Br. J. Ophthalmol.* 46: 257-276.
- Ashton, N., Tripathi, R. (1975). Perivascular and intervascular reticular fibers of the retina. *Am. J. Ophthalmol.* 80 (3): 337-359.
- Astrup, J., Symon, L., Branston, N.M., Lassen, N.A. (1977). Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke.* 8 (1): 51-57.
- Baluk, P., Lee, C.G., Link, H., Ator, E., Haskell, A., Elias, J.A., McDonald, D.M. (2004). Regulated angiogenesis and vascular regression in mice overexpressing vascular endothelial growth factor in airways. *Am. J. Pathol.* 165: 1071-1085.
- Baluk, P., Morikawa, S., Haskell, A., Mancuso, M., McDonald, D.M. (2003). Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am. J. Pathol.* 163 (5): 1801-1815.
- Bannister, R.G., Romanul, F.C. (1963). The localization of alkaline phosphatase activity in cerebral blood vessels. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 26: 333-340.
- Belfort, D., Gole, G., Rush, R. (1987). Localization of laminin to retinal vessels of the rat and mouse using whole mounts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 28: 1761-1766.
- Benjamin, L.E., Hemo, I., Keshet, E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development.* 125: 1591-1598.
- Biggart, J.H. (1936). *Pathology of the Nervous System.* Edinburgh: E and S Livingstone.
- Binswanger, O., Schaxel, J. (1917). Beitrage zur normalen und pathologischen Anatomie der Arterien des Gehirns. *Eur. Arch. Psychiatry. Clin. Neurosci.* 58:141-187.
- Black, J.E., Polinsky, M., Greenough, W.T., (1989). Progressive failure of cerebral angiogenesis supporting neural plasticity in aging rats. *Neurobiol. Aging.* 10: 353-358.

Bohle, A., Herfarth, C. (1958). Zur Frage eines intercapillaren Bindegewebes im Glomerulum der Niere des Menschen. *Virchows Arch. Pathol. Anat.* 331: 573-590.

Bölönyi, F. (1958). Study of the reticulin fibers in brain tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 17: 240-246.

Bölönyi, F., Földes, I. (1954). Changes in the argyrophilic fibre meshwork of the cerebrals vessels under experimental and pathological conditions. *Acta Morphol. Hung.* 4: 138.

Bouma, G.J., Muizelaar, J.P. (1995). Cerebral blood flow in severe clinical head injury. *New Horiz.* 3: 384-394.

Breteler, M.M. (2000). Vascular involvement in cognitive decline and dementia. Epidemiologic evidence from the Rotterdam Study and the Rotterdam Scan Study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 903: 457-465.

Brown, W.R. (2010). A review of string vessels or collapsed, empty basement membrane tubes. *J. Alzheimers Dis.* 21(3): 725-739.

Brown, W.R., Blair, R.M., Moody, D.M., Thore, C.R., Ahmed, S., Robbins, M.E., Wheeler, K.T. (2007). Capillary loss precedes the cognitive impairment induced by fractionated whole-brain irradiation: a potential rat model of vascular dementia. *J. Neurol. Sci.* 257: 67-71.

Brown, W.R., Moody, D.M., Thore, C.R., Anstrom, J.A., Challa, V.R. (2009). Microvascular changes in the white mater in dementia. *J. Neurol. Sci.* 283: 28-31.

Brown, W.R., Moody, D.M., Thore, C.R., Challa, V.R., Anstrom, J.A. (2007). Vascular dementia in leukoaraiosis may be a consequence of capillary loss not only in the lesions, but in normal-appearing white matter and cortex as well. *J. Neurol. Sci.* 257: 62-66.

Brown, W.R., Thore, C.R. (2011). Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 37: 56-74.

Buée, L., Hof, P.R., Bouras, C., Delacourte, A., Perl, D.P., Morrison, J.H., Fillit, H.M. (1994). Pathological alterations of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease and related dementing disorders. *Acta Neuropathol.* 87(5): 469-480.

Buée, L., Hof, P.R., Delacourte, A. (1997). Brain microvascular changes in Alzheimer's disease and other dementias. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 826: 7-24.

Bullock, R., Maxwell, W.L., Graham, D.I., Teasdale, G.M., Adams, J.H. (1991). Glial swelling following human cerebral contusion: an ultrastructural study. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 54 (5): 427-434.

Büttner, A., Kroehling, C., Mall, G., Penning, R., Weis, S. (2005). Alterations of the vascular basal lamina in the cerebral cortex in drug abuse: a combined morphometric and immunohistochemical investigation. *Drug and Alcohol Dependence.* 79: 63-70.

Cammermeyer, J. (1960). A comparative study of intervascular connective tissue Strands in the Central Nervous System. *J. Comp. Neurol.* 114: 189-&.

Cammermeyer, J. (1965). Cerebral intervascular strands of connective tissue as routes -of transportation. *Anat. Rec.* 151: 251–259.

Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 438: 932-936.

Carmeliet, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 407: 249-257.

Carson, K.A., Bossen, E.H., Hanker, J.S. (1980). Peripheral neuropathy in mouse hereditary diabetes mellitus. II. Ultrastructural correlates of degenerative and regenerative changes. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 6 (5): 361-74.

Cassot F., Lauwers, F., Lorthois, S., Puwanarajah, P., Duvernoy, H. (2010). Branching patterns for arterioles and venules of the human cerebral cortex. *Brain Res.* 1313: 62-68.

Castejón, O.J. (1984). Increased vesicular and vacuolar transport in traumatic human brain edema. A combined electron microscopic study and theoretical approach. *J. Submicrosc. Cytol.* 16 (2): 359-369.

Castejón, O.J. (1985). Electron microscopic observations of endothelial junctions in perifocal human brain edema. An interpretative study. *J. Submicrosc. Cytol.* 17 (1): 105-114.

Castejón, O.J. (1988). Ultrastructural alterations of human cortical capillary basement membrane in perifocal brain edema. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 20(3):519-536.

Castejón, O.J. (1998). Electron microscopic analysis of cortical biopsies in patients with traumatic brain injuries and dysfunction of neurobehavioural system. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 30: 145-156.

Castejón, O.J., Castejón, H.V., Díaz, M., Castellano, A. (2001). Consecutive light microscopy, scanning-transmission electron microscopy and transmission electron microscopy of traumatic human brain oedema and ischaemic brain damage. *Histol. Histopathol.* 16(4): 1117-1134.

Castejón, O.J. (2013). Increased vesicular and vacuolar transendothelial transport in traumatic human brain oedema. A review. *Folia Neuropathol.* 51 (2): 93-102.

Castejón, O.J. (2014). Ultrastructural alterations of human cortical capillary basement membrane in human brain oedema. *Folia Neuropathol.* 52 (1): 10-21.

Castejón, O.J., Castejón, H.V., Diaz, M., Castelano, A. (2001). Consecutive light microscopy, scanning-transmission electron microscopy and transmission electron microscopy of traumatic human brain oedema and ischaemic brain damage. *Histol. Histopathol.* 16 (4): 1117-1134.

Castejón, O.J., Valero, C.J. (1980). Scanning electron microscopy of human cerebellar cortex. *Cell. Tissue Res.* 212 (3): 363-377.

Cervós-Navarro, J., Lafuente, J.V. (1991). Traumatic brain injuries: structural changes. *J. Neurol. Sci.* 103: 3-14.

Challa, V.R., Thore, C.R., Moody, D.M., Anstrom, J.A., Brown, W.R. (2004). Increase of white matter string vessels in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 6: 379-383.

Challa, V.R., Thore, C.R., Moody, D.M., Brown, W.R., Anstrom, J.A. (2002). A three-dimensional study of brain string vessels using celloidin sections stained with anti-collagen antibodies. *Journal Neurol. Sci.* 203-204: 165-167.

Clark, E.R. (1918). Studies on the growth of blood vessels in the tail of the frog larva by observation and experiment on the living animal. *Am. J. Anat.* 23: 37-88.

Clower, B.R., Smith, R.R., Haining, J.L., Lockard, J. (1981). Constrictive Endarteropathy Following Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke.* 12: 501-508.

Clower, B.R., Yamamoto, Y., Cain, L., Haines, D.E., Smith, R.R. (1994). Endothelial Injury Following Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Rats: Effects on Brain Blood Flow. *Anat. Rec.* 240: 104-114.

Cogan, D.G. (1963). Development and senescence of the human retinal vasculature. *Trans. Ophthalmol. Soc .U.K.* 83: 465-489.

Cogan, D.G., Kuwabara, T. (1984). Comparison of retinal and cerebral vasculature in trypsin digest preparations. *Br. J. Ophthalmol.* 68(1):10-12.

Coob, S. (1931). The cerebral circulation. The question of "end arteries" of the brain and the mechanism of infarction. *AMA. Arch. Neurol. Psychiat.* 25: 273-280.

Copin, J.C., Gasche, Y. (2003). Morphology and physiology of the blood-brain barrier. *Ann. Fr. Anesth. Reanim.* 22(3): 202-14.

Cornford, E.M., Hyman, S. (2005). Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx.* 2(1): 27-43.

Cragie, E.H. (1921). The vascularity of the cerebral cortex of the albino rat. *J. Comp. Neurol.* 33: 193-212.

Cragie, E.H. (1945). The architecture of the cerebral capillary bed. *Biol. Rev.* 20: 133-146.

Cuevas, P., Gutierrez, J.A., Reimers, D., Dujovny, M., Díaz, F.G., Ausman, J.I. (1984). Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. *Anat. Embryol.* 170: 155-159.

Daicker, B. (1971). The adventitional and intervascular reticulin fibers of the human retina. *Albrecht Von Graefes. Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* 181(3): 179-191.

Das, A., Frank, R.N., Weber, M.L., Kennedy, A., Reidy, C.A., Mancini, M.A. (1988). ATP causes retinal pericytes to contract in vitro. *Exp. Eye Res.* 46:349-362.

Dauber, W. (2006). *Nomenclatura Anatómica Ilustrada.* 5a ed. Masson: Elseiver. Barcelona.

De la Torre, J.C. (2002). Vascular basis of Alzheimer's pathogenesis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 977: 196-215.

De Venecia, G., Davis, M., Engerman, R. (1976). Clinicopathologic correlations in diabetic retinopathy I. Histology and fluorescein angiography of microaneurysms. *Arch. Ophthalmol.* 94:1766-1773.

De Vries, H.E., Kuiper, J., de Boer, A.G., Van Berkel, T.J., Breimer, D.D. (1997). The blood-brain barrier in neuroinflammatory diseases. *Pharmacol. Rev.* 49(2): 143-155.

Delorme, P., Grignon, G. (1978). An autoradiographic study on the biosynthesis of the capillary basal lamina in the chick embryo telencephalon. *Cell. Tissue Res.* 192(2): 299-308.

Denekamp, J. (1993). Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as targets for cancer therapy. *Br. J. Radiol.* 66: 181-196.

Dickstein, D.L., Walsh, J., Brautigam, H., Stockton, S.D., Gandy, S., Hof, P.R. (2010). Role of vascular risk factors and vascular dysfunction in Alzheimer's disease. *Mt. Sinai J. Med.* 77 (1): 82-102.

Dublín. (1954). Citado por Cammermeyer 1960.

Duvernoy, H.M., Delon, S., Vannson, J.L. (1981). Cortical blood vessels of the human brain. *Brain Res. Bull.* 7: 519-579.

Eker, C., Asgeirsson, B., Grande, P.O., Schalen, W., Nordstrom, C.H. (1998). Improved outcome after severe head injury with a new therapy based on principles for brain volume regulation and preserved microcirculation. *Crit. Care Med.* 26: 1881-1886.

Farkas, E., Luiten, P. (2001). Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog. Neurobiol.* 64: 575-611.

Farnoud, M.R., Lissak, B., Kujas, M., Peillon, F., Racadot, J. Li, J.Y. (1992). Specific alterations of the basement membrane and stroma antigens in human pituitary tumours in comparison with the normal anterior pituitary. An immunocytochemical study. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.* 421 (6): 449-55.

Fein, J.M., Flor, W.J., Cohan, S.L., Parkhurst, J. (1974). Sequential changes of vascular ultrastructure in experimental cerebral vasospasm. *J. Neurosurg.* 41: 49-58.

Fischer, V.W., Siddiqi, A., Yusufaly, Y. (1990). Altered angiorchitecture in selected areas of brains with Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 79: 672-679.

Frenkel-Denkberg, G., Gershon, D., Levy, A.P. (1999). The function of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is impaired in senescent mice. *FEBS Lett.* 462: 341-344.

García-Porrero, J.A., Hurlé, J.M. (2005). *Anatomía Humana*. Ed. McGraw-Hill Interamericana de España. Madrid.

García-Salman, J.D., Córdoba-Ramos, M. (1999). The pathological and the compensatory in cerebral ischemia: molecular aspects. *Rev. Neurol.* 28(8): 786-792.

Gaudio, E., Pannarale, L., Caggiati, A., Marinozzi, G. (1990). A three-dimensional study of the morphology and topography of pericytes in the microvascular bed of skeletal muscle. *Scanning Microsc.* 4(2): 491-500.

Ge, S., Song, L., Pachter, J.S. (2005). Where is the blood-brain barrier ... really?. *J. Neurosci. Res.* 79 (4): 421-427.

Gellerstedt, N. (1933). Zur Kenntnis der Hirnveränderungen bei der normales Altersinvolution. *Upsala läkaref förh.* 38: 191-408.

Gerhardt, H., Betsholtz, C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell. Tissue Res.* 22: 15-23.

Gobel, U., Theilen, H., Kuschinsky, W. (1990). Congruence of total and perfused capillary network in rat brains. *Circ. Res.* 66: 271-281.

Golding, E.M., Robertson, C.S., Bryan, R.M. (1999). The consequences of traumatic brain injury on cerebral blood flow and autoregulation: a review. *Clin. Exp. Hypertens.* 21: 299-332.

Graham, D.I., Adams, J.H. (1971). Ischaemic brain damage in fatal head injuries. *Lancet.* 1(7693): 265-266.

Graham, D.I., Adams, J.H., Doyle, D. (1978). Ischaemic brain damage in fatal non-missile head injuries. *J. Neurol. Sci.* 39: 213-34.

Graham, D.I., Ford, I., Adams, J.H., Doyle, D., Teasdale, G.M., Lawrence, A.E., McLellan, D.R. (1989). Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 52: 346-350.

Graham, D.I., Lawrence, A.E., Adams, J.H., Doyle, D., McLellan, D.R. (1987). Brain damage in non-missile head injury secondary to high intracranial pressure. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 13(3):209-217.

Graham, R.C., Karnovsky, M.J. (1966). Glomerular permeability. Ultrastructural cytochemical studies using peroxidases as protein tracers. *J. Exp. Med.* 124 (6): 1123-1134.

Guan, J., Pavlovic, D., Dalkie, N., Waldvogel, H.J., O'Carroll, S.J., Green, C.R., Nicholson, L.B. (2013). Vascular degeneration in Parkinson's disease. *Brain Pathol.* 23: 154-164.

Guseo, A., Gallyas, F. (1974). Intercapillary bridges and the development of brain capillaries. In *Pathology of cerebral microcirculation*, J. Cervós-Navarro, ed. (Berlin, N.Y: de Gruyter): 448-453.

Hall, E.D., Traystman, R.J. (1993). Secondary tissue damage after CNS injury. in: *current concepts*. Ed. Kalamazoo (Michigan): The Upjohn Company: 1-27.

Hallervorden. (1930). Citado por Cammermeyer 1960.

Harris. (1955). Citado por Cammermeyer 1960.

Hassell, J.R., Leyshon, W.C., Ledbetter, S.R., Tyree, B., Suzuki, S., Kato, M., Kimata, K., Kleinman, H.K. (1985). Isolation of two forms of basement membrane proteoglycans. *J. Biol. Chem.* 260(13): 8098-8105.

Henle, F.G. (1838). Ueber die Ausbreitung des Epithelium im menschlichen Körper. *J. Müller Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.* 102–128.

Higashida, T., Kreipke, C.W., Rafols, J.A., Peng, C., Schafer, S., Schafer, P., Ding, J.Y., Dornbos, D., Li, X., Guthikonda, M., Rossi, N.F., Ding, Y. (2011). The role of hypoxia-inducible factor-1 α , aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 in blood-brain barrier disruption and brain edema after traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* 114(1): 92-101.

Hubel, D.H., Wiesel, T.N. (1962). Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *J. Physiol.* 160: 106-154.

Hughes, S., Chan-Ling, T. (2004). Characterization of smooth muscle cell and pericyte differentiation in the rat retina in vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45(8): 2795-2806.

Hunter, J.M., Kwan, J., Malek-Ahmadi, M., Maarouf, C.L., Kokjohn, T.A., Belden, C., Sabbagh, M.N., Beach, T.G., Roher, A.E. (2012). Morphological and pathological evolution of the brain microcirculation in aging and Alzheimer's disease. *PLoS One.* 7(5): e36893.

Hutchings, M., Weller, R.O., Path, F.R. (1986). Anatomical relationships of the pia mater to cerebral blood vessels in man. *J. Neurosurg.* 65: 316-325.

Ide, C., Tohyama, K., Yokota, R., Nitatori, T., Onodera, S. (1983). Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res.* 288: 61–75.

Imayama, S., Urabe, H. (1984). Pericytes on the dermal microvasculature of the rat skin. *Anat. Embryol.* 169: 271-274.

Inai, T., Mancuso, M., Hashizume, H., Baffert, F., Haskell, A., Baluk, P., Hu-Lowe, D.D., Shalinsky, D.R., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., McDonald, D.M. (2004). Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am. J. Pathol.* 165: 35–52.

Johnson, P.C., Brendel, K., Meezan, E. (1982). Thickened cerebral cortical capillary basement membranes in diabetics. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 106 (5): 214-217.

Jones, E.G. (1970). On the mode of entry of blood vessels into cerebral cortex. *J. Anat.* 106: 507-520.

Kalaria, R.N., Hedera, P. (1995). Differential degeneration of the cerebral microvasculature in Alzheimer's disease. *Neuroreport*. 6: 477-480.

Kalaria, R.N., Kroon, S.N. (1992). Expression of leukocyte antigen CD34 by brain capillaries in Alzheimer's disease and neurologically normal subjects. *Acta Neuropathol*. 84: 606-612.

Kalaria, RN. (1992). The blood-brain barrier and cerebral microcirculation in Alzheimer disease. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev*. 4: 226-260.

Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer*. 3: 422-433.

Kamba, T., Tam, B.Y., Hashizume, H., Haskell, A., Sennino, B., Mancuso, M.R., Norberg, S.M., O'Brien, S.M., Davis, R.B., Gowen, L.C., Anderson, K.D., Thurston, G., Joho, S., Springer, M.L., Kuo, C.J., McDonald, D.M. (2006). VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol*. 290: 560-576.

Kamei, M., Saunders, W.B., Bayless, K.J., Dye, L., Davis, G.E., Weinstein, B.M. (2006). Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature*. 442: 453-456.

Kapp, J.P., Neill, V.R., Neill, C.L., Hodges, L.R., Smith, R.R. (1982). The three phases of vasoospasm. *Surg, Neurol*. 18: 40-45.

Katayama, Y., Mori, T., Maeda, T., Kawamata, T. (1998). Pathogenesis of the mass effect of cerebral contusions: rapid increase in osmolality within the contusion necrosis. *Acta Neurochir, Suppl*. 71: 289-292.

Keidel and Stude (2002) *Encyclopedia of the Human Brain*, vol 1. Elsevier Science. 529-544.

Kelley, C., D'Amore, P., Hechtman, H.B., Shepro, D. (1987). Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall. *J. Cell. Biol*. 104: 483-490.

Klatzo, I. (1987). Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol*. 72 (3): 236-239.

Kohner, E.M., Henkind, P. (1970). Correlation of fluorescein angiogram and retinal digest in diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol*. 69: 403-414.

Kornzweig, A.L., Eliasoph, I., Feldstein, M. (1964). Retinal vasculature in the aged. *Bull. N.Y. Acad. Med*. 40: 116-129.

Krogh, A. (1919). The supply of oxygen to the tissues and the regulation of the capillary circulation. *J. Physiol.* 52: 457-474.

Krucker, T., Schuler, A., Meyer, E.P., Staufenbiel, M., Beckmann, N. (2004). Magnetic resonance angiography and vascular corrosion casting as tools in biomedical research: application to transgenic mice modeling Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* 26(5): 507-516.

Kuwabara, T., Cogan, D.G. (1960). Studies of Retinal Vascular Patterns. 1. Normal Architecture. *Arch. Ophthalmol.* 64: 904-911.

Kuwabara, T., Cogan, D.G. (1963). Retinal vascular patterns. VI. Mural cells of the retinal capillaries. *Arch. Ophthalmol.* 69: 492-502.

La Manna, J.C., Chávez, J.C., Pichiule, P. (2004). Structural and functional adaptation to hypoxia in the rat brain. *J. Exp. Biol.* 207 (18): 3163-3169.

Lafuente, J.V., Zarranz, J.J. (1998). Biopatología de los traumatismos craneoencefálicos: modelos experimentales. *Rev. Neurol.* 26: 224-232.

Lange, W., Halata, Z. (1979). Comparative studies on the pre and postterminal blood vessels in the cerebellar cortex of rhesus monkey, cat and rat. *Anat. Embryol.* 158: 51-62.

Lasjunias, P., Berstein, A. (1990). *Surgical Neuroangiography. Vol.3: Functional vascular anatomy of brain, spinal cord and spine.* Berlin: Springer.

Launer, L.J. (2002). Demonstrating the case that AD is a vascular disease: epidemiologic evidence. *Ageing Res. Rev.* 1: 61-77.

Lauwers, F., Cassot, F., Lauwers-Cances, V., Puwanarajah, P., Duvernoy, H. (2008). Morphometry of the human cerebral cortex microcirculation: general characteristics and space-related profiles. *Neuroimage.* 39: 936-948.

Lazorthes, G., Espagno, J., Lazorthes, Y., Zadeh J.O. (1968). The vascular architecture of the cortex and the cortical blood flow. *Prog. Brain Res.* 30: 27-32.

Lazorthes, G., Gouazé, A., Salomon, G. (1976). *Vascularisation et circulation de l'encephale.* Paris: Masson.

Leblond, C.P., Glegg, R.E., Eidinger, D. (1957). Presence de carbohydrates with free 1,2-glycol groups in sites stained by the periodic acid-Schiff technique. *J. Histochem. Cytochem.* 5: 445-458.

Leibnitz, L. (1975). Capillary vessels connecting cells in rat brain. *J. Hirnforsch.* 16 (4): 287-292.

Leibnitz, L., Bär, B. (1988). A blood capillaries-bridging cell type in adult mammalian brains. *J. Hirnforsch.* 29: 367-375.

Leker, R.R., Shohami, E. (2002). Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 39(1): 55-73.

Lewy. (1925). Citado por Cammermeyer 1960.

Ley 14/1986, de 25 de abril, General de Sanidad. BOE 102 de 29/04/1986, pag 15207-15224 <https://www.boe.es>

Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica. BOE 159 de 04/07/2007 Sec 1, pag 28826-28848 <https://www.boe.es>

Ley 41/2002, de 14 de noviembre, Básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica. BOE 274 de 15/11/2002, pag 40126-40132 <https://www.boe.es>

Little, H.L.(1981). Alterations in blood elements in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Ophthalmol.* 88: 647-654.

Llombart, C. (2007). Puentes intervasculares de la retina. Caracterización morfológica e implicación en la patogenia de la retinopatía proliferativa. Tesis doctoral. UAB.

López-Luppo, M., Catita, J., Ramos, D., Navarro, M., Carretero, A., Mendes-Jorge, L., Muñoz-Cánoves, P., Rodríguez-Baeza, A., Nacher, V., Ruberte, J. (2017). Cellular senescence is associated with human retinal microaneurysms formation during aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58: 2832-2842.

López-Luppo, M., Nacher, V., Ramos, D., Catita, J., Navarro, M., Carretero, A., Rodríguez-Baeza, A., Mendes-Jorge, L., Ruberte, J. (2017). Blood vessel basement membrane alterations in human retinal microaneurysms during aging. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 58: 1116-1131.

Lu, M., Zhang, Z.G., Chopp, M. (2004). Analysis of cerebral microvascular architecture-application to cortical and subcortical vessels in rat brain. *J. Neurosci. Meth.* 138: 81-87.

Mancall, E., Brock, D. (2011). Gray's. Clinical Neuroanatomy. The basis for clinical neuroscience. Elsevier-Saunders. Philadelphia.

Mancuso, M.R., Davis, R., Norberg, S.M., O'Brien, S., Sennino, B., Nakahara, T., Yao, V.J., Inai, T., Brooks, P., Freimark, B., Shalinsky, D.R., Hu-Lowe, D.D., McDonald, D.M. (2006). Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. *J. Clin. Invest.* 116: 2610-2621.

Mao, X.W., Archambeau, J.O., Kubinova, L., Boyle, S., Petersen, G., Grove, R. (2003). Quantification of rat retinal growth and vascular population changes after single and split doses of proton irradiation: translational study using stereology methods. *Radiat. Res.* 160: 5-13.

Markiewicz. (1937). Citado por Cammermeyer, 1960.

Maxwell, W.L., Irvine, A., Adams, J.H., Graham, D.I., Gennarelli, T.A. (1988). Response of cerebral microvasculature to brain injury. *J. Pathol.* 155: 327-335.

McDonald, D.M., Choyke P.L. (2003). Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat. Med.* 9 (6): 713-725.

McGeer, P.L., Zhu, S.G., Dedhar, S. (1990). Immunostaining of human brain capillaries by antibodies to very late antigens. *J. Neuroimmunol.* 26: 213–218.

Mendes-Jorge, L., Llombart, C., Ramos, D., López-Luppo, M., Valença, A., Nacher, V., Navarro, M., Carretero, A., Méndez-Ferrer, S., Rodríguez-Baeza, A., Ruberte, J. (2012). Intercapillary bridging cells: Immunocytochemical characteristics of cells that connect blood vessels in the retina. *Exp. Eye Res.* 98: 79- 87.

Millen, J.W., Woollan, D.H. (1961). On the nature of the pia mater. *Brain.* 84: 514-520.

Moody, D.M., Thore, C.R., Anstrom, J.A., Challa, V.R., Langefeld, C.D., Brown, W.R. (2004). Quantification of afferent vessels shows reduced brain vascular density in subjects with leukoaraiosis. *Radiol.* 233: 883–890.

Moschowitz. (1949). Citado por Cammermeyer 1960.

Mott, R.T., Thore, C.R., Moody, D.M., Glazier, S.S., Ellis, T.L., Brown, W.R. (2009). Reduced ratio of afferent to total vascular density in mesial temporal sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68: 1147–1154.

Mountcastle, V.B. (1957). Modality and topographic properties of single neurons of cat's somatic sensory cortex. *J. Neurophysiol.* 20(4): 408-834.

Nag, S. (2003). Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. *Methods Mol. Med.* 89: 3-36.

Neubürger. (1930). Citado por Cammermeyer 1960.

Noble, L.J., Fleury, V., Pries, A., Corvol, P., Eichmann, A., Reneman, R.S. (2005). Control of arterial branching morphogenesis in embryogenesis: go with the flow. *Cardiovasc. Res.* 65 (3): 619-628.

Nodström, C.H., Rehnström, S., Siesjö, B.R. (1990). Cerebral Metabolism. In: Youmas JR, ed. *Neurological Surgery*. Philadelphia: WB Saunders. 623-651.

Obersteiner. (1908). Citado por Cammermeyer 1960.

Orts Llorca, F. (1986). *Anatomía Humana*. Vol.2. Madrid: Científico-médica.

Pais, V., Danaila, L., Pais, E. (2013). Cordocytes-stem cells cooperation in the human brain with emphasis on pivotal role of cordocytes in perivascular areas of broken and thrombosed vessels. *Ultrastruct. Pathol.* 37(6): 425-432.

Paku, S. (1998). Current concepts of tumor-induced angiogenesis. *Pathol. Oncol. Res.* 4 (1): 62-75.

Paku, S., Paweletz, N. (1991). First steps of tumor-related angiogenesis. *Lab. Invest.* 65 (3): 334-346.

Paulus W, Roggendorf W, Schuppan D. (1988). Immunohistochemical investigation of collagen subtypes in human glioblastomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 413(4): 325-332.

Pawlik, G., Rackl, A., Bing, R.J. (1981). Quantitative capillary topography and blood flow in the cerebral cortex of cats: an in vivo microscopic study. *Brain Res.* 208: 35–58.

Perlmutter, L.S., Chui, H.C. (1990). Microangiopathy, the vascular basement membrane and Alzheimer's disease: a review. *Brain Res. Bull.* 24: 677-686.

Peters, A., Palay, S.L., Webster, H.F. (1991) *The fine structure of the nervous system: neurons and their supporting cells*. Oxford University Press, New York.

Pette, E., Pette, H., Bauer, H. (1959). On the etiology and pathogenesis of multiple sclerosis. I. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 13(84): 2061-2066.

Pfeifer, R.A. (1928). Citado por Lazorthes et al. (1976).

Pfister, F., Feng, Y., von Hagen, F., Hoffmann, S., Molema, G., Hillebrands, J.L., Shani, M., Deutsch, U., Hammes, H.P. (2008). Pericyte migration: a novel mechanism of pericyte loss in experimental diabetic retinopathy. *Diabetes.* 57(9): 2495-2502.

Pitts, L.H., McIntosh, T.K. (1990). Dinamyc changes after brain trauma. In: R. Braakman (ed.), Handbook of clinical neurology. N.Y.: Elsevier Science Publishers. B.V. 65-100.

Plenk, H. (1927). Uber argyrophilen Fasern (Gitterfasern) und ihre Bildungszellen. Erg. Anat. 27: 302-412.

Poca, M.A., Sahuquillo, J., Munar, F., Ferrer, A., Auxina, A., Rubio, E. (1996). Nuevas perspectivas en el tratamiento médico de los traumatismos craneoencefálicos. En: Net A, Marruecos-Sant N, eds. Traumatismo craneoencefálico grave. Barcelona: Springer-Verlag. 208-229.

Prados, M., Swank, R.L. (1942). Vascular and interstitial cell changes in thiamin-deficient animals. Arch. Neurol. Psychiatry. 47: 626-644.

Preston, E, Sutherland, G., Finsten, A. (1993). Three openings of the blood-brain barrier produced by forebrain ischemia in the rat. Neurosci. Lett. 149 (1): 75-78.

Pries, A.R., Secomb, T.W. (2003). Rheology of the microcirculation. Clin. Hemorheol. Microcirc. 29(3-4): 143-148.

Puchades-Orts, A., Nombela-Gómez, M., Ortuno-Pacheco, G. (1976). Variation in form of circle of Willis: some anatomical and embryological considerations. Anat. Rec.185: 199-224.

Ragaisis, V. (2002). Brain contusion: morphology, pathogenesis and treatment. Medicina. 38(3) :243-249.

Ramón y Cajal S. (1952). Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. (Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Instituto Ramón y Cajal).

Ramón y Cajal, S. (1907). Quelques formules de fixation destinées à la méthode au nitrate d'argent. Trab. Lab. Invest. Biol. Madr. 5:215-226.

Ramón y Cajal, S. (1909). Histologie du système nerveux de l'homme & des vertébrés. (Madrid: Instituto Ramón y Cajal).

Ramón y Cajal, S. (1911). Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. A. Maloine, ed (Paris).

Ramón y Cajal, S. (1925). Contribution à la connaissance de la nevrologie cérébrale et cérébelleuse dans la paralysie générale progressive. Trab. Lab. Invest. Biol. Univ. Madrid.; 23: 157-216.

Ranke, O. (1915). Zur Histologie und histopathologie der Blutgefäßwand, speziell des Zentralnervensystems. *Ztschr ges Neur. Psychiat.* 27: 221-245.

Rapino, C., Bianchi, G., Di Giulio, C., Centurione, L., Cacchio, M., Antonucci, A., Cataldi, A. (2005). HIF-1alpha cytoplasmic accumulation is associated with cell death in old rat cerebral cortex exposed to intermittent hypoxia. *Aging Cell.* 4: 177-185.

Reese, T.S., Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell. Biol.* 34(1): 207-217.

Reina-de la Torre, F., Rodríguez-Baeza, A., Sahuquillo-Barris, J. (1998). Morphological characteristics and distribution pattern of the arterial vessels in human cerebral cortex: a scanning electron microscope study. *Anat. Rec.* 251: 87-96.

Reinecke, R.D., Kuwabara, T., Cogan, D.G., Weis, D.R. (1962). Retinal vascular patterns. V. Experimental ischemia of the cat eye. *Arch. Ophthalmol.* 67: 470-475.

Reissenwebwer, N.J., Pessacq, T. (1971). Intervascular strands in the central nervous system. A histochemical approach. *Acta Anat.* 78: 51-57.

Renau, J., Megías, L. (1998). Manual de técnicas de microscopía electrónica (M.E.T.). Aplicaciones Biológicas. Ed. Universidad de Granada. Granada.

Richard, E., van Gool, W.A., Hoozemans, J.J., van Haastert, E.S., Eikelenboom, P., Rozemuller, A., van de Berg, W. (2010). Morphometric changes in the cortical microvascular network in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer Disease.* 22: 811-818.

Rickels, E., Zumkeller, M. (1992). Vasospasm after experimentally induced subarachnoid haemorrhage and treatment with nimodipine. *Neurochirurg.* 35: 99-102.

Rivard, A., Berthou-Soulie, L., Principe, N., Kearney, M., Curry, C., Branellec, D., Semenza, G.L., Isner, J.M. (2000). Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem.* 275(38): 29643-29647.

Rivard, A., Fabre, J.E., Silver, M., Chen, D., Murohara, T., Kearney, M., Magner, M., Asahara, T., Isner, J.M. (1999). Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation.* 99: 111-120.

Robertson, W.F. (1899). On a new method of obtaining a black reaction in certain tissue elements of the central nervous system (platinum method). *Scottish Med Surg. J.* 4: 23-30.

Rodríguez-Baeza, A. (2010). Ponts intercapil.lars a l'escorça cerebral i retina humana. *Revista de la Reial Acadèmia de medicina de Catalunya.* 3: 98-101.

Rodríguez-Baeza, A., Reina-de la Torre, F., Ortega-Sánchez, M., Sahuquillo-Barris J. (1998). Perivascular structures in corrosion casts of the human central nervous system: a confocal laser and scanning electron microscope study. *Anat. Rec.* 252: 176-184.

Rodríguez-Baeza, A., Reina-de la Torre, F.; Poca, A., Martí, M. (2003). Morphological features in human cortical brain microvessels after head injury: A three-dimensional and immunocytochemical study. *Anat. Rec.* 273: 583-593.

Rodríguez-Baeza, A., Reina de la Torre, F. (2004). Human brain microvessels: three-dimensional study by microvascular corrosion casts in health and head injury. *Trends in corrosion. Res.* 3: 59-72.

Romeis, B. (1940). Hypophyse. In: *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Ed. Möllendorf, W von. Julius Springer, Berlin vol 6, part 3.

Rosenblath. (1927). Citado por Cammermeyer 1960.

Rossitti, S., Lofgren, J. (1993). Optimality principles and flow orderliness at the branching points of cerebral arteries. *Stroke* 24: 1029-1032.

Sahuquillo, J., Poca, M.A., Amoros, S. (2001). Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Curr. Pharm. Des.* 7 (15): 1475-1503.

Sahuquillo, J., Rodríguez-Baeza, A., Pedraza, S., Munar, F., Poca, M.A., Rubio, E. (1996). Alteraciones de la microcirculación y de la barrera hematoencefálica en los traumatismos craneoencefálicos. Fisiopatología del edema cerebral postraumático. En: Net A, Marruecos-Sant N, eds. *Traumatismo craneoencefálico grave*. Barcelona: Springer-Verlag. 14-44.

Saint-Geniez, M., D'Amore, P.A. (2004). Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature. *Int. J. Dev. Biol.* 48: 1045–1058.

Sánchez-Chávez, J.J. (1999). El área de penumbra. *Rev. Neurol.* 28: 810-816.

Sbarbati, A., Pietra, C., Baldassarri, A.M., Guerrini, U., Ziviani, L., Reggiani, A., Boicelli, A., Osculati, F. (1996). The microvascular system in ischemic cortical lesions. *Acta Neuropathol.* 92 (1): 56-63.

Schaltenbrand. (1928). Citado por Cammermeyer, 1960.

Scheinker. (1951). Citado por Cammermeyer 1960.

Schneider, J.A., Arvanitakis, Z., Bang, W., Bennett. D.A. (2007). Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons. *Neurol.* 69: 2197-2204.

- Scholz. (1938). Citado por Cammermeyer 1960.
- Schoonover, C. (2008). Portraits of the mind. Visualizing the brain from antiquity to the 21st century. Abrams ed. N.Y.
- Scherer. (1944). Citado por Cammermeyer 1960.
- Shiraki. (1959). Citado por Cammermeyer 1960.
- Simionescu, M., Simionescu, N. (1977). Organization of cell junctions in the peritoneal mesothelium. *J. Cell. Biol.* 74(1): 98-110.
- Sims, D.E. (1986). The pericyte. A review. *Tissue Cell.* 18: 153-174.
- Spielmeyer, W. (1911). Über die entzündliche Gefäßneubildung. *Virchows Arch. Path. Anat.* 486-489.
- Spielmeyer, W. (1922). *Histopathologie des nervensystems* Julius Springer, Berlin.
- Standring, S. (2016). *Gray's Anatomy. The anatomical basis of clinical practice.* Ed. Elsevier. U.K.
- Steinberg, G.K., Kunis, D., Saleh, J., De La Paz, R. (1991). Protection after transient focal cerebral ischemia by the N-methyl-D-aspartate antagonist dextrorphan is dependent upon plasma and brain levels. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11(6): 1015-1024.
- Stephens, R.B., Stilwell, D.L. (1969). *Arteries and veins of the human brain.* Ed. Springfield, IL: Charles C. Thomas.
- Teltscharow, L., Zulch, K.J. (1948). Das Astrocytom des Grosshirns vom pathologisch-anatomischen Standpunkt aus. *Arch. Psychiatr. Nervenkr. Z. Gesamte. Neurol. Psychiatr.* 118(5-6): 691-720.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Sci.* 267: 1456-1462.
- Tilton, R.G., Kilo, C., Williamson, J.R., Murch, D.W. (1979). Differences in pericyte contractile function in rat cardiac and skeletal muscle microvasculatures. *Microvasc. Res.* 18: 336-352.
- Timpl, R., Dziadek, M., Fujiwara, S., Nowack, H., Wick, G. (1983). Nidogen: a new, self-aggregating basement membrane protein. *Eur. J. Biochem.* 137 (3): 455-465.

Tubbs, R.S., Shoja, M.M., Loukas, M. (2016). Bergman's Comprehensive Encyclopedia of Human Anatomic Variation. Ed Wiley Blackwell. Canadá.

Vajtr, D., Benada, O., Kukacka, J., Průša, R., Houstava, L., Toupalík, P., Kizsek, R. (2009). Correlation of ultrastructural changes of endothelial cells and astrocytes occurring during blood brain barrier damage after traumatic brain injury with biochemical markers of BBB leakage and inflammatory response. *Physiol. Res.* 58 (2): 263-268.

Vaz, R., Sarmiento, A., Borges, N., Cruz, C., Azevedo, T. (1997). Ultrastructural study of brain microvessels in patients with traumatic cerebral contusions. *Acta Neurochir.* 139: 215-220.

Vaz, R., Sarmiento, A., Borges, N., Cruz, C., Azevedo, T. (1998). Experimental traumatic cerebral contusion: morphological study of brain microvessels and characterization of the oedema. *Acta Neurochir.* 140: 76-81.

Velázquez, A., Ortega, M., Rojas, S., González-Olivan, F.J., Rodríguez-Baeza, A. (2015). Widespread microglial activation in patients deceased from traumatic brain injury. *Brain Inj.* 29(9): 1126-1133.

Vetterlein, F., Demmerle, B., Bardosi, A., Gobel, U., Schmidt, G. (1990). Determination of capillary perfusion pattern in rat brain by timed plasma labeling. *Am. J. Physiol.* 258(1 Pt 2): 80-84.

Villringer, A., Them, A., Lindauer, U., Einhaupl, K., Dirnagl, U. (1994). Capillary perfusion of the rat brain cortex. An in vivo confocal microscopy study. *Circ. Res.* 75: 55-62.

Von Braunmühl. (1957). Citado por Cammermeyer 1960.

Von Tell, D., Armulik, A., Betsholz, C. (2006). Pericytes and vascular stability. *Exp. Cell Res.* 312: 623-629.

Vorbrodt, A.W., Dobrogowska, D.H. (2003). Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 42(3): 221-242.

Vracko, R. (1974). Basal lamina scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am. J. Pathol.* 77: 314-346.

Weibel, E.R., Palade, G.E. (1964). New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J. Cell. Biol.* 23: 101-112.

Weil. (1945). Citado por Cammermeyer 1960.

Weiss, H.R. (1988). Measurement of cerebral capillary perfusion with a fluorescent label. *Microvasc. Res.* 36: 172–180.

Weiss, H.R., Edelman, N.H. (1976). Effect of hypoxia on small vessel blood content of rabbit brain. *Microvasc. Res.* 12: 305-315.

Williams, J.L., Shea, M., Jones, S.C. (1993). Evidence that heterogeneity of cerebral blood flow does not involve vascular recruitment. *Am. J. Physiol.* 264(5 Pt 2): 1740-1743.

Williamson, J.R., Tilton, R.G., Kilo, Ch., Yu, S. (1980). Immunofluorescent imaging of capillaries and pericytes in human skeletal muscle and retina. *Microvasc. Res.* 20: 233-241.

Winkelman. (1926). Citado por Cammermeyer 1960.

Wise, G.N., Dollery, C.T., Henkind, P. (1971). *The retinal circulation*. Harper & Row, editor.

Wisniewski, H.M., Pluta, R., Lossinsky, A.S., Mossakowski, M.J. (1995). Ultrastructural studies of cerebral vascular spasm after cardiac arrest-related global cerebral ischemia in rats. *Acta Neuropathol.* 90: 432-440.

Wolff, H.G. (1938). *The cerebral blood vessels: anatomical principles. The circulation of the brain and spinal cord*. Baltimore: Williams and Wilkins. 29-67.

Wolff, H.G. (1959). Brain and diabetes: the role of the highest integrative functions in disease. *Diabetes.* 8: 358-363.

Wolff, J. (1963). Contributions to the ultrastructure of the capillaries in the normal cortex. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 60: 409-431.

Wolpert, S.M. (1997). The circle of Willis. *AJNR Am. Neuroradiol.* 18 (6): 1033-1034.

Wolter, J.R. (1957). The human optic papilla; a demonstration of new anatomic and pathologic findings. *Am. J. Ophthalmol.* 44(4, Part 2): 48–65.

Wolter, J.R., Arbor, A. (1962). The nature of capillary microaneurysms in diabetic retinopathy. *Diabetes.* 2: 126-131.

Yang, P., Pavlovic, D., Waldvogel, H., Draugnow, M., Synek, B., Turner, C., Faull, R., Guan, J. (2015). String vessel formation is increased in the brain of Parkinson disease. *J. Parkinson Dis.* 5 (4): 821-836.

Zauner, A., Bullock, R., Kuta, A.J., Woodward, J., Young, H.F. (1996). Glutamate release and cerebral blood flow after severe human head injury. *Acta Neurochir. Suppl.* 67: 40-44.

Zhang, J., Lewis, A., Bernanke, D., Zubkov, A., Clower, B. (1998). Stroke: anatomy of a catastrophic event. *Anat. Rec. (New Anat.)*. 253: 58-63.

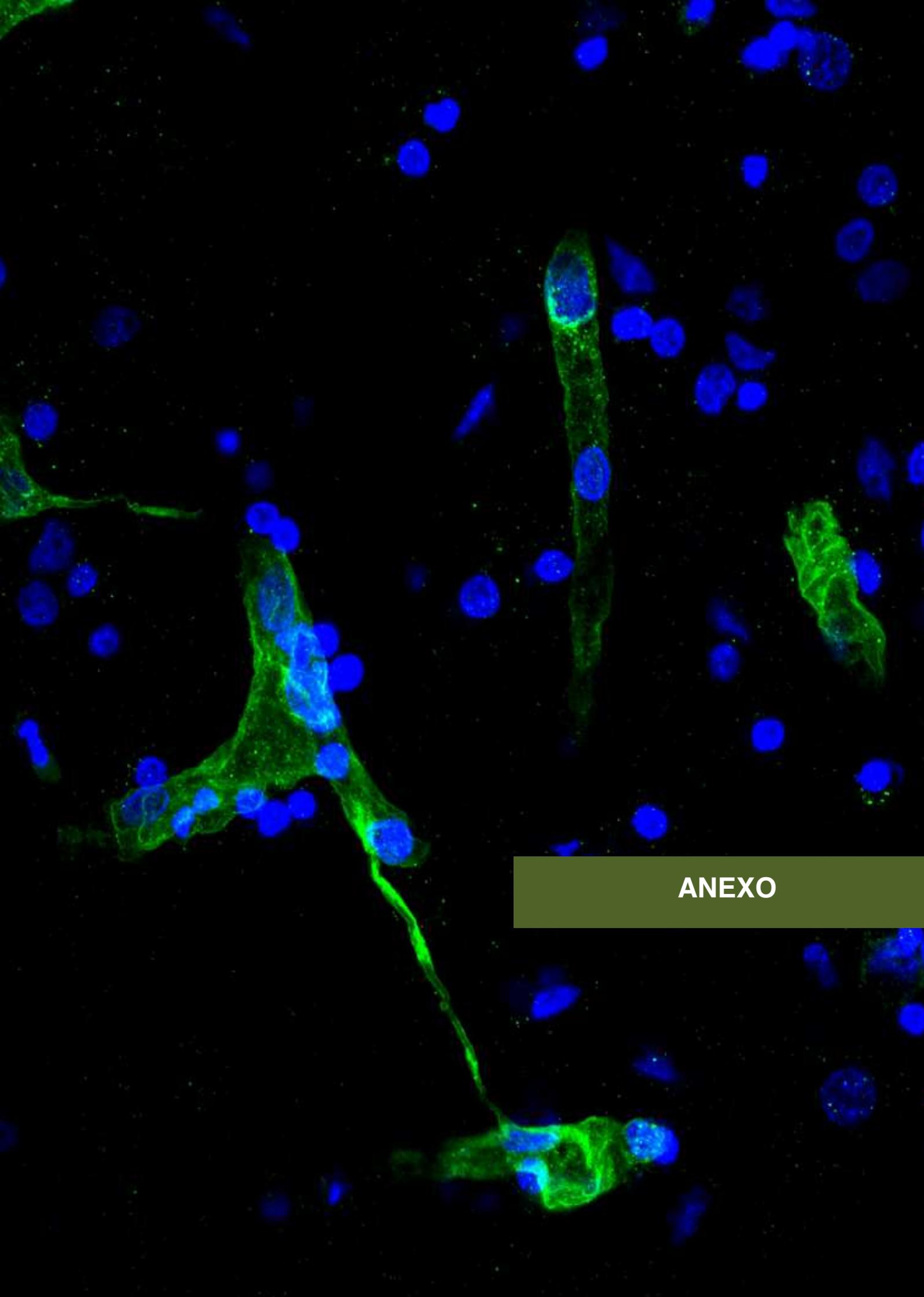
Zimmermann, K.W. (1923). Der feinere han der lotukcapillaren. *Zeitsch. Anat. Entwick.* 68: 29-109.

Zlokovic, B.V. (2005). Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28: 202-208.

Zoccoli, G., Lucchi, M.L., Andreoli, E., Lenzi, P., Franzini, C. (2000). Density of perfused brain capillaries in the aged rat during the wake-sleep cicle. *Exp. Brain Res.* 130: 73-77.

Zudaire, E., Gambardella, L., Kurcz, C., Vermeren, S. (2011). A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PLoS ONE* 6(11): e27385.

Zweifach, B.W. (1961). Biologic propierties of vascular endothelium. *Angiol.* 12: 507-510.



ANEXO

ANEXO

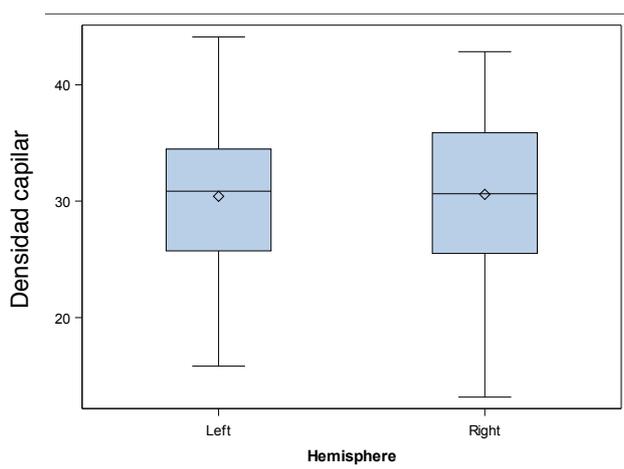
Análisis estadístico (realizado por el servicio de estadística de la UAB)

1. Análisis entre las diferentes zonas (grupo Control)

1.1 Densidad capilar:

Hemisferios cerebrales

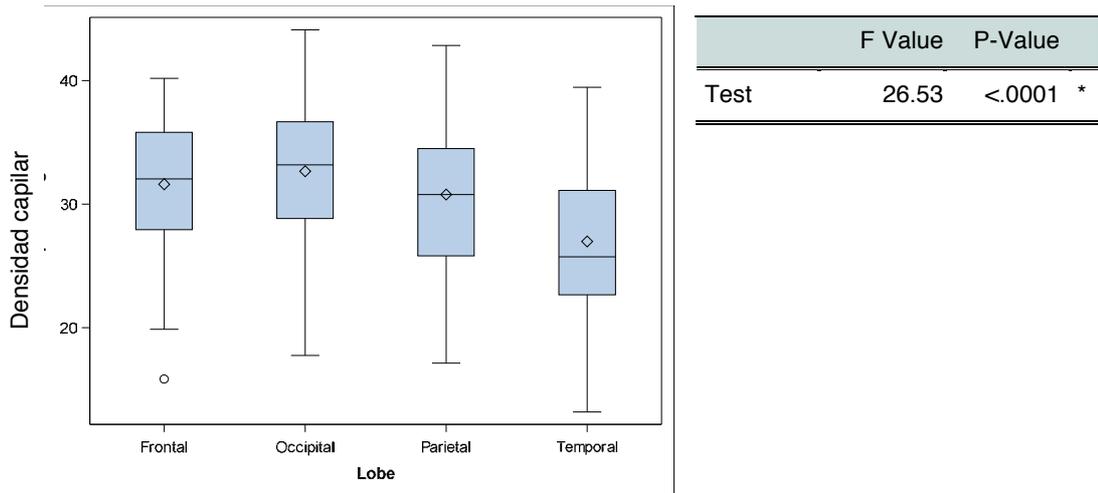
Hemisphere	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Left	192	0	30.43	30.87	6.02	15.84	44.12
Right	192	0	30.59	30.63	6.18	13.17	42.85
Total	384	0	30.51	30.80	6.09	13.17	44.12



	F Value	P-Value
Test	0.09	0.7591

Lóbulos cerebrales

Lobe	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Frontal	96	0	31.61	32.05	5.27	15.84	40.17
Occipital	96	0	32.66	33.18	5.93	17.76	44.12
Parietal	96	0	30.78	30.78	5.92	17.14	42.85
Temporal	96	0	26.97	25.73	5.76	13.17	39.46
Total	384	0	30.51	30.80	6.09	13.17	44.12



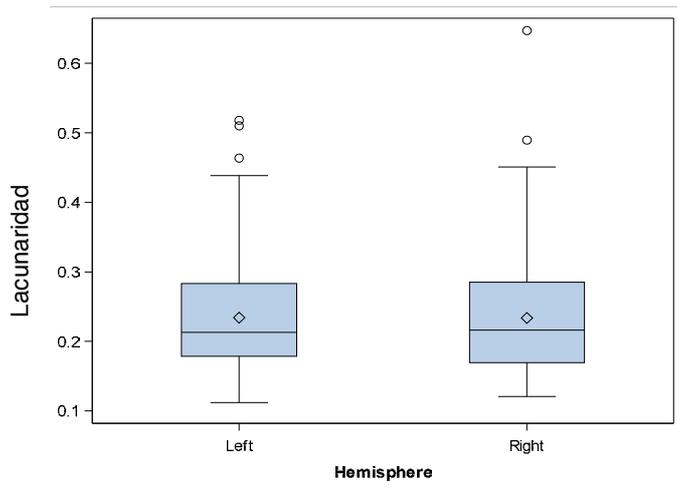
A continuación se muestran las comparaciones 2 a 2:

Lobe	Lobe	Mean difference	t Value	P-Value
Frontal	Occipital	-1.0477	-1.54	0.4147
Frontal	Parietal	0.8376	1.23	0.6076
Frontal	Temporal	4.6403	6.82	<.0001 *
Occipital	Parietal	1.8853	2.77	0.0298 *
Occipital	Temporal	5.6881	8.36	<.0001 *
Parietal	Temporal	3.8027	5.59	<.0001 *

1.2 Lacunaridad

Hemisferios cerebrales

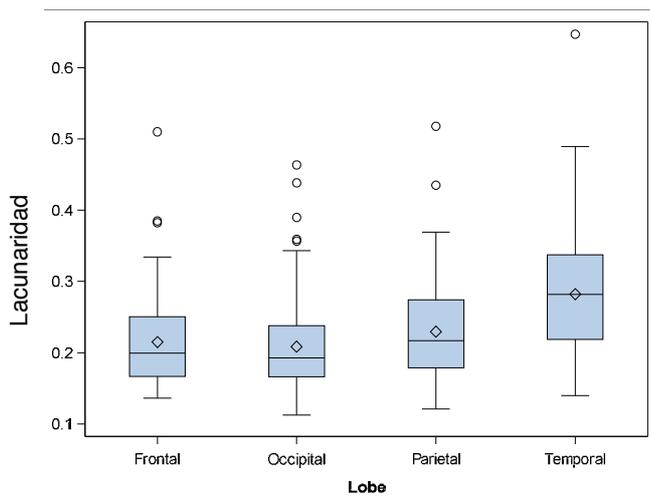
Hemisphere	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Left	192	0	0.2340	0.2129	0.0763	0.1122	0.5178
Right	192	0	0.2335	0.2162	0.0826	0.1208	0.6469
Total	384	0	0.2337	0.2155	0.0794	0.1122	0.6469



	F	P-Value
Test	0.00	0.9533

Lóbulos cerebrales

Lobe	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Frontal	96	0	0.2149	0.1994	0.0649	0.1362	0.5099
Occipital	96	0	0.2084	0.1926	0.0695	0.1122	0.4635
Parietal	96	0	0.2295	0.2166	0.0737	0.1208	0.5178
Temporal	96	0	0.2821	0.2816	0.0871	0.1399	0.6469
Total	384	0	0.2337	0.2155	0.0794	0.1122	0.6469



	F Value	P-Value
Test	25.67	<.0001 *

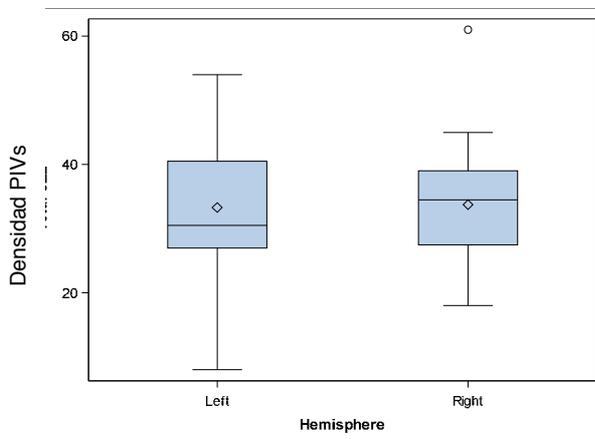
A continuación se muestran las comparaciones 2 a 2:

Lobe	Lobe	Mean difference	t Value	P-Value
Frontal	Occipital	0.006509	0.70	0.8978
Frontal	Parietal	-0.01460	-1.57	0.3995
Frontal	Temporal	-0.06712	-7.20	<.0001 *
Occipital	Parietal	-0.02111	-2.26	0.1084
Occipital	Temporal	-0.07363	-7.90	<.0001 *
Parietal	Temporal	-0.05252	-5.63	<.0001 *

1.3 Puentes de unión (PIVs)

Hemisferios cerebrales

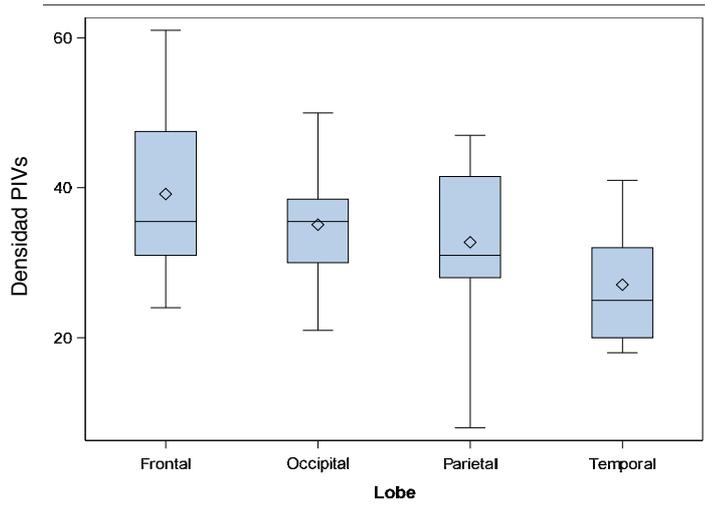
Hemisphere	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Left	24	0	33.29	30.50	10.94	8.00	54.00
Right	24	0	33.75	34.50	9.82	18.00	61.00
Total	48	0	33.52	32.50	10.29	8.00	61.00



	F Value	P-Value
Test	0.03	0.8715

Lóbulos cerebrales

Lobe	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Frontal	12	0	39.17	35.50	11.39	24.00	61.00
Occipital	12	0	35.08	35.50	7.63	21.00	50.00
Parietal	12	0	32.75	31.00	10.69	8.00	47.00
Temporal	12	0	27.08	25.00	8.16	18.00	41.00
Total	48	0	33.52	32.50	10.29	8.00	61.00



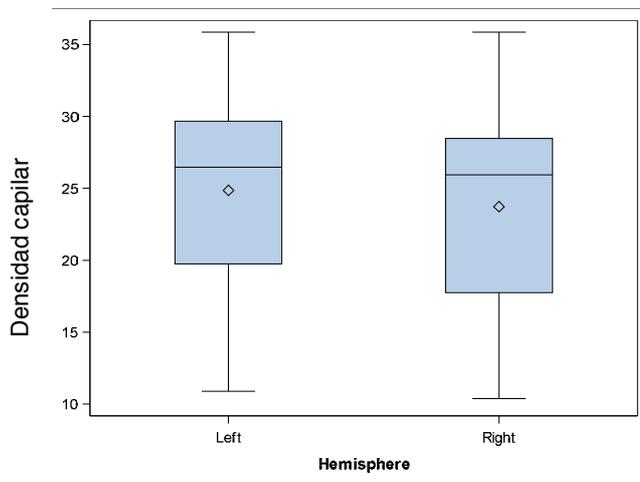
	F Value	P-Value
Test	3.98	0.0144 *

2. Análisis entre las diferentes zonas (grupo TCE)

2.1 Densidad capilar

Hemisferios cerebrales

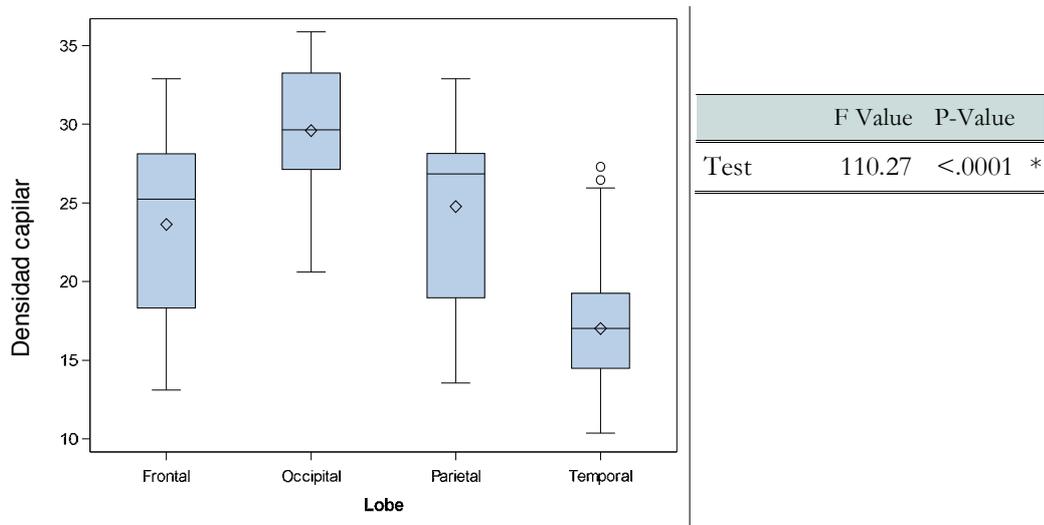
Hemisphere	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Left	152	40	24.86	26.48	6.21	10.88	35.87
Right	176	16	23.72	25.94	6.51	10.37	35.87
Total	328	56	24.19	26.12	6.40	10.37	35.87



	F Value	P-Value
Test	2.98	0.0855

Lóbulos cerebrales

Lobe	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Frontal	96	0	23.63	25.23	5.36	13.10	32.90
Occipital	96	0	29.60	29.64	3.61	20.61	35.87
Parietal	64	32	24.77	26.85	5.36	13.55	32.90
Temporal	72	24	17.02	17.02	3.89	10.37	27.30
Total	328	56	24.17	26.03	6.40	10.37	35.87



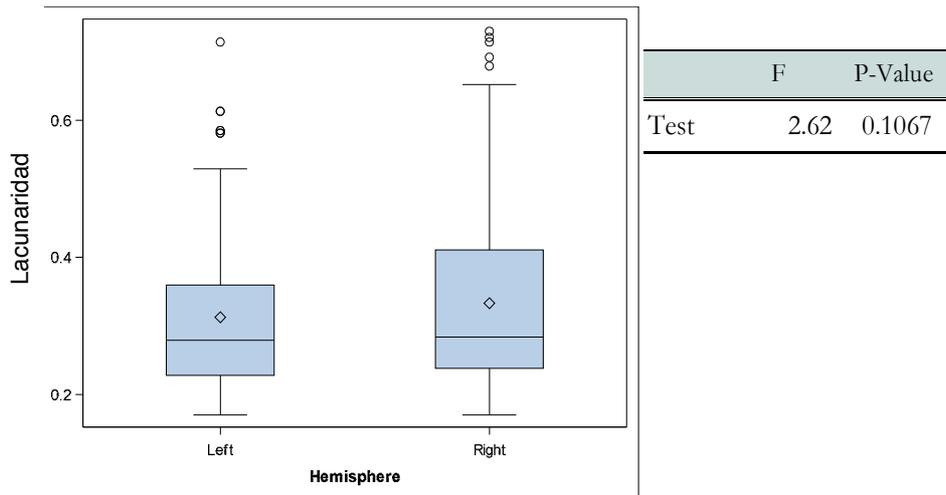
A continuación se muestran las comparaciones 2 a 2:

Lobe	Lobe	Mean difference	t Value	P-Value
Frontal	Occipital	-5.9646	-9.21	<.0001 *
Frontal	Parietal	-1.7016	-2.28	0.1054
Frontal	Temporal	6.7868	9.61	<.0001 *
Occipital	Parietal	4.2630	5.70	<.0001 *
Occipital	Temporal	12.7514	18.04	<.0001 *
Parietal	Temporal	8.4884	10.62	<.0001 *

2.2 Lacunaridad

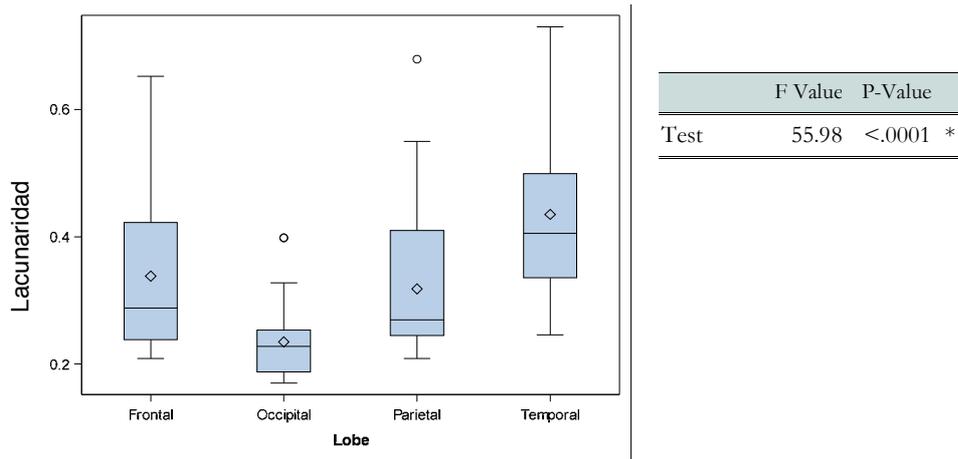
Hemisferios cerebrales

Hemisphere	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Left	152	40	0.3126	0.2792	0.1119	0.1702	0.7144
Right	176	16	0.3329	0.2839	0.1319	0.1702	0.7300
Total	328	56	0.3246	0.2822	0.1243	0.1702	0.7300



Lóbulos cerebrales

Lobe	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Frontal	96	0	0.3381	0.2882	0.1176	0.2089	0.6522
Occipital	96	0	0.2346	0.2276	0.0482	0.1702	0.3983
Parietal	64	32	0.3180	0.2695	0.1076	0.2089	0.6792
Temporal	72	24	0.4352	0.4056	0.1250	0.2459	0.7300
Total	328	56	0.3249	0.2829	0.1242	0.1702	0.7300



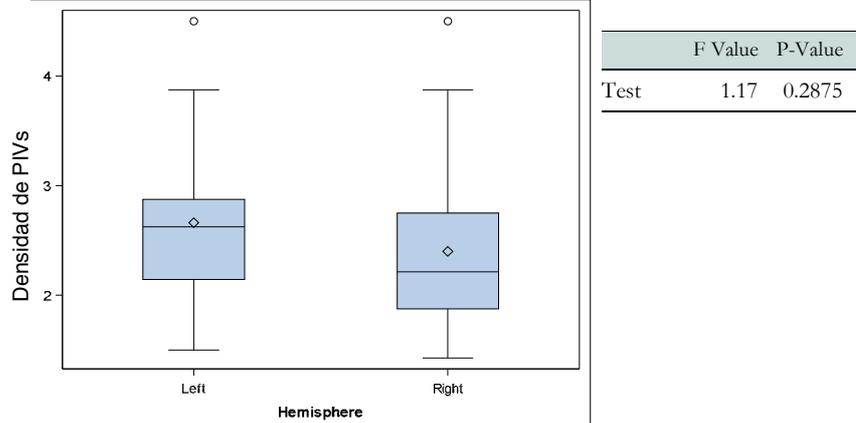
A continuación se muestran las comparaciones 2 a 2:

Lobe	Lobe	Mean difference	t Value	P-Value
Frontal	Occipital	0.1034	7.13	<.0001 *
Frontal	Parietal	0.02935	1.76	0.2935
Frontal	Temporal	-0.09925	-6.28	<.0001 *
Occipital	Parietal	-0.07409	-4.44	<.0001 *
Occipital	Temporal	-0.2027	-12.82	<.0001 *
Parietal	Temporal	-0.1286	-7.22	<.0001 *

2.3 Puentes intervasculares (PIVs)

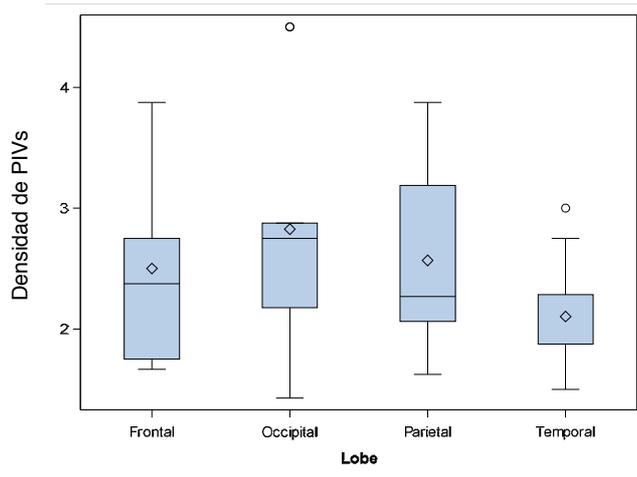
Hemisferios cerebrales

Hemisphere	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Left	22	2	2.66	2.63	0.80	1.50	4.50
Right	22	2	2.40	2.21	0.81	1.43	4.50
Total	44	4	2.51	2.29	0.81	1.43	4.50



Lóbulos cerebrales

Lobe	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Frontal	12	0	2.50	2.38	0.78	1.67	3.88
Occipital	12	0	2.83	2.75	0.95	1.43	4.50
Parietal	8	4	2.57	2.27	0.85	1.63	3.88
Temporal	12	0	2.10	1.88	0.50	1.50	3.00
Total	44	4	2.51	2.29	0.81	1.43	4.50

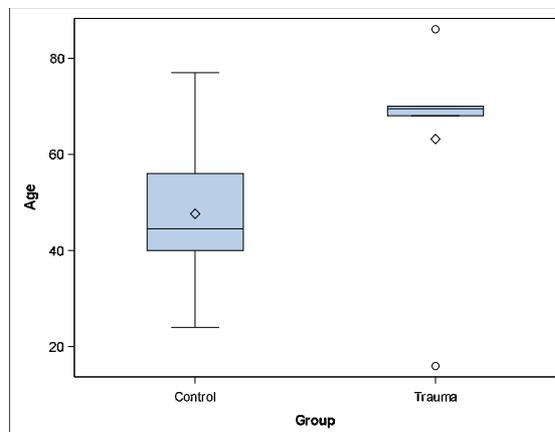


	F Value	P-Value
Test	1.72	0.1833

3. Análisis entre los grupos de estudio Control y TCE

3.1 Edad

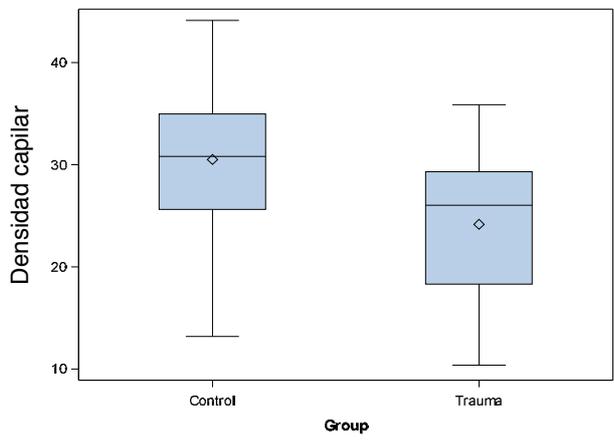
Group	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	6	0	47.67	44.50	17.94	24.00	77.00
Trauma	6	0	63.17	69.50	24.07	16.00	86.00
Total	12	0	55.42	62.00	21.80	16.00	86.00



	P-Value
Wilcoxon Test	0.2534

3.2 Densidad capilar

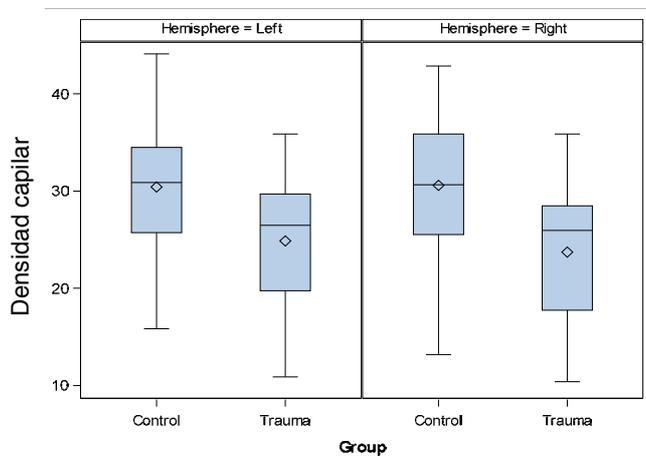
Group	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	384	0	30.51	30.80	6.09	13.17	44.12
Trauma	328	56	24.17	26.03	6.40	10.37	35.87
Total	712	56	27.60	28.10	6.99	10.37	44.12



	F Value	P-Value
Test	16.70	<.0001 *

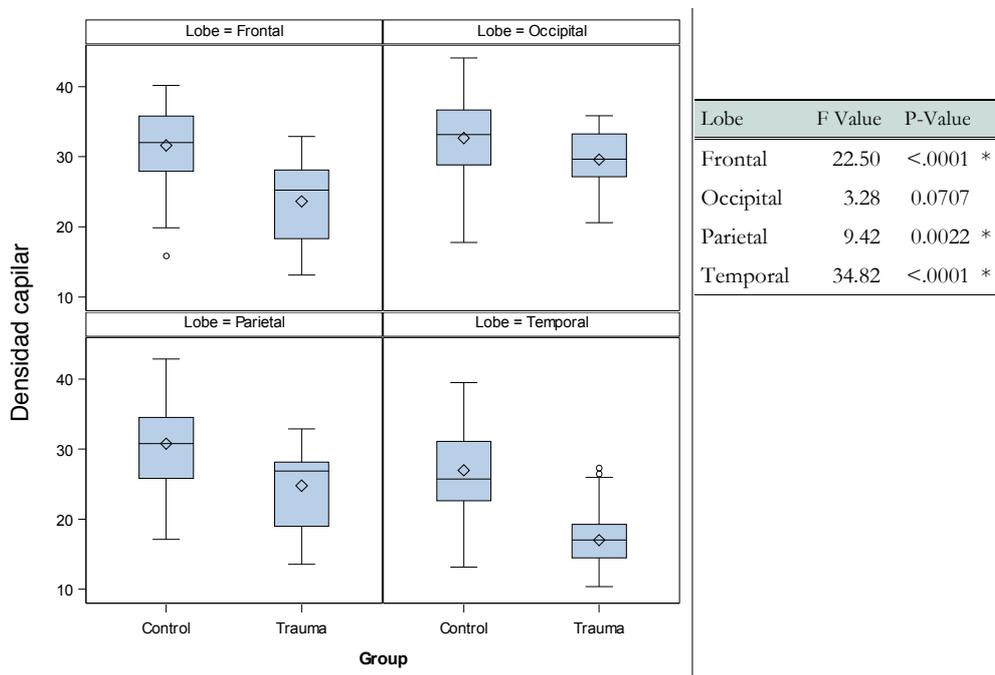
Análisis por hemisferios y lóbulos cerebrales entre los grupos (Control y TCE)

Group	Hemisphere	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	Left	192	0	30.43	30.87	6.02	15.84	44.12
Control	Right	192	0	30.59	30.63	6.18	13.17	42.85
Trauma	Left	152	40	24.86	26.48	6.21	10.88	35.87
Trauma	Right	176	16	23.72	25.94	6.51	10.37	35.87



Effect	F Value	P-Value
Group	17.40	<.0001 *
Hemisphere	0.29	0.5897
Lobe	116.82	<.0001 *
Group*Hemisphere	0.97	0.3243
Group*Lobe	19.19	<.0001 *

Group	Lobe	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	Frontal	96	0	31.61	32.05	5.27	15.84	40.17
Control	Occipital	96	0	32.66	33.18	5.93	17.76	44.12
Control	Parietal	96	0	30.78	30.78	5.92	17.14	42.85
Control	Temporal	96	0	26.97	25.73	5.76	13.17	39.46
Trauma	Frontal	96	0	23.63	25.23	5.36	13.10	32.90
Trauma	Occipital	96	0	29.60	29.64	3.61	20.61	35.87
Trauma	Parietal	64	32	24.77	26.85	5.36	13.55	32.90
Trauma	Temporal	72	24	17.01	17.12	3.92	10.37	27.30



Comparaciones 2 a 2:

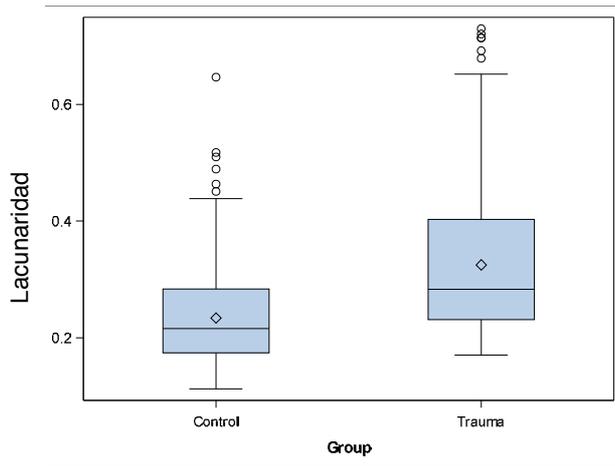
Group	Lobe	Lobe	Mean difference	t Value	P-Value
Control	Frontal	Occipital	-1.0477	-1.57	0.3953
	Frontal	Parietal	0.8376	1.26	0.5908
	Frontal	Temporal	4.6403	6.96	<.0001 *
	Occipital	Parietal	1.8853	2.83	0.0248 *
	Occipital	Temporal	5.6881	8.53	<.0001 *
	Parietal	Temporal	3.8027	5.71	<.0001 *
Trauma	Frontal	Occipital	-5.9544	-8.93	<.0001 *
	Frontal	Parietal	-1.8246	-2.36	0.0864
	Frontal	Temporal	6.7542	9.20	<.0001 *
	Occipital	Parietal	4.1298	5.33	<.0001 *
	Occipital	Temporal	12.7085	17.27	<.0001 *
	Parietal	Temporal	8.5788	10.30	<.0001 *

Análisis ajustado por edad

Effect	F Value	P-Value
Group	12.45	0.0004 *
Hemisphere	0.28	0.5940
Lobe	116.89	<.0001 *
Age	0.29	0.5876
Group*Hemisphere	0.96	0.3273
Group*Lobe	19.23	<.0001 *

3.3 Lacunaridad

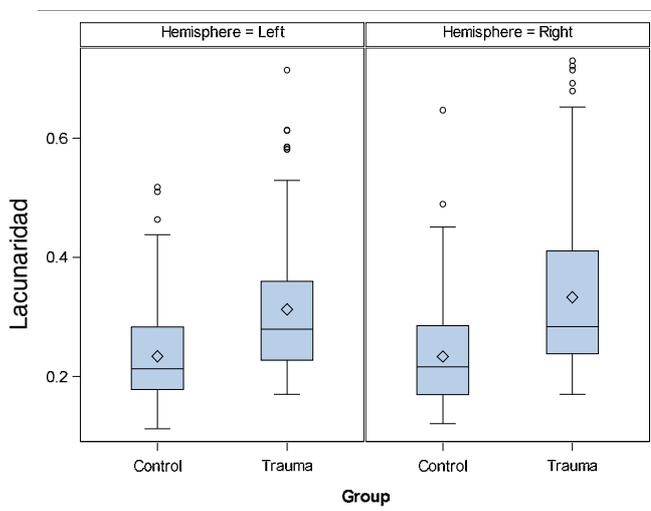
Group	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	384	0	0.2337	0.2155	0.0794	0.1122	0.6469
Trauma	328	56	0.3249	0.2829	0.1242	0.1702	0.7300
Total	712	56	0.2756	0.2459	0.1120	0.1122	0.7300



	F Value	P-Value
Test	22.78	<.0001 *

Análisis por hemisferios y lóbulos cerebrales entre grupos (Control y TCE)

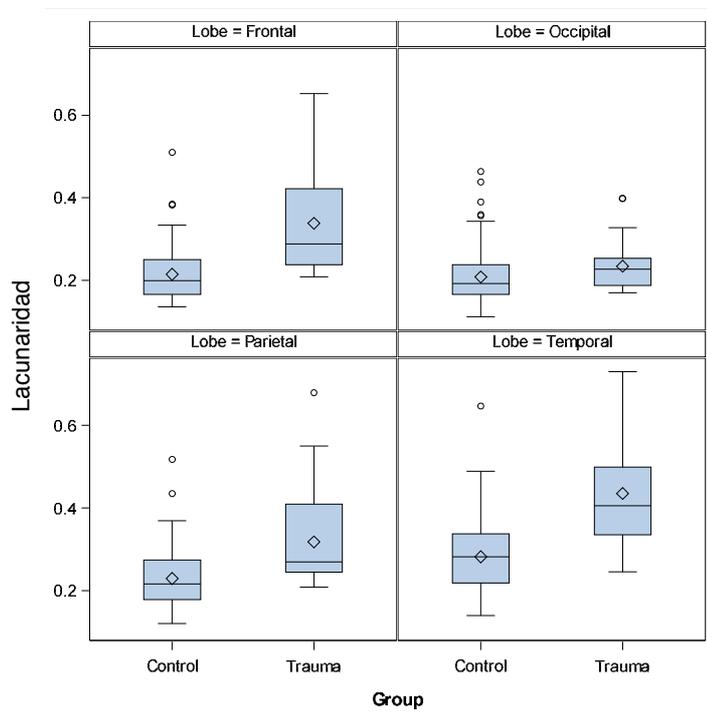
Group	Hemisphere	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	Left	192	0	0.2340	0.2129	0.0763	0.1122	0.5178
Control	Right	192	0	0.2335	0.2162	0.0826	0.1208	0.6469
Trauma	Left	152	40	0.3126	0.2792	0.1119	0.1702	0.7144
Trauma	Right	176	16	0.3329	0.2839	0.1319	0.1702	0.7300



Effect	F Value	P-Value
Group	12.14	0.0005 *
Hemisphere	7.20	0.0075 *
Lobe	36.49	<.0001 *
Group*Hemisphere	7.03	0.0083 *
Group*Lobe	11.45	<.0001 *

Anexo

Group	Lobe	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	Frontal	96	0	0.2149	0.1994	0.0649	0.1362	0.5099
Control	Occipital	96	0	0.2084	0.1926	0.0695	0.1122	0.4635
Control	Parietal	96	0	0.2295	0.2166	0.0737	0.1208	0.5178
Control	Temporal	96	0	0.2821	0.2816	0.0871	0.1399	0.6469
Trauma	Frontal	96	0	0.3381	0.2882	0.1176	0.2089	0.6522
Trauma	Occipital	96	0	0.2346	0.2276	0.0482	0.1702	0.3983
Trauma	Parietal	64	32	0.3180	0.2695	0.1076	0.2089	0.6792
Trauma	Temporal	72	24	0.4356	0.4043	0.1258	0.2459	0.7300



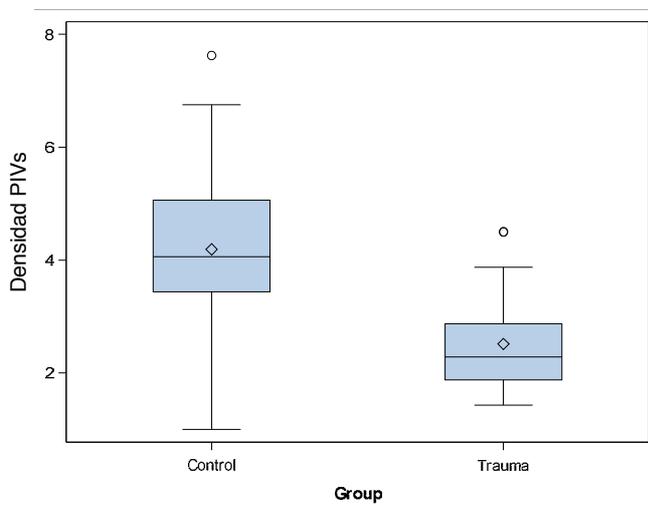
Lobe	F Value	P-Value
Frontal	30.34	<.0001 *
Occipital	1.31	0.2534
Parietal	10.47	0.0013 *
Temporal	45.21	<.0001 *

Comparaciones 2 a 2:

Group	Lobe	Lobe	Mean difference	t Value	P-Value
Control	Frontal	Occipital	0.006509	0.54	0.9484
	Frontal	Parietal	-0.01460	-1.22	0.6154
	Frontal	Temporal	-0.06712	-5.60	<.0001 *
	Occipital	Parietal	-0.02111	-1.76	0.2930
	Occipital	Temporal	-0.07363	-6.14	<.0001 *
	Parietal	Temporal	-0.05252	-4.38	<.0001 *
Trauma	Frontal	Occipital	0.1032	8.61	<.0001 *
	Frontal	Parietal	0.03227	2.32	0.0936
	Frontal	Temporal	-0.09891	-7.50	<.0001 *
	Occipital	Parietal	-0.07095	-5.10	<.0001 *
	Occipital	Temporal	-0.2021	-15.29	<.0001 *
	Parietal	Temporal	-0.1312	-8.77	<.0001 *

3.4 Puentes intervasculares (PIVs)

Group	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	48	0	4.19	4.06	1.29	1.00	7.63
Trauma	44	4	2.51	2.29	0.81	1.43	4.50
Total	92	4	3.44	3.25	1.38	1.00	7.63



	F-Value	P-Value
Test	24.16	<.0001 *

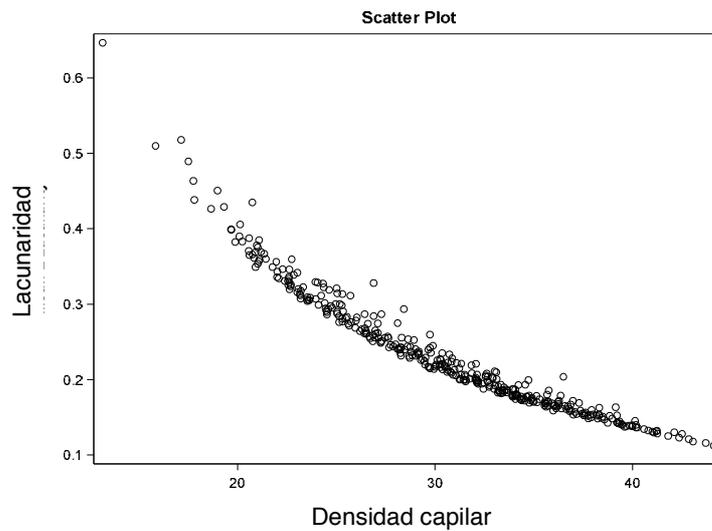
Análisis ajustado por edad

Effect	F Value	P-Value
Group	19.20	0.0001 *
Hemisphere	0.00	0.9514
Lobe	5.26	0.0026 *
Age	0.00	0.9741
Group*Hemisphere	0.04	0.834
Group*Lobe	1.09	0.3585 *

4. Análisis de correlaciones

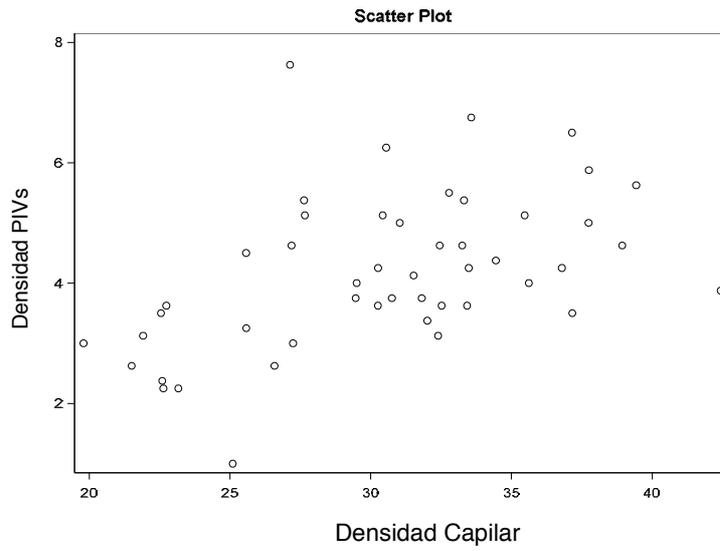
4.1 Grupo Control

Densidad capilar y Lacunaridad



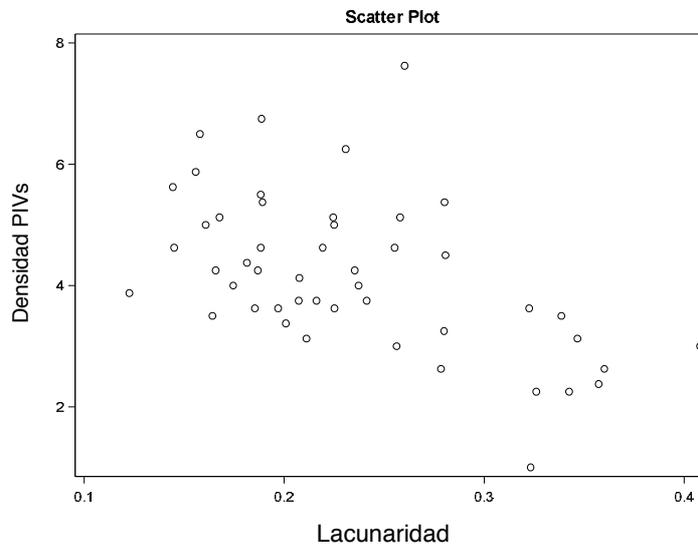
Correlación negativa entre la densidad capilar y la lacunaridad ($r=-0.96$)

Densidad capilar y Densidad de PIVs



La correlación entre estas dos variables es moderada (0,484, p-valor<0.001).

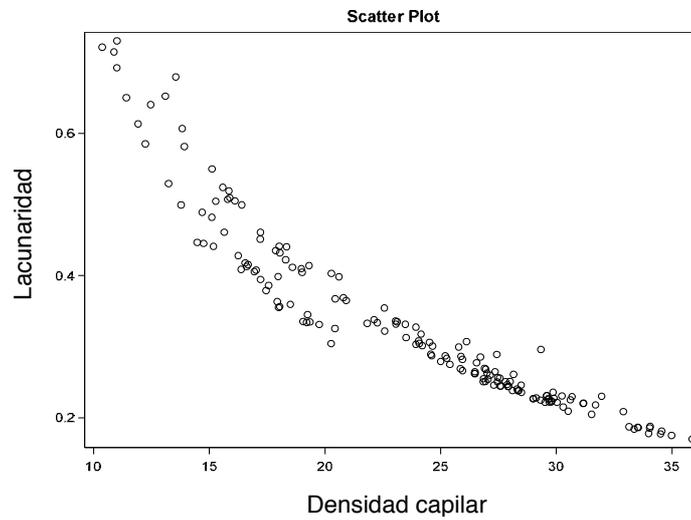
Lacunaridad y Densidad de PIVs



La correlación entre estas dos variables es moderada y negativa (-0,529, p-valor<0,001).

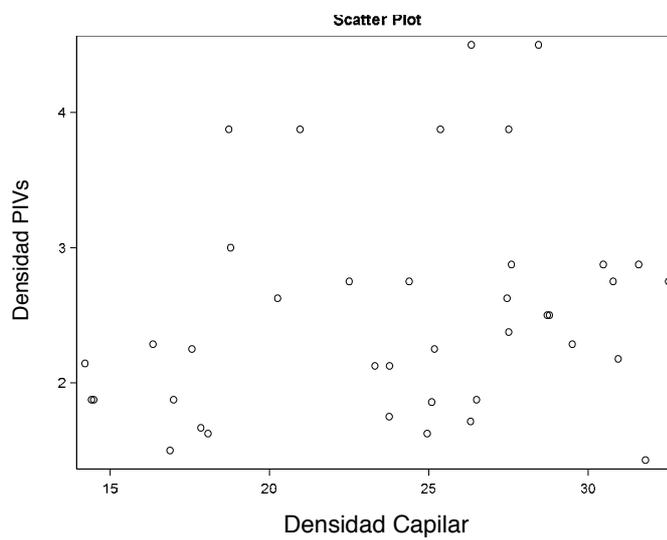
4.2 Grupo TCE

Densidad capilar y Lacunaridad



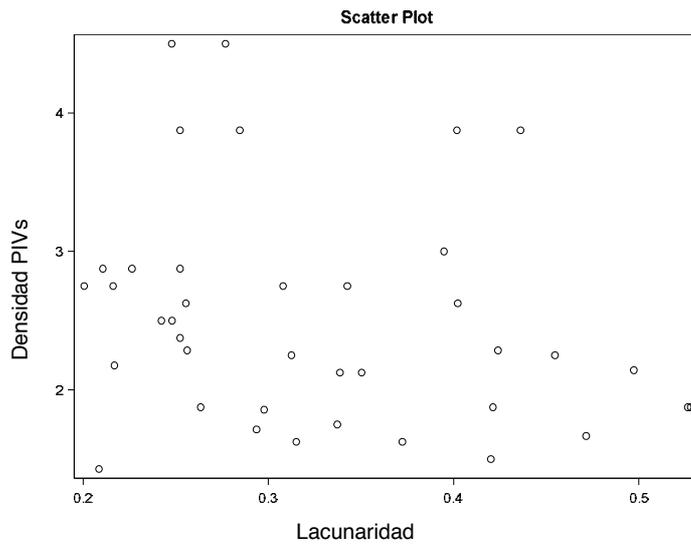
Correlación negativa entre la densidad capilar y lacunaridad ($r=-0.94$)

Densidad capilar y Densidad de PIVs



La correlación entre estas dos variables es baja ($0,239$, $p\text{-valor}=0,143$).

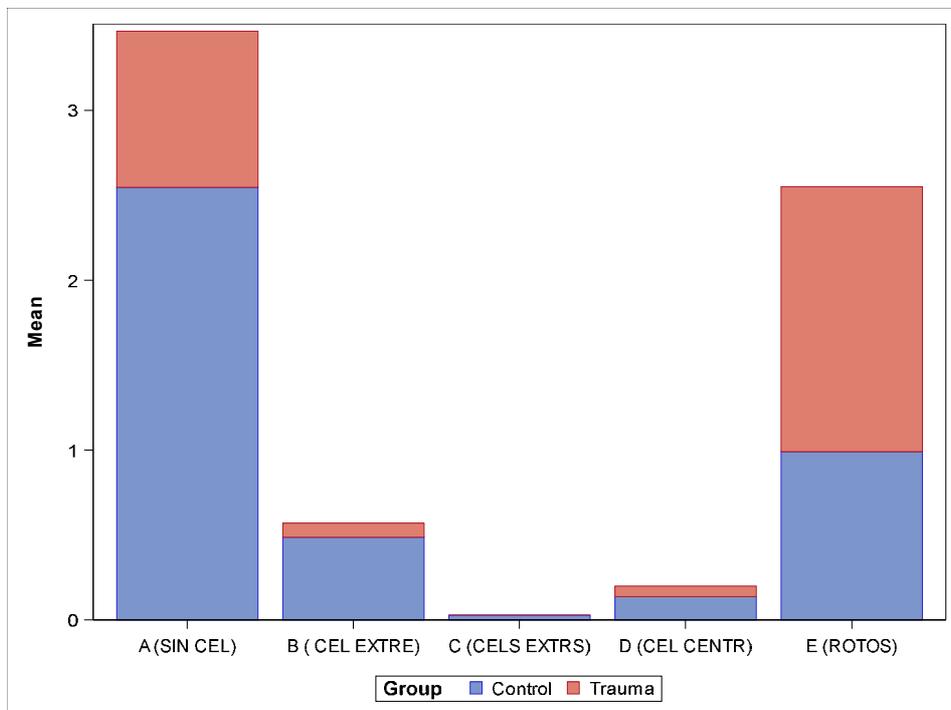
Lacunaridad y Densidad de PIVs



La correlación entre estas dos variables es baja y negativa (-0,246, p-valor=0,132).

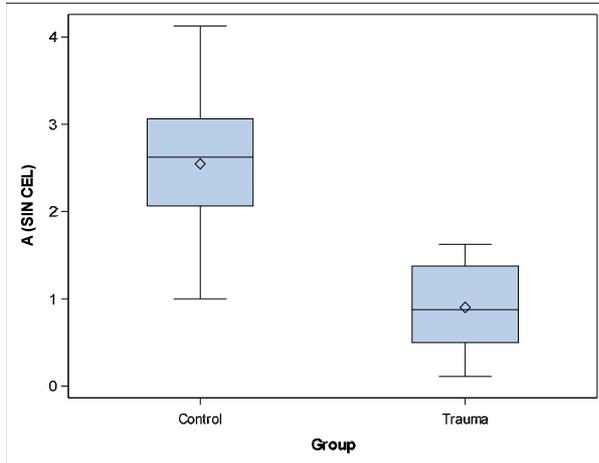
5. Análisis de tipo de PIVs según clasificación (A;B;C;D;E) (recuentos)

Resumen descriptivo:



Tipo A Densidad (SIN CEL)

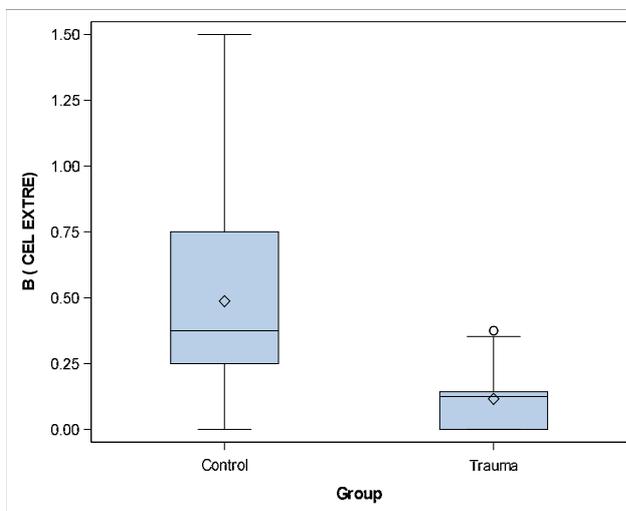
Group	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	48	0	2.55	2.63	0.69	1.00	4.13
Trauma	44	4	0.90	0.88	0.45	0.11	1.63
Total	92	4	1.81	1.63	1.01	0.11	4.13



	F-Value	P-Value
Test	76.23	<.0001 *

Tipo B Densidad (CEL EXTRE)

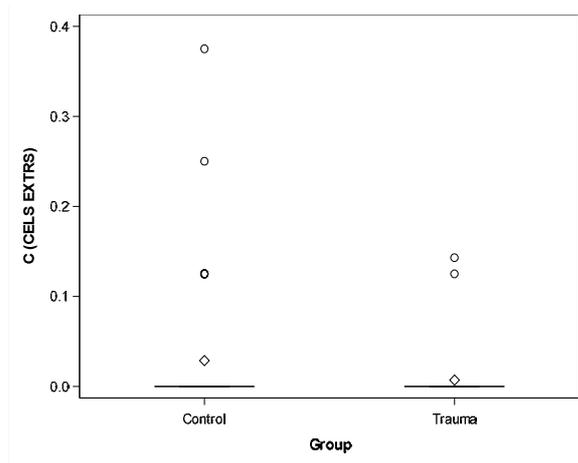
Group	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	48	0	0.49	0.38	0.34	0.00	1.50
Trauma	44	4	0.12	0.13	0.12	0.00	0.38
Total	92	4	0.32	0.25	0.32	0.00	1.50



	F-Value	P-Value
Test	23.00	<.0001 *

Tipo C Densidad (CELS EXTRS)

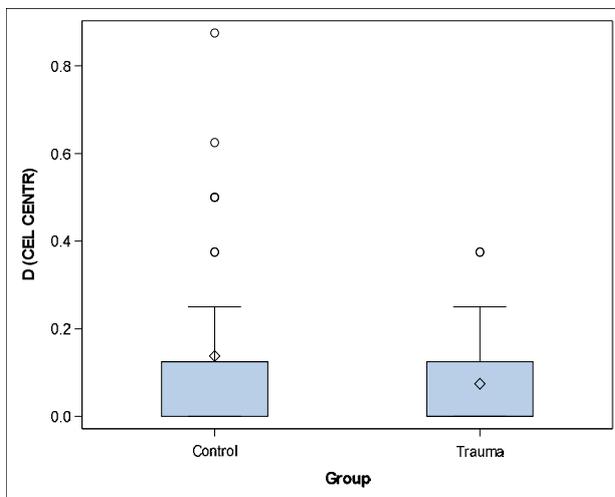
Group	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	48	0	0.03	0.00	0.07	0.00	0.38
Trauma	44	4	0.01	0.00	0.03	0.00	0.14
Total	92	4	0.02	0.00	0.06	0.00	0.38



	F-Value	P-Value
Test	2.97	0.0887

Tipo D Densidad (CEL CENTR)

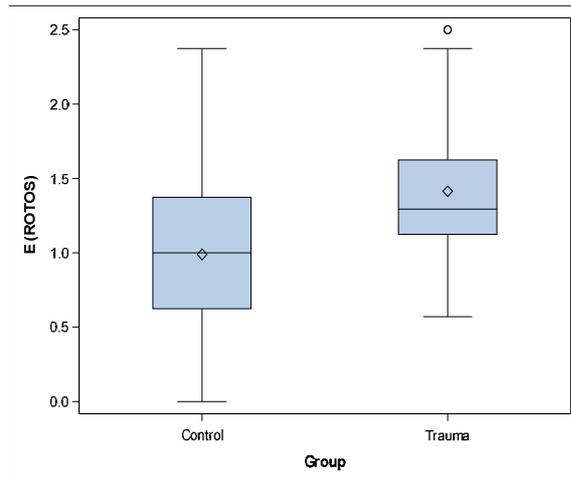
Group	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	48	0	0.14	0.13	0.19	0.00	0.88
Trauma	44	4	0.07	0.00	0.10	0.00	0.38
Total	92	4	0.11	0.00	0.16	0.00	0.88



	F-Value	P-Value
Test	1.95	0.1670

Tipo E Densidad (ROTOS)

Group	Nobs	Nmiss	Mean	Median	Std	Min	Max
Control	48	0	0.99	1.00	0.53	0.00	2.38
Trauma	44	4	1.41	1.29	0.46	0.57	2.50
Total	92	4	1.18	1.25	0.54	0.00	2.50



	F-Value	P-Value
Test	5.04	0.0277 *

6. Análisis de tipo de PIVs según clasificación (A:B:C:D:E) (porcentajes)

Resumen descriptivo:

