

OBSERVACIONES MICROSCOPICO-ELECTRONICAS
A NIVEL DE LA CAPA MOLECULAR DE LA CORTEZA CEREBELOSA

Tesis doctoral

— **Dr. Orlando J. Castejón.**
Instituto de Investigación Clínica.
Apartado 1151.
Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela,

Esta tesis doctoral es un resumen de los siguientes trabajos de investigación:

1. Fijación del sistema nervioso central del ratón por perfusión vascular con glutaraldehído.
2. Características submicroscópicas de las dendritas de Purkinje.
3. Características submicroscópicas de los contactos sinápticos entre dendritas de Purkinje y fibras paralelas.
4. Ultraestructura de las neuronas estrelladas de la capa molecular de la corteza cerebelosa.

Resúmenes de estos trabajos han sido presentados en:

- I. XVI Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia, Caracas, Mayo 1966.
- II. II Congreso Venezolano de Neurología y Psiquiatría, Valencia, Enero 1967.
- III. XVII Convención Anual de la Asociación Venezolana para el Avance de la Ciencia, Caracas, Mayo 1967.
- IV. VII Congreso Venezolano de Ciencias Médicas, Caracas, Octubre 1967.

INTRODUCCION

Purkinje en 1837, hizo la primera descripción de las neuronas piriformes de la corteza cerebelosa, que hoy llevan su nombre⁵¹. Ramón y Cajal, entre los años de 1840 y 1926, aportó el conocimiento básico sobre la estructura y las conexiones sinápticas de la corteza cerebelosa^{51, 54, 55 y 56}. Sus observaciones sobre la disposición de las prolongaciones de las células de cesta alrededor de las células de Purkinje, constituyeron la primera evidencia de un contacto sináptico interneuronal.

Golgi, en 1873 y 1894, realizó el estudio sobre las ramificaciones dendríticas de Purkinje y las dividió en ramas primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias^{26, 27}. Las observaciones de Cajal, sobre las espinas peridendríticas de Purkinje⁵⁵, originaron una corrección en la clasificación original de Golgi, diferenciándolas en ramas lisas primarias, secundarias y terciarias y ramificaciones terminales espinosas. Esta clasificación es de gran importancia, ya que permitió establecer que cada segmento de la célula de Purkinje tiene su aferente específico, a saber: el cuerpo celular está en contacto con los axones de las células de cesta, las ramificaciones lisas están en contacto con las fibras trepadoras y las ramificaciones terminales espinosas con las fibras paralelas^{24, 55}.

Estable en 1923, publicó un estudio detallado sobre el sistema sináptico de las fibras trepadoras con las dendritas de Purkinje, las relaciones intracorticales de las fibras musgosas, las células estrelladas y fusiformes de la capa granulosa, las células de Purkinje y las células estrelladas y de cesta de la capa molecular²¹. Carrea y colaboradores en 1947, utilizando métodos de degeneración, postularon que las fibras trepadoras se origi-

nan en los núcleos cerebelosos². Posteriormente, Scheibel y Scheibel estudiaron las relaciones sinápticas intracorticales de las fibras trepadoras⁴⁰.

En 1957, Fox y Barnard²² demostraron, mediante microscopía óptica, que las ramificaciones primarias, secundarias y terciarias de Purkinje, dan origen a ramificaciones espinosas terminales, las cuales establecen contacto con las fibras paralelas. Asimismo, estos autores hicieron una estimación cuantitativa de los contactos sinápticos entre ambos tipos de prolongaciones.

En 1959, Szentagothai y Rajkowitz⁴⁴ identificaron a las fibras trepadoras como los terminales específicos del tracto olivocerebeloso.

Los primeros estudios de la corteza cerebelosa realizados con el microscopio electrónico, fueron los de Hager en 1959 y 1960, y los de Gray en 1961. Estos autores describieron aspectos parciales de la organización submicroscópica de la corteza cerebelosa^{30, 32, 33}.

En su estudio sobre la organización de la corteza cerebelosa, Gray³⁰ describe las características submicroscópicas de las células granulosas, la relación sináptica de las fibras musgosas con las dendritas de las células granulosas (glomérulos cerebelosos) y las sinapsis espinosas de la capa molecular.

Palay en 1962, en un estudio sobre la fijación del sistema nervioso por la técnica de perfusión vascular⁴⁰, describe algunos aspectos de la organización submicroscópica de la capa granulosa y de la capa molecular. Posteriormente este autor, en 1964, en un estudio sobre la estructura fina de la neurona⁵¹, muestra los detalles ultraestructurales de los glomérulos cerebelosos, de las células de Purkinje y de la capa molecular.

En 1962, Fox hizo un meticuloso estudio, al microscopio de luz y electrónico, de la estructura de la corteza cerebelosa, con especial énfasis en la estructura de la capa molecular²³. Los hallazgos de Fox en la capa molecular, proveen las bases estructurales para estudios ulteriores, utilizando técnicas de microscopía electrónica de alta resolución.

Herndon en 1963 y 1964, hizo una descripción general de la estructura de la célula de Purkinje, de las células granulosas,

de las células estrelladas y de la neuroglia de la corteza cerebelosa^{39, 40}.

En 1964, Fox y colaboradores²⁴ y Hamori y Szentagothai³⁵, publicaron los primeros estudios sistemáticos utilizando microscopía de luz y electrónica, sobre la relación sináptica de las dendritas de Purkinje con las fibras paralelas. Recientemente, Hamori y Szentagothai (1965, 1966) describieron la ultraestructura de la sinapsis inhibitoria existente entre las células de cesta y las dendritas de Purkinje, e hicieron un intento de identificación de las fibras trepadoras con el microscopio electrónico^{36, 37}.

Estudios electrofisiológicos han demostrado⁵², que la integración y la información aferente de la corteza cerebelosa, dependen de su organización sináptica intrínseca; esto es, de las conexiones sinápticas existentes entre las fibras aferentes de la corteza cerebelosa (las fibras musgosas y las trepadoras) y las células de Purkinje. La localización funcional cerebelosa, es también dependiente de la diversidad de su organización sináptica.

A la luz de esta información, la capa molecular de la corteza cerebelosa ofrece un excelente arreglo geométrico para estudiar las características ultraestructurales de su organización sináptica.

El propósito del presente trabajo es reportar nuestros hallazgos sobre la ultraestructura de las dendritas de Purkinje, la relación sináptica de estas dendritas con las fibras paralelas, la interrelación glía-neurona, las características submicroscópicas de las neuronas estrelladas y sus relaciones sinápticas con las dendritas de Purkinje.

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron ratones albinos suizos, cuyo peso oscilaba entre 20 y 35 gramos, los cuales se anestesiaron con inyección intraperitoneal de 0.20 - 0.30 mg. de Nembutal (Pentobarbital sódico de los laboratorios Abbott) por gramo de peso corporal. Se practicó la fijación del sistema nervioso central mediante la técnica de perfusión vascular, popularizada por Palay y colaboradores⁵⁰ y modificada por el autor para adaptarla al ratón albino suizo.

Los animales recibieron respiración artificial con carbógeno (mezcla de 96% de oxígeno y 4% de anhídrido carbónico), para evitar alteraciones estructurales por hipoxia. El líquido de perfusión utilizado fue una solución de glutaraldehído al 1%, en solución reguladora 0.1M de fosfato de sodio, a pH de 7.4 y osmolaridad de 380-410 mOsm/litro. La osmolaridad de la solución se determinó mediante el método crioscópico, utilizando un osmómetro Fiske, modelo G; calibrado con soluciones patrones de cloruro de sodio de 100 y 500 mOsm/litro. Una vez finalizada la perfusión se aisló cuidadosamente el sistema nervioso central y se observó al microscopio estereoscópico para evaluar la calidad de la perfusión. Se consideró como criterio de una buena perfusión la ausencia de sangre en las arterias de la base del cerebro. Se tomaron luego muestras de la corteza cerebelosa, las cuales fueron lavadas por dos horas en solución reguladora de fosfato de sodio, de composición similar a la utilizada en el líquido de perfusión. Bloques pequeños, de 1-2 mm, se fijaron secundariamente en solución al 1% de tetraóxido de osmio en solución tampón 0.1M de fosfato de sodio, a un pH de 7.4 y osmolaridad de 210 mOsm/litro. Se hizo deshidratación de los bloques en etanol a concentraciones crecientes y en dos pasajes sucesivos por óxido de propileno; luego se les incluyó en Epon⁸⁴. Para estudiar la histología de la capa molecular de la corteza cerebelosa, se hicieron secciones gruesas, de 0.5-2 micras de espesor, antes de realizar las secciones finas. Estas últimas, se obtuvieron con un ultramicrotomo LKB, provisto de cuchilla de vidrio y se recogieron sobre rejillas de cobre, cubiertas con una película de Formvar y estabilizadas con un baño de carbón. Se colorearon con solución saturada de acetato de uranilo⁸⁵ o citrato de plomo a pH alto⁸⁶ y se observaron en un microscopio electrónico Siemens Elmiskop 1, provisto de una apertura de 50 micrones en el objetivo. Las estructuras submicroscópicas de las microfotografías electrónicas se midieron con una máquina Universal Cambridge.

RESULTADOS

Características submicroscópicas de las dendritas de Purkinje.

Las dendritas de Purkinje constituyen las prolongaciones más grandes de la capa molecular de la corteza cerebelosa. Se bi-



Fig. 1. Microfotografía electrónica de la capa molecular de la corteza cerebelosa, mostrando una dendrita de Purkinje (dP) cubierta por un citoplasma claro de naturaleza glial (G). El citoplasma dendrítico contiene numerosas mitocondrias (M) y membranas del retículo endoplasmático (flechas). En la vecindad de las dendritas de Purkinje se observan las secciones transversales de las fibras paralelas (fp) y numerosos botones sinápticos (bs). Magnificación: 36.000 X.



Fig. 2. Dendrita de Purkinje (dP) mostrando las mitocondrias (M) y los sistemas cisternales endoplasmáticos (flechas) ubicados inmediatamente por debajo de la membrana celular. Las fibras paralelas (fp) están separadas de las dendritas de Purkinje por un citoplasma de naturaleza glial (G), Magnificación: 28.000 X.



Fig. 3. Dendrita de Purkinje (dP) mostrando los canaliculos dendríticos (flechas) dispuestos en paralelo a lo largo de su eje longitudinal. Se observan además, las mitocondrias (M) y los sistemas cisternales endoplasmáticos (flechas en cruz). El citoplasma glial (G) que cubre a las dendritas de Purkinje, muestra inclusiones densas. Magnificación: 24.000 X.

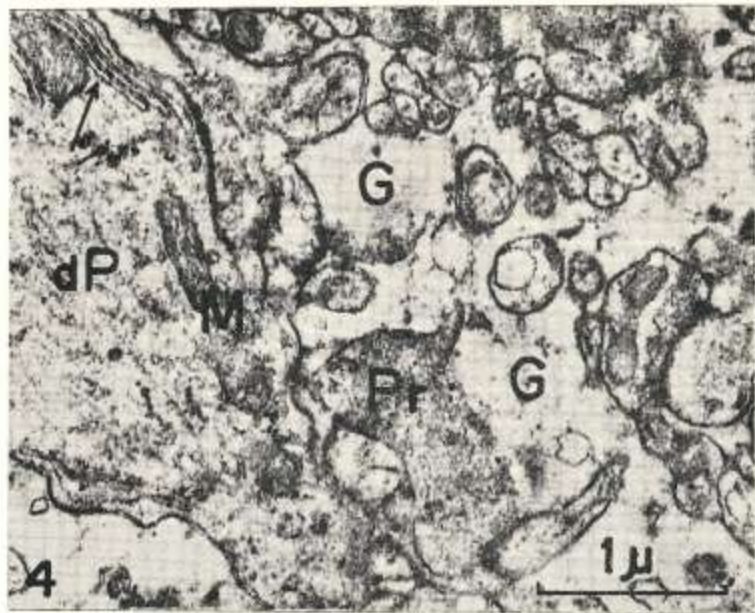


Fig. 4. Microfotografía electrónica mostrando una dendrita de Purkinje (dP) con mitocondrias (M) y un sistema cisternal endoplasmático (flecha). En la vecindad se observa un terminal presináptico (Pr), que contiene gran cantidad de vesículas sinápticas. La dendrita de Purkinje se halla rodeada por un citoplasma claro, de naturaleza glial, presumiblemente fibras de Bergmann (G). El citoplasma glial separa los terminales sinápticos de las dendritas de Purkinje. Magnificación: 28.000 X.

furcan en ramas primarias, secundarias y terciarias, siguiendo un plano perpendicular a la hoja cerebelosa^{55, 56}. Se caracterizan por poseer abundantes membranas del retículo endoplasmático, canaliculos dendríticos y numerosas mitocondrias densas y alargadas, con sus crestas dispuestas longitudinalmente, en paralelo con el eje mayor de la prolongación. Se observan de 4 a 16 mitocondrias por cada 10 micrones de largo de la dendrita: El número de estos organelos aumenta en las dendritas más pequeñas. El retículo endoplasmático muestra un arreglo especial, el cual designaremos con el nombre de sistemas cisternales endoplasmáticos (Figs. 2, 3, 4, 5, 6), formados por sacos aplanados, agrupados en sentido paralelo, en número de 2 a 10, y de aproximadamente 0.2 a 1 micra de longitud. Estas cisternas son de 120 a 240 Å de ancho, y su contenido es electrónicamente lúcido. La membrana limitante de cada cisterna es de aproximadamente 80 Å de grosor y muestra la estructura triple característica de las membranas celulares (Fig. 6). No hemos observado ribosomas adheridos a la superficie externa de las membranas limi-



Fig. 5. Sección transversal de una ramificación dendrítica de Purkinje (dP) mostrando mitocondrias (M) y los canaliculos dendríticos (flechas), de aproximadamente 200 Å de diámetro, Magnificación: 42.000 X.

Fig. 6. Sistema cisternal endoplasmático de una dendrita de Purkinje, cortado en paralelo a su eje longitudinal. La membrana limitante de cada cisterna muestra la estructura triple, característica de las membranas celulares. Magnificación: 90.000 X.

Fig. 7. Dendrita de Purkinje (dP) mostrando gran cantidad de mitocondrias (M) y sistemas cisternales (flechas). Las cisternas están considerablemente distendidas y su contenido es de baja densidad electrónica. El tejido ofrece una apariencia precipitada, aparentemente debida a una fijación deficiente. Magnificación: 42.000 X.



Fig. 8. Ramificación dendrítica terciaria (P3) originándose de una dendrita secundaria de Purkinje (P2). En su interior se observa un acúmulo de mitocondrias (M). La flecha muestra el sitio de emergencia de una espina dendrítica. Separando ambos tipos de prolongaciones dendríticas se observan prolongaciones gliales (G). Magnificación: 39.000 X.

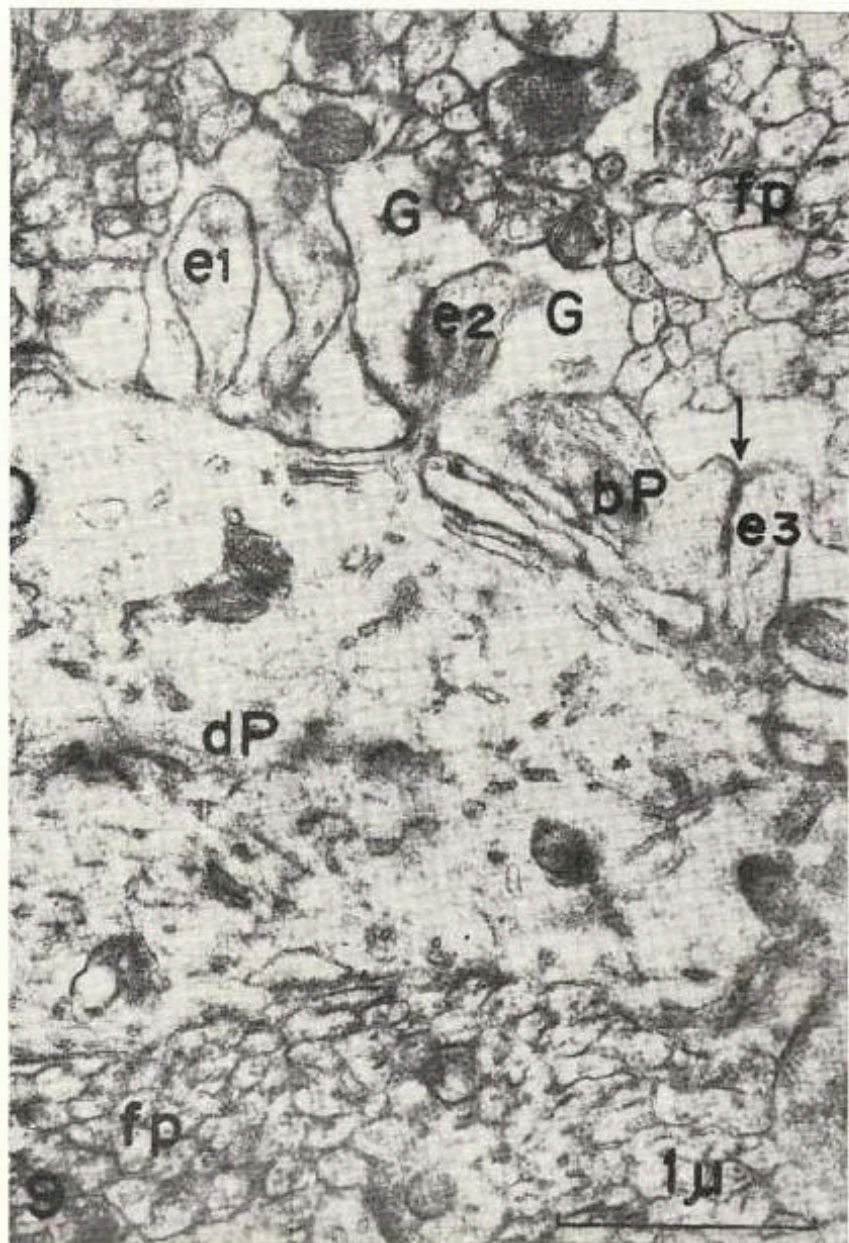


Fig. 9. Ramificación dendrítica de Purkinje (dP) mostrando las espinas dendríticas (e1, e2, e3), cubiertas por citoplasma glial (G). Una de las espinas dendríticas (e3) recibe un botón presináptico (bP). La flecha señala el sitio del contacto sináptico. Las partes superior e inferior de la figura, muestran la sección transversal de las fibras paralelas (fp). Magnificación: 36.000 X.



Fig. 10. Dendrita secundaria de Purkinje (P2) mostrando numerosas mitocondrias (M), membranas del retículo endoplasmático (flechas) y canaliculos dendríticos. En su vecindad se observan varios botones sinápticos (1, 2, 3). En la parte inferior de la figura se observa, parcialmente, otra dendrita de Purkinje (P3). Magnificación: 39.000 X.

tantes, ni continuidad de estas membranas con las del retículo endoplasmático rugoso. El espacio existente entre las membranas es de aproximadamente 70-110 Å y contiene un material electrónicamente más denso que el resto del citoplasma dendrítico.

En algunas microfotografías electrónicas (Fig. 7), las cisternas se observan considerablemente distendidas, siendo de aproximadamente 0.09 a 0.2 micras de ancho. A pesar de su distensión, el espacio entre las membranas limitantes de las cisternas se mantiene constante, lo cual sugiere que el material existente entre ellas actúa como una sustancia cementante. Estos sistemas cisternales se hallan siempre en íntima relación topográfica con las mitocondrias.

De la superficie de las ramificaciones dendríticas de Purkinje emergen numerosas espinas dendríticas (Figs. 8, 9, 11 y 12), las cuales están formadas por un cuerpo redondeado u oval y un pedículo que las une al tallo dendrítico principal; siendo de hasta 3.7 micras de largo y hasta 0.5 micras de diámetro. El citoplasma espinoso contiene membranas del retículo endoplasmático liso. En algunas microfotografías electrónicas, se observan sacos endoplasmáticos (Fig. 20) que semejan al aparato espinoso descrito por Gray²⁹. Las espinas dendríticas constituyen parte de la superficie postsináptica de las dendritas de Purkinje.

Cubriendo casi completamente las dendritas de Purkinje se encuentra un citoplasma claro, de naturaleza glial, que presumiblemente corresponde a los astrocitos de Bergmann^{24, 25}. Este citoplasma rodea a las espinas dendríticas, a los contactos sinápticos espinosos y muestra un carácter infiltrante entre las diferentes prolongaciones nerviosas existentes en la capa molecular.

En la vecindad de las dendritas de Purkinje se observan numerosos botones sinápticos, redondeados u ovales, caracterizados por la presencia de vesículas sinápticas y mitocondrias (Figs. 1, 9, 10, 11 y 12). Estos botones sinápticos corresponden a los terminales de las principales fibras aferentes a las dendritas de Purkinje: fibras paralelas o axones de las células granulosas, fibras trepadoras, axones de las células estrelladas, colaterales recurrentes de los axones de las células de Purkinje y a las colaterales ascendentes de las células de cesta.



Fig. 11. Ramificación dendrítica secundaria de Purkinje (dP) cortada transversalmente. Las flechas señalan los sitios de origen de las espinas dendríticas. Se observa un citoplasma glial (G) rodeando completamente la dendrita y sus espinas. En su inmediata vecindad se observan varios contactos sinápticos espinosos (1, 2, 3, 4) con las fibras paralelas. Magnificación: 24.000 X.



Fig. 12. Ramificación dendrítica terciaria de Purkinje (P3) mostrando numerosas espinas dendríticas (flechas). En su vecindad se observan numerosos contactos sinápticos espinosos con las fibras paralelas (flechas en cruz), los cuales se hallan rodeados por citoplasma glial (G). Magnificación: 36.000 X.

Fig. 13. El segmento engrosado de una fibra paralela (Pr) establece contacto sináptico espinoso con tres espinas dendríticas (1, 2, 3). Nótese que la espina dendrítica 3, aparece englobada por la fibra paralela (Sinapsis esplosa invaginada). Magnificación: 32.000 X.

Fig. 14. La espina dendrítica de Purkinje (e) invagina el segmento sináptico paralelo (Pr). (Sinapsis esplosa invaginada). Magnificación: 66.000 X.

Fig. 15. Un segmento sináptico paralelo (Pr), que contiene numerosas vesículas sinápticas, establece contacto con las espinas dendríticas de Purkinje (e1 y e2). Obsérvese que la membrana postsináptica (membrana de la espina dendrítica) es considerablemente más gruesa que la membrana presináptica (membrana de la fibra paralela). La flecha señala una vesícula sináptica más grande y de centro denso. Magnificación: 66.000 X.

Fig. 16. Una espina dendrítica de Purkinje (e), presiona ligeramente un segmento sináptico paralelo (Pr). La espina dendrítica no muestra estructuras en su citoplasma. El espacio sináptico (flecha) es de mayor densidad electrónica que el resto de la interfase axo-dendrítica. Magnificación: 66.000 X.

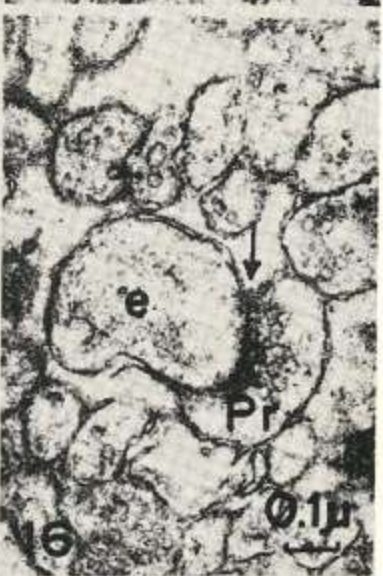


Fig. 17. Microfotografía electrónica mostrando dos contactos sinápticos espinosos. Obsérvese, a nivel de los segmentos sinápticos paralelos (Pr1 y Pr2), la tendencia a la agrupación de las vesículas sinápticas hacia la membrana presináptica. El espacio sináptico (flecha) muestra un material de alta densidad electrónica. Esta imagen sugiere un contacto sináptico durante la fase de excitación. Magnificación: 60.000 X.

Fig. 18. Sección perpendicular a través de las membranas pre y postsinápticas. Obsérvese la diferencia en grosor de ambas membranas y la existencia del espacio sináptico (flecha) entre ellas. El citoplasma de la espina (e) muestra perfiles de membranas. Pr, segmento sináptico paralelo. La imagen sugiere una sinapsis en reposo. Magnificación: 54.000 X.

Fig. 19. Contacto sináptico espinoso mostrando considerable engrosamiento de la membrana postsináptica (flechas paralelas), debido a depósito de material de alta densidad electrónica. Nótese la reflexión de la membrana del citoplasma glial a nivel del espacio sináptico (flecha). Pr, segmento sináptico paralelo; e, espina dendrítica. Magnificación: 66.000 X.

Fig. 20. Sección tangencial a través de una sinapsis espinosa. No se observa el perfil de las membranas pre y postsinápticas ni el espacio sináptico. El citoplasma de la espina dendrítica (e) muestra contornos de membranas que semejan vagamente al aparato espinoso descrito por Gray. Magnificación: 69.000 X.



Sistema sináptico fibras paralelas-dendritas de Purkinje.

Los axones de las células granulosas ascienden a la capa molecular, donde se bifurcan en T siguiendo luego un trayecto paralelo unas a otras y a la superficie de la hoja cerebelosa. De allí su designación de fibras paralelas⁵⁵. Estas fibras cruzan perpendicularmente las ramificaciones dendríticas de Purkinje, estableciendo contactos sinápticos, en pasaje, de tipo cruciforme, con los extremos de las espinas dendríticas de Purkinje. A este nivel, las fibras paralelas muestran un engrosamiento fusiforme que contiene mitocondrias, acúmulos de vesículas sinápticas y una sustancia homogénea densa. Las vesículas sinápticas son de 400-600 Å de diámetro, de contenido claro, y tienden a agruparse hacia la membrana presináptica. La sustancia homogénea densa es de forma irregular y de centro claro (Figs. 10, 20).

El extremo de la espina dendrítica de Purkinje puede observarse simplemente apuesto a la fibra paralela. Sin embargo, muy a menudo la invagina formando "sinapsis espinosas invaginadas", en forma tal que, cuando se observan microfotografías electrónicas de secciones perpendiculares al eje de la espina, esta última aparece completamente rodeada por el terminal sináptico paralelo (Fig. 13).

A nivel del contacto especializado (Figs. 13-20), las membranas pre y postsinápticas están engrosadas y de mayor densidad electrónica que en el resto de la interfase axodendrítica. Este engrosamiento es debido a la presencia de un material citoplasmático adherido a la hoja interna de cada membrana, siendo la postsináptica más gruesa que la presináptica. Las membranas sinápticas están separadas por un espacio de hasta 800 Å de ancho, el cual contiene un material electrónicamente denso. Este tipo de conexión recuerda al contacto sináptico tipo I de Gray²⁵.

Constantemente se observó que los contactos sinápticos espinosos se hallaban rodeados por citoplasma glial, de naturaleza astrocitaria, el cual cubre a las dendritas de Purkinje y que presumiblemente corresponde a los astrocitos de Bergmann (Figs. 10-20). Las estructuras pre y postsinápticas aparecen como incluidos dentro de este citoplasma astrocitario, el cual tiende a encapsular los contactos sinápticos.

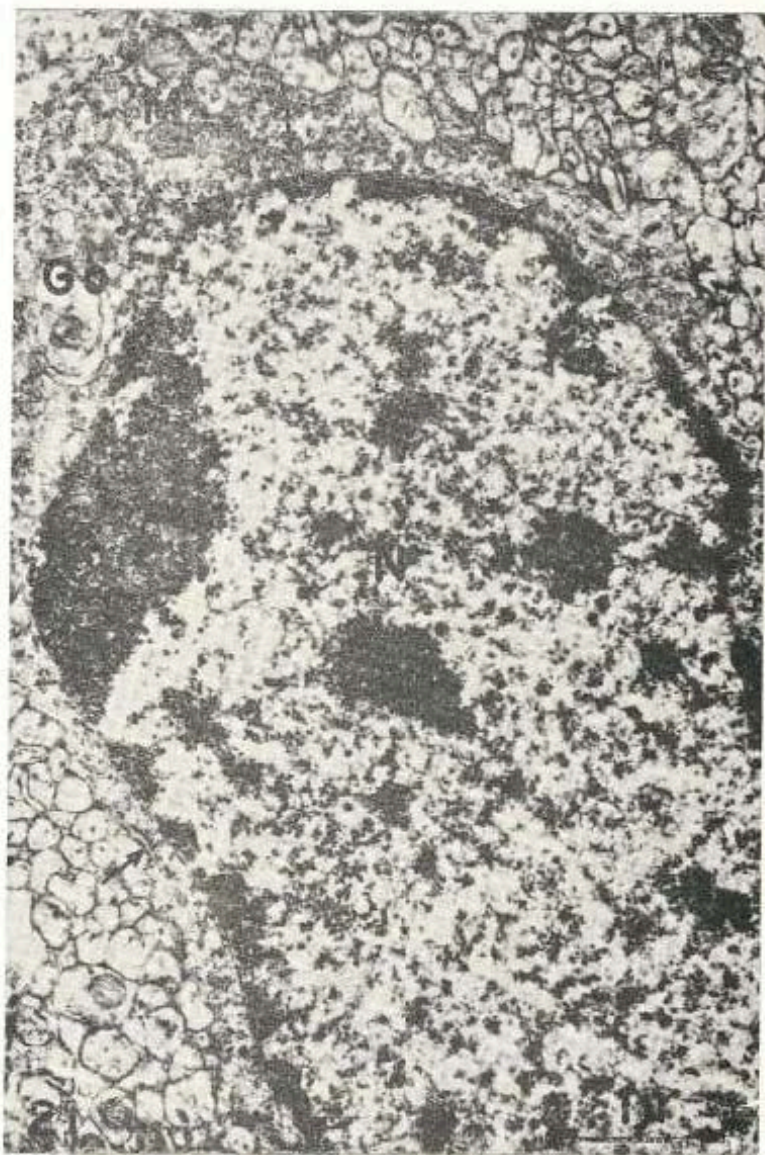


Fig. 21. Neurona estrellada de la capa molecular mostrando un núcleo voluminoso (N) rodeado por una estrecha faja de citoplasma. Este último contiene muy pocos canalículos del retículo endoplasmático rugoso (flechas), mitocondrias (M) y complejo de Golgi (Go). Rodeando al citoplasma se observa una fina red de prolongaciones nerviosas. Magnificación: 24.000 X.



Fig. 22. Neurona estrellada de la capa molecular mostrando un núcleo prominente (N), con cromatina periférica agrupada hacia la membrana nuclear interna. Nótese la regularidad de la cisterna perinuclear ubicada entre las dos membranas nucleares. En el citoplasma se observa un escaso retículo endoplasmático rugoso (flecha), ribosomas libres (flecha en cruz) y mitocondrias (M). Inmediatamente por debajo de la membrana celular se observan cisternas endoplasmáticas aplanadas (flechas paralelas). Rodeando a la neurona estrellada existe una neuropila formada por terminales sinápticos (ts), citoplasma glial (G) y prolongaciones nerviosas pequeñas e indiferenciables. Magnificación: 36.000 X.

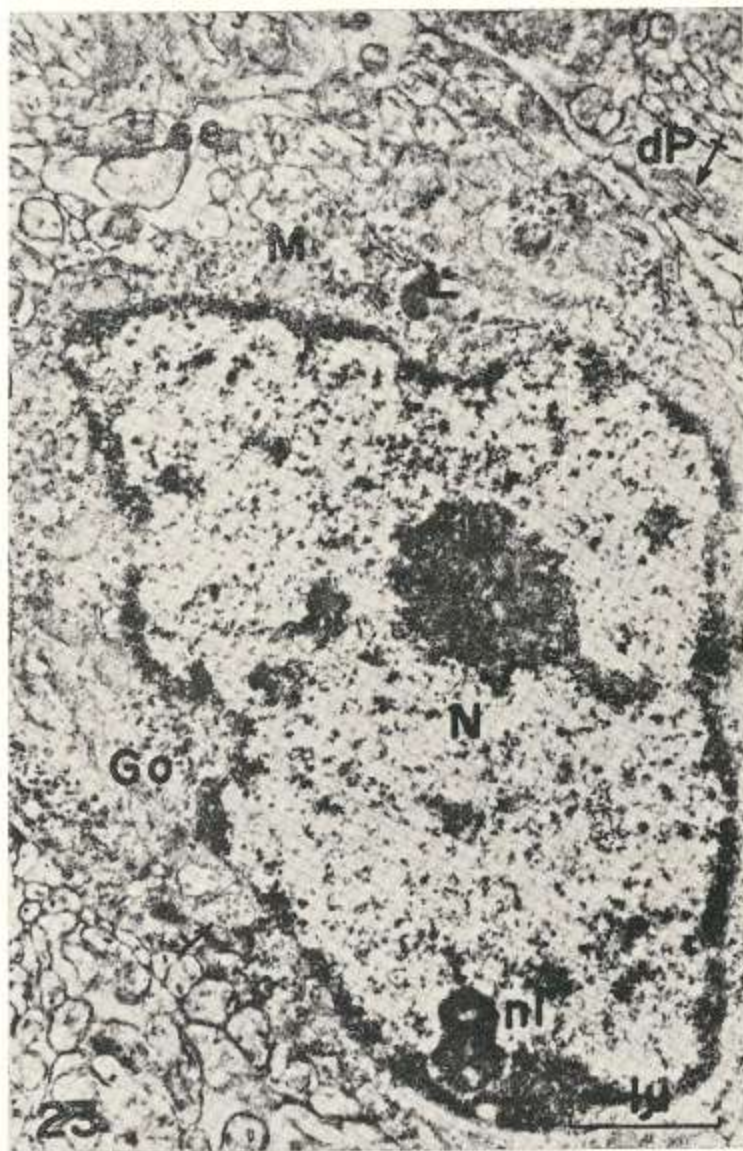


Fig. 23. Neurona estrellada de la capa molecular mostrando un núcleo voluminoso (N), de contorno irregular, provisto de un nucléolo (nl). El citoplasma contiene un escaso retículo endoplasmático rugoso, numerosos ribosomas libres, mitocondrias (M), lisosomas (L), cuerpos multivesiculares (flecha) y complejos de Golgi (Go). Rodeando a la célula se observa una dendrita de Purkinje (dP), con su característico sistema cisternal endoplasmático (flecha en cruz) y una sinapsis espinosa (se) rodeada por citoplasma glial. Magnificación: 22.000 X.



Fig. 24. Neurona estrellada de la capa molecular mostrando un núcleo (N) con cromatina periférica y un nucléolo (nl). El citoplasma contiene numerosas mitocondrias (M) y ribosomas libres. La flecha señala el sitio de emergencia de una dendrita. Cruzando horizontalmente la parte superior de la figura, se halla una dendrita de Purkinje (dP) con mitocondrias alargadas. Separando la neurona estrellada de la dendrita de Purkinje, se observan los contornos de las fibras paralelas (fp) y citoplasma glial (G). Se visualizan además, contactos sinápticos espinosos (flechas cruzadas). Magnificación: 26.000 X.

En algunas microfotografías electrónicas, se observan dos o más espinas dendríticas estableciendo conexión con un solo terminal sináptico (Fig. 13). Generalmente se observan de 5 a 15 fibras paralelas, en una superficie de 100 micras cuadradas, estableciendo uniones sinápticas con las espinas de una dendrita de Purkinje.

Características submicroscópicas de las neuronas estrelladas de la capa molecular de la corteza cerebelosa.

Las células estrelladas son neuronas multipolares de pequeño y mediano tamaño que miden aproximadamente 2-5 micras de diámetro (Figs. 21-27). Muestran un núcleo prominente, redondo u oval, limitado por una doble membrana que presenta, de trecho en trecho, perforaciones o poros nucleares. La membrana nuclear interna está separada de la externa, por un espacio o cisterna perinuclear, que oscila entre 200 y 400 Å de ancho. La doble membrana nuclear muestra ocasionalmente pliegues. La membrana nuclear externa exhibe discontinuidades y desviaciones hacia las membranas del retículo endoplasmático. La cromatina se condensa en grumos gruesos adheridos a la membrana nuclear interna y se esparce en granulaciones gruesas en el carioplasma claro. Los grumos cromatínicos adheridos a la membrana nuclear interna tienden a separarse a nivel de los poros nucleares. Esta distribución de la cromatina es característica de las células fijadas primariamente con glutaraldehído⁵. El núcleo posee un nucléolo denso (Fig. 24), formado por granulaciones finas compactadas.

El citoplasma es abundante en las células de tamaño mediano, y escaso en las pequeñas neuronas estrelladas; formando una banda delgada alrededor del núcleo. Generalmente muestra mayor expansión hacia uno de los polos de las células. El desarrollo del retículo endoplasmático es escaso, pudiendo observarse solamente pocos canaliculos limitados por membranas rugosas o alfa-citomembranas⁶³. Se observan además vesículas de 650 Å de diámetro, y cisternas pequeñas, de contenido claro, distribuidas en todo el citoplasma.

El complejo de Golgi (Figs. 21 y 23) muestra el patrón convencional de cisternas aplanadas, limitadas por membranas, no asociadas a ribosomas, dispuestas paralelamente, rectas o cur-



Fig. 25. Neurona estrellada de la capa molecular mostrando el núcleo (N), el citoplasma con numerosas mitocondrias (M) y abundante cantidad de ribosomas libres. Nótese el axón de la neurona estrellada (Ax). El axoplasma contiene estructuras fibrilares y mitocondrias. No muestra ribosomas. En contacto con el cuerpo celular se hallan varios terminales sinápticos (1, 2, 3, 4), los cuales corresponden probablemente a los colaterales de Schelbel de las fibras trepadoras. En la parte inferior derecha de la figura, se observa una dendrita de Purkinje (dP). Magnificación: 24.000 X.

vas y con dilataciones ocasionales. Estas cisternas aplanadas se hallan rodeadas por vacuolas.

Se observan en el citoplasma cuerpos de inclusión densos o lisosomas (Fig. 23), redondos u ovales, limitados por una unidad de membrana y de aproximadamente 0.4 micras de diámetro. Existen además, cuerpos multivesiculares (Fig. 23), de aproximadamente 350 milimicras de diámetro, los cuales muestran una

membrana limitante y contienen varias vesículas, de contenido claro, y de aproximadamente 300 Å de diámetro.

Se observó abundante cantidad de ribosomas libres (Fig. 25) ocupando todo el citoplasma, llenando los espacios entre los escasos canaliculos del retículo endoplasmático, alrededor de la doble membrana nuclear y en las dendritas. No se observaron alrededor de la zona de Golgi ni en el sitio aparente de emergencia del axón. Los ribosomas muestran un diámetro de 100-150 Å.

Inmediatamente por debajo de la membrana celular se han observado cisternas del retículo endoplasmático liso, aplanadas (Fig. 22), dispuestas paralelamente, y de apariencia similar a



Fig. 26. Microfotografía electrónica mostrando dos dendritas de Purkinje (dP1 y dP2) en la vecindad de una neurona estrellada. Se observan numerosos contactos sinápticos espinosos (flechas) rodeados por citoplasma glial (G). Magnificación: 13.500 X.

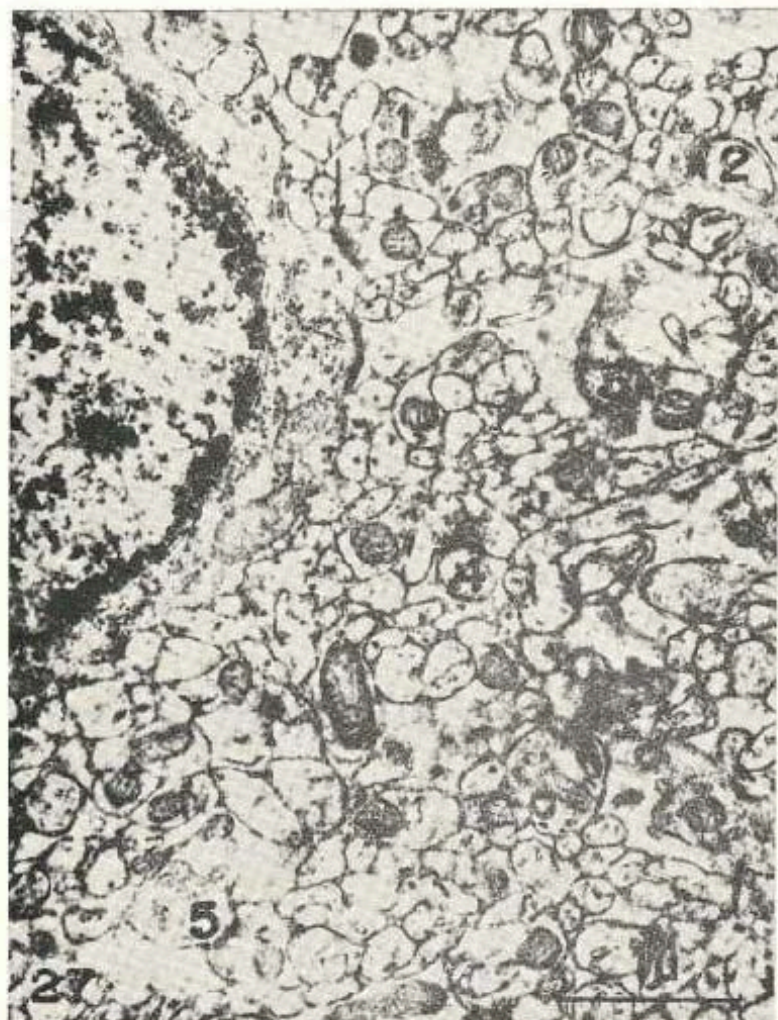


Fig. 27. Microfotografía electrónica ilustrando una compleja neuropila en la vecindad de una neurona estrellada. Se visualizan numerosos contactos sinápticos espinosos (1, 2, 3, 4, 5) entre dendritas de Purkinje y fibras paralelas. La flecha señala un contacto sináptico somático, presumiblemente, con una fibra trepadora (colateral de Scheibel). Magnificación: 26.000 X.

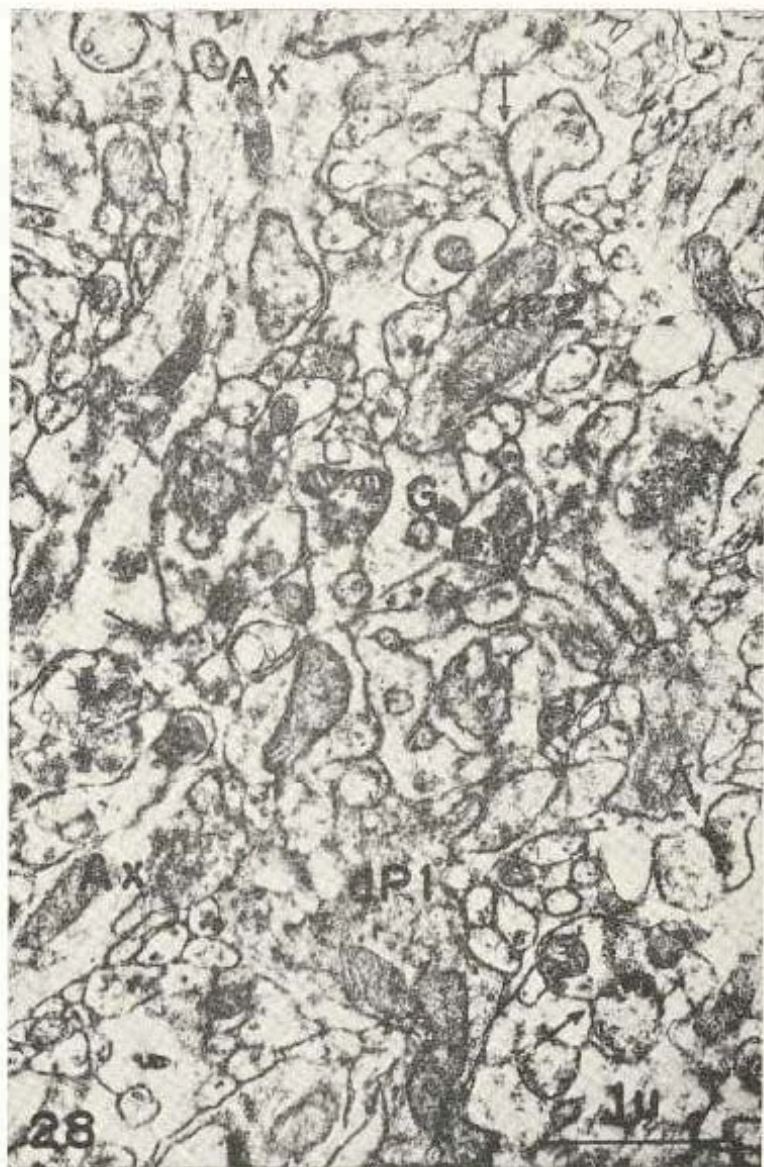


Fig. 28. Microfotografía electrónica de la capa molecular mostrando dendritas de Purkinje (dP1 y dP2), axones de las neuronas estrelladas (Ax) y citoplasma glial (G). Los axones de las células estrelladas muestran neurofilamentos y mitocondrias. La flecha señala la emergencia de una colateral axónica. En los ángulos superior e inferior derechos de la figura se observan dos contactos sinápticos (flechas cruzadas), los cuales presumiblemente corresponden a conexiones entre el axón de la neurona estrellada y la dendrita de Purkinje. Magnificación: 26.000 X.

las ya descritas, en el presente trabajo, a nivel de las dendritas de Purkinje.

Las prolongaciones dendríticas de estas células representan una continuación del citoplasma neuronal. Sólo se ha observado (Fig. 24) el sitio de emergencia de las dendritas, y no hemos obtenido hasta el presente, secciones que muestren el trayecto dendrítico por una distancia apreciable. Se han observado botones sinápticos en contacto con estas dendritas (Fig. 24).

Hemos observado la presencia de axones amielínicos en contacto con el cuerpo celular (Fig. 25), caracterizados por la presencia de neurofilamentos y mitocondrias y por la ausencia de ribosomas. Estos axones se han observado estableciendo contacto sináptico con las dendritas de Purkinje (Figs. 29 y 30), mediante expansiones terminales o botones sinápticos y muestran además prolongaciones colaterales (Fig. 28). Algunos de estos axones, que hemos identificado a nivel de la capa molecular como pertenecientes a las células estrelladas, podrían corresponder también a las fibras trepadoras. Una distinción entre ambos tipos de axones no puede hacerse atendiendo a un criterio puramente morfológico. Se requiere, en el futuro, la utilización de métodos de degeneración muy selectivos^{37,66} para distinguir, con el microscopio electrónico, ambos tipos de axones.

Rodeando a las neuronas estrelladas (Figs. 24, 25), se observan los contornos de prolongaciones celulares pequeñas, indiferenciadas, de formas redondas, ovaladas o poligonales y de citoplasma claro, las cuales no pueden ser identificadas con seguridad como prolongaciones neuronales o neurogliales; probablemente, corresponden a las ramificaciones dendríticas pequeñas de estas neuronas. En contacto con la membrana del soma celular, se observan botones sinápticos típicos, caracterizados por la presencia de mitocondrias y vesículas sinápticas.

En la vecindad de las neuronas estrelladas (Figs. 26-29), se observa una compleja red formada por las ramificaciones dendríticas de Purkinje, las fibras paralelas, los contactos sinápticos espinosos entre dendritas de Purkinje y fibras paralelas, y los axones correspondientes a las fibras trepadoras o a las células estrelladas vecinas. Los espacios entre estas prolongaciones se



Fig. 29. Microfotografía electrónica de la capa molecular mostrando una compleja neuropila formada por dendritas de Purkinje (dP1 y dP2), fibras paralelas (fp), axones de las neuronas estrelladas (Ax) y citoplasma glial (G). La dendrita de Purkinje señalada con dP1, muestra la emergencia de dos espinas dendríticas (flechas). La superficie dendrítica ubicada entre las dos espinas, está en contacto con el terminal sináptico (ts) del axón de las células estrelladas. Las flechas en cruz señalan los contactos sinápticos espinosos entre dendritas de Purkinje y fibras paralelas. Magnificación: 26.000 X.

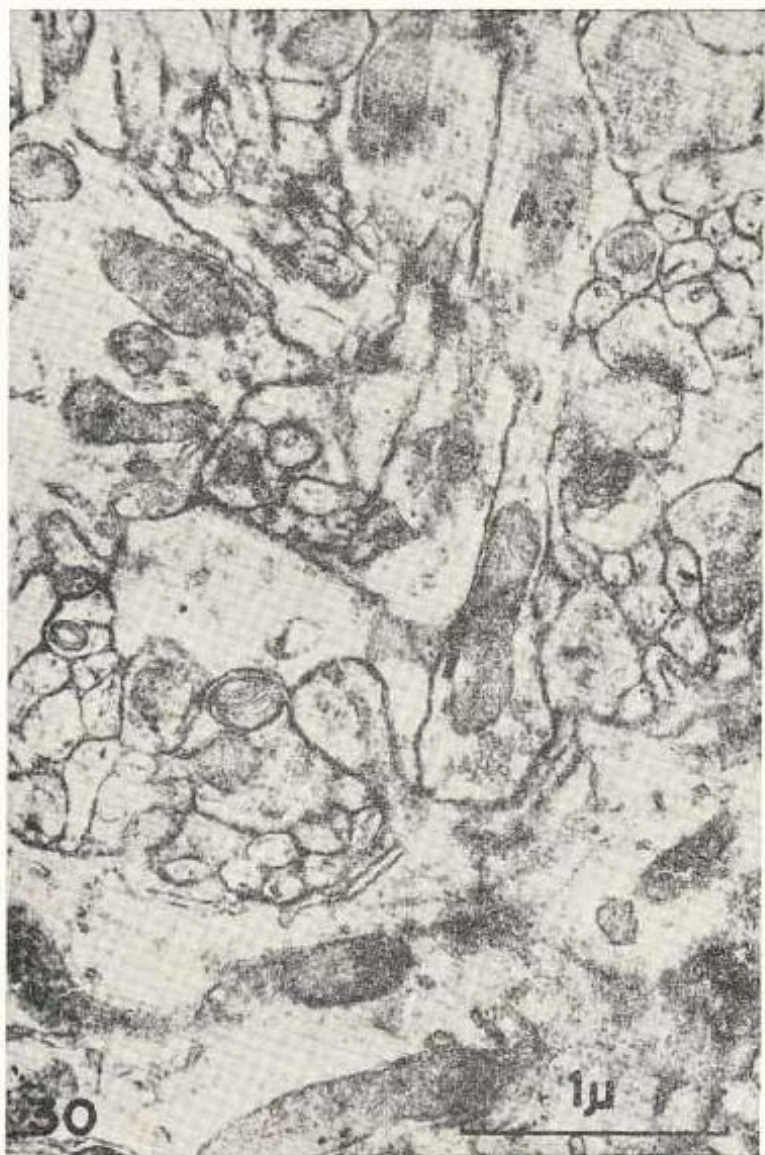


Fig. 30. Microfotografía electrónica de la capa molecular mostrando el axón de una neuroma estrellada (Ax), el cual termina mediante un botón sináptico sobre la superficie de una dendrita de Purkinje (DP). El botón sináptico muestra vesículas sinápticas y mitocondrias. Magnificación: 39.000 X.



Fig. 31. Microfotografía electrónica de la capa molecular mostrando el axón de una neurona estrellada (Ax) y una dendrita de Purkinje (dP). La flecha señala la emergencia de una espina dendrítica, estableciendo contacto sináptico con lo que aparentemente corresponde a una prolongación colateral del axón de la neurona estrellada. El contacto sináptico (flecha en cruz) muestra engrosamiento de las membranas pre y postsinápticas. El engrosamiento de la membrana postsináptica es mayor que el de la presináptica. Las dos membranas se hallan separadas por el espacio sináptico. En la vecindad del contacto sináptico se observa citoplasma glial (G). Magnificación: 39.000 X.

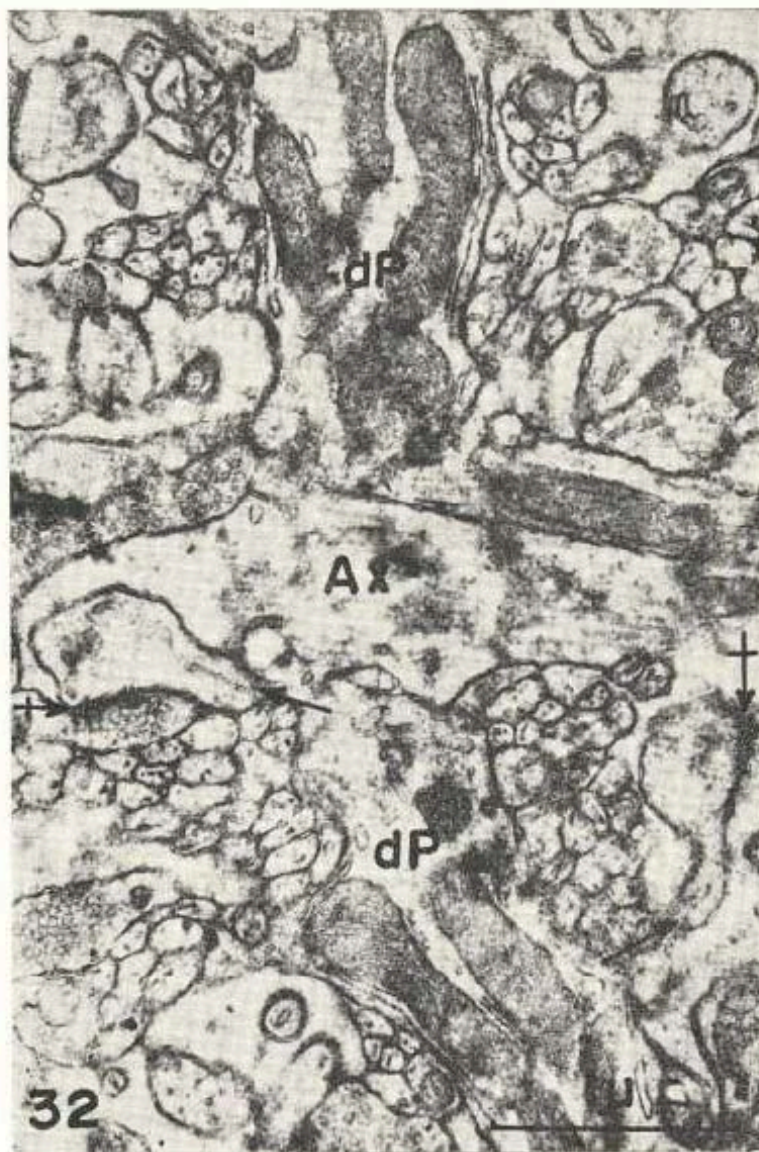


Fig. 32. Microfotografía electrónica de la capa molecular mostrando un axón de la neurona estrellada (Ax) cruzando horizontalmente el centro de la figura. En sentido perpendicular se desplaza una dendrita de Purkinje (dP). Las flechas señalan la emergencia de las espinas dendríticas, las cuales establecen contactos sinápticos con las prolongaciones colaterales del axón de la neurona estrellada. Las flechas en cruz indican el nivel del contacto entre la membrana pre y postsináptica. Magnificación: 36.000 X.

hallan ocupados por citoplasma glial, el cual cubre casi completamente las prolongaciones nerviosas existentes en la capa molecular.

Los axones que han sido interpretados como pertenecientes a las células estrelladas (Figs. 28-30), terminan después de un trayecto de longitud variable, en las dendritas de Purkinje mediante botones sinápticos. Estos botones contienen numerosas vesículas sinápticas y mitocondrias. A baja magnificación, los contactos sinápticos (Figs. 31, 32) muestran engrosamiento de las membranas pre y postsinápticas, las cuales se hallan separadas por una hendidura sináptica. La membrana postsináptica aparece más engrosada que la presináptica. Este tipo de unión corresponde al contacto tipo I, descrito por Gray²⁹. Se requiere un estudio adicional para estudiar, a mayor resolución, sus características ultraestructurales y establecer si existen diferencias con la sinapsis excitatoria.

DISCUSION

Características submicroscópicas de las dendritas de Purkinje.

El estudio de las características submicroscópicas de las dendritas de Purkinje es importante, para tener una mejor comprensión de los mecanismos de propagación del impulso nervioso, a lo largo de uno de los sistemas dendríticos más elaborados del sistema nervioso. Las estructuras submicroscópicas observadas en las dendritas de Purkinje, tales como las mitocondrias y el retículo endoplasmático, han sido observadas en el soma de la célula de Purkinje²⁹. Los canaliculos dendríticos parecen ser los únicos elementos diferenciales existentes entre las dendritas y el soma neuronal de Purkinje. Los registros electrofisiológicos intracelulares efectuados por Granit y Phillips²⁸, no han demostrado una respuesta especial de este gran sistema dendrítico.

Los sistemas cisternales endoplasmáticos observados en las dendritas de Purkinje, constituyen un arreglo especial del retículo endoplasmático. Estos sistemas muestran en su disposición, cierta semejanza con el aparato espinoso descrito por Gray²⁹ y Gray y Guillery³¹ a nivel de la porción basal de las dendritas de

las neuronas de la corteza cerebral y de la médula espinal. No hemos observado, hasta ahora, asociación de estas membranas con ribosomas, ni las placas densas situadas entre las membranas limitantes de las cisternas, en la forma descrita por estos autores. Estas placas densas podrían ser debidas a depósito del ácido fosfotúngstico, utilizado por estos investigadores en la técnica de preparación del tejido. Los sistemas cisternales endoplasmáticos muestran también, semejanza con los cuerpos laminares descritos por Herndon en el citoplasma de las células de Purkinje³⁹, con las cisternas superficiales observadas en el ganglio acústico³⁹, y con los sacos endoplasmáticos descritos por Morales y Duncan⁴⁵.

La significación funcional de este arreglo del retículo endoplasmático es hasta ahora desconocida. Según Herndon³⁹, la formación de estos cuerpos laminares podría ser debida a varias causas, entre ellas, a la temperatura del fijador (la acción del tetraóxido de osmio frío) o a la presión de la cuchilla utilizada para seccionar los tejidos, parcialmente fijados. Nimwegen y Sheldon⁴⁷ consideran que los cuerpos laminares son un arreglo del retículo endoplasmático producido durante la anoxia del tejido.

Los sistemas cisternales endoplasmáticos de las dendritas de Purkinje, los hemos observado en ratones normales, cuyo sistema nervioso central fue fijado, por perfusión vascular, con glutaraldehído a temperatura ambiente. Durante la perfusión vascular, se utilizó, además, un sistema de respiración artificial con carbógeno. Este procedimiento experimental nos permite sugerir, que los sistemas cisternales endoplasmáticos pueden ser arreglos del retículo endoplasmático existente en la célula viva; aunque no se descarta la posibilidad de que sean un ordenamiento provocado por el glutaraldehído. Los hemos observado además, en las dendritas de Purkinje de la corteza cerebelosa obtenida de pacientes con tumores del cerebello, en donde existen zonas de tejido edematoso y sometidos a hipoxia. En estos casos, los sistemas cisternales, a menudo, pierden su regularidad y se observan considerablemente distendidos⁸. Por otra parte, estos sistemas cisternales parecen poseer cierto grado de plasticidad funcional. Su asociación con las mitocondrias sugiere que puede tratarse de estructuras relacionadas con la utilización de fosfatos de alta energía, como el ATP³⁸.

Numerosas prolongaciones colaterales o espinas dendríticas emergen de las ramificaciones secundarias y terciarias de Purkinje. Estas espinas dendríticas constituyen las zonas receptoras postsinápticas en contacto con la porción engrosada de las fibras paralelas. Observaciones similares han sido hechas por Fox y colaboradores^{23, 24}.

Las dendritas de Purkinje y sus espinas dendríticas se hallan cubiertas por prolongaciones de citoplasma glial probablemente continuación de aquel que envuelve el cuerpo de las células de Purkinje⁶⁵, y que presumiblemente corresponde a las prolongaciones de los astrocitos de Bergmann²⁵. Este citoplasma fue identificado erróneamente por Herndon¹⁸ como perteneciente a las fibras trepadoras.

En la actualidad se desconoce la significación funcional de la íntima relación de los astrocitos de Bergmann con las dendritas de Purkinje. Probablemente, esta íntima relación glía-neurona tiene papel en el intercambio de agua e iones; en la forma como ha sido considerada por De Robertis, Gerschenfeld y Wald¹³ en los astrocitos cerebrales.

Se han observado numerosos botones sinápticos, que contienen mitocondrias y vesículas sinápticas, densamente distribuidos alrededor de las dendritas de Purkinje. Esto demuestra, que estas dendritas son excitables químicamente. El número de botones sinápticos que rodea a las dendritas secundarias y terciarias de Purkinje es numeroso y, aparentemente, la densidad de los botones sinápticos no disminuye a medida que nos alejamos del cuerpo celular, como ha sido observado en las dendritas de las motoneuronas¹⁹. Esto indica, que las más finas ramificaciones de las dendritas de Purkinje son funcionalmente activas.

Sistema sináptico fibras paralelas - dendritas de Purkinje.

Las fibras paralelas o axones de las células granulosas, ascienden a la capa molecular de la corteza cerebelosa, donde se bifurcan siguiendo un curso paralelo a la superficie de la folia cerebelosa y perpendicular a las dendritas de Purkinje. Esta disposición geométrica, origina sinapsis axo-dendríticas "cruciformes" entre ambos tipos de prolongaciones. Un arreglo geométrico similar se observa en las sinapsis de la sustancia gelatinosa

de Rolando y en el cuerpo geniculado lateral⁶⁵. Las fibras paralelas efectúan sinapsis en pasajes ("terminaisons en passant") con las dendritas de Purkinje. Este tipo de sinapsis no terminal, permite a cada fibra paralela, hacer contactos múltiples con cada dendrita de Purkinje. En esta forma, como ha sido ya considerado por Fox y Barnard²², la divergencia de los impulsos aferentes a la capa molecular se complementa con la numerosa convergencia de impulsos sobre cada célula de Purkinje. Estos autores han estimado, que aproximadamente 250.000 fibras paralelas pasan a través de cada árbol dendrítico de Purkinje, con los cuales efectúan alrededor de 61.000 contactos sinápticos. Se trata de un arreglo en el cual hay máxima convergencia y máxima divergencia en un espacio mínimo.

Estudios electrofisiológicos muestran que las fibras paralelas son responsables de la conducción del impulso nervioso a lo largo del eje longitudinal de la folia cerebelosa. Eccles ha demostrado²⁰, que las células granulosas generan descargas repetitivas de impulsos a través de las fibras paralelas, las cuales excitan sinápticamente a las células de Purkinje, estrelladas y de cesta. De acuerdo con estos estudios, el presente trabajo provee las bases estructurales de una sinapsis de naturaleza excitatoria, ya que muestra en detalles, las características ultraestructurales de los contactos sinápticos espinosos del sistema sináptico fibra paralela-dendrita de Purkinje. La porción engrosada de las fibras paralelas contiene vesículas sinápticas típicas, mitocondrias y una sustancia homogénea densa; características muy similares a las que ha descrito el autor³ en sinapsis de invertebrados. El contacto sináptico con la espina dendrítica se efectúa, algunas veces, mediante simple aposición, o a menudo, el extremo de la espina invagina el terminal sináptico paralelo formando sinapsis espinosas invaginadas. Sinapsis espinosas, similares a las aquí descritas, han sido observadas en la corteza visual por Gray²⁹, en la médula espinal por Whittaker y Gray³¹, en el cerebelo por Gray³⁰, Hamori y Szentagothai³⁵ y Fox y colaboradores²⁴ y por Westrum y Blackstad⁷⁰ en el stratum radiatum del hipocampo.

El contacto sináptico espinoso muestra considerable engrosamiento de la membrana postsináptica, correspondiendo a la sinapsis tipo I descrita por Gray en la corteza visual de la rata²⁹. El engrosamiento de la membrana postsináptica se debe a de-

pósito de material citoplasmático electrodensó, a nivel de su superficie citoplasmática.

Neuronas estrelladas de la capa molecular de la corteza cerebelosa.

Las neuronas estrelladas de la capa molecular de la corteza cerebelosa fueron descritas, casi simultáneamente por Fusari y Ponti (citado por Jakob, 1928) y por Ramón y Cajal, 1888^{41, 44}. Posteriormente Ramón, 1896; Smirnow, 1897; Crevatín, 1898; y Ramón y Cajal, 1911, las describieron más detalladamente^{7, 55, 57, 61}. Ramón y Cajal en 1901, citado por Estable²¹, las clasificó de acuerdo a su trayecto axónico. Esta clasificación fue empleada en las descripciones de Estable, 1923; y Jakob, 1928. Posteriormente Scheibel y Scheibel, 1954, describieron las relaciones sinápticas de estas neuronas con las fibras trepadoras y con las células de cesta⁴⁰. En un estudio sobre la estructura fina de la corteza cerebelosa, Herndon, 1964, describe brevemente las características submicroscópicas de las neuronas estrelladas de la capa granulosa y molecular del cerebelo⁴⁰.

En el presente trabajo hemos detallado, a baja magnificación, las características submicroscópicas de las neuronas estrelladas. En su citoplasma llama la atención el escaso desarrollo del retículo endoplasmático rugoso en contraste con la abundancia de ribosomas libres. Algunos organelos intracelulares descritos, tales como las mitocondrias, el complejo de Golgi, los lisosomas y los cuerpos multivesiculares, no muestran características ultraestructurales diferentes a las ya descritas en otros tipos neuronales^{4, 5, 42, 46, 48, 67}. Se observó, además, la presencia de cisternas endoplasmáticas superficiales, de apariencia similar a aquellas observadas por Rosenbluth⁵⁷ en el ganglio acústico.

Se observaron contactos sinápticos a nivel del soma neuronal y de las dendritas, los cuales presumiblemente corresponden a los botones sinápticos, terminales o de paso (*boutons-en-passage*), de las colaterales de las fibras trepadoras (colaterales de Scheibel) y de las fibras paralelas⁴⁰. Los contactos sinápticos observados a nivel del sitio de emergencia del axón, corresponden probablemente a los terminales sinápticos de los axones de otras células estrelladas o de las fibras trepadoras. Trabajos previos han demostrado, que estas neuronas son sinápticamente

excitadas a través de las fibras paralelas y de las fibras trepadoras²⁰. Los axones muestran prolongaciones colaterales las cuales corresponden a sus colaterales ascendentes y descendentes descritas al microscopio de luz⁶⁰. Estos axones terminan en botones sinápticos a nivel de las dendritas de Purkinje. En este tipo de contacto sináptico, de naturaleza inhibitoria^{20, 43}, no se han observado hasta el presente características ultraestructurales diferentes a las ya descritas para las sinapsis excitatorias^{3, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 19, 36, 37, 49, 65}. Estudios electrofisiológicos han permitido a Eccles²⁰ postular, que estas células actúan como interneuronas que ejercen una acción sináptica inhibitoria sobre la actividad de las células de Purkinje. Estas células no están presentes en la capa molecular de la corteza cerebelosa del sapo; los registros eléctricos efectuados en este animal, no muestran la prolongada hiperpolarización correspondiente a los potenciales postsinápticos inhibitorios⁴³. De acuerdo con estos hallazgos, este trabajo provee las bases estructurales de una neurona intercalar inhibitoria, colocada entre las principales fibras aferentes a la capa molecular: fibras trepadoras y fibras paralelas (axones de las células granulosas) y las dendritas de Purkinje. Este circuito neuronal: fibras aferentes - neuronas estrelladas - dendritas de Purkinje, parece constituir parte del substratum estructural de los fenómenos de localización cerebelosa^{1, 16, 17, 62}.

RESUMEN

1. Muestras de la corteza cerebelosa de ratón fueron fijadas por perfusión vascular con glutaraldehído al 1%, en solución reguladora de fosfato de sodio, a pH de 7.4 y osmolaridad de 380-410 mOs/litro; fijadas secundariamente en solución al 1% de tetraóxido de osmio, en solución similar a la del líquido de perfusión, e incluidas en Epon. Se hicieron secciones finas con ultramicrotomo LKB, las cuales se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo, y se observaron con microscopio electrónico.

2. Las dendritas de Purkinje contienen abundantes membranas del retículo endoplasmático, mitocondrias alargadas, canalículos dendríticos y un arreglo especial del retículo endoplasmático; los sistemas cisternales endoplasmáticos. Se postula este sistema membranoso como un arreglo existente en la célula viva.

3. Las ramificaciones dendríticas de Purkinje emiten numerosas espinas dendríticas, las cuales constituyen los elementos estructurales postsinápticos.

4. Las dendritas de Purkinje y sus espinas dendríticas se hallan cubiertas por un citoplasma glial, el cual presumiblemente corresponde a los astrocitos de Bergmann.

5. Los segmentos engrosados de las fibras paralelas establecen contactos sinápticos de paso, con las espinas dendríticas de Purkinje. El engrosamiento fusiforme muestra vesículas sinápticas, mitocondrias y una sustancia homogénea densa. Las espinas dendríticas, que contienen perfiles de membranas, presionan el terminal sináptico paralelo formando sinapsis espinosas invaginadas.

6. A nivel del contacto sináptico, las membranas pre y postsinápticas están engrosadas. El engrosamiento considerable de la membrana postsináptica se debe a la aposición de material electro-denso en su superficie citoplasmática.

7. Los contactos sinápticos espinosos se hallan rodeados por citoplasma glial de naturaleza astrocitaria.

8. Las neuronas estrelladas de la capa molecular muestran un núcleo prominente, rodeado por un citoplasma escaso con muy pocas membranas del retículo endoplasmático rugoso y abundantes ribosomas libres. Los organelos citoplasmáticos, tales como las mitocondrias, el complejo de Golgi y los lisosomas, muestran los caracteres ultraestructurales ya descritos en otros tipos neuronales.

9. Se observó la presencia de terminales sinápticos alrededor del cuerpo celular y en el sitio de emergencia del axón; los cuales presumiblemente corresponden a las fibras paralelas y trepadoras.

10. Los axones de las neuronas estrelladas establecen conexión sináptica, mediante botones terminales, con las dendritas de Purkinje. Estos botones sinápticos contienen mitocondrias y vesículas sinápticas.

SUMMARY

1. Mouse cerebellar cortex was fixed by the vascular perfusion technique using one per cent solution of glutaraldehyde-sodium phosphate buffer, the pH as 7.4 and osmolarity of 380-410 mOs/liter; postfixed in 1% osmium tetroxide-sodium phosphate buffer solution, embedded in Epon, stained with uranyl acetate or lead citrate and examined with the electron microscope.

2. Purkinje cell dendrites show numerous endoplasmic reticulum membranes, elongated mitochondria, dendritic canaliculi and an unusual arrangement of the endoplasmic reticulum: the endoplasmic cisternae systems. The functional significance of this membrane array is discussed.

3. The Purkinje cell dendritic branches give off dendritic spines which represent the postsynaptic structural elements.

4. Purkinje cell dendrites and its spines are covered by a glial sheath, which presumably belongs to the Bergmann astrocytes.

5. The fusiform thickening of the parallel fibers establish synaptic connexion with the Purkinje cell dendritic spine. The parallel synaptic enlargement contains synaptic vesicles, mitochondria and a dense-homogeneous substance. The dendritic spines, containing membrane profiles, deeply impress the parallel synaptic terminal, making "invaginated spine synapses".

6. At the region of contact, the pre and postsynaptic membranes are thickened and the postsynaptic membrane is clearly thicker than the presynaptic one. The synaptic junction resembles Gray's type I synaptic contact.

7. The spine synapses are completely surrounded by a glial cytoplasm, astrocytic in nature.

8. The stellate neurons show a prominent nucleus, surrounded by a thin ring of cytoplasm, which contains scarce rough endoplasmic reticulum membrane profiles and numerous free ribosomes. The cytoplasmic organelles such as mitochondria, Golgi complex and lysosomes exhibit the ultrastructural features already described in other cellular types.

9. Synaptic knobs were observed surrounding the neuronal body at the level of the axon hillock. These synaptic endings presumably correspond to parallel and climbing fibers.

10. The stellate cell axons end in the Purkinje cell dendritic surface by means of synaptic knobs containing synaptic vesicles and mitochondria.

AGRADECIMIENTO

Nuestra gratitud a la Dra. Haydée Viloría de Castejón, por su colaboración durante la realización de la técnica de perfusión vascular; a la Srta. Zoila González y al Sr. José Espinoza, por su asistencia técnica; al Sr. Eduardo Añez, por el trabajo fotográfico; al Sr. Aurelio Bohórquez, por su ayuda en la realización de los dibujos esquemáticos; y a la Sra. Francoise Vestrini de Zagni, por su asistencia secretarial.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 — ADRIAN, E. D. "Afferent areas in the cerebellum connected with the limbs". *Brain*. 66: 289-319. 1939.
- 2 — CARREA, R. M. E.; REISSIG, M.; METTLER, F. A. "The climbing fibers of the simian and feline cerebellum. Experimental inquiry into their origin by lesions of the inferior olives and deep cerebellar nuclei". *J. Comp. Neurol.* 87: 321-365. 1947.
- 3 — CASTEJON, O. J.; VILLEGAS, G. M. "Fine structure of the synaptic contacts in the stellate ganglion of the squid". *J. Ultrastr. Res.* 10: 585-598. 1964.
- 4 — CASTEJON, O. J. "Ultraestructura de la neurona". *Invest. Clín.* N° 21: 35-62. 1967.
- 5 — CASTEJON, O. J. "Fijación química de tejidos para microscopía electrónica". *Invest. Clín.* N° 22: 11-44. 1967.
- 6 — CASTEJON, O. J. "Los sistemas cisternales endoplasmáticos en las dendritas de Purkinje del cerebelo humano". *Invest. Clín.* N° 26: 71-79. 1968.

- 7 — CREVATIN, F. "Ueber die Zellen Von Fusari und Ponti in der Kleinhirnrinde von Säugetieren". *Anat. Anz.* 14: 433-436. 1898.
- 8 — DE LEMOS, C.; PICK, J. "The fine structure of thoracic sympathetic neurons in the adult rat". *Zeitschrift für Zellforschung.* 71: 189-206. 1966.
- 9 — DE LORENZO, A. J. D. "Electron microscopy of the cerebral cortex. I. The ultrastructure and histochemistry of synaptic junction". *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 108: 258-279. 1961.
- 10 — DE ROBERTIS, E.; BENNET, H. S. "Submicroscopic vesicular component in the synapse". *Fed. Proc.* 13: 35. 1954.
- 11 — DE ROBERTIS, E.; BENNET, H. S. "Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1: 47-58. 1955.
- 12 — DE ROBERTIS, E. "Submicroscopic morphology and function of the synapse". *Exper. Cell Res. Suppl.* 5: 347-369. 1958.
- 13 — DE ROBERTIS, E.; GERSHENFELD, H. M.; WALD, F. "Ultrastructure and function of glial cells". *Structure and function of the cerebral cortex.* Págs. 69-80. Tower C. B.; Schadé, J. P. (eds.) Elsevier. New York. 1960.
- 14 — DE ROBERTIS, E. "Histophysiology of synapses and neurosecretion". Pergamon Press. New York. 1964.
- 15 — DE ROBERTIS, E. "Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region". *Science.* 156: 907-914. 1967.
- 16 — DOW, R. S. "Cerebellar action potentials in response to stimulation of various afferent connections". *J. Neurophysiol.* 2: 543-555. 1939.
- 17 — DOW, R. S. "Action potentials in response to local electrical stimulation". *J. Neurophysiol.* 12: 245-246. 1949.
- 18 — ECCLES, J. C. "The properties of the dendrites". *Structure and function of the cerebral cortex.* Págs. 192-203. Tower, C. B.; Schadé, J. P. (eds.) Elsevier. New York. 1960.
- 19 — ECCLES, J. C. "The physiology of synapses". Pág. 11. Academic Press. New York. 1964.
- 20 — ECCLES, J. "Functional meaning of the patterns of synaptic connexions in the cerebellum". *Perspect. Biol. Med.* 8: 289-310. 1965.
- 21 — ESTABLE, C. "Notes sur la structure comparative de l'écorce cérébelleuse, et dérivées physiologiques possibles". *Trab. Lab. Invest. Biol. Madrid.* 21: 169-265. 1923.
- 22 — FOX, C. A.; BARNARD, J. W. "A quantitative study of the Purkinje dendritic branchlets and their relationship to afferent fibers". *J. Anat. (Lond.)* 91: 299-313. 1957.
- 23 — FOX, C. A. "The structure of the cerebellar cortex". *Correlative anatomy of the nervous system.* Págs. 193-198. MacMillan, Co. New York. 1962.

- 24 — FOX, C. A.; SIEGESMUND, K. A.; DUTTA, C. R. "The Purkinje cell dendritic branchlets and their relations with parallel fibers: Light and electron microscopic observations". Págs. 112-141. Morphological and biochemical correlates of neural activity. Cohen, M.; Snider, R. S. (eds.) Hoeber Medical Division. Harper and Row. New York. 1964.
- 25 — FOX, C. A. "Observaciones en microscopía electrónica en las relaciones de las células de Purkinje - fibras de Bergmann". I Congreso Panamericano de Anatomía. Archivos Mexicanos de Anatomía. 8: 35. 1966.
- 26 — GOLGI, C. "Sulla struttura della sostanza grigia del cervello". Gazz. Med. Ital. 31: 244-246. 1873.
- 27 — GOLGI, C. "Untersuchungen über den feineren Bau des centralen und peripherischen Nerven System". Jena, 6. Fischer, 1894.
- 28 — GRANIT, R.; PHILLIPS, C. G. "Excitatory and inhibitory processes acting upon individual Purkinje cells of the cerebellum in cats". J. Physiol. 133. 520-547. 1956.
- 29 — GRAY, E. G. "Ultrastructure of synapse of the cerebral cortex and of certain specializations of neuroglial membranes". Electron microscopy in anatomy. Boy, J. D.; Johnson, F. R.; Lever, J. D. (eds.) Edward Arnold Publisher. London. 1961.
- 30 — GRAY, E. G. "The granule cells, mossy synapses and Purkinje spine synapses of the cerebellum: light and electron microscope observations". J. Anat. (Lond.) 95: 345-356. 1961.
- 31 — GRAY, E. G.; GUILLERY, R. W. "A note on the dendritic spine apparatus". J. Anat. (Lond.) 97: 389-392. 1963.
- 32 — HAGER, H. "Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Struktur der sogenannten Grundsubstanz in der, Gross- und Kleinhirnrinde des Säugetieres". Arch. Psych. Ztschr. ges. Neurol. 198: 574-600. 1959.
- 33 — HAGER, H.; HIRSCHBERGER, W. "Die Feinstruktur der Kleinhirnrinde des Goldhamsters". Fourth International Conference on Electron Microscopy. Bergmann, W. (ed.) Springer. Berlin. 1960.
- 34 — HAMA, K. "Some observations on the fine structure of the giant fibers of the crayfishes (*Cambarus virilis* and *Cambarus clarkii*) with special reference to the submicroscopic organization of the synapses". Anat. Rec. 141: 275-293. 1961.
- 35 — HAMORI, J.; SZENTAGOTHAI, J. "The 'crossing-over' synapses: An electron microscope study of the molecular layer on the cerebellar cortex". Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 15: 95-117. 1964.
- 36 — HAMORI, J.; SZENTAGOTHAI, J. "The Purkinje cell baskets: Ultrastructure of an inhibitory synapse". Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 15: 465-479. 1965.

- 37 — HAMORI, J.; SZENTAGOTHAJ, J. "Identification under the electron microscope of climbing fibers and their synaptic contacts". *Exptl. Brain Res.* 1: 85-81. 1966.
- 38 — HERNDON, R. M. "The fine structure of the Purkinje cell". *J. Cell Biol.* 18: 167-180. 1963.
- 39 — HERNDON, R. M. "Lamellar bodies, an unusual arrangement of the granular endoplasmic reticulum". *J. Cell Biol.* 20: 338-342. 1964.
- 40 — HERNDON, R. M. "The fine structure of rat cerebellum. II. The stellate neurons, granule cells, and glia". *J. Cell Biol.* 23: 277-293. 1964.
- 41 — JAKOB, A. "Das kleinhirn". *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*. Vol. IV Págs. 771-831. Mollendorff, W. V. (ed.) Julius Springer, Berlin. 1928.
- 42 — KARLSSON, U. "Three-dimensional studies of neurons in the lateral geniculate nucleus of the rat. I. Organelle organization in the perikarion and its proximal branches". *J. Ultrast. Res.* 16: 429-481. 1966.
- 43 — LLINAS, R.; BLOEDEL, J. R. "Absence of long-term inhibition upon Purkinje cells". *Science*. 115: 601-603. 1967.
- 44 — LUFT, J. H. "Improvements in epoxy resin embedding methods". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9: 409-414. 1961.
- 45 — MORALES, R.; DUNCAN, D. "Multilaminated bodies and other unusual configurations of endoplasmic reticulum in the cerebellum of the cat. An electron microscopy study". *J. Ultrast. Res.* 15: 480-489. 1966.
- 46 — NAKAJIMA, Y.; PAPPAS, G. D.; BENNET, V. L. "The fine structure of the supramedullary neurons of the puffer with special reference to endocellular and pericellular capillaries". *Amer. J. Anat.* 116: 471-491. 1965.
- 47 — NIMWEGEN, D.; SHELDON, H. "Early postmortem changes in cerebellar neurones of the rat". *J. Ultrast. Res.* 14: 34-46. 1966.
- 48 — PALAY, S. L.; PALADE, C. E. "The fine structure of neurons". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1: 69-88. 1955.
- 49 — PALAY, S. L. "Synapses in the central nervous system". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2 (Suppl.): 193-202. 1956.
- 50 — PALAY, S. L.; MCGEE-RUSSELL, S. M.; GORDON S.; GRILLO, M. A. "Fixation of neural tissues for electron microscopy by perfusion with solutions of osmium tetroxide". *J. Cell Biol.* 12: 385-410. 1962.
- 51 — PALAY, S. L. "The structural basis for neural actions". *Brain Functions*, Vol. II. Págs. 69-108. Brazier, M. A. (ed.) University of California Press. Berkeley. 1964.

- 52 — PURPURA, D. P. "Nature of electrocortical potentials and synaptic organizations in cerebral and cerebellar cortex". *Int. Rev. Neurobiol.* 1: 47-163. 1959.
- 53 — RAMON Y CAJAL, S. "Sobre ciertos elementos bipolares del cerebelo joven y algunos detalles más acerca del crecimiento y evolución de las fibras cerebelosas". *Gac. San. Barcelona.* Febrero 10. 1840.
- 54 — RAMON Y CAJAL, S. "Estructura de los centros nerviosos de las aves". *Rev. Trim. Hist. Normal y Patol.* Mayo 1. Madrid, 1888.
- 55 — RAMON Y CAJAL, S. "Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés." Vol. II. Págs. 1-32. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, 1955.
- 56 — RAMON Y CAJAL, S. "Sur les fibres mousseuses et quelques points douteux de la texture de l'écorce cérébelleuse". *Trab. Lab. Biol. Univ. Madrid.* 24: 214-251. 1926.
- 57 — RAMON, P. "Las células estrelladas de la capa molecular del cerebelo de los reptiles". *Rev. Trim. Micrográfica.* Tomo I. Madrid, 1896.
- 58 — REYNOLDS, E. S. "The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy". *J. Cell Biol.* 17: 208-212. 1933.
- 59 — ROSENBLUTH, J. R. "Subsurface cisterns and their relationship to neuronal plasma membrane". *J. Cell Biol.* 13: 405. 1962.
- 60 — SCHEIBEL, M. E.; SCHEIBEL, A. B. "Observations on the intracortical relations of the climbing fibers of the cerebellum". *J. Comp. Neurol.* 101: 733-764. 1954.
- 61 — SMIRNOW, A. E. "Ueber eine besondere Art von Nervenzellen der Molecularschicht der Kleinhirns bei erwachsenen Säugtieren und beim Menschen". *Anat. Anz.* 13: 636-642. 1897.
- 62 — SNIDER, R. S.; STOWELL, A. "Evidence of tactile sensibility in the cerebellum of the cat". *Fed. Proc.* 1: 82. 1942.
- 63 — SJOSTRAND, F. S. "A comparison of plasma membrane, cytomembranes and mitochondrial membrane elements with respect to ultrastructural features". *J. Ultrast. Res.* 9: 561-580. 1963.
- 64 — SZENTAGCTHAI, J.; RAJKOVITZ, J. "Über den Ursprung der Kletterfasern des Kleinhirns". *Z. Anat. Entwick. Gesch.* 121: 130-141. 1959.
- 65 — SZENTAGCTHAI, J. "Anatomical aspects of junctional transformation". *Information processing in the nervous system.* Vol. III. Proc. Int. Union Physiol. Sci. XXII International Congress. Leiden, 1962.
- 66 — SZENTAGCTHAI, J. "The use of degeneration methods in the investigation of short neuronal connexions". *Progr. Brain Res.* 14: 1-32. 1964.

- 67 — TAKAHASHI, R.; HAMA, K. "Some observations on the fine structure of nerve cells bodies and their satellite cells in the ciliary ganglion of the chick". *Zeitschrift für Zellforschung*. 67: 835-843. 1965.
- 68 — VIETS, H. R.; GARRISON, H. F. "Purkinje's original description of the pear-shaped cells in the cerebellum". *Bull. Hist. Med.* 8: 1397. 1940.
- 69 — WATSON, M. L. "Staining tissue sections for electron microscopy with heavy metals". *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 475-478. 1958.
- 70 — WESTRUM, L. E.; BLACKSTAD, T. W. "An electron microscopic study of the stratum radiatum of the rat hippocampus (regio superior, CA1) with particular emphasis on synaptology". *J. Comp. Neurol.* 119: 281-309. 1962.
- 71 — WHITTAKER, V. P.; GRAY, E. G. "The synapse: biology and morphology". *Brit. Med. Bull.* 18: 223-228. 1962.
-

"Si un hombre se ha adueñado de los principios fundamentales del objeto que estudia, y ha aprendido a pensar y a trabajar de manera independiente, recorrerá su camino con seguridad y, además, será más capaz de adaptarse a los progresos y a los cambios, que aquel cuya educación consiste en adquirir conocimientos detallados".

Alberte Einstein

"Conceptions scientifiques, morales et sociales".