

DIFERENCIACION HISTOTIPICA DE LA CORTEZA CEREBELOSA IN VITRO

E. Palacios-Prü, L. Palacios y R.V. Mendoza B.

*Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes.
Apartado 163. Mérida 5101-A. Mérida, Estado Mérida.*

RESUMEN

Se estudió la diferenciación neuronal de la corteza cerebelosa del pollo tanto *in situ* como *in vitro*. La maduración de los elementos principales corticales ocurre en una secuencia de eventos morfológicos por primera vez descrita en el pollo. Este proceso tiene un período crítico de modelaje neuronal, entre los días 14-16, cuando las células granulosas descienden en un 80% desde la capa plexiforme hasta su región definitiva. Las células de Purkinje inician simultáneamente la formación de su árbol dendrítico. *In vitro* se pudo reproducir los eventos esenciales, manteniendo constante la edad de cultivo y variando la edad del embrión del cual se tomaban las muestras para la preparación de los cultivos rotatorios.

Además de lograrse reproducir casi en su totalidad las características fenotípicas de las células cerebelosas corticales, se analizó el proceso de sinaptogénesis y sus variaciones *in vitro*. Algunas consideraciones en torno a la plasticidad neuronal *in vitro* son discutidas.

INTRODUCCION

Durante los últimos diez años, la investigación neurobiológica ha experimentado los cambios más significativos de su reciente evolución. Ade-

más de los avances tecnológicos, se han producido hechos definitivos en la reconciliación entre fisiólogos y morfólogos. Es este, quizás, el cambio más importante, pues ha conducido definitivamente a la convergencia de esfuerzos hacia un común objetivo, la exploración del Sistema Nervioso Central.

Hasta muy recientemente, los neurocientíficos interpretaban el sistema neuronal, como un conjunto estable de células en sus características morfológicas y funcionales. Un grupo de estos investigadores, los neurobiólogos del desarrollo, insistieron en ver en el tejido nervioso una colectividad cambiante, en contraposición a la visión estable del tejido. Numerosos son los aportes de este grupo, que adelantaron el conocimiento que hoy tenemos del conjunto neuronal. Sin embargo, este enfoque no ha sido suficiente, pues aun cuando este tipo de exploración es más dinámica que la anterior, descuida numerosas variables extrínsecas e intrínsecas que condicionan el desarrollo y modelaje de los complejos circuitos neuronales. Todo esto ha conducido a que se desarrollasen de nuevo y con renovado ahínco, los métodos que tienden a simplificar numéricamente el tejido nervioso. Por una parte han estimulado el desarrollo de los estudios en modelos vivos de sistemas nerviosos simplificados y por la otra, se han incrementado notablemente, los análisis *in vitro* de células nerviosas aisladas o conjuntos de neuronas. En el contexto de esta última avenida experimental, se ubican los resultados descritos en este trabajo.

En la literatura reciente, dedicada a este tipo de estudios, existen excelentes documentos relacionados al análisis estructural de fragmentos de tejido nervioso cultivados *in vitro*, en particulares dispositivos de cultivo sobre bases sólidas. Uno de los más comúnmente empleados, es el de cultivos sobre una base de colágeno, preparada de la cola de ratas o ratones. Estos estudios comprenden análisis de los cultivos tanto a nivel de microscopía de luz con los métodos histológicos rutinarios y con los métodos de la plata reducida, así como a nivel de microscopía electrónica (1, 2, 7-9, 17, 23). Notables resultados han sido descritos por Crain y col. (10-15) en el campo de la fisiología neuronal en estos cultivos. También se han estudiado los problemas relacionados a la diferenciación neuronal *in vitro* conjuntamente con puntos específicos como la sinaptogénesis (19, 26, 31, 34, 37, 39, 43-45, 47, 49).

Aun cuando todas estas comunicaciones demuestran el creciente interés por esta rama de la Neurobiología, solamente existe una publicación, la de Wolff y Dubois-Dalcq (49), en la cual se demuestra el desarrollo de células nerviosas, con el método de Golgi, aplicado a los cultivos de tejidos. Nuestros resultados previamente publicados y los que describiremos en el presente trabajo, intentan demostrar la aplicación consistente de este

poderoso instrumento en la exploración morfológica neuronal, a las células cultivadas *in vitro*; además de describir y correlacionar el desarrollo y diferenciación de neuronas crecidas *in vitro* con las homólogas desarrolladas normalmente *in situ*. Para esto nuestro interés ha estado centrado en la producción y análisis de cultivos neuronales histotípicos, los cuales de acuerdo al grado de diferenciación neuronal pueden ser homologados a las regiones encefálicas de las cuales provienen las células cultivadas; en esta dirección enfocamos nuestros esfuerzos hasta lograr una técnica de cultivo que nos permitiese alcanzar tales objetivos. La técnica más eficaz que logramos desarrollar, se basa en la descrita por A. Moscona y B. Garber (16, 24, 25), diseñada para el cultivo de células disociadas. La metodología de cultivo desarrollada permite cultivar fragmentos de tejidos en un medio líquido, lo cual evita las deformaciones celulares que ocurren en los cultivos sobre base sólida. Además de esto, se le aplica al medio, un constante y suave movimiento rotatorio que contribuye a modelar esféricamente los fragmentos cultivados. Estas simples características le permiten a esta técnica, lograr la producción de cultivos, en los cuales las células nerviosas pueden desarrollarse, de acuerdo a sus programas de información genética, sin ser afectadas por factores físicos o químicos indeseables.

Finalmente, el presente estudio permite sentar bases experimentales de significación en el análisis de fenómenos neuronales tales como la diferenciación neuronal *in vitro*, sinaptogénesis, interrelación glia-neurona, formación de conectividades, etc., y abre importantes vías exploratorias al estudio del comportamiento neuronal ante manipulaciones fisiológicas, farmacológicas, inmunológicas y bioquímicas, por citar algunas. Además nos plantea interrogantes críticas al conocimiento biológico en general, al demostrarse que las células nerviosas cuentan con insospechados mecanismos plásticos, expresados en estos modelos de cultivos que les permiten alcanzar no tan sólo sus características fenotípicas diferenciales, sino que logran adaptaciones epigenéticas indispensables para mantenerse *in vitro*, como un conjunto de células que interactúan dinámicamente, a pesar de estar aisladas de su medio natural.

MATERIAL Y METODOS

En la presente publicación describiremos los resultados obtenidos con el procedimiento de los cultivos íntegros por rotación, utilizando fragmentos de cerebelo de embriones de pollo. Pequeños fragmentos de corteza cerebelosa de embriones de pollo de diferentes edades, se obtienen cuidadosamente mediante el uso de un microscopio estereoscópico en ambiente estéril; inmediatamente son sumergidos en una solución Tyrode estéril, para el lavado y la remoción mecánica del tejido contaminante. Luego son

transferidos a una solución de Tripsina al 2.5%, preparada en solución Tyrode libre de Ca^{++} y Mg^{++} . En este momento se observa cómo los trozos se dilatan y parecen estar prontos a disolverse (separación celular controlada). Los fragmentos así tratados son transferidos a un medio de cultivo enriquecido, preparado de la siguiente manera: a 100 ml. de Medio Basal de Eagle se le adicionan 10 ml. de suero de caballo o eventualmente suero de pollo, 1 ml. de una solución de Penicilina-estreptomicina y 1 ml. de una solución de L-glutamina. Los explantes semidisociados son incubados en este medio, en frascos de Erlenmeyer de 50 ml., los cuales son colocados en un incubador rotatorio de ambiente controlado, a 37°C y 70 rpm. El tiempo de cultivo se ajusta a las necesidades del estudio. Una vez completado el tiempo de cultivo planificado, durante el cual el medio de cultivo se cambia cada 48 hrs. y se oxigena cada 24 hrs., los cultivos son extraídos de los frascos y procesados de acuerdo a las técnicas de microscopía electrónica desarrolladas para estas preparaciones y de acuerdo al método de Golgi modificado, previamente publicado, para efectuar el análisis ulterior (32, 27, 29, 33).

El procedimiento para microscopía electrónica es el siguiente: cuando el período de incubación planificado es alcanzado, los cultivos rotatorios se fijan en el mismo frasco de cultivo, descartando el medio y substituyéndolo por el líquido fijador, que es una mezcla de Glutaraldehído 3% y Formaldehído 3%, en tampón fosfato 0.09 M a un pH de 6.3 (33). En algunos casos se utilizó tampón cacodilato con iguales características de osmolaridad y pH. La osmolaridad se controló con un osmómetro Osmette 200. El tiempo de fijación oscila entre 3 y 6 horas, después del cual se lavan los cultivos y se postfijan en una solución de Tetraóxido de Osmio al 1%, preparado en el mismo tampón; se deshidratan en alcohol etílico y son incluidos en Epon. De todos los especímenes se hacen secciones de 1 micra de espesor, las cuales son coloreadas con los métodos argénticos y el OPTO (osmio-p-fenilendiamina-toluidina) desarrollados en nuestro laboratorio (datos aún no publicados). Las secciones finas son coloreadas de acuerdo al método de Reynolds (42).

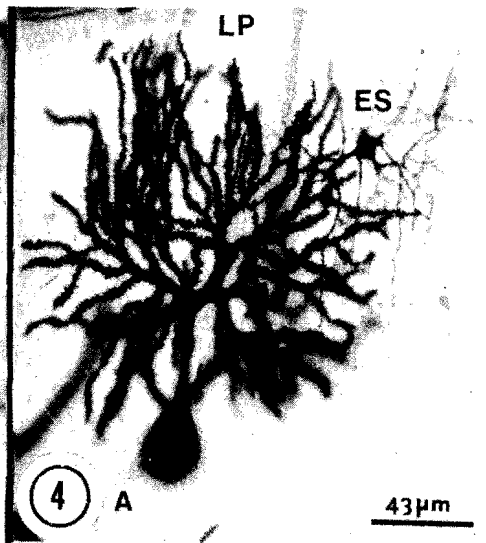
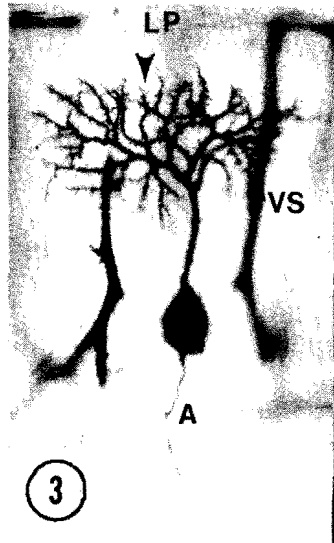
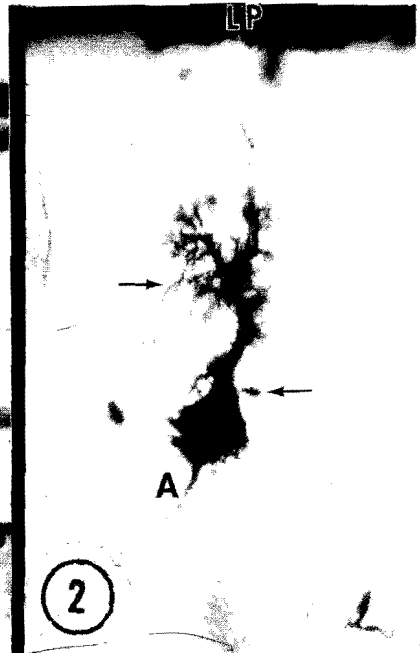
El método de Golgi empleado, procede de la siguiente manera: después de alcanzado el tiempo de incubación deseado, se descarta el medio de incubación y los cultivos se sumergen en la siguiente mezcla fijadora-cromante: 44 ml. de Dicromato de Sodio al 2%, 4 ml. de Glutaraldehído al 25%, 3 ml. de Formaldehído puro y 1 ml. de Acido Acético Glacial. Los cultivos permanecen en esta mezcla durante 12-24 horas. Luego de extraerlos del envase que contiene la solución cromante, se lavan durante 10 minutos y se colocan en un envase con Nitrato de Plata al 1.5%, en la oscuridad y por un período de 24 horas. Completado el período de permanencia en la solución de Nitrato de Plata, los cultivos se lavan y se deshi-

dratan ligeramente (15 minutos) en alcohol isopropílico puro; se colocan sobre un bloque de parafina, donde se encastran y se seccionan en un microtomo de deslizamiento, obteniéndose secciones de 200 micras. En algunos casos se incluyen en Epon blando y se seccionan con cuchilla de vidrio en el mismo microtomo y al mismo espesor. Las secciones en cualquiera de los casos se recogen en alcohol isopropílico puro y si no fueron incluidas en Epon, se procede a deshidratarlas en pasos ascendentes del mismo alcohol y se aclaran en Xilol, antes de montarlas en Permount. Si el material fue incluido en Epon, se montan directamente en el portaobjeto, con una gota de Permount o de Epon.

OBSERVACIONES

Desarrollo in situ de las células de Purkinje de la corteza cerebelosa del pollo.

Las macroneuronas cerebelosas corticales en el embrión del pollo, sufren una serie de modificaciones transitorias semejantes a las que ocurren en otros vertebrados (21, 22, 40, 41, 46) sin embargo, es necesario indicar algunas particularidades observadas en su desarrollo en el pollo: las células de Purkinje se alinean en la corteza cerebelosa del pollo, alrededor del séptimo día de desarrollo. Una vez alcanzada esta topotipia, permanecen morfológicamente inalteradas hasta el día 16 ± 24 horas. Durante este período las células de Purkinje están caracterizadas por su aspecto inmaduro, citológicamente hablando; el citoplasma es rico en organoides celulares y el conjunto de membranas ribosomales conforman un sistema de cisternas irregulares dilatadas que no componen los conocidos grupos de Nissl, numerosos conjuntos de cisternas lisas pueden observarse, algunos de los cuales constituyen segmentos del complejo de Golgi, claramente identificables. La mayoría de estos organoides se observan irregulares debido a lo delicado de su estructura, la cual parece ser afectada durante el tratamiento preservatorio para microscopía electrónica. Otros componentes del citoplasma como mitocondrias, filamentos, microtúbulos, lisosomas, etc., se muestran con características morfológicas semejantes a las descritas en otras células durante el desarrollo (1, 21). Una importante modalidad morfológica que debemos describir aquí, la constituyen los numerosos procesos de tipo filopódico que se forman a lo largo de toda la superficie celular (Figs. 1, 2 y 26), estos procesos irregulares adoptan configuraciones muy particulares al introducirse entre los numerosos procesos y somas de las células que rodean a las células de Purkinje. El citoplasma contenido en estas expansiones, se hace finamente granuloso y puede observarse en ellas, una red muy fina de delicados microfilamentos. La membrana celular de estos procesos laterales tiene las mismas características estructurales de la membrana somática. Estos procesos



Figs. 1, 2, 3, 4.— Esta secuencia fotográfica se incluye para ilustrar los eventos más importantes en el desarrollo y diferenciación de las células de Purkinje en el embrión del pollo. En la Fig. 1, podemos observar una célula de Purkinje del cerebelo de 16 días de embrión de pollo; obsérvese que el cuerpo es bastante irregular debido a la cantidad de procesos filopódicos, que emergen de él. Por arriba de las células de Purkinje se puede observar, intacta, la capa de células granulosas externas, y por debajo numerosas fibras no mielinizadas que caracterizan esta capa, en esa edad. En la Fig. 2, observamos una célula de Purkinje de un embrión de 19 días de edad, estas células muestran cómo la serie de procesos irregulares se reabsorben en sólo 3 días y se polariza el crecimiento de los procesos localizados en la parte superior de la célula, esto dará origen al árbol dendrítico de la célula de Purkinje. Las flechas muestran algunos de los procesos de tipo filopódico laterales. En la fotografía 3, se observa una célula de Purkinje de un embrión de 20 días de edad en el cual se nota claramente que los procesos filopódicos han desaparecido y se concentra el desarrollo ulterior de esta célula en la formación del árbol dendrítico, en todas sus ramas secundarias y terciarias, estando las ramas principales ya formadas. La flecha indica las espinas dendríticas de las ramas terciarias. En la Fig. 4, se observa una célula de Purkinje de embrión de pollo de un día de nacido, nótese la alta complejidad celular. Se observa una célula estrellada entremezclando sus dendritas con las de la célula de Purkinje. Esta secuencia fotográfica nos muestra además de los eventos de maduración de las células de Purkinje, que su modelaje final comienza a partir del día 16, después de este día, la diferenciación celular se concentra en la formación del árbol dendrítico y antes del día 16 es evidente que no ocurren cambios morfológicos importantes.

laterales del soma se reabsorben totalmente cuando el desarrollo alcanza el vigésimo día y los que se encuentran en la parte superior de las células, se orientan hacia la superficie del cerebelo y darán origen al árbol dendrítico de las células de Purkinje (Figs. 3, 4 y 26). Algunas células reducen tanto sus procesos laterales, que sólo se observa un tallo dendrítico emergente en dirección a la superficie pial. Después del día 16 de desarrollo, las células de Purkinje concentran sus modificaciones morfológicas de diferenciación hacia el árbol dendrítico, lo cual constituye el modelaje terminal de estas células. La arborización sigue una secuencia sincronizada de formación de dendritas primarias, luego secundarias y finalmente la formación de las dendritas terciarias o espinosas que ocuparán aproximadamente el 80% del territorio dendrítico terminal (18, 30) (Figs. 4 y 26).

Organización cortical In Vitro.

En publicaciones anteriores (34, 36, 37) describimos en detalle la morfología transicional de las células de Purkinje, cultivadas in vitro, aquí diri-

giremos nuestro esfuerzo a describir la organización cortical en aquellos cultivos cerebelosos que alcanzaron mayor grado de diferenciación histotípica. Los cultivos con mejor desarrollo celular, en términos generales, resultaron ser, luego de numerosos ensayos, aquellos preparados con fragmentos cerebelosos tomados de embriones que tenían una edad de desarrollo de 16 días. Estos cultivos fueron mantenidos en rotación por 6 días; este período de cultivo fue escogido después de haber realizado también, numerosos ensayos y comprobarse que si los fragmentos son cultivados por más de 6 días, las células sufren un grado variable de deterioro estructural y si se cultivan por períodos de tiempo inferiores a 6 días, las células no alcanzan grados satisfactorios de desarrollo. Por estas razones, a todo lo largo de este estudio, nos referiremos a los cultivos preparados de cerebelo de embriones de pollo de 16 días de edad y cultivados por 6 días (referidos en el texto como 16-6). No todos los fragmentos de corteza cerebelosa logran alcanzar grados significantes de desarrollo celular, pero aproximadamente el 70% de los fragmentos cultivados, alcanzan notable desarrollo. En estos fragmentos, una vez fijados y cortados, se pueden observar, en secciones de una micra, preparadas para microscopía de luz, pequeñas células, ubicadas en la región central de los cultivos, que se distinguen por la diversidad de su morfología nuclear y grandes células situadas por debajo de la superficie de los cultivos. Entre la superficie del cultivo y estas grandes células, existen zonas poco celulares, si se toma en cuenta la gran celularidad de las regiones más profundas de los cultivos (Fig. 5). Esta distribución particular de las células, de acuerdo a sus dimensiones nos indica que se reconstruyen las partes constitutivas de la corteza cerebelosa, esto es, una capa externa rica en fibras y pobre en células, equivalente a la capa plexiforme, una capa celular profunda caracterizada por poseer grandes células que son el equivalente a la capa de células de Purkinje; finalmente en la región central del cultivo se observa gran cantidad de células pequeñas que corresponden a las células granulosas y escasas células grandes, que pueden ser efectivamente las células de Golgi. Esta descripción puede ser observada en la figura 5, donde se puede notar su semejanza con la corteza cerebelosa intacta *in situ*. Es frecuente observar en estas secciones de una micra, numerosos cuerpos celulares en degeneración, los cuales adquieren una coloración muy intensa con los colorantes básicos empleados para teñir estas secciones; es también frecuente distinguir algunos fragmentos de dendritas y axones mielinizados, en estas secciones (Fig. 5). La capa de células de Purkinje tienen una distribución celular irregular, esto quiere decir que no todas las células están niveladas en un plano como ocurre en el cerebelo *in situ*. En la figura 5 puede notarse también que algunas de estas células se localizan más profundamente que otras. Las células de Purkinje de estos cultivos no alcanzan todas el mismo grado de diferenciación, aun cuando el cultivo en general se muestra con un buen grado de desarrollo celular. En la superficie de los cultivos, se ven procesos

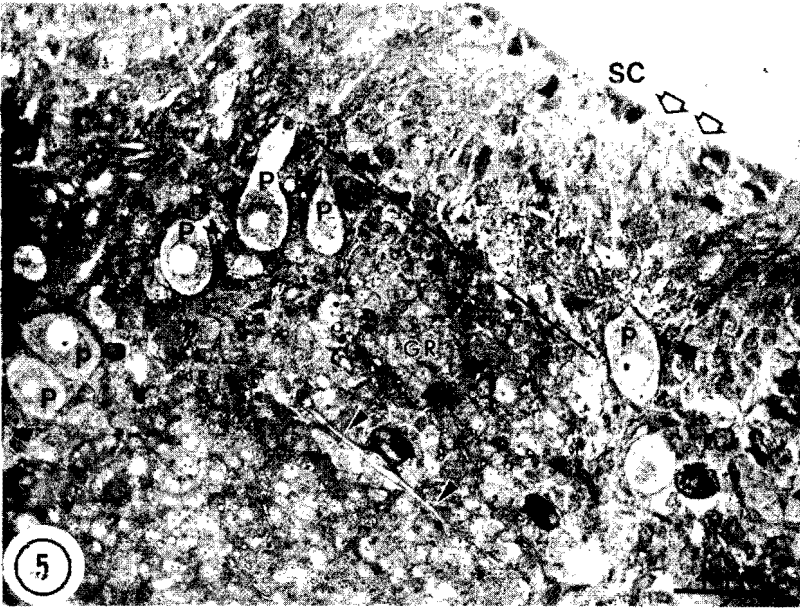


Fig. 5.— Segmento de una sección de una micra de un cultivo de cerebelo, preparado de un embrión de pollo de 16 días de edad y cultivado durante 6 días (16-6). En esta imagen destacan los grandes cuerpos de las células de Purkinje. Nótese como se alinean irregularmente por debajo de una región plexiforme que limita con el borde del cultivo, donde se encuentran los procesos terminales de las células gliales, indicados con las flechas claras. La línea recta indica la separación entre la región plexiforme y el conjunto de células granulosas. Las flechas triangulares indican un axón mielinizado de gran calibre, probablemente de una célula de Purkinje. Las masas oscuras que se observan en la parte inferior de la fotografía corresponden a células en degeneración. Esta fotografía nos ilustra además sobre el alto grado de diferenciación citológica alcanzado por estas células.

celulares densos, que corresponden a prolongaciones de células gliales, (Figs. 5 y 9). Las células gliales se orientan aproximadamente como las células gliopiteliales de la corteza cerebelosa *in situ*, esto quiere decir que existen células en estos cultivos, cuyos cuerpos se localizan profundamente y envían procesos gliales hacia la superficie del cultivo donde forman un mosaico superficial de expansiones gliales adosadas, que de acuerdo a los resultados preliminares de experimentos de incorporación de trazadores electrón-densos a los cultivos, se demuestra que estos procesos imposibilitan la penetración de grandes moléculas al cultivo (observaciones no publicadas).

Análisis de los cultivos de Cerebelo 16-6 con el método de Golgi.

El método de Golgi modificado resultó de una extraordinaria utilidad

en el análisis de la organización de estos cultivos histotípicos de cerebelo, las observaciones en secciones de una micra o con el microscopio electrónico, no fueron lo suficientemente resolutivas, de los principales problemas de organización *in vitro*, que enfrentamos en estos modelos de cultivos. El método de Golgi, como es lo habitual *in situ*, nos reveló la morfología externa de las células que componen los cultivos cerebelosos 16-6, en algunos casos fue posible, incluso, observar con este método la formación de laminillas cerebelosas como la mostrada en la figura 6. Esta observación había sido hecha también, en secciones de una micra, pero fue interpre-

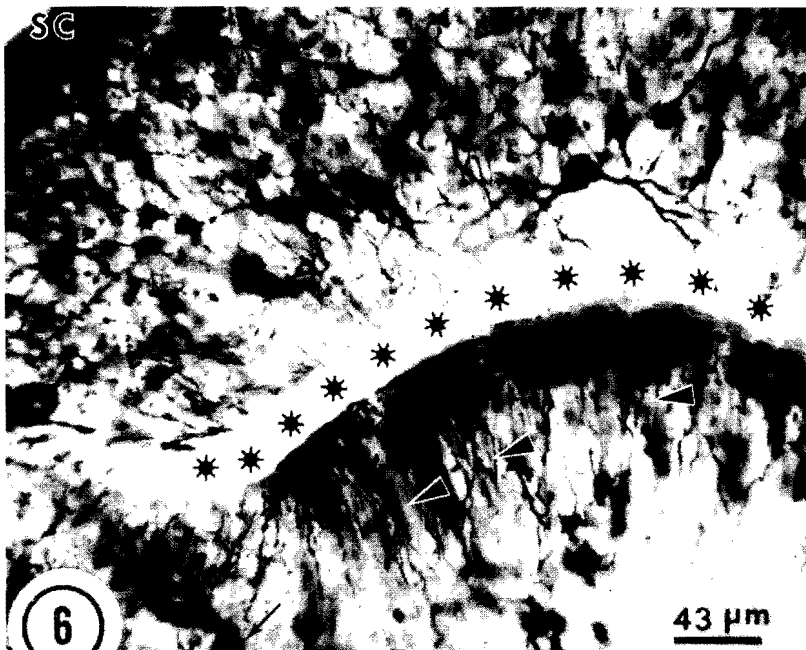


Fig. 6.— Segmento de un cultivo de cerebelo 16-6, impregnado con el método de Golgi modificado. Se puede observar la formación de dos laminillas cerebelosas, separadas por una línea de asteriscos. Dentro de la laminilla se observa una célula de Purkinje, indicada con la flecha y numerosos procesos gliales indicados con los triángulos densos. En la laminilla superior se observan algunas células irregulares.

tada como irregularidad en el proceso de desarrollo del cultivo, mientras que el método de Golgi nos reveló con gran precisión, además de la morfología celular, la disposición de las células, las cuales tratan de homologar la situación y distribución de los procesos celulares como ocurre *in situ*. En las imágenes a bajos aumentos, es posible observar que las células de Purkinje orientan su ramazón dendrítica hacia la superficie de la laminilla y su cuerpo se localiza en profundidad (Fig. 6). Entre las células de Pur-

kinje se pueden observar numerosos procesos gliales orientados perpendicularmente hacia la superficie de estas laminillas. Otros componentes celulares como las células estrelladas y algunas células granulosas, pueden ser observadas entre las células de Purkinje. En algunas laminillas que no contienen ni el número celular suficiente, ni las células correspondientes *in situ*, se observan células con características morfológicas finales que no las definen como las células que participan normalmente en estas laminillas *in situ*, esto corresponde en particular a algunas células de Purkinje que se muestran atípicas sin alcanzar un 40% de sus características fenotípicas; igual puede decirse de otros componentes celulares como las células estrelladas y las células granulosas. Un ejemplo de este tipo de laminillas, con celularidad atípica, puede ser observado en la parte superior de la figura 6. Las laminillas cerebelosas típicas contienen células estrelladas, con sus características fenotípicas, es decir, son células de tamaño mediano, aproximadamente, con 3 a 6 dendritas emergentes que le configuran el aspecto estrellado característico (Fig. 7). Sus dendritas siguen un corto e irregular recorrido y tienen un axón que se ramifica después de un breve trayecto de su inicio, este axón pudo ser visto emergiendo tanto del cuerpo como de las dendritas. Las células granulosas observadas en estos cultivos, no tienen "garras" dendríticas terminales que las caracterizan *in situ*, estas "garras" muestran poca diferenciación, forman especies de muñones terminales irregulares que continúan inmediatamente con sus dendritas correspondientes, las cuales por lo general son irregulares y cortas. Los cuerpos celulares son pequeños, entre 5 a 8 micras, tienen un axón muy fino que se dirige en la mayoría de los casos, hacia la superficie del cultivo, donde las células de Purkinje desarrollan su árbol dendrítico. Ha sido posible observar la bifurcación en "T" de estos axones, no siempre los dos segmentos de esta "T" axónica tienen un recorrido paralelo como ocurre *in situ*. En la figura 7 puede observarse la bifurcación en "T" de un axón de célula granulosa. Las células de Purkinje muestran una gran variabilidad morfológica, existen algunas que alcanzan un alto grado fenotípico de desarrollo (Fig. 10) y otras que logran menor grado de fenotipia (Figs. 6 y 8). Las células de Purkinje que presentan características no diferenciales, se dividen en dos grupos, células con citotipia citoplasmática que no alcanzan fenotipia en su aspecto externo (Fig. 8) y células de Purkinje que aun cuando alcancen un alto grado fenotípico de desarrollo, tanto citoplasmático como en su morfología externa, no logran su topotipia en los cultivos. Por lo general las células de Purkinje altamente diferenciadas, tienen una precisa localización dentro del cultivo, nos referimos a las células de Purkinje que se localizan por debajo de la capa plexiforme externa con sus dendritas orientadas hacia la superficie del cultivo y su axón dirigiéndose hacia las capas profundas. Las células de Purkinje como la observada en la parte inferior de la figura 6, no alcanzan estos grados de citotipia neuronal y se localizan en cualquier región de los cultivos

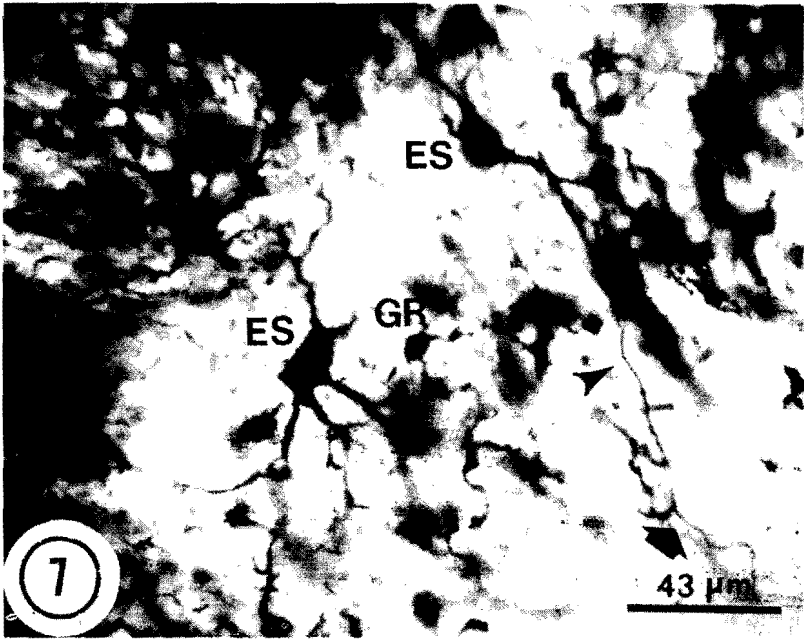


Fig. 7.— Esta imagen nos muestra la variedad de células estrelladas encontradas en los cultivos de cerebelo 16-6. Se puede observar el alto grado de desarrollo citológico que alcanzan las células estrelladas, las cuales poseen dendritas con espinas irregulares como es lo habitual in situ. Además de las células estrelladas se observan pequeñas células que corresponden a células granulosas, en una de las cuales se observa como se bifurca el axón después de un breve trayecto.

cerebelosos. Cuando las células de Purkinje alcanzan un alto grado de diferenciación (Figs. 10 y 27), podemos en ellas describir las características citotípicas de estas células en el animal adulto; poseen un cuerpo del cual emerge, de su porción inferior, un axón uniforme y rectilíneo y en el extremo superior del soma celular se observa la emergencia de uno o más tallos dendríticos, que después de un breve trayecto se ramifican dando ramas secundarias, que a su vez se bifurcarán en ramas terciarias o espinosas. Estas ramas dendríticas tienen numerosas espinas, aun cuando no en el mismo número que las dendritas espinosas de las células in situ (Fig. 26). El análisis numérico de características citotípicas nos permite decir que estas células pueden alcanzar hasta un 70% del desarrollo equivalente in situ. De mayor complicación resulta conocer, en el cultivo, cuantas células del total, alcanzan ese grado de diferenciación. Para establecer un orden de magnitud, se calculó de 100 células de Purkinje impregnadas satisfactoriamente, cuantas de ellas alcanzaron altos grados de diferenciación, esto nos mostró aproximadamente que de estas 100 células,

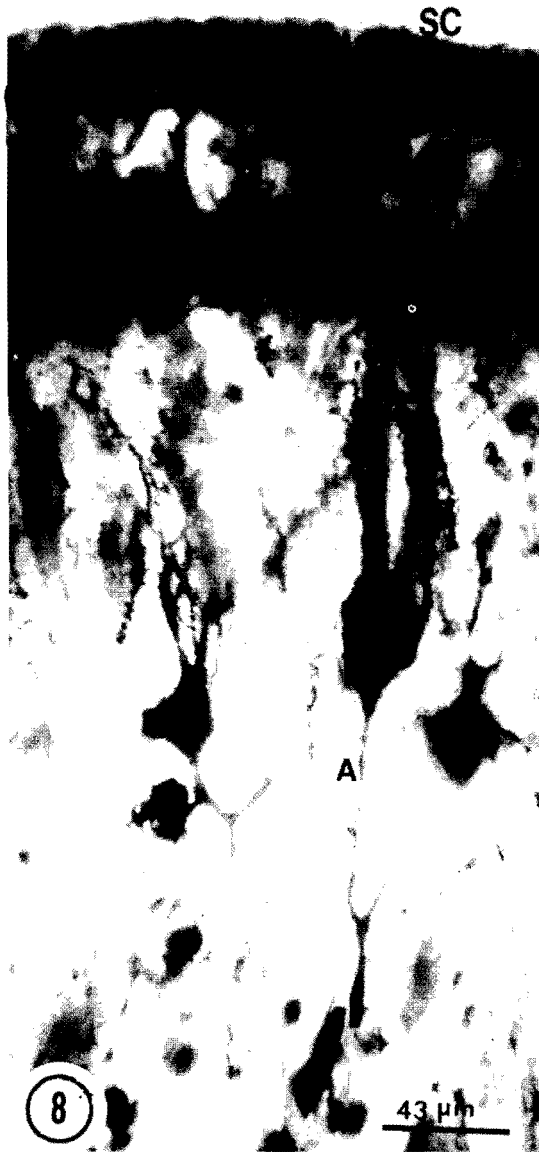


Fig. 8.— En esta imagen a mayor aumento se encuentran dos células de Purkinje con diferentes grados de desarrollo, imagen frecuente en los cultivos de cerebelo 16-6. La célula de Purkinje, situada a la derecha, posee un grado medio de diferenciación mientras que la otra, a la izquierda, es más pequeño y tiene dendritas irregulares, por lo cual su grado de desarrollo es menor. Nótese que aún con grados medio y bajos de desarrollo fenotípico estas dos células se localizan y orientan en forma típica.

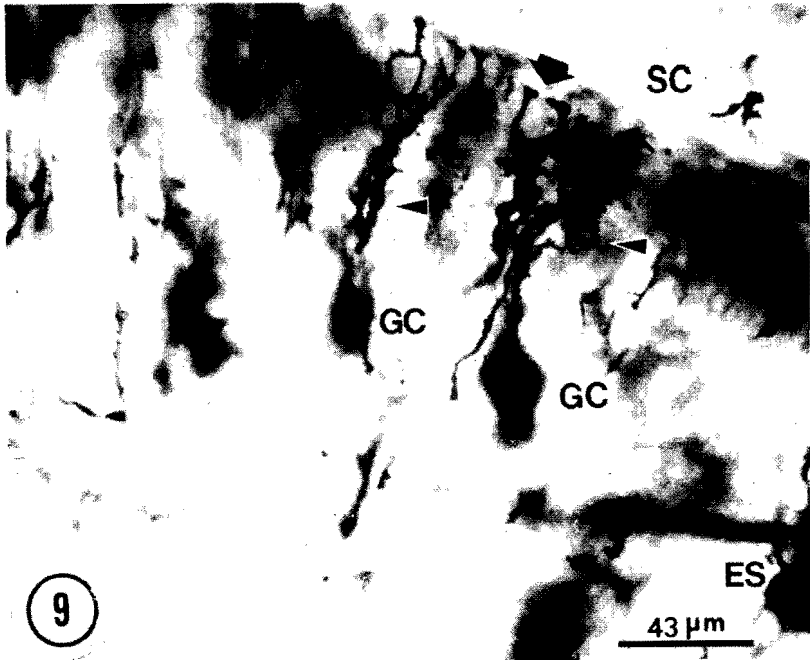


Fig. 9.— Esta figura corresponde a una impregnación de un cultivo de cerebelo 16-6, la cual fue satisfactoria para mostrar los elementos gliales; se excluyen del campo de foco los cuerpos de las células gliales para destacar los procesos terminales sobre la superficie del cultivo, indicados con la flecha densa. Las flechas triangulares indican típicos procesos gliales.

un 30 a 40% alcanzan altos grados de desarrollo; estas cifras, sin embargo, varían si se discrimina de cultivo a cultivo. Existen cultivos en los cuales no se logra sino un 2% de desarrollo fenotípico, en las células de Purkinje, mientras que hay otros cultivos que alcanzan 70% de desarrollo fenotípico. Esto podría estar indicando que no todos los cultivos contienen los mismos componentes celulares y podría significar eventualmente, que para que exista un buen desarrollo en un tipo determinado de células, es necesaria la coincidencia de otros desarrollos celulares semejantes y sincronizados, de los elementos que constituyen el sistema. Una observación que apoya esta hipótesis, la constituye el hecho de que en los cultivos donde existe poco desarrollo de las células de Purkinje, se observa poco desarrollo en el resto de las células constituyentes.

Algunas células de Purkinje pueden presentar espinas en sus somas, como ocurre en las células embrionarias durante ciertas etapas del desarrollo del cerebelo *in situ*, estas espinas somáticas constituyen una estructura morfológica consistente en la mayoría de los cultivos (Figs. 10 y 20), pudiendo esto indicar que estas células, aun cuando su aspecto externo

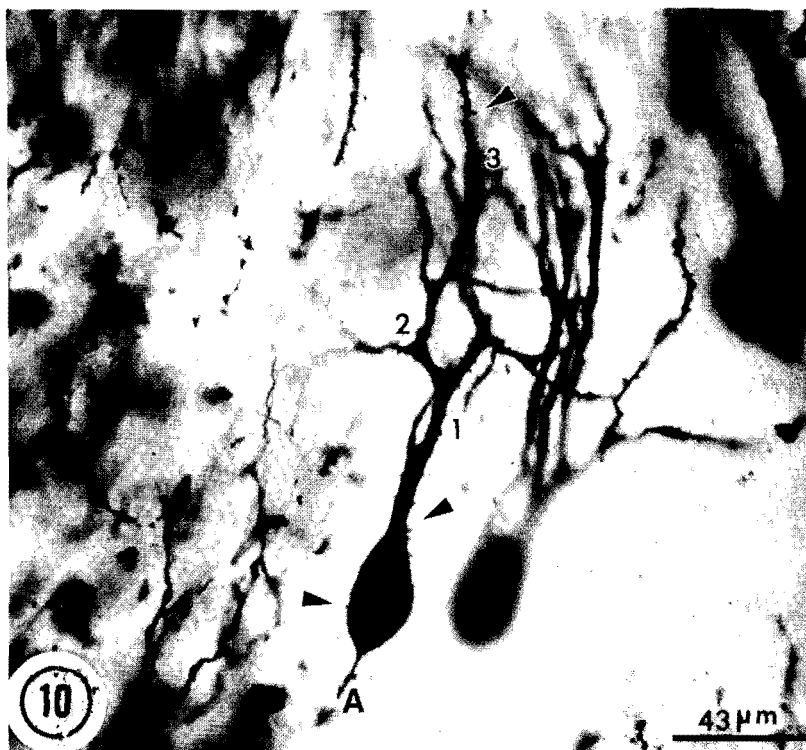


Fig. 10.— Esta fotografía ilustra claramente el alto grado de desarrollo que pueden alcanzar las células de Purkinje en estos cultivos. Las células centrales están en una zona clara que corresponde a la zona plexiforme. Las células de Purkinje aquí mostradas tienen un 70% de su desarrollo equivalente al alcanzado por las células homólogas in situ. El cuerpo es piriforme del cual emerge un axón; numerosas espinas se observan tanto en el cuerpo como en los tallos dendríticos principales (flechas densas). El árbol dendrítico se ramifica en dendritas primarias (1), secundarias (2) y terciarias (3).

sea el fenotípico, conservan algunos rasgos embrionarios que no logran desaparecer durante su ulterior crecimiento. El desarrollo de las células de Purkinje *in vitro* se obtiene a partir del cuarto día de cultivo, sin embargo, no se logran desarrollos o modelajes satisfactorios hasta el día 6 de cultivo, cuando los fragmentos de cerebelo provienen de embriones de 16 días de edad y sin embargo a esta edad *in situ*, las células de Purkinje no han alcanzado ningún grado de desarrollo, que no sea aquel determinado por la topotipia de su alineamiento a partir del día 6 de desarrollo. En estos cultivos de alto grado de diferenciación, también las células gliales alcanzan mayores grados de desarrollo celular, lo que permite a los cultivos mantenerse en los frascos, con medios líquidos en rotación, por varios

días. Ya indicamos anteriormente, que estas células llegan a formar expansiones en la superficie de los cultivos, que probablemente les permiten regular el transporte de sustancias desde el medio al interior del cultivo. Estos procesos gliales con expansiones laterales como ocurre *in situ*, tapizan toda la superficie de los cultivos. Cuando los cultivos se mantienen por períodos de tiempo de incubación mayores de 16 días, por ejemplo hasta 20 días, se observa que muchas neuronas se dediferencian y las células gliales se hipertrofian y proliferan. Muchas de estas células gliales dejan de ubicarse en la superficie de los cultivos para localizarse en cualquier sitio del mismo.

Análisis ultraestructural de los cultivos de Cerebelo 16-6.

Utilizando el microscopio electrónico hemos podido analizar las características citológicas más importantes de estos cultivos, con la intención de establecer un citograma de las células que los componen y poder lograr subsecuentemente los patrones de citología diferencial que ocurren entre estas células cultivadas y las que se desarrollan normalmente *in situ*. Básicamente con el microscopio electrónico procedimos a estudiar las características sinaptológicas con la idea de averiguar si la sinaptología de las células estudiadas *in vitro* se corresponde con la que tienen las mismas células *in situ*. Las células de Purkinje de los cultivos 16-6, tienen las mismas características ultraestructurales que poseen *in situ*. En la figura 11 se puede observar una célula de Purkinje, a bajo aumento, la cual contiene un núcleo grande claro, bien delimitado por su envoltura nuclear y con un nucleolo bastante desarrollado; estas células poseen un alto contenido en elementos subcelulares y pueden observarse algunas características específicas de las células nerviosas (Fig. 12), como son los paquetes de cisternas de retículo endocitoplasmático rugoso que conforman los grupos de Nissl, numerosas mitocondrias se ven en cualquier sección de estas células, así como lisosomas y fragmentos de complejo de Golgi, aunque generalmente son observados en las porciones más dilatadas de su citoplasma. También pueden ser vistos, numerosos microtúbulos dispersos en el citoplasma de estas células, así como retículo endocitoplasmático liso y abundantes ribosomas libres, en la matriz del citoplasma. En resumen, todos los organelos y aproximadamente en la misma proporción que se encuentran en las células desarrolladas *in situ*, pueden ser observados en las células de Purkinje crecidas *in vitro*. Alrededor de las células de Purkinje se localizan numerosos procesos celulares de variada electronodensidad, en su mayoría corresponden a prolongaciones de las células gliales, algunos a terminales axónicos y otros a prolongaciones dendríticas (Fig. 11). Llama la atención, cuando se observa a mayores aumentos en el microscopio electrónico, el espacio extracelular en estos cultivos, que esperábamos estuviese más dilatado que *in situ*, debido al medio de cultivo y al trata-

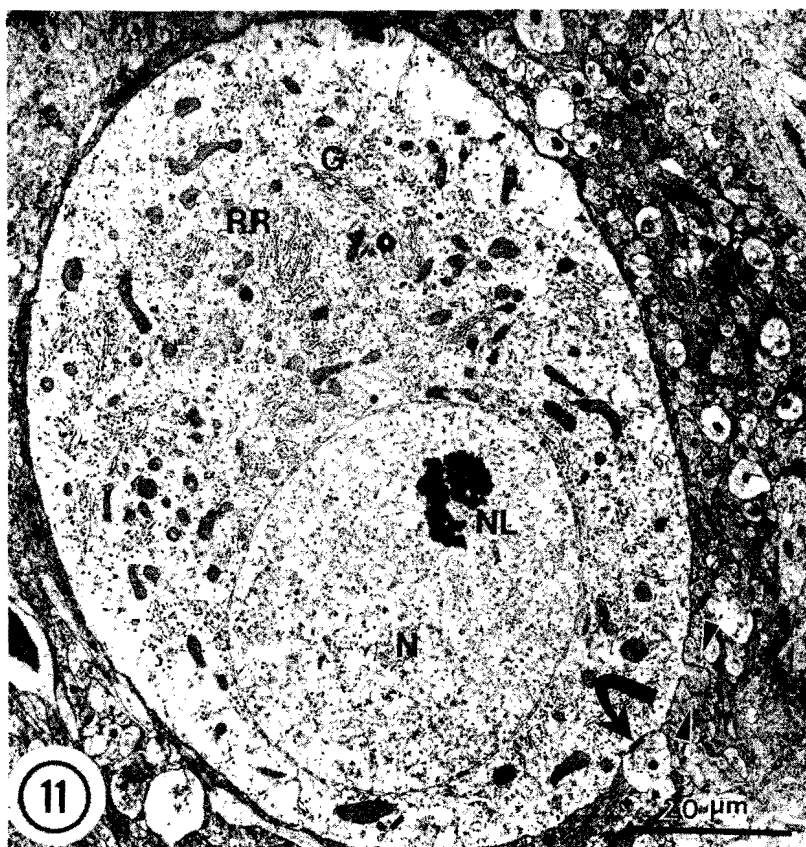


Fig. 11.— Esta microfotografía electrónica, a bajo aumento muestra una sección de célula de Purkinje 16-6, en la cual podemos observar todas las características citológicas relevantes de esta célula: un núcleo grande, localizado en la parte profunda de la célula, bien limitado por su envoltura nuclear y que contiene un nucléolo bastante desarrollado; en el citoplasma se observan los elementos subcelulares comunes, además de algunos grupos de Nissl. La flecha curva indica una sinapsis axosomática y las flechas triangulares densas, muestran una espina somática.

miento, sin embargo se encuentra separando las células con las mismas dimensiones conocidas in situ; esto es, tanto el espacio sináptico como el resto del espacio extracelular entre las células nerviosas se mantiene aproximadamente en el orden de 20 a 35 nanómetros. Esto es fácilmente corroborable en las figuras 13-25. Una vez analizadas las características citológicas de las células de Purkinje, que son las células más prominentes de estos cultivos, procedimos al análisis sistemático de las pequeñas células que se encuentran por debajo de las células de Purkinje en los cultivos 16-6. Ya las secciones de una micra nos habían revelado que estas micro-

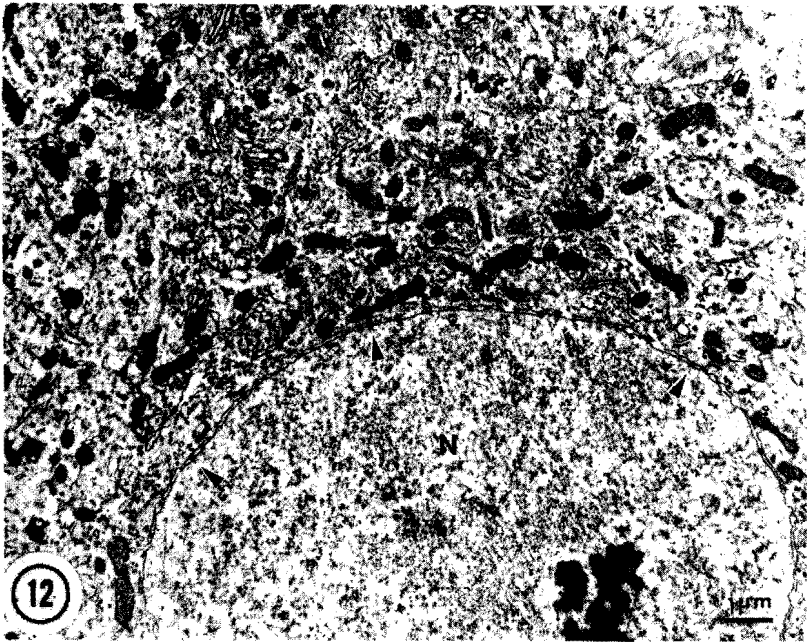


Fig. 12.— Segmento del citoplasma y núcleo de una célula de Purkinje 16-6, a mayor aumento, para destacar su maduración citológica. En la parte inferior se observa el núcleo con sus características normales, una matriz cromatinica y un nucléolo, las flechas triangulares muestran los poros de la envoltura nuclear. En el segmento citoplasmático pueden reconocerse conjuntos de membranas de Golgi, mitocondrias, ribosomas, retículo citoplasmático rugoso y otras estructuras subcelulares comunes.

células correspondían a las células granulosas del cerebelo, el microscopio electrónico confirma definitivamente esta observación y nos muestra células con un gran núcleo, en proporción al tamaño celular, con una cromatina algo más densa, uno o dos nucleolos y algunos grumos de cromatina densa, generalmente localizada en el centro de núcleo. El citoplasma de estas células es escaso y pobre en estructuras citoplasmáticas generalmente en este delgado citoplasma se observa tan sólo una o dos mitocondrias por sección, abundantes ribosomas y escasos lisomas (Figs. 13 y 14). Estas células se encuentran agrupadas en conjuntos o nidos celulares y el espacio celular entre ellas es bastante reducido, alrededor de 20 nanómetros; en algunas secciones afortunadas, se pueden observar los procesos dendríticos que emergen del citoplasma, estos procesos son cortos e irregulares y se dirigen hacia las zonas vecinas no celulares (Figs. 15-17), que son el equivalente a las regiones glomerulares que tiene el cerebelo in situ. Hemos denominado a estas zonas no celulares, como regiones glomerulo-similares, por su similitud, en efecto, con los glomérulos cerebelosos. Las dendritas

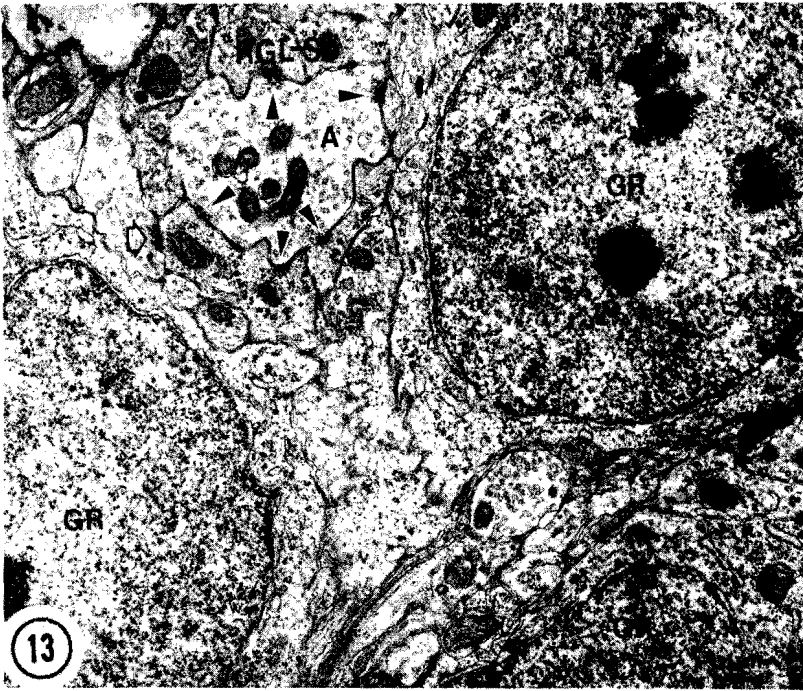


Fig. 13.— Esta microfotografía corresponde a un segmento de la región de los cultivos, donde se localizan las células granulosas; en ella se observan dos células granulosas en las cuales se destacan su gran núcleo y el escaso citoplasma que lo rodea. Estas células limitan una región plexiforme de tipo glomérulo-similar, en la cual es prominente, un axón central de tipo musgoso que establece numerosos contactos sinápticos con dendritas de las células granulosas vecinas (triángulos densos). La flecha corta muestra un contacto sináptico de un axón externo al glomérulo.

de las células granulosas constituyen el componente más importante de los que nutren estructuralmente estas regiones glomérulo-similares, como la indicada en la figura 14. Estas dendritas constituyen elementos postsinápticos para los terminales axónicos que se encuentran en las regiones glomérulo-similares (Figs. 13 y 14). Estos glomérulos llamaron poderosamente nuestra atención por su consistente presencia en todos los cultivos de cerebelo 16-6 estudiados. Se conoce que los glomérulos cerebelosos *in situ* tienen una estructura bastante regular que puede ser descrita simplificada de la siguiente manera: están compuestos centralmente por un terminal axónico irregular y en la mayoría de los casos de grandes dimensiones, correspondiendo a la porción terminal de las fibras musgosas; estas fibras musgosas o este axón musgoso, está rodeado por las dendritas de las células granulosas y por fuera de estas se localizan los axones de las células de Golgi. En los cultivos 16-6 existe una organización glomerular

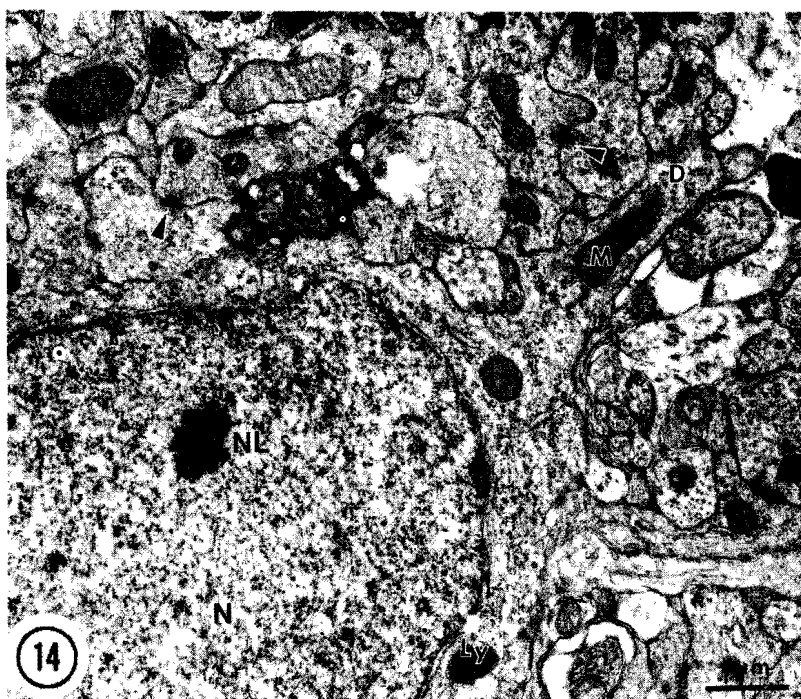


Fig. 14.— Esta fotografía nos muestra una célula granulosa de la cual emerge una dendrita corta que se mezcla inmediatamente en una región glomérulo-similar, vecina al cuerpo; note como esta dendrita contiene las características citológicas habituales descritas para la célula granulosa in situ. Las flechas densas señalan contactos sinápticos de las regiones glomérulo-similares.

bastante semejante, encontramos que hay algunos axones de contornos muy irregulares y con una población numerosa de vesículas sinápticas esferoidales, como se observa en la figura 15 y que se localizan centralmente en estas regiones, estos axones de tipo musgoso están rodeados de numerosos procesos dendríticos entre los cuales se identifican fundamentalmente dendritas de células granulosas, algunas otras dendritas no identificables pero que podrían corresponder a dendritas de las interneuronas que se localizan en la vecindad y en algunos casos segmentos citoplasmáticos que pueden corresponder a porciones de células granulosas y en otros a segmentos de las células de Purkinje. El componente presináptico más importante de la región de las células granulosas de los cultivos, lo constituyen estos amplios axones irregulares de tipo musgoso, que conforman la región glomérulo-similar ya descrita, sin embargo, otros elementos axónicos pueden ser observados en vecindad a las células granulosas o entremezclados en la neuropila de estas regiones, por lo general no forman parte de las regiones glomérulo-similares, algunos de estos

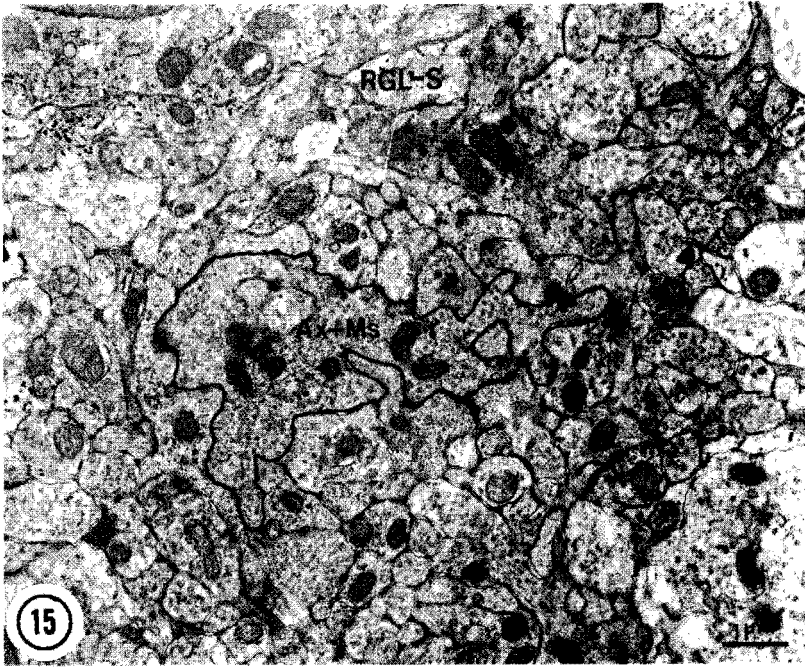


Fig. 15.— Esta imagen muestra la porción central de una región glomérulo-similar; es evidente que la porción central de esta región está ocupada por un axón bastante irregular, con las características descritas para los axones musgosos in situ. El límite del axón ha sido delineado para destacar sus contornos; obsérvese la alta densidad vesicular de estos axones, así como la localización central de sus mitocondrias. Numerosos segmentos dendríticos de células granulosas y pequeños axones que contienen vesículas irregulares rodean la parte externa del glomérulo.

axones tienen poblaciones de vesículas sinápticas con características de vesículas ovoidales o aplanadas y establecen sinapsis del tipo simétrico con dendritas de células granulosas y otras, hasta ahora no identificadas; un ejemplo de esto aparece en la figura 19. Existen segmentos de axones de tipo irregular, no tan amplios como los que se encuentran en el centro de las regiones glomérulo-similares y con vesículas esféricas (Fig. 18); que establecen contactos sinápticos con estructuras, algunas de las cuales pueden ser reconocidas como dendritas de células granulosas y otras no claramente identificables, que podrían corresponder a dendritas de las interneuronas de la región; estos axones han sido interpretados, también, como axones musgosos que no llegan a alcanzar grandes dimensiones como los que se localizan en el centro de las regiones glomérulo-similares. Cuando nuestro territorio de observación se moviliza hacia la superficie del cultivo y se analiza la región en la cual se localiza la célula de Purkinje, la

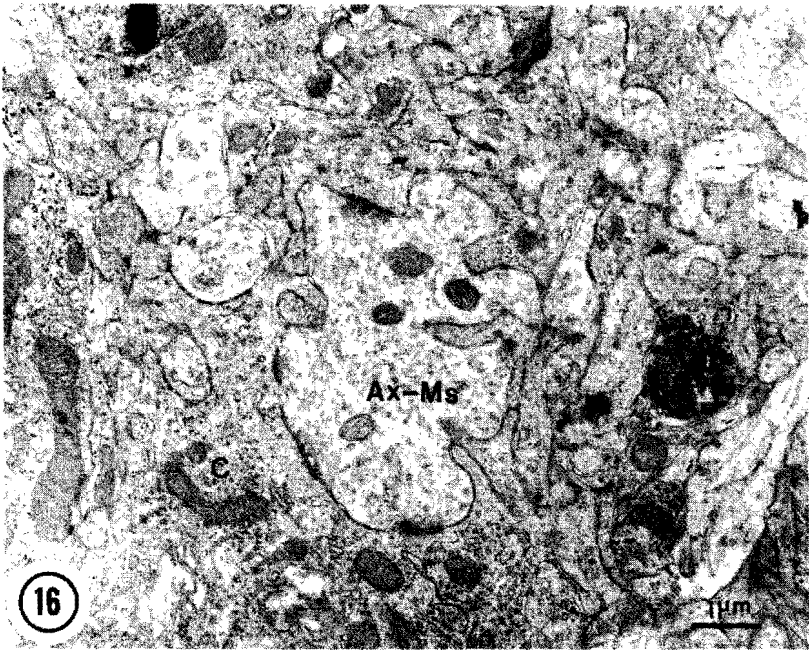


Fig. 16.— Esta microfotografía muestra un axón tipo musgoso con la particularidad de establecer contactos sinápticos múltiples con un segmento somático de una célula de Purkinje; alrededor del axón se localizan segmentos dendríticos de otras células. Esta imagen fue relativamente frecuente en el análisis ultraestructural de los cultivos 16-6.

citología de estos cultivos varía sensiblemente, por una parte dejan de observarse los cuerpos de las células granulosas y las regiones glomérulo-similares y aparece una gran cantidad de axones de dimensiones mucho menores y más regulares, los cuales tienen vesículas sinápticas esferoidales y establecen contactos sinápticos de tipo asimétrico, con diferentes estructuras que serán descritas más adelante (Figs. 20-23). El contorno de las células de Purkinje en la mayoría de los casos y dependiendo del grado de diferenciación, puede presentar numerosas espinas irregulares de tipo filopódico, como las que se encuentran en las células de Purkinje *in situ*, antes del día 16 de desarrollo. Estos grandes procesos espinosos, establecen contactos con axones de contenido vesicular esferoidal y de dimensiones semejantes a la de las fibras paralelas *in situ*. En la figura 20 se puede observar un ejemplo de este tipo de contacto sináptico. Estos contactos sinápticos han sido pues interpretados como sinapsis entre fibras axónicas de las células granulosas con espinas del cuerpo de las células de Purkinje. Algunas células de Purkinje que no presentan este tipo de espinas somáticas, forman contactos sinápticos en su cuerpo con axones de tipo musgoso semejantes (Fig. 17). Si ascendemos en observación a las

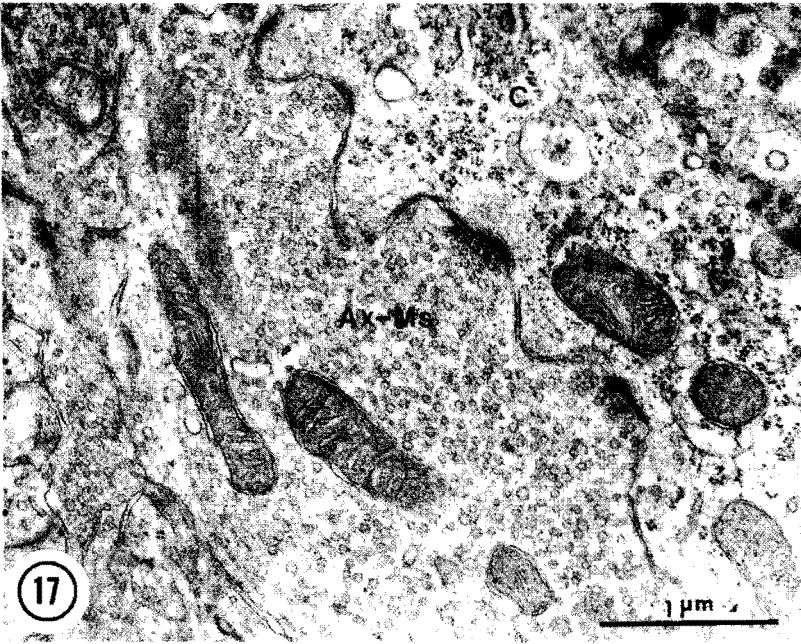


Fig. 17.— Imagen a mayor aumento donde se observan las sinapsis múltiples entre un axón musgoso y el citoplasma de una célula de Purkinje. Puede observarse claramente la alta densidad poblacional de vesículas sinápticas y la homogeneidad de sus contornos esferoidales; en los sitios de contactos sinápticos, el citoplasma se especializa y forma la densidad postsináptica en continuidad con un material filamentoso fino, como es lo habitual en los contactos sinápticos asimétricos.

regiones que ocupan las dendritas de las células de Purkinje, inmediatamente encontraremos una gran cantidad de procesos dendríticos grandes, que corresponden a las dendritas primarias de las células de Purkinje rodeadas de una gran cantidad de procesos, entre los cuales se observan procesos gliales y fibras de tipo paralelo que corresponden a los axones de células granulosas y dendritas de células estrelladas (Figs. 21, 22 y 24).

Las grandes dendritas principales de Purkinje tienen las mismas características morfológicas que ellas poseen *in situ*. Al microscopio electrónico se puede observar su alto contenido en microtúbulos y mitocondrias orientados de acuerdo al eje principal de las dendritas (Fig. 21). Estas grandes dendritas poseen espinas dendríticas, las cuales establecen contactos sinápticos con axones que contienen vesículas sinápticas esferoidales (Fig. 21); estas sinapsis son del tipo asimétrico como ocurre normalmente *in situ*; el conjunto formado por el axón de tipo fibra paralela y las espinas dendríticas de células de Purkinje fue observado, en numerosas ocasiones, ro-

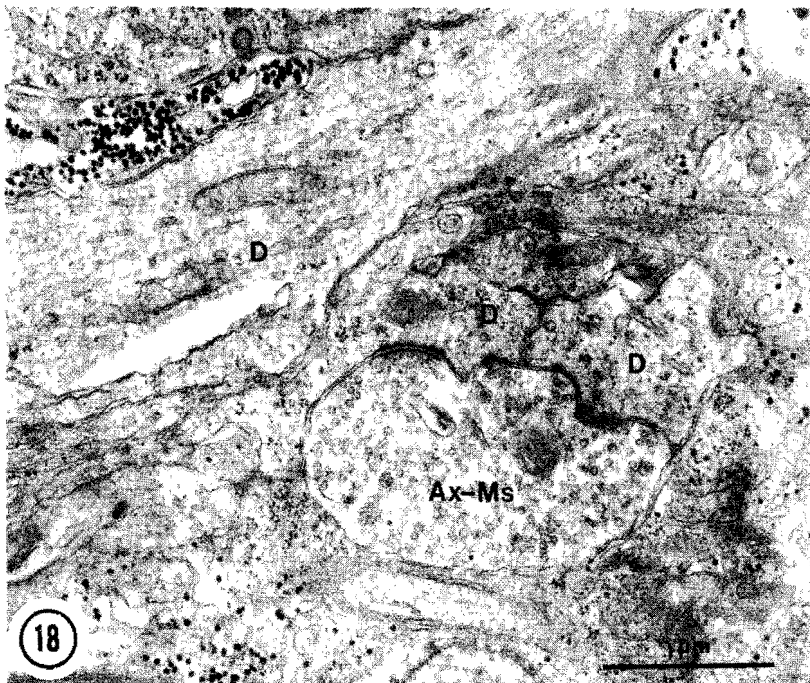


Fig. 18.— En esta imagen podemos observar un axón irregular que no alcanza las dimensiones de los axones musgosos y se localiza a nivel de las células de Purkinje. Este tipo de axón establece contactos sinápticos con dos dendritas grandes que corresponden a dendritas de células estrelladas.

deado de procesos gliales que conforman los corredores extracelulares de los complejos sinápticos, en la capa plexiforme del cerebelo (Fig. 21). Estas dendritas pueden formar sinapsis sobre su tronco principal, como la observada en la figura 21. Muchas de las espinas no se ven en continuidad con el tallo dendrítico, pero de acuerdo a sus características morfológicas, se conoce que son espinas de los troncos dendríticos vecinos, éstas establecen también contactos sinápticos con fibras de tipo paralelo. En las secciones transversales se pueden observar, con toda nitidez, las espinas dendríticas que le dan cierta irregularidad a las dendritas de Purkinje en estos cultivos (Fig. 22), por otra parte estas secciones transversales demuestran que las dendritas principales de las células de Purkinje cultivadas no son siempre tan regulares como lo son *in situ*, es decir, no tienen un contorno circular uniforme. Las espinas dendríticas de células de Purkinje cultivadas en cerebelos sometidos a irradiaciones con rayos-X durante el desarrollo (3-6) y las observaciones en cerebelos anormales, debido a alteraciones genéticas (46), se ha descrito que están rodeadas por procesos de células gliales, no estableciendo contacto con elementos presinápticos. Por todo esto, uno de los objetivos de nuestro estudio fue analizar si las células de

Purkinje cultivadas podrían establecer o no los contactos sinápticos típicos descritos *in situ*; fue sorprendente encontrar que la mayoría de las espinas



Fig. 19.— Segmento de la capa plexiforme cerca del nivel de las células de Purkinje en el cual se observa una sinapsis entre una dendrita pequeña y un axón que contiene vesículas aplanadas, este contacto sináptico es de tipo simétrico, dado que no se observa densidad postsináptica significativa, como en los contactos sinápticos asimétricos.

dendríticas observadas establecerían contactos sinápticos con los axones de las células granulosas, y es de relativa poca frecuencia, que existan espinas dendríticas rodeadas por procesos gliales, en nuestros preparados. Esto induce a pensar que las espinas dendríticas se originan porque existe la información programada en el ADN original de estas células y que el efecto trófico para su formación, de los axones que con ella establece contacto sináptico es de menor importancia. Nuestro criterio es que probablemente los dos factores son importantes para su creación, su forma y su número. Las dendritas terciarias, al igual de lo que ocurre *in situ*, presentan proporcionalmente mayor número de espinas dendríticas aunque su diámetro de sección es bastante pequeño, estas espinas también establecen contactos sinápticos con fibras de tipo paralelo, sinapsis de tipo asimétrico con un elemento presináptico que contiene vesículas esféricas como la mostrada en la figura 24. Con todas estas observaciones podríamos determinar

que el crecimiento y la diferenciación de las células de Purkinje siguen los mismos patrones logrados *in situ*, la diferencia es numérica, debido a que las células de Purkinje crecidas *in vitro*, contienen menor número de elementos citológicos diferenciales. En los actuales momentos estamos dedicados al análisis de las células gliales, sus características citológicas diferenciales y su gliogénesis *in vitro*, sin embargo, durante la realización del presente estudio, pudimos seguir el desarrollo de algunas células gliales de los

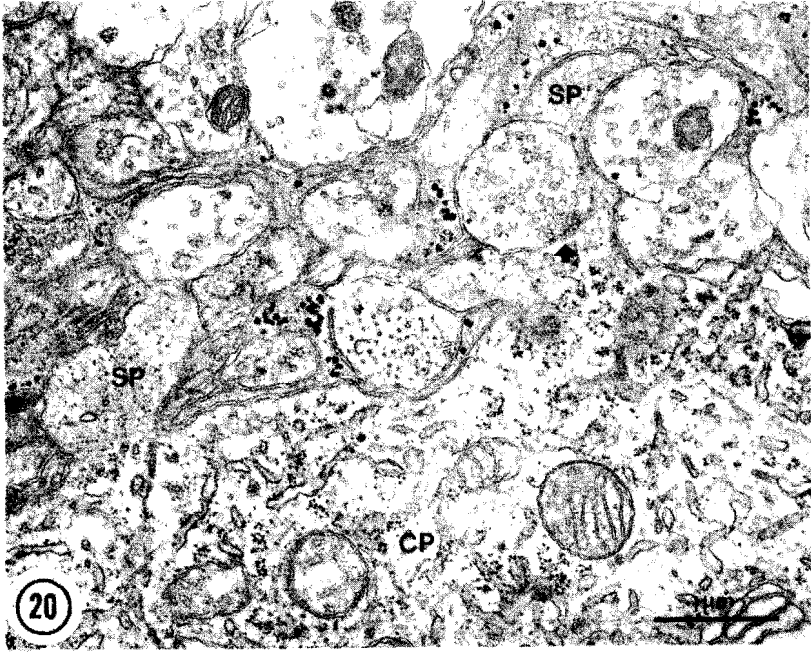


Fig. 20.— Segmento de célula de Purkinje en el cual se pueden apreciar las espinas somáticas irregulares que emergen de su cuerpo, las espinas establecen en su gran mayoría contactos sinápticos asimétricos (flecha) con axones claros que contienen vesículas esféricas, los cuales hacen interpretar que estos axones corresponden a los axones de células granulosas.

cultivos de cerebelo 16-6 y podemos decir, hasta el presente, que las células gliales conservan también sus patrones de características morfológicas citotípicas. En la figura 25 se muestra un segmento de célula glial, en el cual se observa parte de su citoplasma con numerosas gliofibrillas, se señala esta imagen para indicar que las células gliales en estos cultivos, también poseen procesos irregulares como ocurre *in situ*, que se insinúan entre el resto de los procesos celulares confiriéndole la gran irregularidad característica de estas prolongaciones.

DISCUSION

La información recogida en el presente estudio nos permite hacer los siguientes alcances en la investigación neurobiológica: por una parte estas observaciones han demostrado que es posible lograr desarrollo fenotípico neuronal *in vitro*, y aquí es importante insistir que cuando nos referimos al desarrollo fenotípico celular, en nuestros modelos de cultivo, las células pueden ser homologadas a las equivalentes *in situ*. La mayoría de las técnicas de cultivo sobre sustratos sólidos tienen el inconveniente de que las



Fig. 21.— Sección longitudinal de una dendrita principal de la célula de Purkinje, el dendroplasma muestra las características citológicas habituales: gran cantidad de microtúbulos orientados longitudinalmente, mitocondrias y retículo citoplasmático liso. En esta fotografía se observa claramente, cómo una espina establece contacto sináptico con un axón de tipo asimétrico con vesículas sinápticas esféricas. En la parte inferior izquierda de la dendrita se observa un contacto sináptico axodendrítico. El contacto sináptico entre la espina y el axón está rodeado por procesos gliales que forman corredores extracelulares alrededor de él.

células, para adaptarse al medio de cultivo, deben modificar su morfología a tal extremo, que el aspecto externo de éstas se modifica sustancialmente. Crain y col. (11-15) han demostrado que funcionalmente estas células

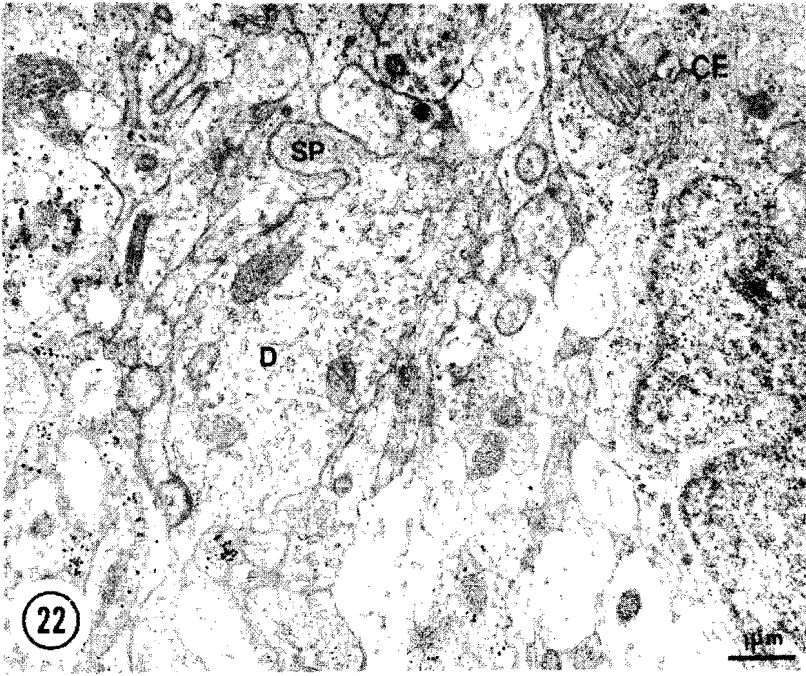


Fig. 22.— Sección transversal de una dendrita de una célula de Purkinje, en la cual se observa la emergencia de espinas dendríticas, una de las cuales, la superior está rodeada por procesos gliales sin que se observe en este plano de sección, ningún contacto sináptico. Una célula estrellada es observable en el extremo derecho de esta fotografía, esta célula muestra las características citológicas habituales incluyendo la irregularidad nuclear que es manifiesta en la imagen.

pueden ser homologables, pero nuestra experiencia señala que si bien esto es cierto, la morfología de estas células es sustancialmente diferente. Ya desde los clásicos trabajos de Paul Weiss (48), es conocido, que la adhesividad celular al medio sólido de soporte en los cultivos, imprime a las células necesidades motoras y de sobrevivencia, que hacen que éstas se modifiquen cuando son cultivadas en estos medios. En nuestros modelos, hemos utilizado, como se señaló en materiales y métodos, las técnicas desarrolladas por Moscona (24-25) desde el año 1952, esta técnica, originalmente empleada en la preparación de cultivos de células disociadas ha sido modificada en nuestro laboratorio, para producir cultivos celulares a partir de células disociadas o a partir de grupos neuronales íntegros, esto equivale a decir que cultivamos circuitos neuronales seleccionados que se toman a diferentes edades embrionarias y se propicia la diferenciación del circuito en el medio de cultivo; hacemos este señalamiento porque consideramos

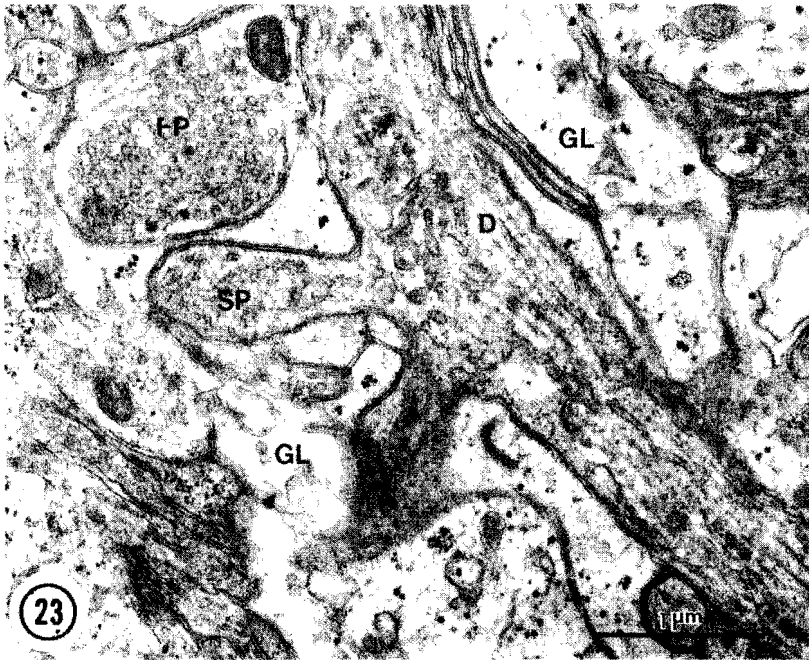


Fig. 23.— Esta imagen a mayor aumento, muestra una dendrita de Purkinje secundaria con la emergencia de dos espinas dendríticas, las cuales están rodeados por procesos gliales y aparentemente no forman sinapsis. En estos casos es difícil determinar si se debe al plano de corte o que en efecto estas espinas están desprovistas de su elemento presináptico.

importante clarificar en que se basan las modificaciones que hemos introducido, para poder obtener neuronas citotípicas. Por otra parte, hemos logrado, además de la diferenciación de neuronas específicas, las conectividades típicas de los circuitos, obviamente no nos referimos a aquellas conectividades que por la misma naturaleza de la obtención del fragmento, no pueden estar en ellos, como las aferentes al circuito que lo relacionan con grupos neuronales distantes.

En términos de diferenciación neuronal, nuestros resultados han sido inesperadamente satisfactorios, dado que las expectativas en estos modelos, inicialmente eran de que las células alcanzasen como máximo el 40% de desarrollo fenotípico final; se hacía esta consideración debido a que asumimos que las aferencias cerebelosas eran indispensables para la diferenciación neuronal y como en la preparación de los cultivos estas aferencias eran eliminadas, suponíamos que la diferenciación se vería significativamente reducida. El encontrarnos con buena diferenciación, sin las aferen-

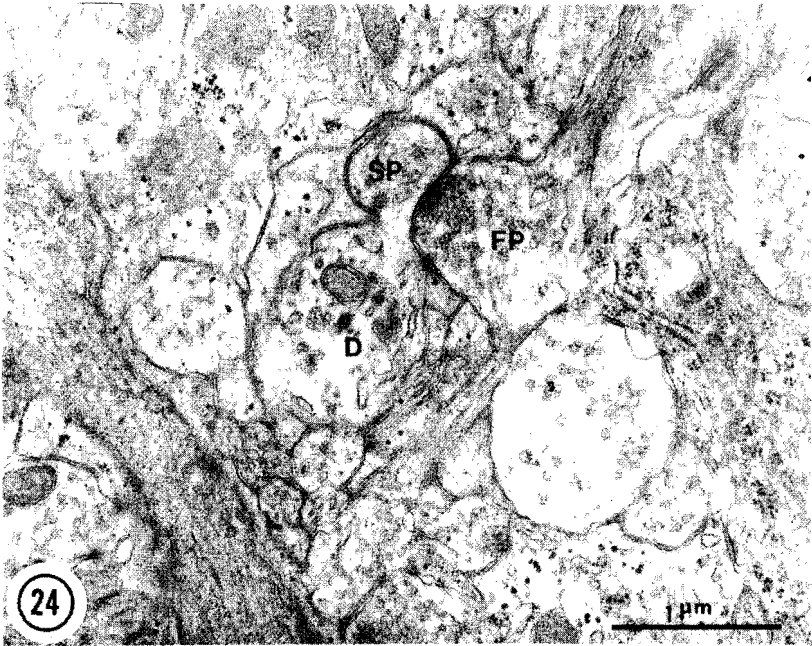


Fig. 24.— Sección transversal de una dendrita terciaria en la cual se observa una espina emergente que establece un contacto sináptico con un elemento presináptico de células granulosas. Obsérvese el contenido de vesículas esféricas y el origen de la bulbosidad presináptica a partir de una fibra muy fina.

cias, puede inducir a pensar, que los factores más importantes en la diferenciación neuronal, son tan sólo aquellos determinados por el programa genético de cada conjunto de células y de cada célula en particular, más adelante discutiremos acerca de este punto.

Tres tipos de neuronas debemos considerar en nuestros modelos de cultivo de cerebelo 16-6, o sea, las células de Purkinje, las células granulosas y el conjunto de las interneuronas cerebelosas. Las células de los núcleos cerebelosos también fueron eliminadas, por lo tanto no podemos incluirlas; para su eliminación se procedió cuidadosamente a seleccionar los fragmentos de cortes tangenciales del cerebelo embrionario, esta operación se hace utilizando un microscopio estereoscópico que permite con seguridad, la realización de tal manipulación.

Las neuronas de Purkinje, como señalamos anteriormente, tienen todas las características morfológicas que las definen como tal, cuantitativamente alcanzan un desarrollo equivalente a un 70% a 75% del normal, con esto

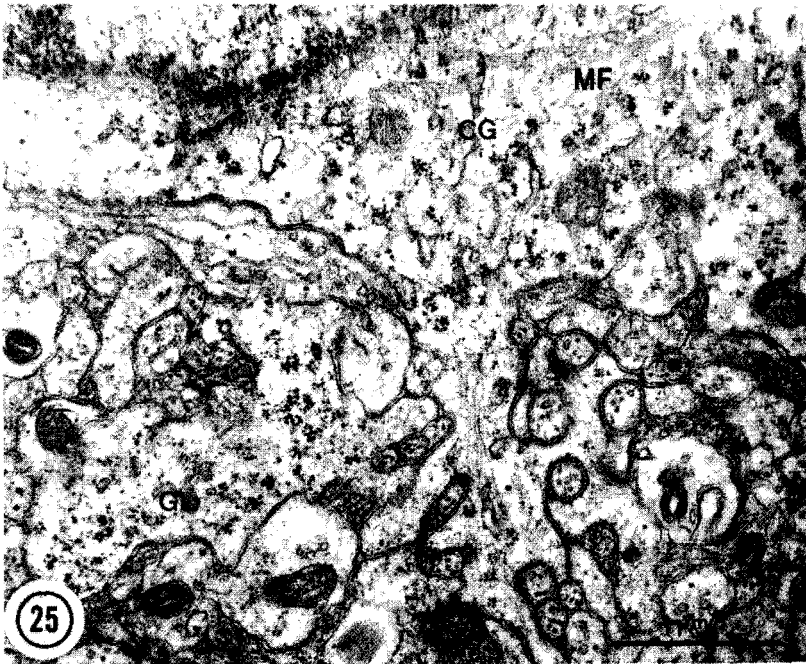
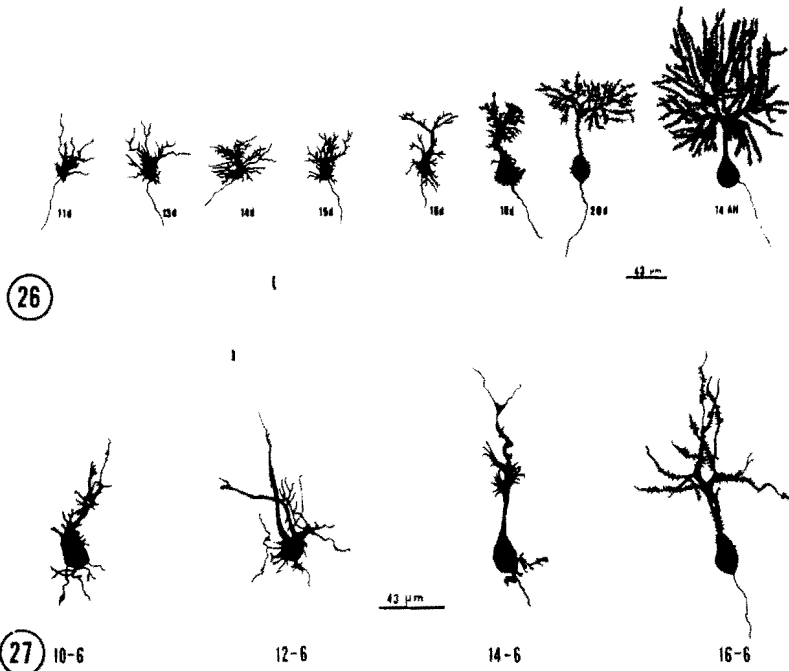


Fig. 25.— Esta fotografía muestra un segmento de célula glial, la cual se identifica por la gran cantidad de microfilamentos que se observan en su citoplasma, nótese además los procesos irregulares que se introducen entre las estructuras del parénquima, envolviendo los pequeños axones y dendritas que están en su vecindad.

queremos decir que el número de espinas dendríticas es significativamente menor, pero que el número de ramas dendríticas terciarias llega al mismo número que estas células poseen *in situ*. El cuerpo como ya mencionamos, tiene su típica morfología piriforme y un axón se desprende de la parte inferior de él. Las células granulosas alcanzan también sus características fenotípicas, quizás la única modificación digna de señalar es que no forman las "garras" dendríticas terminales como ocurre *in situ*, esto puede ser debido a que los elementos propios aferentes a estas dendritas, han sido removidos en la preparación de los cultivos. Las interneuronas adquieren una morfología muy variable, lo cual puede ser debido en parte, a que evidentemente la organización cerebelosa, su arquitectura precisa en capas, no se reproduce con la misma fidelidad en estos cultivos, en consecuencia es difícil diferenciar si se trata de células de Golgi o células estrelladas. Fue posible observar axones con las características de axones inhibitorios, que definen a los bulbos terminales de las células estrelladas del cerebelo y de las células de Golgi (Fig. 19). El desarrollo y citotipia alcanzados por todas estas células nos permiten concluir que los modelos de



Figs. 26, 27.— Este conjunto de cámaras lúcidas muestra el crecimiento in vitro de las células de Purkinje (Fig. 27) comparándose con el crecimiento normal in situ (Fig. 26). Puede observarse fácilmente cómo los pasos transicionales morfológicos más importantes se repiten in vitro. Entre el día 11 al día 16 in situ existen pocas modificaciones morfológicas significativas, esto quiere decir que las células de Purkinje del día 11 al 16 no se diferencian aunque hayan alcanzado su topotipia. A partir del día 16 se observan las modificaciones que inician y completan la diferenciación hasta un día después de nacido; igual fenomenología aunque en menor dimensión, puede ser demostrada en las neuronas cultivadas in vitro, nótese que cuando se cultivan neuronas de fragmentos provenientes de embriones de 10, 12 y 14 días de edad no se observa una franca diferenciación, pero cuando se toman fragmentos de cerebelo de embriones de 16 días, la diferenciación es definitiva. Todas las células fueron cultivadas por el mismo período de tiempo (6 días).

cultivos íntegros rotatorios constituyen un dispositivo experimental de gran importancia en futuras investigaciones en neurobiología dado que como hemos señalado, no solamente las células alcanzan sus características morfológicas finales, sino que establecen los contactos intercelulares apropiados. Esto nos permite contar con un conjunto o circuito de células nerviosas in vitro, al cual pueden diseñarse numerosos experimentos bioquímicos, farmacológicos, fisiológicos, y aún morfológicos, sin que se

tengan todas las variables que hay que enfrentar cuando se realizan experimentos en el animal vivo.

Una revisión a la literatura, nos permite afirmar que es la primera vez que se obtienen altos grados de diferenciación neuronal *in vitro*, en futuros experimentos esperamos poder realizar cultivos neuronales en los cuales se mezclen dos grupos de circuitos interactuantes *in situ*, por ejemplo, esperamos poder hacer cultivos mixtos de médula espinal y cerebelo. En cuanto a la sinaptología de estos cultivos 16-6, hay unos hechos importantes de enfatizar; ha sido posible reproducir la sinaptología típica del cerebelo, es decir, podemos considerar que estos modelos son sinaptotrópicos, no solamente en términos de las conectividades apropiadas, como indicamos en los párrafos anteriores, sino también que los aparatos sinápticos tienen las mismas características que tienen sus equivalentes *in situ*, así, las espinas dendríticas de las células de Purkinje establecen contactos de tipo asimétrico con axones que tienen todas las características morfológicas de los axones de células granulosas; se pudo establecer que estos axones de células granulosas forman también contactos sinápticos con los troncos de las dendritas de células de Purkinje o con dendritas no bien identificadas hasta ahora, pero que supuestamente pertenecen a las dendritas de las células estrelladas. Por otra parte estos axones pueden establecer contactos sinápticos, en una proporción no muy alta, con espinas y somas de células de Purkinje, esto es un hallazgo importante de describir porque constituye una variedad diferente a lo que habitualmente ocurre *in situ* en el animal adulto. Sobre dendritas y somas de células de Purkinje se observan sinapsis del tipo simétrico, que corresponden a sinapsis retenidas como de tipo inhibitorio; este tipo de sinapsis es importante que se desarrolle, debido a que con ello sabemos que pueden producirse los mecanismos modulatorios de estos circuitos, es decir, estos circuitos requieren para su mantenimiento, no solamente de sinapsis excitatorias sino también de sinapsis inhibitorias que contribuyan a mantener su fisiologismo con efectos tróficos de depolarización e hiperpolarización, dentro del mismo circuito. Preveemos que este mecanismo es útil no solamente para mantener un mínimo fisiologismo dentro del cultivo, sino un balance iónico satisfactorio para la sobrevivencia de estas neuronas. Las sinapsis de tipo inhibitorio, que se caracterizaron morfológicamente porque establecían contactos de tipo simétrico y porque el elemento presináptico contiene vesículas polimórficas, pensamos que correspondan a terminales axónicos de las interneuronas de la corteza cerebelosa que se desarrollaron *in vitro*, sin poder precisar si se tratan de homólogos de las células de la capa plexiforme o equivalentes de las células de Golgi, en este sentido preferimos interpretarlas como interneuronas corticales, sin pretender diagnosticar a que tipo de interneuronas corresponde cada una de ellas. Lo más importante de destacar desde el punto de vista sinap-

tológico y de la biología celular en general, en estos cultivos, fue la presencia en ellos, en las regiones glomerulares de un axón irregular y de grandes dimensiones, que establece contactos sinápticos múltiples con las dendritas de células granulosas y que morfológicamente puede ser homologado a los axones musgosos que normalmente se encuentran en los glomérulos cerebelosos *in situ*. Este tipo de terminal nos hace reflexionar en que esta clase de axón no puede estar en nuestros cultivos, debido a que las fibras musgosas tienen orígenes muy variados en el encéfalo de los vertebrados, pero que cualquiera de estos orígenes está muy lejos de la corteza cerebelosa, histológicamente hablando, en consecuencia si nuestra metodología fue la de preparar los cultivos de fragmentos corticales, es imposible mecánicamente, tener las células que dan origen a estos axones como contaminantes de los cultivos. A pesar de ser esto así, la presencia de este axón hizo que nos formuláramos la pregunta inicial en el sentido de si ellos eran el producto de algún contaminante celular, duda que también se la plantearon Kim (20) y Wolff y Dubois-Dalcq (49) en sus publicaciones relacionadas a cultivos de cerebelo; a diferencia de ellos nos dedicamos a diseñar una serie de experimentos que permitiesen sin lugar a dudas, descartar la posibilidad de contaminación celular; para esto procedimos, como mencionamos con anterioridad, usando un microscopio estereoscópico, para remover solamente la porción cortical y una vez aclarado que no se trataba de contaminantes, nos dedicamos sistemáticamente a seguir en secciones seriadas, el origen probable de estos axones; sabíamos que contábamos con tres tipos de células que podían producir esta clase de axón, las células gliales fueron descartadas por razones obvias; un grupo de células lo constituían las células de Purkinje, que son un componente importante en la producción de sinapsis simétricas con axones muy pequeñas e irregulares que forman contactos, también pequeños; en consecuencia este tipo de célula tuvo que ser descartado como productor de los axones musgosos, quedándonos dos grupos importantes de células, las células granulosas y las interneuronas. Siguiendo axones de células granulosas, encontramos que estos axones en un determinado momento de recorrido, se ensanchan significativamente y producen bulbos mucho más grandes que los formados normalmente *in situ*, estableciendo contactos sinápticos con las espinas de las células de Purkinje, estos axones se dilatan en las regiones vecinas a los arboles dendríticos de las células de Purkinje, pero algunos axones de células granulosas que se dirigen en profundidad, por debajo de las células de Purkinje, producen bulbosidades bastante grandes e irregulares, esto fue demostrado tanto con el método de Golgi como en secciones seriadas al microscopio electrónico, en consecuencia nuestra conclusión es que los axones de tipo musgoso que se localizan en el centro de las regiones glomérulo-similares, son axones de las células granulosas que se han modificado significativamente, para poder lograr producir este tipo de terminales presinápticas. Los axones de células estre-

lladas fueron descartados también, como originadores de este tipo de axón, porque se logró seguir estos axones y sólo producen elementos presinápticos pequeños con vesículas aplanadas y que forman sinapsis simétricas; además era lícito suponer que las células de Purkinje y las interneuronas formasen sinapsis simétricas con elementos presinápticos conteniendo vesículas ovoidales o aplanadas como ha sido ampliamente aceptado *in situ* (38). La formación de estos axones *in vitro* nos plantea una tesis importante de trabajo, la cual está relacionada con el hecho de que aparezca en un sistema neuronal dado, una estructura celular que no deba aparecer por razones estrictamente mecánicas; su presencia en este conjunto celular indica que ella es el producto de la modificación apropiada de uno de los elementos constituyentes del conjunto celular. Esta transformación de la fenotipia de una célula por otra, escapa a lo que en biología se conoce como determinismo biológico, es difícil aceptar que una neurona postmitótica contenga en su programa genético la posibilidad de transformarse en un elemento determinado que está ausente en un circuito neuronal dado, sin embargo, esto parece ser el caso en estos cultivos de cerebelo 16-6, en el cual el axón de las células granulosas se modifica para adquirir finalmente las características citológicas del axón musgoso ausente en el circuito. Sabemos que en el circuito cerebeloso la aferencia múltiple la constituyen las fibras musgosas, ya que estas fibras son un axón que establece contacto sináptico con numerosas células granulosas simultáneamente y amplifica su efecto a través de estas células, las cuales a su vez, contactarán a las células de Purkinje para cerrar el circuito musgoso-Purkinje; en estos cultivos donde falta la fibra musgosa existe la necesidad de mantener activo el circuito y probablemente, la única manera que encontraron estas células en cultivo, para mantener la actividad eléctrica amplificada del circuito fue la de modificar el axón de las fibras granulosas hasta adquirir las características de los axones musgosos y poder contactar de esta manera, simultáneamente numerosas células granulosas, por otra parte este es el axón más susceptible de ofrecer tal cambio. Estas estructuras fueron encontradas consistentemente en los cultivos hasta ahora examinados. Si esta hipótesis resulta ser correcta, nos encontraríamos entonces con que un elemento de un circuito dado *in vitro* puede modificar su desarrollo para adquirir las características de otra célula no incluida en el circuito, pero cuyo axón es de importancia significativa para el mantenimiento de este. Una información que apoya esta hipótesis de trabajo la constituye el hecho de que aquellos circuitos en los cuales quirúrgicamente no se incluyó cuantitativamente un número proporcionado de células perecen y las neuronas son sustituidas por células gliales, vale decir que cuando no existe un balance entre las células granulosas y las otras neuronas, no se produce el cambio observado. Los factores que inducen a las células granulosas a modificar su axón, para adquirir el aspecto de los axones musgosos requieren de futuras investigaciones in-

munológicas y neuroquímicas que intenten determinar los factores causales de este intrigante fenómeno neurobiológico.

Agradecimientos

La realización de este trabajo no hubiese sido posible sin la colaboración del personal del Centro de Microscopía Electrónica.

Este trabajo ha sido financiado por el CONICIT, a través de la subvención 3126-SI-0462 y por el C.D.C.H., Universidad de Los Andes, subvención M-04R.

ABREVIATURAS:

A	: Axón
AH	: Después de nacido.
Ax-Ms	: Axón musgoso.
C	: Citoplasma.
D	: Dendrita.
ES	: Célula Estrellada.
FP	: Fibra Paralela.
G	: Complejo de Golgi.
GC	: Célula Glial.
GE	: Capa Granulosa Externa.
GL	: Proceso Glial.
GR	: Célula Granulosa.
LP	: Lámina Pial.
Ly	: Lisosoma.
M	: Mitocondria.
Mf	: Microfilamento.
Mt	: Microtúbulo.
N	: Núcleo.
NL	: Nucleolo.
P	: Célula de Purkinje.
RGL-S	: Región Glomérulo-Similar.
RR	: Retículo Endocitoplasmático Rugoso.
SC	: Superficie del Cultivo.
SP	: Espina.
VS	: Vaso Sanguíneo.

ABSTRACT

In vitro histotypic differentiation of the cerebellar cortex. Palacios-Prü E., Palacios L., Mendoza B., R.V. (*Centro de Microscopía Electrónica. Facultad de Medicina, Universidad de los Andes. Apartado 163. Mérida 5101-A. Mérida, Estado Mérida, Venezuela*). *Invest Clín* 21(2): 67-107, 1980. — Cerebellar cortex rotary cultures were prepared from chick embryos cerebellum at different ages of development. The samples were incubated during 6 days, at 37°C and oxygenated every 24 hours. This procedure allows to obtain different sequential grades of neuronal differentiation of the cerebellar cortex, as well as to determinate the critical period of maturation of the cortical cells. Before day 15 of in situ development the removed embryonic cortex was not suitable to produce well differentiated cerebellar cultures. When the cultures were prepared with cortical fragment from 16 days-old chick embryos best results were obtained. These results indicate that the critical period of cerebellar differentiation is around day 15 of development. Within histotypic culture we were able to observe 70% of the phenotypic morphological characteristics of the in situ cerebellar cortex, not only from a cytological point of view but sinap- tologically and cytoarchitectonical speaking.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1— ADDISON WHF: The development of the Purkinje cells and of the Cortical Layers in the cerebellum of the albino rat. *J Comp Neurol* 21: 459-485, 1911.
- 2— ADLER R: Ultrastructural changes associated with an invagination phenomenon in embryonic neuronal aggregates. *Exp Cell Res* 68: 395-403, 1971.
- 3— ALTMAN J, ANDERSON WJ: Experimental reorganization of the cerebellar cortex. I. Morphological effects of elimination of all microneurons with prolonged X-irradiation started at birth. *J Comp Neurol* 146: 355-406, 1972.
- 4— ALTMAN J, ANDERSON WJ: Experimental reorganization of the cerebellar cortex. II. Effects of elimination of most microneurons with prolonged x-irradiation started at four days. *J Comp Neurol* 149: 123-152, 1973.
- 5— ALTMAN J: Experimental reorganization of the cerebellar cortex. III. Regeneration of the external germinal layer and granule cell ectopia. *J Comp Neurol* 149: 153-180, 1973.

- 6- ALTMAN J: Experimental reorganization of the cerebellar cortex. IV. Parallel fiber reorientation following regeneration of the external germinal layer. *J Comp Neurol* 149: 181-192, 1973.
- 7- BORNSTEIN MB, MODEL PG: Development of synapse and myelin in cultures of dissociated embryonic mouse spinal cord, medulla and cerebrum. *Brain Res* 37: 287-293, 1972.
- 8- BUNGE MB: Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture. *J Cell Biol* 56: 713-735, 1973.
- 9- BUNGE MB, BUNGE RP, PETERSON ER: The onset of synapse formation in spinal cord cultures as studied by electron microscopy. *Brain Res* 6: 728-749, 1967.
- 10- BUNGE RP, REES R, WOOD P, BURTON H, KO CP: Anatomical and physiological observations on synapses formed on isolated autonomic neurons in tissue culture. *Brain Res* 66: 401-412, 1974.
- 11- CRAIN SM: Development of "organotypic" bioelectric activities in central nervous tissues during maturation in culture. *Int Rev Neurobiol* 9: 1-43, 1966.
- 12- CRAIN SM, BORNSTEIN MB: Early onset in inhibitory functions during synaptogenesis in fetal mouse brain cultures. *Brain Res* 68: 351-357, 1974.
- 13- CRAIN SM, BORNSTEIN MB: Organotypic bioelectric activity in cultured reaggregates of dissociated rodent brain cells. *Science* 176: 182-184, 1972.
- 14- CRAIN SM, PETERSON ER: Development of neuronal connections in culture. *Ann NY Acad Sci* 228: 6-34, 1974.
- 15- CRAIN SM, PETERSON ER: Onset and development of functional interneuronal connections in explants of rat spinal cord-ganglia during maturation in culture. *Brain Res* 6: 750-762, 1967.
- 16- GARBER BB, MOSCONA AA: Reconstruction of brain tissue from cell suspensions. I. Aggregation patterns of cells dissociated from different regions of the developing brain. *Develop Biol* 27: 217-234, 1972.
- 17- GUILLERY RW, SOBKOWICZ M, SCOTT GL: Light and electron microscopical observations of the ventral horn and ventral root in long term cultures of the spinal cord of the fetal mouse. *J Comp Neurol* 134: 433-476, 1968.

- 18- GUTIERREZ E, PALACIOS-PRÜ EL: Análisis cuantitativo del desarrollo neuronal: Célula de Purkinje. *Acta Científica Venezolana* 25 :60, 1974.
- 19- KIM SU: Formation of synapses and myelin sheaths in cultures of dissociated chick embryonic spinal cord. *Exp Cell Res* 73: 528-530, 1972.
- 20- KIM SU: Observations on cerebellar granule cells in tissue culture. A silver and electron microscopic study. *Z Zellforsch* 107: 454-465, 1970.
- 21- LARRAMENDI LMH: Analysis of synaptogenesis in the cerebellum of the mouse. In: *Neurobiology of Cerebellar Evolution and Development*. pp. 803-843. Edited by R. Llinas, A.M.A. Education and research Foundation, Chicago, 1969.
- 22- LYSER KM: Early differentiation of the chick embryo cord in organ culture: Light and electron microscopy. *Anat Rec* 169: 45-64, 1971.
- 23- MILLER R, VARON S, KRUGER I, COATES PW: ORKAND PM: Formation of synaptic contacts on dissociated chick embryo sensory ganglion cells in vitro. *Brain Res* 24: 356-358, 1970.
- 24- MOSCONA AA: Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Exp Cell Res* 3: 535-539, 1952.
- 25- MOSCONA AA: Rotation-mediated histogenetic aggregation of dissociated cell. A quantifiable approach to cell interactions in vitro. *Exp Cell Res* 22: 455-475, 1961.
- 26- OLSON MI, BUNGE RP: Anatomical observations on the specificity of synapse formation in tissue culture. *Brain Res* 59: 19-33, 1973.
- 27- PALACIOS-PRÜ EL: Two useful variations of the Golgi silver-chromate method. *Acta Científica Venezolana* 21: 105-106, 1970.
- 28- PALACIOS-PRÜ EL, MENDOZA RV: An unusual relationship between glial cells and neuronal dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*. *Brain Res* 36: 404-408, 1972.
- 29- PALACIOS-PRÜ EL, GARBER BB, LARRAMENDI LMH: Silver-chromate impregnation of chick embryo brain cell aggregates. *Brain Res* 66: 173-178, 1974.
- 30- PALACIOS-PRÜ EL: Modelaje postnatal de la célula de Purkinje. *Acta Científica Venezolana* 25: 60, 1974.

- 31- PALACIOS-PRÜ EL, GARBER BB, LARRAMENDI LMH: The "Reazione Nera": A tool for the analysis of neuronal aggregates reconstituted *In vitro* from dissociated embryonic brain cells. In: Golgi Centennial Symposium: Perspectives in Neurobiology. pp. 593-601. Edited by M. Santini. Raven Press, New York, 1975.
- 32- PALACIOS-PRÜ EL: Golgi studies of the telencephalon of the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Anat Rec* 184: 495, 1976.
- 33- PALACIOS-PRÜ EL, GARBER BB, LARRAMENDI LMH: Neuronal organization of aggregates prepared from chick embryo striatum and entorhinal cortex. Proc. 30th Annual Meeting Cajal Club. USA, 1976.
- 34- PALACIOS-PRÜ EL, PALACIOS L, MENDOZA RV: Formación de circuitos neuronales *in vitro*. I. Análisis con el método de Golgi de cultivos rotatorios íntegros de cerebelo. *Acta Científica Venezolana* 27: 301-308, 1976.
- 35- PALACIOS-PRÜ EL, PALACIOS L, MENDOZA RV: Formación de circuitos neuronales *in vitro*. II. Análisis con el método de Golgi de cultivos rotatorios íntegros de médula espinal. *Acta Científica Venezolana* 27: 309-313, 1976.
- 36- PALACIOS-PRÜ EL, PALACIOS L, MENDOZA RV: *In vitro* vs *in situ* development of Purkinje cells. *Neurosci Res* 2: 357-362, 1976.
- 37- PALACIOS-PRÜ EL, PALACIOS L, MENDOZA RV: Formación de circuitos neuronales *in vitro*. III. Análisis ultraestructural de cultivos histotípicos de cerebelo y médula espinal. *Acta Científica Venezolana* 28: 19-29, 1977.
- 38- PALAY SL, CHAN-PALAY R: *Cerebellar Cortex, Cytology and Organization*. Springer-Verlag, Berlin, 1974.
- 39- PETERSON ER, CRAIN SM, MURRAY MR: Differentiation and prolonged maintenance of bioelectrically active spinal cord cultures (rat, chick and human). *Z Zellforsch* 66: 130-153, 1965.
- 40- RAMON Y CAJAL S: *Histologie du Systeme Nervoux de l'Homme et des Vértèbres*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Madrid, España. 1909-1911.
- 41- RAMON Y CAJAL S: *Studies on vertebrate neurogenesis*; 1929. Translated by L. Guth, Thomas, Springfield, Illinois, 1960.

- 42- REYNOLDS ES: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Biophys Biochem Cytol* 19: 208-212, 1963.
 - 43- SEEDS NW, VATTER AE: Synaptogenesis in reaggregating brain cell culture. *Proc Nat Acad Sci USA* 68: 3219-3222, 1971.
 - 44- SEIL FJ, HERNDON RM: Cerebellar granule cells *in vitro*. A light and electron microscope study. *J Cell Biol* 45: 212-220, 1970.
 - 45- SHEFFIELD JB, MOSCONA AA: Electron microscopic analysis of aggregation of embryonic cells: the structure and differentiation of aggregates of neuronal retina cells. *Develop Biol* 23: 36-61, 1970.
 - 46- SIDMAN RL: Development of interneuronal connections in brains of mutant mice. In: *Physiological and Biochemical aspects of Nervous Integration*. pp. 163-193. Edited by F.D. Carlsson. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New York, 1968.
 - 47- VARON S: Neurons and glia in neural cultures. *Exp Neurol* 48: 93-134, 1975.
 - 48- WEISS P: The Development of the Nervous System (Neurogenesis). In: *Principles of Development. A text in Experimental Embryology*. pp. 491-557. Hafner Publishing Company. New York, 1969.
 - 49- WOLFF MK, DUBOIS-DALCQ M: Anatomy of cultured mouse cerebellum. I. Golgi and electron microscopic demonstrations of granule cells, their afferent and efferent synapses. *J Comp Neurol* 140: 261-280, 1970.
-