



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA

INTERACCIONES DE LA GLÍA DE BERGMANN CON CÉLULAS DE LA REGIÓN
SUBPENDIMARIA DEL TECHO DEL IV VENTRÍCULO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA
BIÓL. NINFA MARIANA GALVÁN YTTESÉN

TUTORES PRINCIPALES
DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES INB
DR. DANIEL REYES HARO INB

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. SOFÍA YOLANDA DÍAZ MIRANDA INB
DR. JORGE ANTONIO LARRIVA SAHD INB

CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Al laboratorio de “Neurobiología Molecular y Celular” del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular en el Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Ataúlfo Martínez Torres.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca No.220224)

A la Dra. Sofía Yolanda Díaz Miranda, al Dr. Jorge Antonio Larriva Sahd, y al Dr. Daniel Reyes Haro miembros del comité tutor.

A los miembros del jurado de examen, el Dr. Manuel Salas Alvarado, el Dr. Miguel Pérez de la Mora y la Dra. María Teresa Morales Guzmán.

A la Unidad de Microscopía, en particular a Ma. Lourdes Palma Tirado.

Al Bioterio del INB, en especial a Alejandra Castilla León.

A Angeles Edith Espino Saldaña.

A Ana, Lety, Freya, Annie.

A mi Familia

RESUMEN

El cerebelo es una estructura involucrada principalmente en el control de la postura y la coordinación motriz. Está ubicado en la fosa craneal posterior formando el techo del cuarto ventrículo, está constituido por una capa de materia blanca y una de materia gris. La materia gris se organiza en tres capas, en la capa intermedia se encuentran los somas de las neuronas de Purkinje y de la Glía de Bergmann (GB), mientras que en la capa más externa se ubican las dendritas de las neuronas de Purkinje y los procesos de la GB que las rodean.

La GB tiene un papel importante tanto en el desarrollo embrionario, como en el mantenimiento funcional del cerebelo. En este trabajo se encontró que la GB en el techo del cuarto ventrículo se puede clasificar en tres subpoblaciones de acuerdo con el tipo celular con el que contactan sus pies terminales. Por lo que, el propósito de este trabajo es caracterizar ultraestructuralmente, la interacción entre la GB y las células de la región subependimaria del techo del IV ventrículo.

Con el análisis ultraestructural, empleando microscopía electrónica de transmisión, se encontró que los pies de la GB en esta región difieren en algunas características con los pies de la GB que proyectan hacia la pía madre. En esta zona los pies de la GB no forman lámina basal, presentan mayor cantidad de organelos y son más electro-opacos. Además, contactan con otros grupos celulares como las células ependimales y un tipo de células con citoplasma electro-opaco. Estos hallazgos sugieren que la GB de esta zona tiene mayor actividad metabólica y traduccional; y que posee funciones especializadas que difieren en relación a su ubicación y las estructuras con las que contactan sus pies terminales.

ABSTRACT

The cerebellum is mainly involved in posture control and locomotive coordination. It is located in the posterior cranial fossa, constituting the roof of the fourth ventricle; it has a layer of white matter and a layer of gray matter. The gray matter is organized in different layers, the inner layer is the granular layer, it contains the granular neurons somas, the mid layer has the Purkinje neurons and Bergmann glia (GB) somas, while the outer layer contains Purkinje dendrites and the surrounding GB processes.

GB has an important role in development and in the functional maintenance of the cerebellum. Studies in our lab found that GB in the roof of the fourth ventricle (IVv) can be classified in three subpopulations according to the cellular type with which their end-feet contact. The aim of this project was to characterize the ultrastructure of the interaction between GB end-feet and the subependymal zone cells of the IVv.

Using Transmission Electron Microscopy (TEM), it was found that GB end-feet differ ultrastructurally in certain characteristics from GB end-feet contacting pia. In this area, GB end-feet do not present basal lamina, they present a greater amount of organelles, and a more electro dense cytoplasm. Furthermore, GB end-feet contact with other cellular structures like ependymal cells and a type of cells with electro dense cytoplasm.

5. Objetivos	26
6. Método	27
7. Resultados	28
8. Discusión	40
9. Conclusiones	43
10. Referencias	

1. INTRODUCCIÓN

El cerebelo es una región del sistema nervioso central (SNC) implicada en el control de la postura, así como en la coordinación del movimiento y en habilidades del aprendizaje motor. Estudios recientes lo vinculan además con el lenguaje y funciones cognitivas (Pombano y Evans, 2012; Wang *et al.* 2014). El cerebelo está constituido por una capa externa de sustancia gris conocida como corteza cerebelosa, y una capa interna de sustancia blanca. La corteza cerebelosa comprende tres capas: 1) la molecular en donde se ubican las células de canasto y de Golgi; 2) la de células de Purkinje, donde se ubican sus somas y la glía de Bergmann (GB); y 3) la granular que está conformada por cuatro tipos celulares; las granulares, de Golgi, de Lugaro, y las de cepillo (Pombano y Evans, 2012; Sillitoe *et al.* 2012 Kandel *et al.* 2013).

Los procesos de la GB rodean completamente el soma, las dendritas y las sinapsis de las células de Purkinje (Riquelme *et al.* 2002), manteniendo una estrecha relación entre la GB y las neuronas presinápticas, por lo que se ha sugerido el concepto de sinapsis tripartita (Grosche *et al.* 1999, 2002); además, los procesos de la GB se extienden a través de la capa molecular hasta llegar a la pía. Asimismo, la GB secreta factores que promueven sobrevivencia, crecimiento dendrítico y el alineamiento en columnas de las células de Purkinje. Por lo anterior, a la GB se le atribuye tanto el mantenimiento, como la regulación de la estructura y función de las células de Purkinje (Yamada y Watanabe, 2002).

Asimismo, este tipo de glía puede establecer contacto con los capilares, por lo que tiene el potencial de intercambiar los nutrientes y metabolitos entre el torrente sanguíneo y la neurona (Araque *et al.* 2001), así la GB ejerce influencia en la actividad neuronal (Grosche *et al.* 1999).

Por otra parte, los pliegues que posee el cerebelo permiten dividirlo en 10 lóbulos, de los cuales el primero (I) y el décimo (X) están en contacto con el cuarto ventrículo, formando el techo de esta estructura (Sillitoe *et al.* 2012). En nuestro grupo de trabajo se encontró que la GB que proyecta hacia el cuarto ventrículo se

puede dividir en tres grupos de acuerdo a la zona o estructura en donde terminan sus procesos: 1) en contacto con la zona periventricular, 2) en contacto con la zona subventricular, y 3) los procesos que se extienden hacia la luz del ventrículo (Gómez, 2014). Así, con este proyecto se pretende caracterizar de manera ultraestructural la interacción entre los pies de la GB con las células de la región subependimaria del techo del IV ventrículo.

2. ANTECEDENTES

2.1 Anatomía del Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso está dividido en dos componentes anatómicamente distintos: el sistema nervioso periférico (SNP) que se compone de nervios periféricos y cúmulos de neuronas especializadas (ganglios) y el sistema nervioso central (SNC), que está constituido por el cerebro y la médula espinal. El SNC, se compone de siete regiones principales (en sentido caudal a rostral): la médula espinal, el bulbo raquídeo, el puente de Varolio, el cerebelo, el cerebro medio o mesencéfalo, el diencéfalo, y los hemisferios cerebrales (Figura 1; Purves *et al.* 2012; Kandel *et al.* 2013).

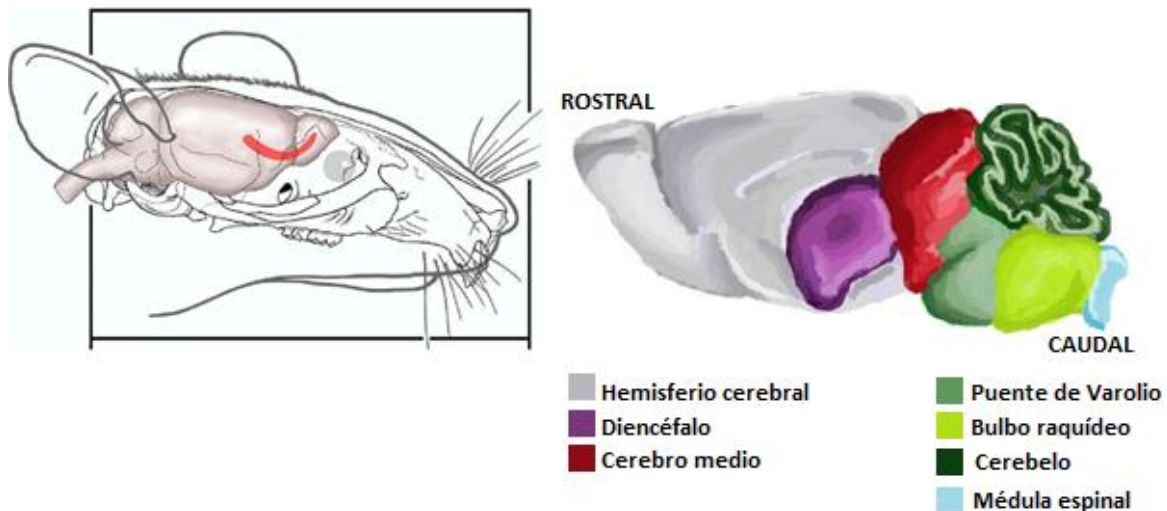


Figura 1 Organización del cerebro murino. La imagen la izquierda es un esquema de la posición del cerebro en la cabeza de un ratón. Al lado derecho hay una representación de las siete divisiones principales en el cerebro de un roedor.

2.1.1 Sistema Ventricular

Dentro del cerebro existe un conjunto de cavidades interconectadas (Figura 2) que se conforman por los ventrículos laterales, y el tercer ventrículo que mediante el acueducto cerebral se conecta con el cuarto ventrículo. A los ventrículos y el

líquido cefalorraquídeo (LCR), junto con el epitelio circundante y las estructuras asociadas, se les llama sistema ventricular (Lowery y Sive, 2009).

El cuarto ventrículo está ubicado entre el cerebelo y el puente, es el que une al canal central de la médula espinal y al espacio subaracnoideo que envuelve al cerebro.

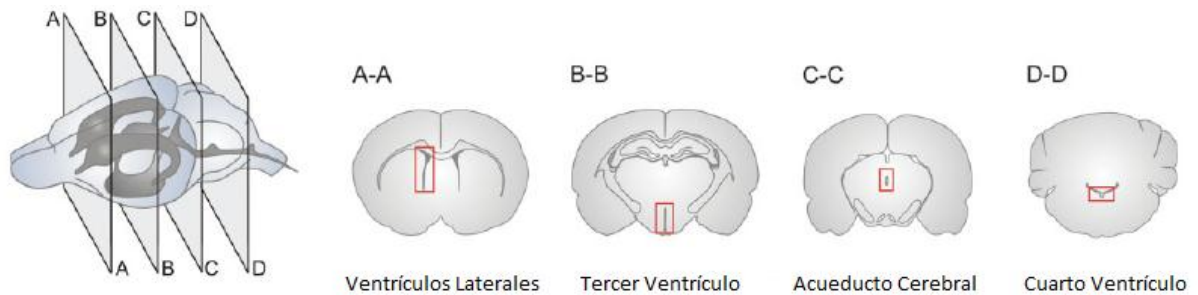


Figura 2 Sistema Ventricular del cerebro de ratón. La imagen de la izquierda indica la altura de los cuatro cortes coronales que se muestran en la figura de la derecha. Esta segunda figura indica la ubicación de los ventrículos cerebrales (A-A, B-B, C-C y D-D). Modificado de Hermann *et al.* 2009.

Dentro de los ventrículos, las células del plexo coroideo junto con las células endoceliales que los revisten, producen activamente el LCR (Lowery y Sive, 2009) que fluye a lo largo del sistema ventricular y entra al espacio subaracnoideo por la cisterna magna (Bedussi *et al.* 2015).

Las células epiteliales del plexo coroideo y los vasos sanguíneos constituyen la barrera hematoencefálica que limita el movimiento de solutos de la sangre al LCR y viceversa, además posee sistemas de transporte para el influjo y eflujo de nutrientes, productos metabólicos y iones, y está involucrada en procesos de desintoxicación (Bedussi *et al.* 2015). De tal forma que, los fluidos que bañan el intersticio del SNC y sus compartimentos, están regulados por la BHE y el LCR (Bedussi *et al.* 2015).

2.2 Tipos celulares en el SNC

El SNC cuenta con dos tipos celulares principales, las neuronas y la glía. Las primeras, se caracterizan por tener una asimetría morfológica y funcional: tienen dendritas en un extremo y un axón en el otro, esto es la base para la señalización neuronal unidireccional. Además, las neuronas son eléctricamente y químicamente excitables, ya que pueden crear corrientes eléctricas y alterar el voltaje de la membrana.

La glía, es menos excitable, pero sus membranas contienen transportadores de proteínas que facilitan la captura de iones y proteínas que remueven neurotransmisores del espacio extracelular, regulando la función neuronal (Kandel *et al.* 2013).

2.2.1 Las Neuronas

Las neuronas están dotadas con la habilidad de comunicarse precisa y rápidamente con otras células en distintos sitios del cuerpo. En el SNC existen alrededor de 100 tipos distintos de neuronas y aunque todas ellas heredan el mismo complejo de genes, cada una expresa un conjunto restringido de estos, por ello, son morfológica, bioquímica, y electrofisiológicamente diferentes, lo que contribuye a la gran complejidad del proceso de la información en el cerebro.

La complejidad de sus árboles dendríticos, la extensión de la ramificación de sus axones, y el número de terminales sinápticas que forman están relacionadas con la función que ejercen (Kandel *et al.* 2013).

2.2.2 La Glía

En el SNC existen diferentes tipos de glía de acuerdo a su función pueden clasificarse en tres grupos principales: microglía, oligodendrocitos, astrocitos y la glía NG2 (Reyes-Haro *et al.* 2014). Los oligodendrocitos son células productoras

de mielina, por lo que son responsables de la rápida velocidad de procesamiento de la información en los axones. La microglía son células inmunes con capacidad fagocitaria, reaccionan a los agentes extraños en el sistema nervioso, por lo que se conocen también como los sensores patológicos del cerebro. Además, en condiciones fisiológicas se encargan del mantenimiento de las sinapsis (Kettenmann y Ranson 2013; Reyes-Haro *et al.* 2014). Por último, los astrocitos, palabra que significa célula tipo estrella, presentan una gran heterogeneidad en su morfología y función (Kettenmann y Ranson 2013).

2.2.2.1 Astroglía

La diversidad intrínseca de la astroglía está relacionada con las interacciones estructurales y funcionales entre cada célula y su microambiente, esto incluye por un lado a las neuronas, y por el otro, a los vasos sanguíneos, la pía madre, y/o el espacio ventricular (Wolburg *et al.* 2009).

De acuerdo a su localización en el parénquima se puede clasificar en tres grupos. A las células alineadas en la periferia de los ventrículos se les llama glía ependimal. Existe otro tipo de glía que se caracteriza por ser células bipolares que extienden sus procesos desde el ventrículo hasta la superficie pial, a estas se les denomina glía radial no ependimal, sin embargo, si los cuerpos celulares de la glía radial están alineados en la periferia del ventrículo, se les llama glía radial ependimal (Kettenmann, 2013).

El tercer grupo está compuesto por células gliales con procesos múltiples que por su morfología estrellada son llamados astrocitos los que contactan con capilares, y expresan a la proteína ácida fibrilar glial (GFAP por sus siglas en inglés). Sin embargo, cabe destacar que existen muchos tipos de glia radial y ependimal que también expresan GFAP (Reyes-Haro *et al.* 2014).

La astroglía es el grupo celular más diverso y numeroso del SNC, pero no existe una definición inequívoca ni uniforme para describir a este grupo, ya que no

todos los tipos celulares que comprenden este grupo tienen forma de estrella, no todos expresan GFAP, ni todos contactan con capilares (Kettenmann y Ransom, 2013).

2.2.2.1.1 Glía Limitante

Por otra parte, los pies terminales de los procesos astrocíticos pueden formar una estructura en los límites del parénquima con la pía madre o los vasos sanguíneos (Kettenmann & Ransom, 2013). A dicha estructura se le llama glía limitante, y puede clasificarse en dos poblaciones de acuerdo a su ubicación; la que se encuentra en la capa más externa de la corteza que cubre la superficie entera del cerebro y la médula espinal es llamada glía limitante superficial porque da hacia el espacio subaracnoideo, y la que se encuentra rodeando íntimamente la vasculatura, se llama glía perivascular (Owens *et al.* 2008).

2.2.2.1.2 Glía Limitante Superficial

Ubicada directamente bajo la pía madre, la glía limitante superficial (GLS) está compuesta generalmente por una densa malla de astrocitos firmemente atados a la lámina basal externa que contacta íntimamente con las células de la pía madre (Landis y Reese, 1982; Owens *et al.* 2008; Liu *et al.* 2013).

2.2.2.1.3 Glía Limitante Perivascular y Barrera Hematoencefálica

La homeostasis del SNC permite la correcta actividad neuronal, por lo que la barrera hematoencefálica (BHE) del cerebro debe prevenir que iones y otros solutos en la sangre entren al parénquima, para esto, existen dos barreras físicas que regulan la entrada al parénquima del SNC, el endotelio vascular y la glía limitante perivascular (GLP), cada uno con su propia membrana basal (Engelhardt *et al.* 2014).

En la BHE las células del endotelio vascular del SNC están conectadas mediante uniones estrechas, formando una barrera restrictiva al movimiento de moléculas y electrolitos entre el cerebro y el flujo sanguíneo. En cuanto a la microvasculatura, esta responde rápidamente a la actividad neuronal para incrementar el flujo sanguíneo donde es requerido, esto último se logra gracias al acoplamiento neuro-glio-vascular. Estos dos factores están relacionados con las señales astrocíticas provistas por la GLP (Owens *et al.* 2008, MacVicar y Newman, 2015).

En vecindad con la GLP y las células endoteliales de los capilares, existen otros tipos de glia, pericitos y neuronas. Los astrocitos envuelven con sus pies las paredes de los capilares casi completamente, cubriendo no solamente a las células endoteliales, sino a los pericitos asociados (Haseloff *et al.* 2005).

2.3 Cerebelo

El cerebelo recibe e integra la información que llega desde diversas regiones, como la información somática que proviene de la médula espinal, o la información sobre el balance del cuerpo que le llega desde los órganos vestibulares en el oído interno, y la información tanto motora como sensorial que proviene de varias áreas de la corteza cerebral mediante los núcleos del puente (Kandel *et al.* 2013; Pombano y Evans, 2012).

2.3.1 Organización anatómica

El cerebelo, se encuentra dorsal al puente de Varolio y al bulbo raquídeo (Figura 3A), formando el techo del cuarto ventrículo. Ocupa la mayor parte de la fosa craneal posterior (Sillitoe *et al.* 2012; Kandel *et al.* 2013; Marzban *et al.* 2015). La superficie cerebelar presenta muchos pliegues y fisuras, dos de estas fisuras transversales lo dividen en tres lóbulos conformando así a los hemisferios (izquierdo y derecho) y el vermis (Figura 3 B), que es una estructura característica

del cerebelo de mamíferos. Los hemisferios y el vermis se subdividen en 10 lóbulos que son los pliegues paralelos que se enumeran del I al X (Figura 3 C; Pombano y Evans, 2012; Sillitoe *et al.* 2012; Marzban *et al.* 2015).

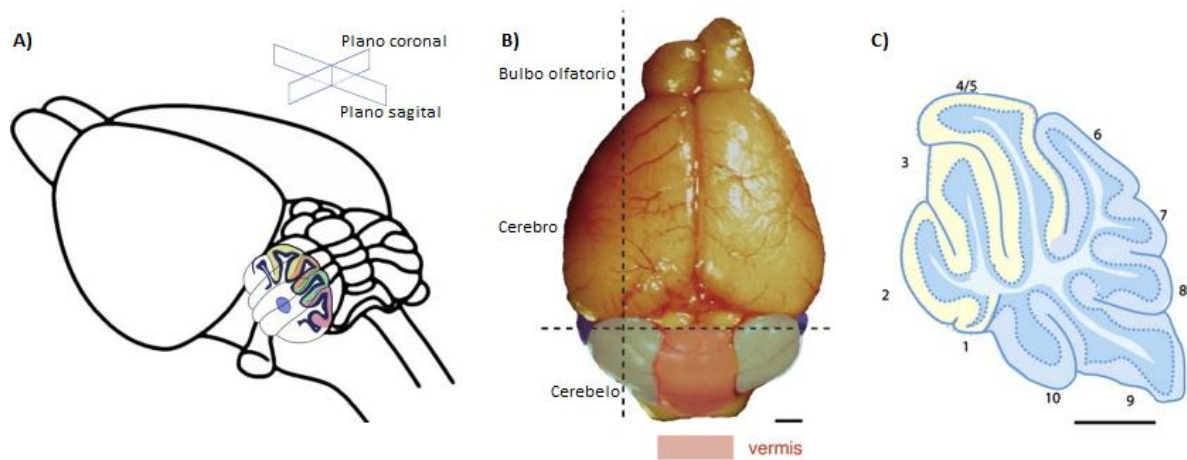


Figura 3 El cerebelo del ratón adulto. A) Esquema del cerebro, el cerebelo se ubica en la región dorsal del tallo cerebral, con un corte sagital en esta región se indica en colores las folias o lóbulos. B) Vista dorsal del cerebro, el cerebelo (posterior), en gris se indican sus hemisferios, en morado la parte del vestibular, y en rosa el vermis. C) Esquema de un corte sagital del cerebelo donde se distingue la subdivisión de los 10 lóbulos, donde el décimo forma parte del lóbulo floculonodular. La barra equivale a 1mm. Modificado de Courtemanche *et al.* 2013 y Sillitoe *et al.* 2012.

De acuerdo con la función que ejercen y con el orden de aparición filogenética, el cerebelo se divide en tres áreas: la región más primitiva que se presenta por primera vez en peces, es el arquicerebelo o vestibulocerebelo, dicha región comprende al lóbulo floculonodular (Figura 3 B y C) y recibe información visual y vestibular, por lo que participa en el balance, reflejos vestibulares y movimientos oculares. Posteriormente en la filogenia, aparece el paleocerebelo o espinocerebelo (Figura 3 B) que comprende al vermis y las regiones intermedias de los hemisferios, esta región recibe información somatosensorial y propioceptiva desde la médula espinal; el vermis en particular, recibe señales visuales, auditivas y vestibulares, así como somatosensoriales desde la cabeza y regiones proximales del cuerpo; mientras que las regiones adyacentes de los hemisferios reciben la información somatosensorial desde las extremidades. Por último, el

área de aparición más reciente en la filogenia es el neocerebelo o cerebrocerebelo (Figura 3 B), este se compone de las regiones laterales de los hemisferios, se encuentra más desarrollado en humanos y simios, en comparación con monos y gatos. Las vías de entrada a esta región provienen de la corteza cerebral. A los hemisferios laterales se les ha involucrado en la planificación y ejecución del movimiento y se les ha asociado también con ciertas funciones cognitivas como la memoria de trabajo (Sillitoe *et al.* 2012; Kandel *et al.* 2013).

2.3.1.1 Vasculatura del Cerebelo Murino

En la fosa craneal posterior existe una relación entre las arterias cerebelares y los nervios craneales, el tallo cerebral, los pedúnculos cerebelares, las fisuras entre el cerebelo y el tallo cerebral y las superficies cerebelares. De estas relaciones se pueden definir tres complejos neurovasculares: el relacionado con la arteria cerebelar superior (ACS); un complejo intermedio relacionado con la arteria cerebelar anteroinferior (ACAI); y un complejo inferior relacionado con la arteria cerebelar posteroinferior (ACPI). De estos complejos, son el ACAI y el ACPI los que se relacionan con el IV ventrículo.

2.3.2 Desarrollo del Cerebelo Murino

El inicio de la organización cerebelar ocurre temprano durante el desarrollo embrionario y precede a los procesos de neurogénesis y axogénesis. El primordio cerebelar emerge alrededor del día embrionario (E) 7-8 en el ratón. La formación de esta estructura comienza como un ensanchamiento del neuroepitelio del labio rostral del cuarto ventrículo, llamado rhombomera-1/r1 (Figura 4). En consecuencia, las terminales rostro-mediales del primordio bilateral, forman el vermis y la parte caudolateral se convierte en los hemisferios del cerebelo. El límite caudal del primordio cerebelar está definido por la placa del techo del cuarto ventrículo (Marzban *et al.* 2015).

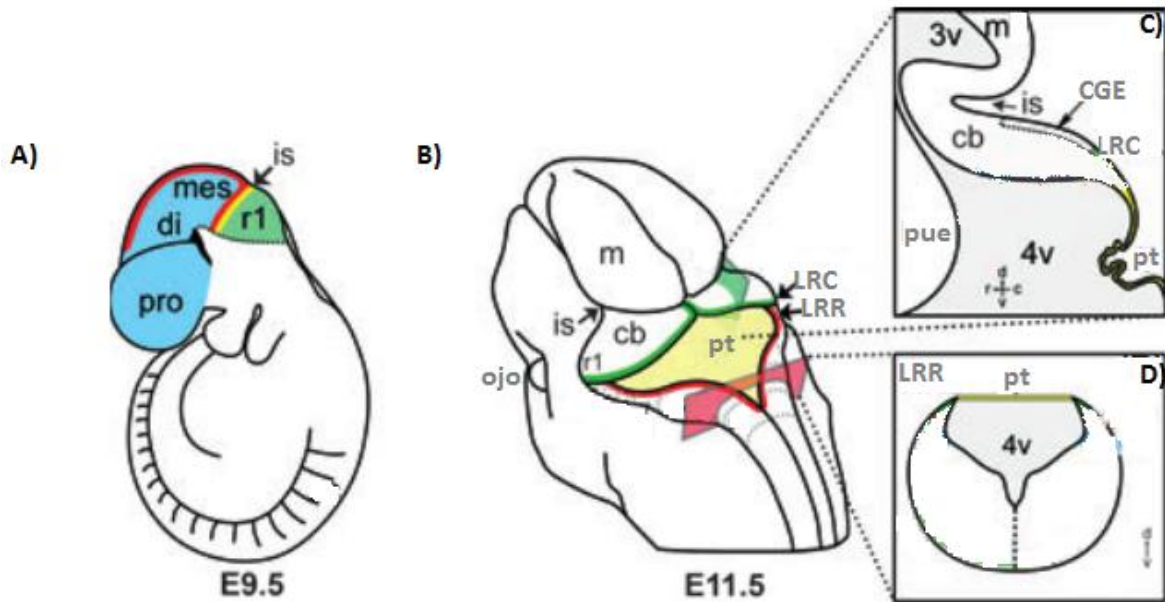


Figura 4 Desarrollo del cerebelo en ratón. A) Esquema que indica el estado del embrión en E9.5, se muestra el prosencéfalo (pro), el diencefalo (di), el mesencéfalo (mes), el istmo (is) y la rombómera 1 (r1). B) Esquema que ilustra la vista posterior del embrión de ratón en la etapa E11.5 se muestra al mesencéfalo (m), el istmo, el cerebelo (cb), el labio rómbico cerebelar (LRC) que se localiza en el borde caudal del cerebelo (delimitado por la línea verde), el labio rómbico del rombencéfalo (LRR) que se localiza en el borde del rombencéfalo (delimitado por la línea roja), y la placa del techo (pt) localizada entre el LRC y el LRR (en amarillo). C) Ilustración de una sección sagital del cb a lo largo de la placa verde mostrada en B). La zona ventricular se señala con gris claro y muestra al tercer (3v) y cuarto ventrículo (4v), además se muestra el cerebelo, la placa del techo, el LRC, el puente (pue), y las flechas indican el istmo y la capa granular externa (CGE) respectivamente. D) Esquema de un corte transversal del rombencéfalo a lo largo de la placa roja indicada en B), que muestra al LRR, el 4v y la placa del techo. Las flechas en las figuras C) y D) indican el plano dorsal-ventral (d-v) y rostral caudal (r-c). Modificado de Hashimoto e Hibi, 2012.

Las zonas germinales principales que forman el primordio son: el neuroepitelio de la pared del cuarto ventrículo y el labio rómbico, las zonas germinales secundarias incluyen la zona germinal externa (ZGE), la zona germinal rostral (ZGR), y el borde anterolateral de la placa cerebelar (Marzban *et al.* 2015).

2.3.2.1 Organización de la Corteza Cerebelar

Durante el desarrollo del cerebelo, las neuronas nacen en múltiples zonas germinales y migran a su destino utilizando vías migratorias radiales o tangenciales (Marzban *et al.* 2015). Finalmente quedan organizadas en dos capas,

la externa es la capa de materia gris y se denomina corteza cerebelar, y la capa interna es de materia blanca y es donde se encuentran los tres pares de núcleos profundos: el fastigial, el interpuesto y el dentado (Kandel *et al.* 2013).

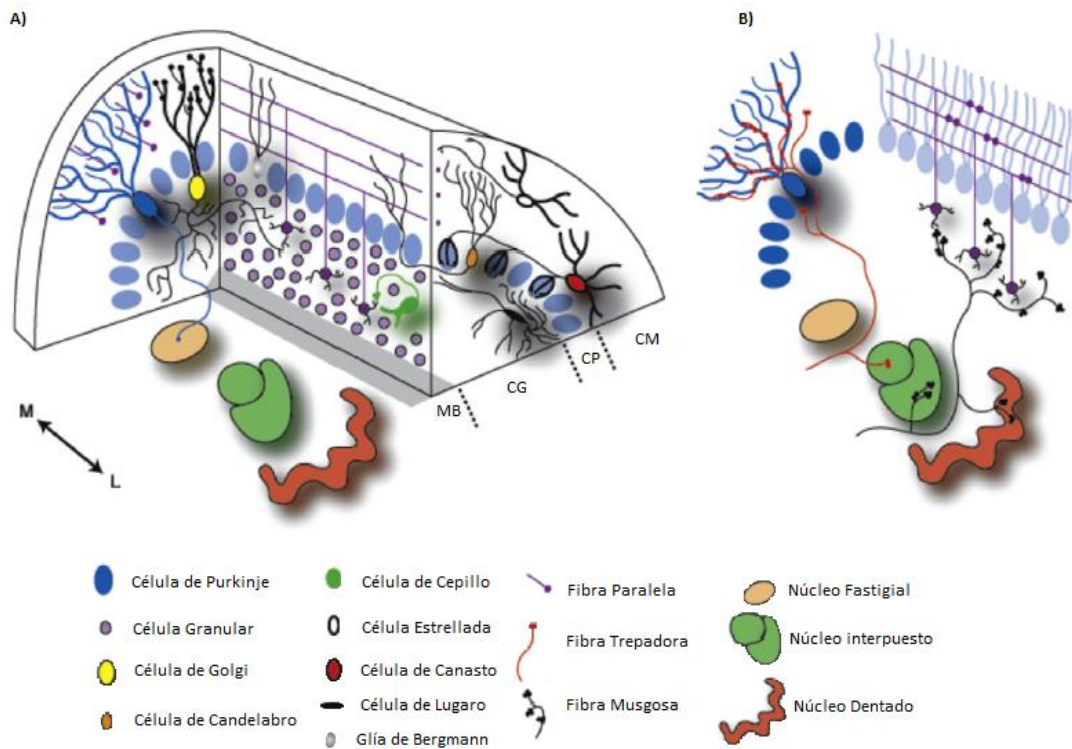


Figura 5 Organización de la corteza cerebelar. En estos esquemas se representan los principales tipos celulares y su organización en la corteza cerebelar. En A) están las distintas capas: Materia Blanca (MB), Capa Granular (CG), Capa de Purkinje (CP) y Capa Molecular (CM). En B) están esquematizadas las conexiones entre diferentes tipos celulares y los núcleos cerebelosos profundos. M indica la zona medial y L la zona lateral. Modificado de Sillitoe *et al.* 2012.

La materia gris o corteza cerebelar se conforma por tres capas, cada una de estas posee distintos tipos celulares y realiza diferentes funciones (Figura 5). La capa más profunda es la granular (CG) que contiene a las células granulares y en menor cantidad se encuentran las células de Golgi, las células de Lugaro, células de cepillo unipolares, y las células de candelabro. La capa media es la de Purkinje y está formada por los cuerpos celulares de estas neuronas, cuyas prolongaciones dendríticas se extienden hacia la capa molecular, en esta capa

también se encuentran los somas de la GB. La capa más externa es la capa molecular, que se conforma por una red que contiene abundantes procesos dendríticos y axonales, pero solo unos pocos cuerpos de células neuronales. Esta capa contiene a las fibras paralelas, que son los axones de las células granulares, también presenta los cuerpos y dendritas de dos tipos de interneuronas inhibitorias, a las células estrelladas y de canasta, así como a las extensas dendritas de las células de Purkinje (Figura 6; Kandel *et al.* 2013; Marzban *et al.* 2015; Pombano y Evans, 2012).

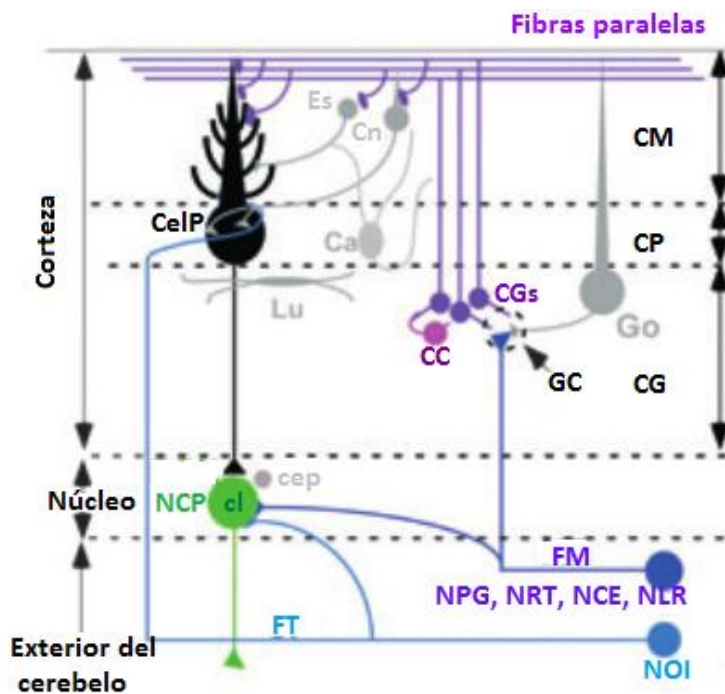


Figura 6 Estructura simplificada de los circuitos cerebelares del ratón. Representación esquemática de las neuronas cerebelares y los circuitos neurales en el ratón. Célula de canasto (Cn); célula de candelabro (Ca); fibra trepadora (FT); glomérulo cerebelar (GC); núcleo cerebelar profundo, NCP (cl, célula larga; cep, célula pequeña), núcleos cuneiformes externos (NCE); células granulares (CGs); capa granular (CG); células de Golgi (Go); núcleos de la oliva inferior (NOI); células de Lugaro (Lu); núcleos laterales reticulares (NLR); fibra musgosa (FM); capa molecular (CM); célula de Purkinje (CelP); núcleos pontinos grises (NPG); núcleo retículo tegmental (NRT); células estrelladas (Es); células de cepillo (CC). Las neuronas cerebelares reciben la señal excitatoria a partir del núcleo precerebelar fuera del cerebelo. Hay dos tipos de aferencias, las fibras trepadoras y las fibras musgosas. La información de las células trepadoras llega a las células de Purkinje mediante los axones de las células granulares. La información de las células trepadoras y las fibras musgosas es integrada por las células de Purkinje, la actividad de las células trepadoras suprime la transmisión sináptica proveniente de las fibras paralelas. Las células de Purkinje reciben estas señales simultáneamente. Modificado de Hashimoto e Hibi, 2012.

2.3.2.1.1 Neuronas de Purkinje

La corteza cerebelar está organizada en torno a las células de Purkinje (CP; ver Figura 5). Estas son neuronas cuyos somas miden entre 50 y 80 μm , y se ubican en una monocapa que sirve de interfaz entre la capa granular interna y la capa molecular, además poseen largos axones y árboles dendríticos con extensos procesos. Sus axones atraviesan la capa granular y se extienden hasta las neuronas del núcleo dentado, proveyendo la principal vía de salida en la corteza cerebelar. Las dendritas se extienden hasta la capa molecular orientándose hacia la superficie pial, sirven como una vía de entrada sináptica para las fibras paralelas de las células granulares (Pombano y Evans 2012; Sillitoe *et al.* 2012).

Tanto la conectividad, como el desarrollo del cerebelo dependen en gran medida de las CP (Sillitoe *et al.* 2012). Por ejemplo, se ha reportado que cuando se disminuye la población de CP hay una reducción en la población de células granulares, esto se debe a que en el desarrollo temprano las CP controlan la actividad mitótica de los neuroblastos granulares dentro de la capa granular externa (Goldowitz y Hamre, 1998). También, se sabe que estas son las neuronas inhibitorias del cerebelo y modulan la actividad de las neuronas de los núcleos del cerebelo mediante la liberación del neurotransmisor GABA (White *et al.* 2014).

Estas neuronas son la única vía de salida que tiene la corteza cerebelar, además, poseen la habilidad de computar eficientemente la información procedente de distintas fuentes y que converge en ellas. Por lo que no es de sorprender que sean determinantes para la correcta función y desarrollo del cerebelo, ya que cuando las CP son afectadas resultan distintas patologías, como la alteración en el aprendizaje motor, la ataxia, la distonía, la esclerosis tuberosa e incluso defectos cognitivos (White *et al.* 2014).

2.3.3 Glía en el Cerebelo

En el cerebelo, la complejidad anatómica y funcional se refleja en la variedad de los fenotipos neuronales que presenta, y en la heterogeneidad de sus células gliales. Ya que estas participan en procesos cruciales del desarrollo y contribuyen a regular la función del cerebelo maduro (Buffo y Rossi, 2013).

Inicialmente la glía del cerebelo se clasificó en tres categorías de acuerdo a su morfología y posición en el tejido cerebelar: 1) Las células gliales de la materia blanca que incluyen a los oligodendrocitos y se caracterizan por tener procesos orientados a lo largo de los tractos axonales, también hay glía NG2, astrocitos fibrosos y microglía 2) los astrocitos de la capa granular que poseen procesos en forma estrellada (estos son los astrocitos velados), 3) la glía NG2 también se distribuye en la capa molecular (Lin et al. 2009), además de las células neuroepiteliales con fibras de Bergmann, ahora conocidas simplemente como Glía de Bergmann (GB), que son los cuerpos celulares alineados con los somas de las neuronas de Purkinje y con procesos ascendentes que se distribuyen radialmente en la capa molecular, enviando sus pies terminales a contactar con la membrana basal subpial (Ramón y Cajal, 1893).

2.3.3.1 Glía de Bergmann

En 1857, Bergmann describió por primera vez la presencia de procesos radiales en el cerebelo del gato, el perro y el humano (Yamada, *et al.* 2002). Estos procesos corresponden a la GB, cuyas prolongaciones atraviesan la capa molecular y sus pies terminan en la superficie pial.

2.3.3.1.1 Glía de Bergmann en el desarrollo

En ratones, la GB surge en el día embrionario 15 (E15) y se origina en la ZV (Yamada *et al.* 2002). Las células de Purkinje y otros precursores corticales salen

de la ZV y migran a lo largo del sistema de fibras radiales gliales para establecer una placa de células neuronales inmaduras después del E13. La placa de CP inicia como una capa gruesa de muchas células y en el desarrollo se dispersa en una monocapa después del nacimiento del ratón (Marzban *et al.* 2015). Posteriormente, durante el desarrollo postnatal temprano, las células granulares del cerebelo (CGC) migran por las fibras de la GB hacia la capa granular interna (Sillitoe *et al.* 2012). Por lo anterior, los procesos de la GB tienen un papel complejo en la corticogénesis del cerebelo ya que no solo guían la direccionalidad de la migración celular, sino que, el desarrollo de sus pies terminales y su anclaje con la membrana basal en la superficie pial resulta un paso crítico. La disrupción de este proceso tiene como consecuencia que las folias se fusionen entre sí a lo largo de la superficie cortical, que las células granulares disminuyan su número y permanezcan ectópicamente localizadas a lo largo de las folias fusionadas y en la capa molecular (Sievers, *et al.* 1981), y que las células de Purkinje se preserven pero sin lograr su arreglo en monocapa (Buffo y Rossi, 2013).

Así, la maduración de la corteza cerebelar depende del desarrollo coordinado entre la GB y las CP. Las CGC migran a través de las fibras gliales desde la capa molecular (CM) y la capa de Purkinje, hasta la capa granular externa (CGe), para en su desarrollo postnatal llegar a su posición final en la capa granular interna (CGi), ya que después del día P20 la CGe deja de existir (Yamada *et al.* 2000; Pombano. y Evans 2012).

2.3.3.1.2 Importancia de la Glía de Bergmann

Las células de la GB establecen interacciones anatómicas y funcionales con las neuronas de la corteza cerebelar. En el cerebelo maduro, la GB permanece asociada con las CP (Sillitoe *et al.* 2012), sus prolongaciones son ejes rectos que poseen numerosos apéndices o abultamientos laterales que rodean desde los somas de las células de Purkinje, hasta sus sinapsis y dendritas (Yamada *et al.* 2000; Yamada y Watanabe, 2002).

En los murinos existen ocho células de GB por cada célula de Purkinje y, en particular en la rata, cada glía envuelve entre 2100 y 6300 sinapsis (Araque *et al.* 2001). Además, se ha demostrado que la formación de sinapsis y el mantenimiento de la capa molecular dependen de que la GB envuelva a las CP y a sus sinapsis, porque son los procesos de la GB los que permiten o no los contactos sinápticos entre neuronas (Riquelme *et al.* 2002).

En estudios con ratones transgénicos donde se indujo la ablación de la GB y células GFAP⁺, los animales presentaron defectos severos en las neuronas del cerebelo, así como en la coordinación motriz (Cui *et al.* 2001). Además, Saab y colaboradores (2012) reportaron que la eliminación selectiva de la expresión de receptores de Glutamato en la GB de ratones jóvenes disminuye las sinapsis de las CP con las fibras paralelas; mientras que en ratones adultos provoca la retracción de procesos gliales, así como el deterioro en el control motriz fino.

Entonces puede decirse que la GB tiene un papel importante tanto en el desarrollo, como en la comunicación, el funcionamiento y la sobrevivencia neuronal del cerebelo de los vertebrados (Sillitoe *et al.* 2012).

2.3.3.1.3 Glía de Bergmann y pía madre

Tradicionalmente se ha descrito que la GB extiende sus procesos desde la capa de Purkinje hasta la superficie cerebelar, donde sus pies terminales constituyen la glía limitante externa que interactúa íntimamente con los fibroblastos de la pía madre formando una lámina basal (Sotelo y Changeux, 1974, Landis y Reese, 1982; Owens *et al.* 2008; Liu *et al.* 2013).

En los análisis de microscopía electrónica se pueden observar las características particulares en los pies terminales de la GB superficial, estos tienen forma cónica, están unidos entre sí mediante uniones comunicantes, y poseen mitocondrias alargadas menos electrodensas que las mitocondrias neurales, presentan gránulos de glucógeno, conjuntos de gliofilamentos, y retículo

endoplásmico con formaciones espirales (ver Tabla 1; Sotelo y Changeux, 1974; Sievers, *et al.* 1981).

3. JUSTIFICACIÓN

En el techo del cuarto ventrículo existen diversos tipos celulares que incluyen neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Reyes-Haro *et al.* 2013). En esta misma región se encontró que los procesos de los pies terminales de la GB proyectan a distintas zonas, por lo que la GB se clasificó en tres subpoblaciones: 1) en contacto con la zona periventricular (células endodimales), 2) en contacto con la zona subventricular (vasos sanguíneos y cúmulo de células GFAP⁺/Nestina⁺), 3) y los que se extienden hacia la luz del ventrículo (Figura 7; Gómez, 2014).

Para determinar si existe alguna diferencia funcional entre las diferentes poblaciones que presenta la GB del techo del IV ventrículo, es importante caracterizar las interacciones que existen entre ésta y las células del techo del IV ventrículo.

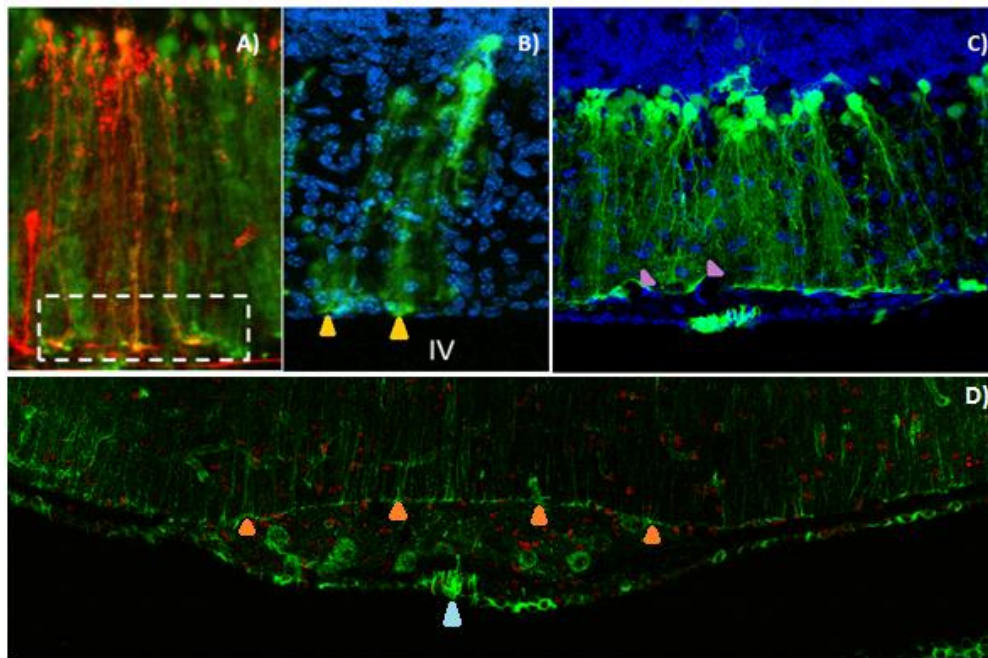


Figura 7 Pies de la Glía de Bergmann en el techo del IV ventrículo. La fotografía A) muestra a la GB, en el recuadro de línea punteada se muestra el ensanchamiento de los pies terminales de la GB en la zona sub ventricular. B) las cabezas de flecha amarillas señalan los pies de la GB que proyectan hacia la luz del cuarto ventrículo. C) las cabezas de flecha moradas indican los pies de la GB que contactan con los vasos sanguíneos. D) las flechas anaranjadas indican la interfaz que forman los pies de la GB con el nicho de neuronas y células Nestina⁺; la flecha azul señala un cúmulo de células GFAP⁺/Nestina⁺. Modificado de Gómez, 2014; González, 2016.

4. HIPÓTESIS

Los pies de las distintas poblaciones de GB en el techo del IV ventrículo, presentarán diferencias ultraestructurales de acuerdo con la región subependimaria que contacten.

5. OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar a la GB en el techo del IV ventrículo.

Objetivos Particulares:

- Corroborar la presencia de las tres poblaciones de la GB mediante microscopía electrónica de transmisión.
- Caracterizar por microscopía electrónica de transmisión los contactos entre la GB, y los diferentes tipos celulares en el techo del IV ventrículo.

6. MÉTODO

Selección de animales

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD-1 (n=3) con edad de 60 días postnatales (P₆₀), proporcionados por el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los animales tuvieron disposición de agua y alimento *ad libitum*, fueron alimentados con dieta estándar de laboratorio (LabDiet- 5001). Se mantuvieron en condiciones controladas de bioterio. Este protocolo fue aprobado por el comité de Bioética del Instituto de Neurobiología, el manejo de los animales se realizó conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y la guía para cuidado y uso de animales de laboratorio del NIH.

Análisis ultraestructural

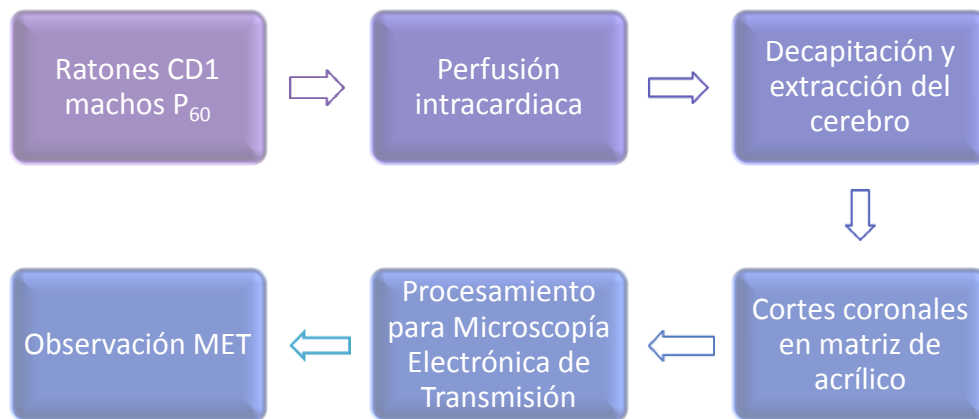
Los ratones fueron sedados con una dosis letal de pentobarbital sódico (90 mg/kg) para posteriormente sacrificarlos mediante perfusión intracardiaca en la que se utilizaron 50 ml de solución salina al 0.9% para limpiar la sangre y posteriormente 100 ml de PFA 2% + glutaraldehído 2.5% para fijar los tejidos. Los cerebros fueron extraídos y dejados 24 h en post-fijación.

Los cerebros fueron enjuagados con PBS 0.1 M y cortados coronalmente con una matriz de acrílico. Las rebanadas del cerebelo fueron recolectadas y bañadas con buffer de glutaraldehído al 3% + buffer de cacodilato 0.1 M, posteriormente fueron lavadas con buffer de cacodilato 0.2 M, después se cambió por osmio al 2%. Nuevamente se lavó con cacodilato 0.2 M. Las muestras fueron deshidratadas mediante lavados con un gradiente de alcoholes desde el 10% hasta llegar a alcohol absoluto, se lavaron con óxido de propileno y se infiltraron con resina epóxica.

Los cortes coronales fueron incluidos en plano, los cortes semifinos de 500 nm fueron teñidos con azul de toluidina para su visualización en microscopía de luz. Los cortes ultrafinos de 60-75 nm se contrastaron con uranilo, y

posteriormente fueron observados mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) con un microscopio JEOL (JEM-1010); las imágenes fueron obtenidas mediante una cámara digital (ORIOUS de Gatan) acoplada al microscopio electrónico.

Tabla 1 Secuencia del protocolo.



7. RESULTADOS

Diferentes zonas en el techo del IV ventrículo

En la figura 8 se observan las fotografías muestra de los cortes coronales de la región del lóbulo I (LI), en -6.12 mm respecto a Bregma. En las rebanadas teñidas con azul de toluidina se observa parte de la capa granular, la capa molecular y los plexos coroideos. Entre los plexos coroideos y la capa molecular está la monocapa de células endociliares que forman la zona periventricular (PV). Dorsal a la zona PV hay un conjunto de axones transversales, y en los extremos laterales del LI hay axones longitudinales formando la zona subventricular (SbV). Entre la zona subventricular y la capa molecular se presentan algunos vasos sanguíneos transversales.

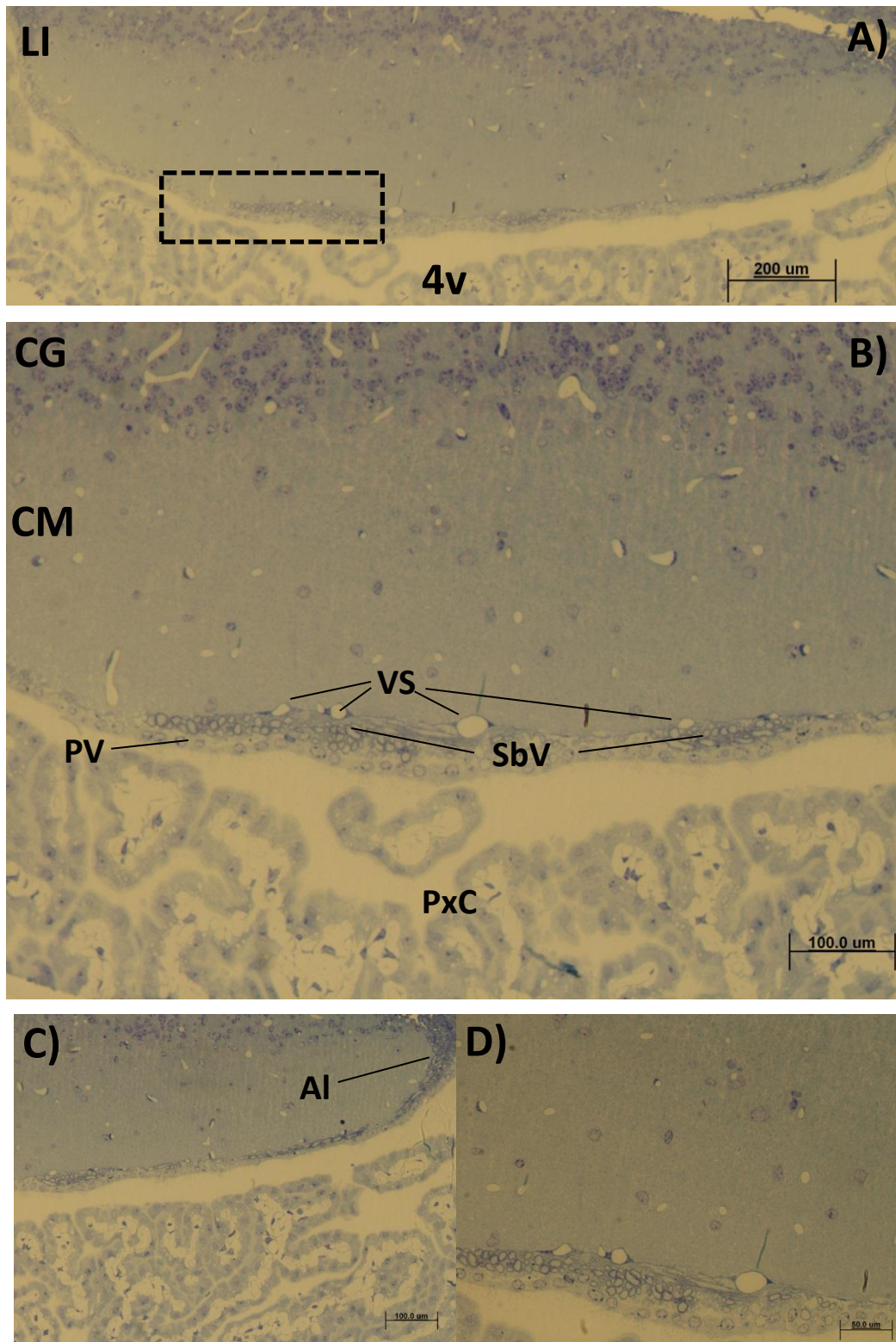


Figura 8 Techo del 4v. Tinción con azul de toluidina. A) Imagen panorámica del lóbulo I (LI). B) Acercamiento del recuadro en A), se indica la zona periventricular (PV), subventricular (SbV), los plexos coroideos (PxC), la capa molecular (CM), y la capa granular (CG). C) Acercamiento de región lateral del LI, se señala capa con axones longitudinales (Al). D) Zona analizada en MET (Figura 12-15), región delimitada en el recuadro en A).

Zona periventricular

En otra región del eje anteroposterior, en la zona lateral del IV ventrículo, inmediatamente sobre la luz, una monocapa de células ependimales aplanadas recubren el límite entre el IV ventrículo y el parénquima cerebeloso. Sus cilios (arreglo 9+2) y microvellosidades emanan de sus cuerpos basales, estas células forman la capa periventricular. Alrededor de 4 μm por encima de estas células se observa un conjunto de axones mielínicos y procesos de GB (Figura 9).

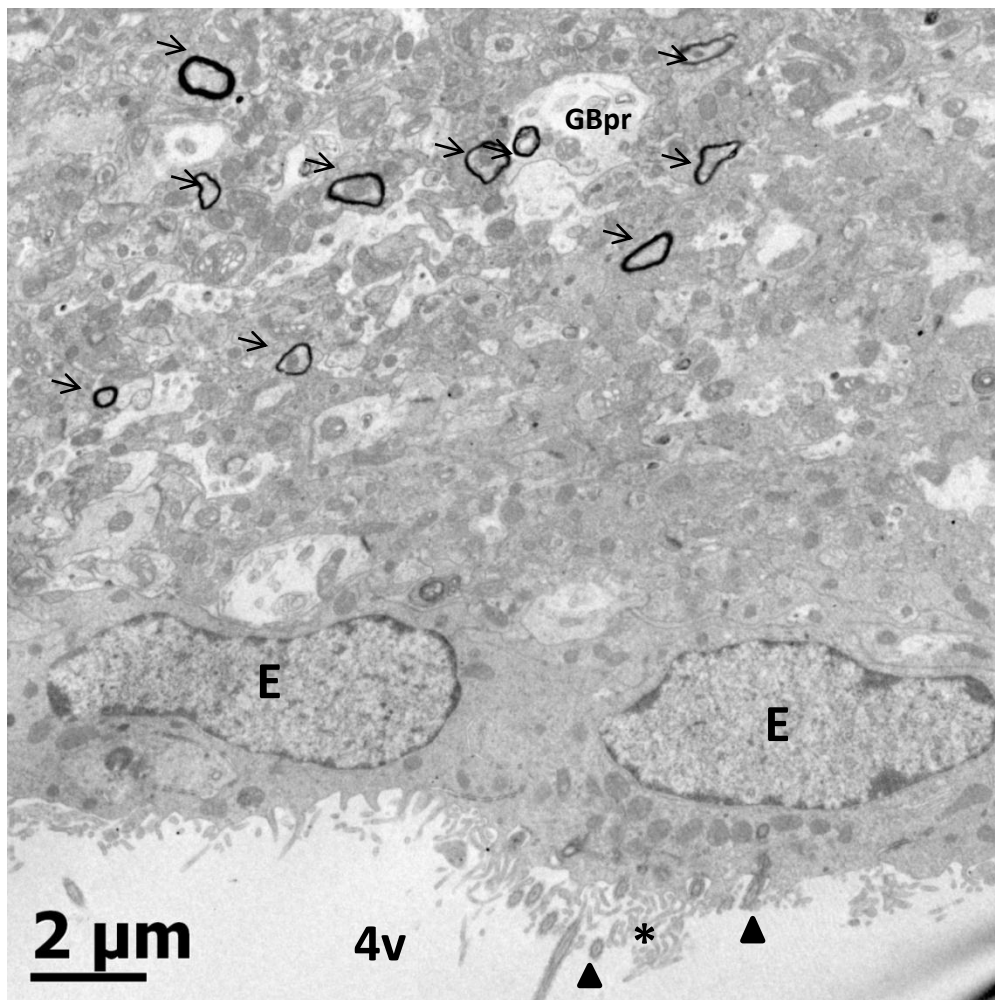


Figura 9 Fotomicrografía del techo del IV ventrículo (X 5,000). Se observan las células ependimales (E) y sus cilios (cabecitas de flecha) y microvellosidades (*), proyectando hacia la luz del IV ventrículo (4v) se aprecian axones mielínicos muy próximos al IV ventrículo (flechas) y procesos de la Glía de Bergmann (GBpr).

En esta zona, se muestra que los pies de GB se encuentran dorsales a las células endodimales (Figura 10), las características para identificar los pies de la GB están enlistadas en la Tabla 1, también se tomó en cuenta la distancia respecto a la luz del ventrículo.

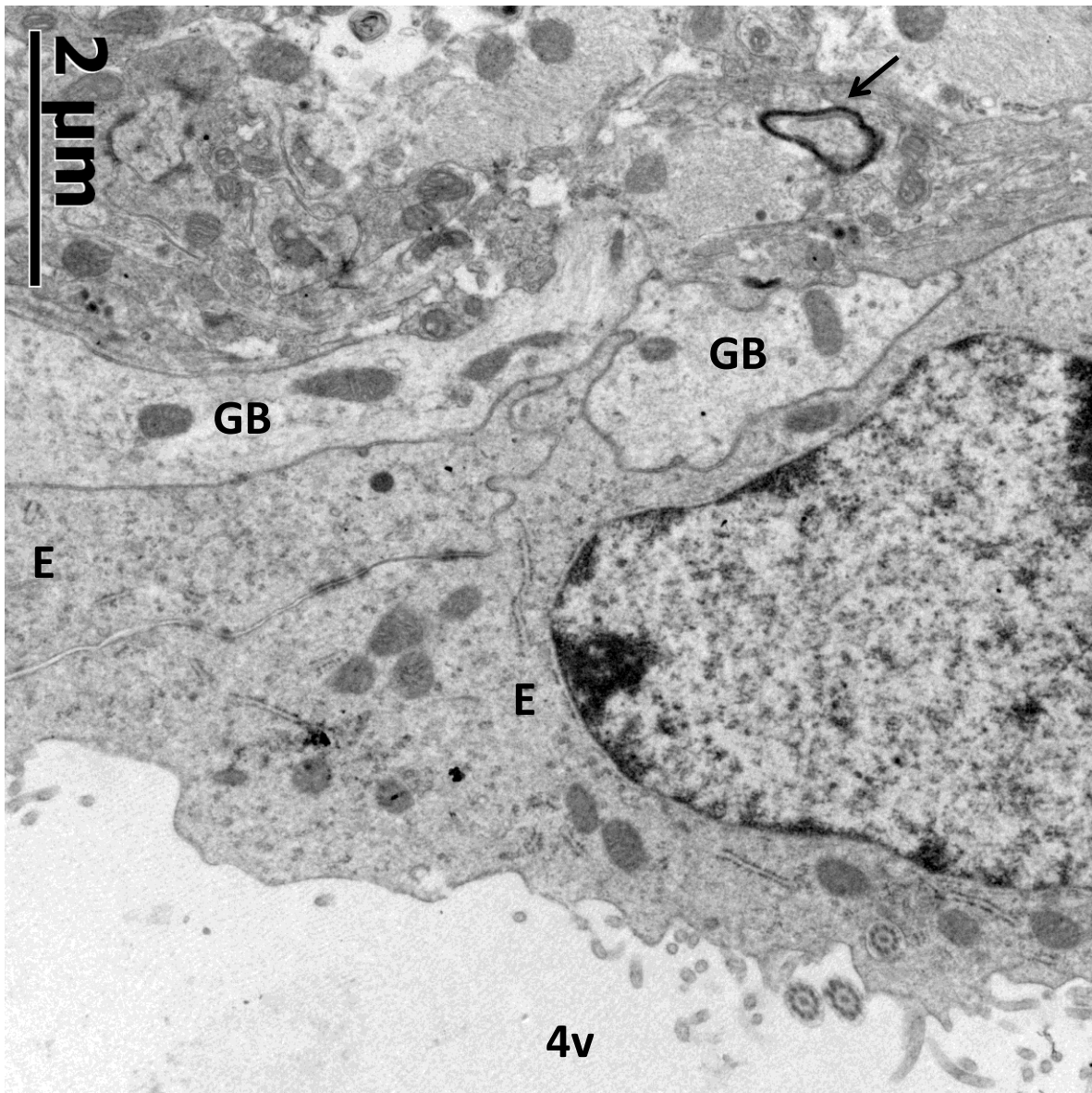


Figura 10 Célula endodimal, glía de Bergmann y axón mielínico (X 10,000). Se observan dos células endodimales (E), el núcleo y los cilios de una de ellas y, a la izquierda una porción del citoplasma de otra. Por encima de éstas están los pies de la glía de Bergmann (GB). Y muy próximo a ellos se encuentra un axón mielínico (flecha).

Con una mayor magnificación se observa que los pies de la GB están en contacto entre sí mediante uniones comunicantes, y con las células endodiales contactan mediante uniones estrechas. También presentan vesículas, filamentos intermedios y gránulos de glucógeno; organelos membranosos como mitocondrias, y retículo endoplásmico rugoso (RER). Además, próximos a ellos hay conjuntos de axones amielínicos transversales (Figura 11).

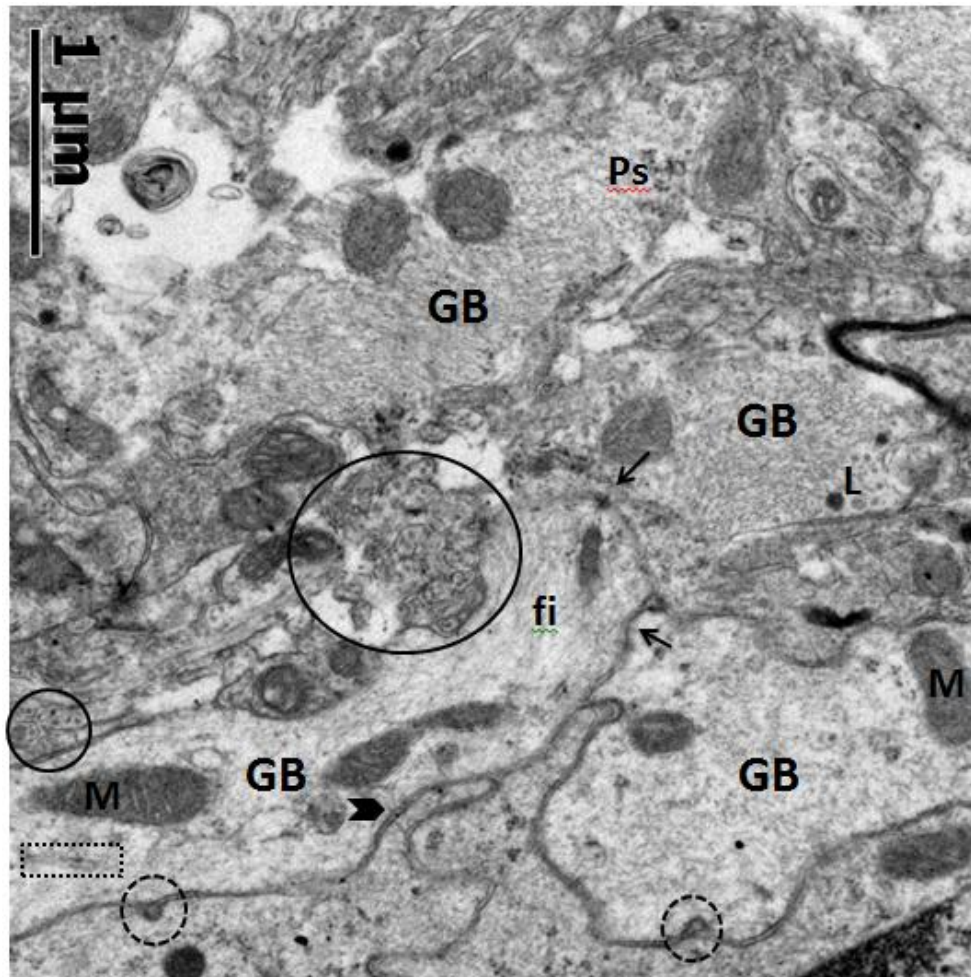


Figura 11 Contactos de la Glía de Bergmann (X 20,000). Se observan en secciones longitudinales y transversales los pies de la Glía de Bergmann (GB), mitocondrias (algunas marcadas, M), filamentos intermedios (fi), polisomas (Ps), lisosomas (L), retículo endoplásmico rugoso (rectángulo punteado). Encerrados en círculo se indican dos conjuntos de axones amielínicos en secciones transversales. Las flechas señalan uniones Gap y las cabezas de flecha señalan las uniones estrechas. Los círculos con línea punteada señalan vesículas en la membrana de la GB.

Zona subventricular

De la región indicada en la Figura 8 D, se observa que en el área central del techo del IV ventrículo, dorsales a la zona periventricular formada por las células endodiales, existen diversas estructuras y tipos celulares (Figura 12). Esta diversidad celular constituye la zona subventricular, que está separada de la capa molecular por un conjunto de células electro opacas (Figura 12,13 A, 14 y 15), que constituyen una interfase entre ambas regiones en el lóbulo I.

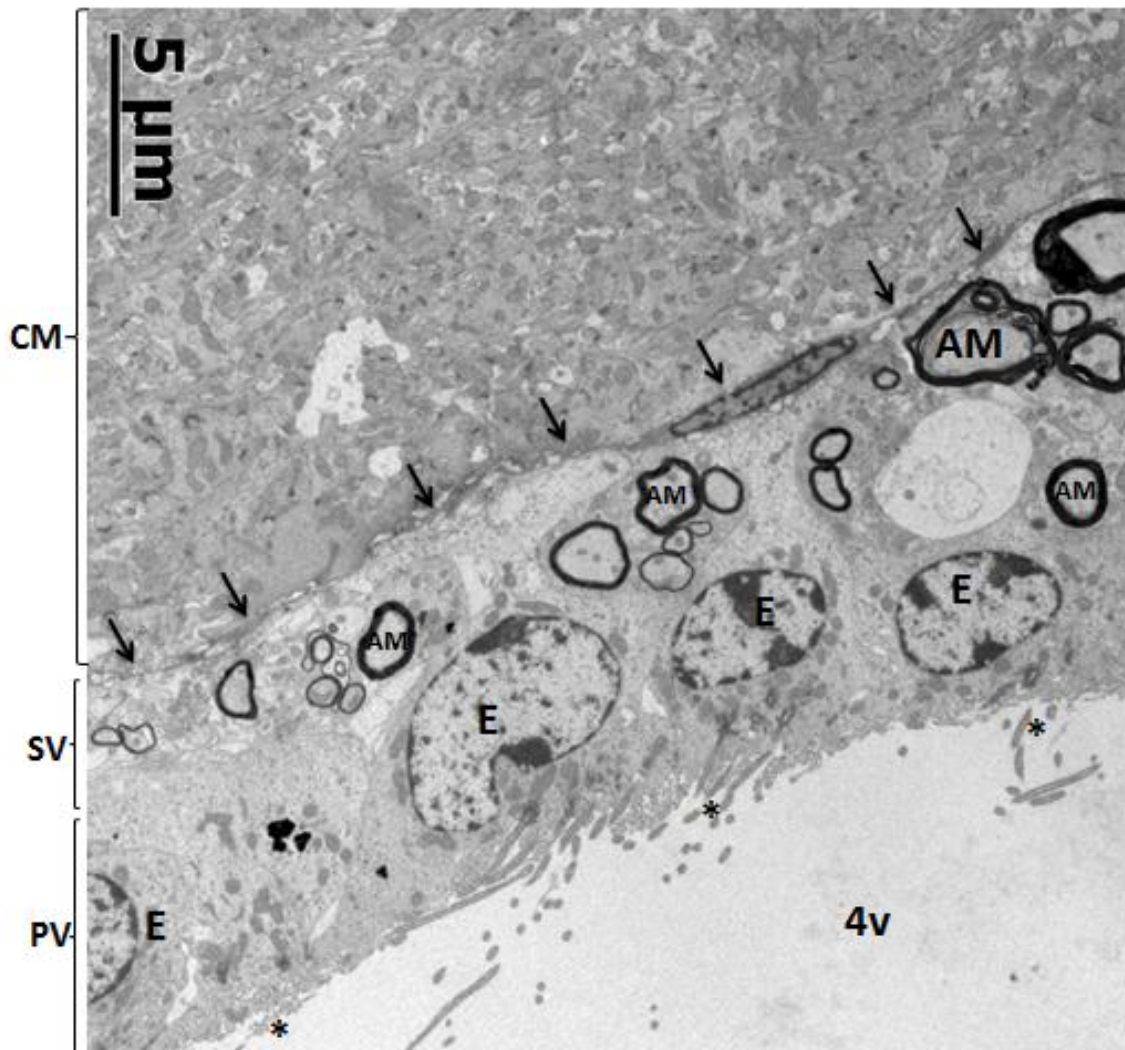


Figura 12 Zona de axones mielínicos (X 3,000). Monocapa de células endodiales (E) con sus cilios y microvellosidades (*). En la región subventricular (SV) hay una capa de axones mielínicos (AM) y otros tipos celulares. Delimitación de células electro opacas (flechas) separa la capa molecular (CM) en el parénquima cerebeloso de la zona SV.

En esta zona se encontró el núcleo de una célula electro opaca limitando con un vaso sanguíneo y con un pie de la GB del lado del parénquima cerebeloso. En la región subventricular se observó diversidad en estructuras celulares, entre ellos, axones mielínicos, axones amielínicos, y sinapsis. Además se encontraron cuerpos de neuronas, citoplasma de astrocitos y a las células ependimales formando la capa periventricular (Figura 13 A).

Al observar la región subventricular con mayor magnificación se distingue una sinapsis asimétrica o sinapsis tipo I, que ultraestructuralmente se caracteriza por presentar vesículas esféricas, y una densidad postsináptica y hendidura sináptica evidente (Figura 13 B), este tipo de sinapsis son frecuentemente excitadoras.

En esta zona hay una cantidad considerable de axones, tanto amielínicos, como mielínicos, y hay diversidad en el calibre de estos. Los astrocitos en esta zona también son abundantes (Figura 13 C).

En la Figura 14 se observa a mayor magnificación el núcleo aplanado de una célula electro opaca que separa ambas zonas (capa molecular y zona subventricular) en el techo del cuarto ventrículo. Del lado inmerso en el parénquima cerebeloso se observa una estructura electro lúcida, presumiblemente un pie de GB. En la capa molecular se observan algunas sinapsis.

El arreglo de la interfase constituida por las células electro opacas, consiste en que el citoplasma de dichas células se adelgaza hasta alcanzar el citoplasma de la célula siguiente, los núcleos de estas células frecuentemente se encuentran asociados a vasos sanguíneos, sin embargo, se llegan a encontrar núcleos electro-opacos en el trayecto entre un vaso y otro. Por lo tanto, estas células pueden clasificarse en dos tipos; 1) las de núcleos cercanos a vasos sanguíneos, y 2) las de núcleos no asociados a vasos sanguíneos.

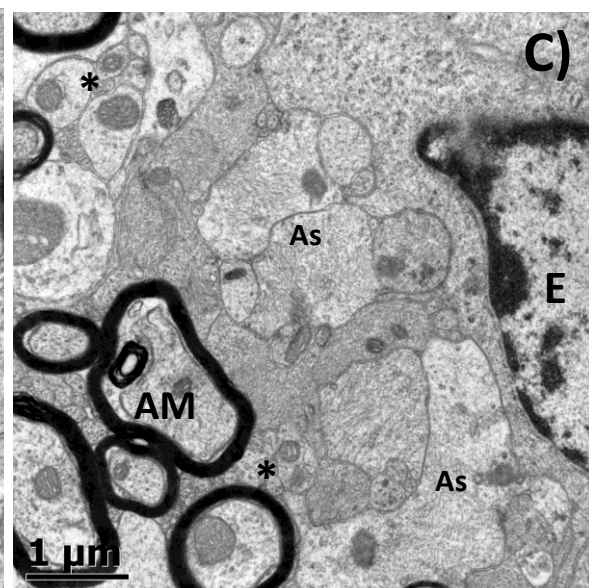
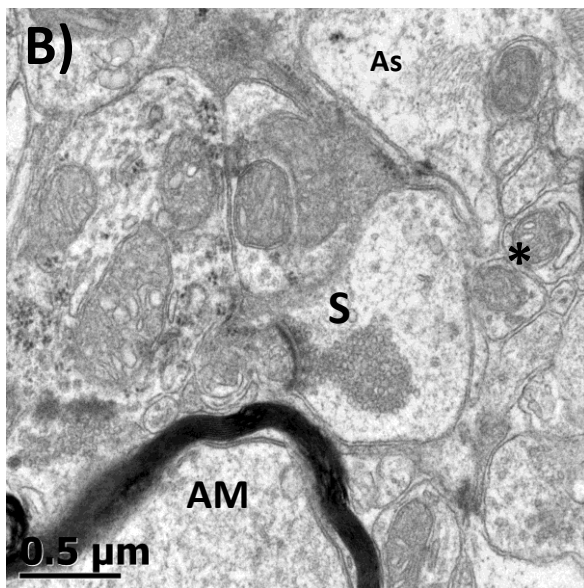
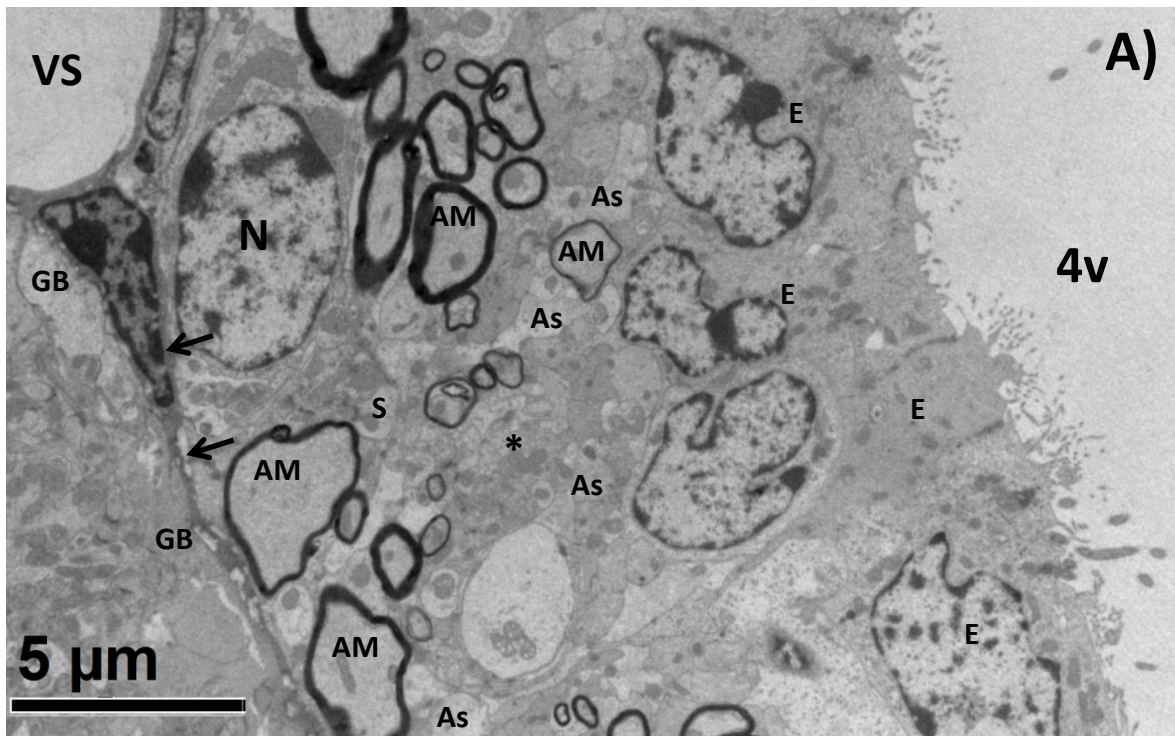


Figura 13 Heterogeneidad celular en el techo del 4v. A) célula electro-opaca con núcleo triangular aplanado (flechas), del lado izquierdo, en contacto con ella, hay un pie de Glía de Bergmann (GB), por encima de ambas está la luz de un vaso sanguíneo. Del lado derecho de la fotomicrografía, pasando la delimitación electro-opaca, están los axones mielínicos (AM), los axones amielínicos (*), las sinapsis (S), neuronas (N), y astrocitos, algunos marcados (As). En el extremo derecho de la imagen están las células ependimales (E) en contacto con el 4v (fotomicrografía X 3,000). B) axón mielínico, axones amielínicos (*), sinapsis y astrocitos (fotomicrografía X 30,000). C) abundancia de axones mielínicos de distintos calibres, axones amielínicos, y astrocitos (fotomicrografía X 15,000).

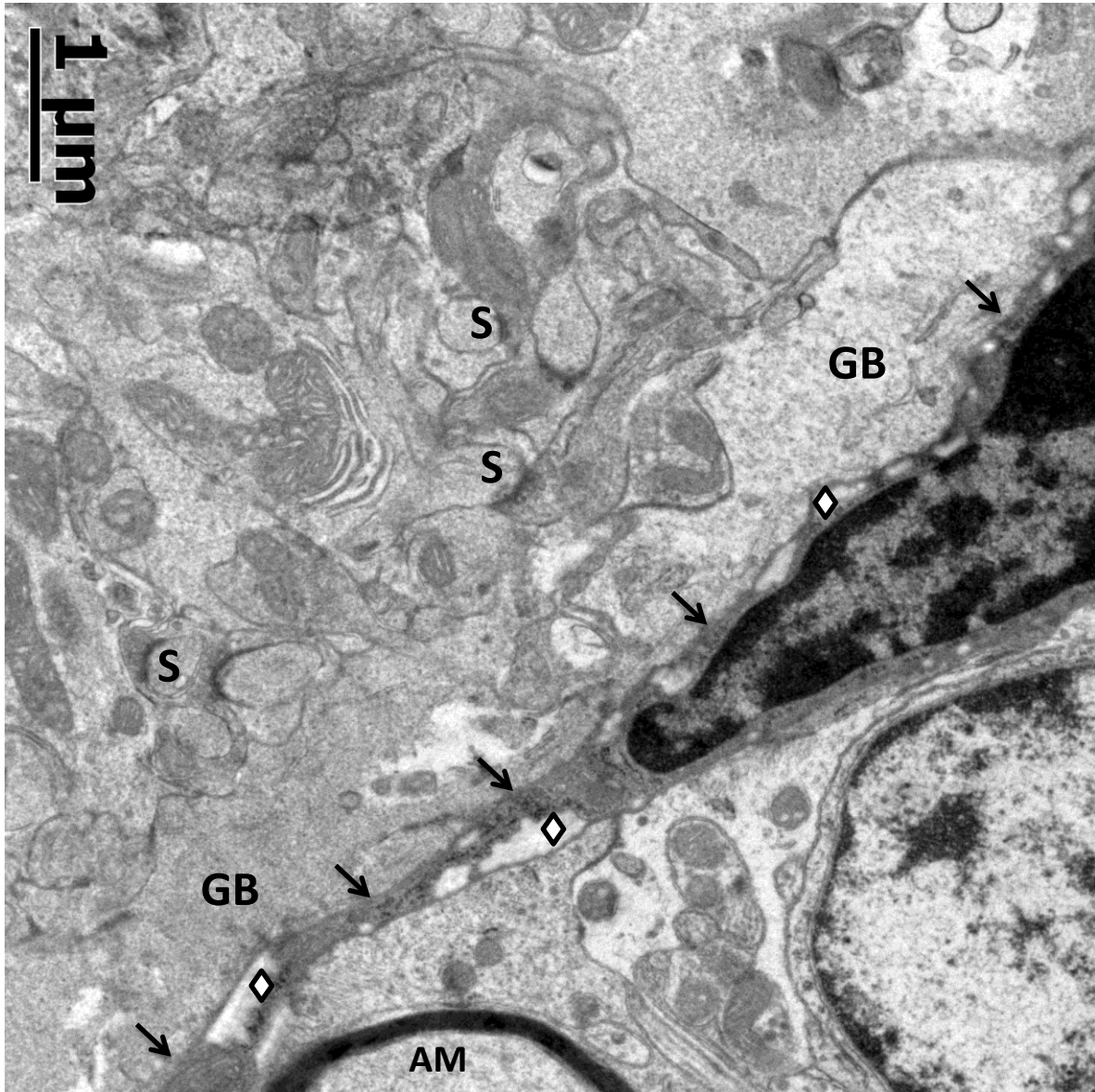


Figura 14 Células electro opacas separan la zona subventricular de la capa molecular (X 12,000). Núcleo aplanado y citoplasma electro-opaco (flechas), las masas de desechos granulares, algunas están indicadas (◊). Del lado izquierdo de la división se encuentra un pie de Glía de Bergmann (GB) y múltiples sinapsis, algunas indicadas (S). Por debajo de la división se aprecia un fragmento de axón miélinico (AM).

Los pies de la GB se extienden longitudinalmente, limitando con las células electro-opacas (Figura 11, 12 y 13 A). En las zonas donde hay vasos sanguíneos, los pies contactan con estas células pero no las envuelven.

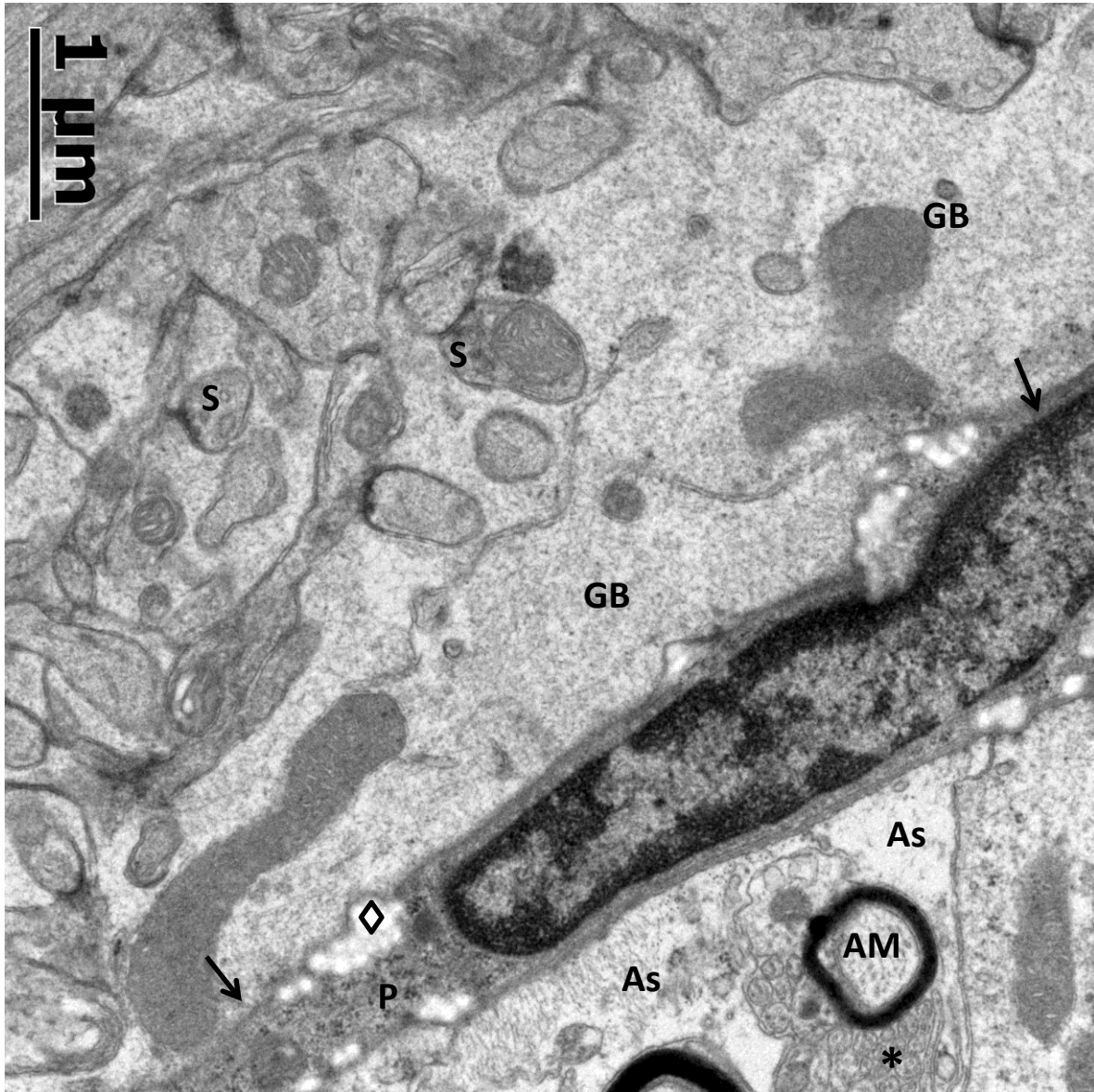


Figura 15 Pies de Glía de Bergmann y célula electro opaca (X 15,000). Célula electro-opaca (flechas) con núcleo aplanado, presenta polisomas (P), además presenta una masa de desechos granulares (◊). Del lado izquierdo de la división se encuentra un pie de Glía de Bergmann (GB) y múltiples sinapsis (S). Por debajo de la división se aprecia un fragmento de axón mielinico (AM), axones amielínicos cortados transversalmente (*) y citoplasma de astrocitos (As).

Los pies de la GB en el techo del IV ventrículo presentan características que los vuelve más complejos y los diferencia de los pies que proyectan hacia la pía madre. Estas características se mencionan a continuación, y están resumidas en la Tabla 1 donde se comparan con las características de los pies de GB que terminan en la pía.

Tanto en la zona periventricular como en la subventricular, se observa que los pies no forman lámina basal, presentan una cantidad considerable de polisomas, filamentos intermedios y los gránulos de glucógeno son más abundantes. Poseen organelos membranosos como lisosomas, retículo endoplásmico, y mayor cantidad de mitocondrias, aunque no son tan abundantes como en las células nerviosas. El citoplasma de los pies terminales en esta región es más electro-opaco que el citoplasma de los pies de GB que proyectan hacia la pía, y pueden distinguirse dos tonalidades electro-opacas (una más tenue que otra, sin llegar a ser electro-lúcidas).

Una característica observada únicamente en la zona periventricular, es que los pies de GB están en contacto directo con las células ependimales y entre ambos tipos celulares hay vesículas.

Tabla 2 Características ultraestructurales de los Pies de la Glía de Bergmann del ratón.

<p>Pies de la Glía de Bergmann que terminan hacia la Pía</p>	<p>Pies de la Glía de Bergmann que terminan en el techo del 4v</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Membranas espiraladas (polisomas). • Mitocondrias alargadas y menos electro-opacas que las mitocondrias neurales. • Forman lámina basal en la superficie pial. <p>(Sotelo y Changeux, 1974)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Citoplasma más electro-opaco. • Mayor cantidad de mitocondrias, pero no abundantes. • Retículo Endoplásmico. • Polisomas libres. • Gránulos de glucógeno muy abundantes. • Filamentos intermedios. • Uniones Gap. • Contactan con distintos tipos celulares: células electro-opacas, y células ependimales. • No forman lámina basal. • Forman sinapsis tripartita.
<ul style="list-style-type: none"> • Pies ligados unos con otros mediante uniones gap. • Hemidesmosomas en la cara pía-aracnoides. • Forman lámina basal en la superficie pial. <p>(Sievers <i>et al.</i> 1981)</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • Contienen más filamentos. • Citoplasma más electro-lúcido. • Uniones Gap. <p>(Landis y Reese, 1982)</p>	

8. DISCUSIÓN

Previamente se reportó que en el techo del IV ventrículo existen perfiles electrofisiológicos que corresponden a neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Reyes-Haro *et al.* 2013), en este estudio se corrobora, mediante imágenes de microscopía electrónica de transmisión, que en el techo del IV ventrículo hay una amplia variedad de estructuras que corresponden a los axones, tanto mielínicos (Figura 9, 10, 12 y 13) como amielínicos (Figura 11 y 15), procesos de astrocitos (Figura 13, 14, y 15) y cuerpos de neuronas (Figura 13).

Los pies de Glía de Bergmann en la región del IV ventrículo (GB_{IV}) se diferencian de los de la GB que proyecta hacia la pía madre (GB_P) por la aparente cantidad de organelos presentes. El aumento en el número de mitocondrias, y gránulos de glucógeno en la GB_{IV} , sugieren que hay mayor actividad metabólica. El glucógeno es un polisacárido que provee de energía, ya que almacena subunidades de glucosa. Se localiza casi exclusivamente en los astrocitos, por lo que en estas células hay un procesamiento metabólico activo, de hecho, los astrocitos procesan la glucosa para transformarla en lactato, lo que posteriormente sirve como sustrato metabólico para las neuronas. Así, los gránulos de glucógeno encontrados en los pies terminales de la GB_{IV} , son prueba de que en esta zona hay alta demanda energética.

Por otra parte, la presencia de RE y polisomas libres indican actividad traduccional. En el RE se sintetizan lípidos, y para que las mitocondrias mantengan la integridad de sus membranas, requieren del recambio constante y coordinado de éstos (Marchi *et al.* 2014), por lo que es probable que en la GB_{IV} haya transporte de fosfolípidos entre mitocondrias y RE. Además, se sabe que las mitocondrias participan en el mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, y el RE es un reservorio de Ca^{2+} , por lo que podría estar suministrando el Ca^{2+} intracelular. Los niveles de Ca^{2+} intracelular son importantes para la señalización de Ca^{2+} en astrocitos, como la propagación de las ondas de Ca^{2+} , y la gliotransmisión. Así, se sugiere que los pies terminales de la GB_{IV} podrían tener una función similar a la de los microdominios, es decir, compartimentos

subcelulares independientes, capaces de responder con autonomía mediante el incremento de las concentraciones de Ca^{2+} cuando son estimulados (Grosche *et al.* 1999). Para probarlo es conveniente realizar un estudio de MET con cortes seriados, para discernir primero si las mitocondrias y el RE en los procesos de la GB_{IVV} , están contactando directamente. Por otra parte, se deben hacer estudios de imagen de calcio para identificar si el comportamiento de los pies terminales de la GB_{IVV} que contactan con las células ependimales (Figura 10 y 11) y con las células de citoplasma electro opaco (Figura 13 A, 14 y 15), es similar al de los microdominios gliales ubicados en los apéndices de la GB que interactúan con las neuronas de Purkinje o las fibras paralelas (Grosche *et al.* 1999).

Se sabe que los filamentos intermedios (FI) están compuestos por diferentes proteínas de acuerdo al tipo celular, a la función de la célula o al estado de desarrollo (Eliasson *et al.* 1999). Cuando los FI están implicados en patologías del SNC, como el trauma, la isquemia y la neurodegeneración, presentan cambios en la morfología y en la expresión de los genes que, en astrocitos codifican para las proteínas: ácido fibrilar glial (GFAP), vimentina y nestina; las dos últimas se expresan también en astrocitos inmaduros, por tanto, es normal que en etapas tempranas del desarrollo sean muy abundantes (Pekny y Pekna, 2004). En el caso concreto de la GB, los FI presentes en roedores en estado adulto son los de GFAP, ya que los animales utilizados para este proyecto no fueron sometidos a ningún tratamiento, como isquemia o lesiones mecánicas, los FI visibles en esta región (Figura 11) deben corresponder a los de tipo GFAP.

Es probable que por la diversidad celular del techo del IV ventrículo el microambiente de esta zona sea más dinámico que aquel de la pía madre. En consecuencia, la cantidad de organelos presentes en las poblaciones de GB_{IVV} es mayor y más diversa que la reportada para la GB_{P} , ya que la diversidad de los astrocitos está relacionada con el ambiente que los rodea.

Las características ultraestructurales de estas células electro-opacas sugieren que puede tratarse de alguno de dos tipos celulares, microglía o pericitos. Las características sugieren que se trata de microglía son que estas

células presentan núcleos aplanados, elípticos y algo triangulares, y en MET pueden identificarse por presentar aglomeraciones densas de cromatina en el núcleo, un citoplasma denso, procesos con pocos microtúbulos, un aparato de Golgi (G) bien desarrollado, y un Retículo Endoplásmico Rugoso (RER) que consiste de cisternas estrechas y alargadas que siguen un sinuoso camino en el citoplasma, además presentan masas de desechos granulares. A diferencia de los astrocitos, estas células no tienen gránulos de glucógeno ni paquetes de filamentos. Además, se ha descrito que la microglía se establece en lugares cercanos a la pía madre, la tela coroidea y los plexos coroideos, para posteriormente migrar al interior del parénquima del SNC (Pannese, 1994). En este caso, las células electro opacas presentan varias características de microglía, en particular, su ubicación cercana a la luz del IV ventrículo, la forma del núcleo, la electro opacidad, presencia de RER arreglado en estrechas y cisternas alargadas, la posible presencia de lisosomas, y la ausencia de glucógeno y filamentos intermedios. Por otra parte, los núcleos de células electro-opacas asociadas a los vasos, sugieren que se trata de pericitos, ya que son estas células las que están típicamente relacionadas con los vasos sanguíneos. Además, la microglía presenta una distribución de organelos restringida a la zona central de las células, sin llegar a la periferia (Larriva-Sahd, comunicación personal).

A pesar de que la MET es una técnica capaz de evidenciar las estructuras y sucesos presentes en un tiempo dado dentro de una célula, no es posible aseverar que lo que se describe en una fotomicrografía, corresponda con lo que ocurre realmente en la célula o el ambiente celular. Por esto, la MET debe realizarse preferentemente con imágenes seriadas que permitan obtener la reconstrucción digital del organelo, la célula, e incluso de la zona ya estudiada. Además es recomendable complementarla con otras técnicas que den certeza de que las propiedades electrofisiológicas, inmunohistoquímicas, moleculares, etc. De las estructuras presentes, correspondan con la identidad de los organelos y tipos celulares señalados en este trabajo.

9. CONCLUSIONES

Utilizando la técnica de MET, se observaron dos de las tres poblaciones sugeridas previamente para clasificar a la Glía de Bergmann del techo del IV ventrículo en relación con las estructuras que contactan sus pies terminales:

- La población de la GB cuyos pies terminan en la región periventricular contactan tanto con capilares, como con una región subventricular delimitada por un conjunto de células electro-opacas. De esta población, se destaca que los pies de la GB no se encuentran en contacto directo con la diversidad celular ubicada en la región subependimal del techo del IV ventrículo, por debajo de la división electro-opaca.
- La población de la GB con los pies que establecen contacto con la región periventricular compuesta por las células ependimales.
- De la población que sugiere que los pies de la GB llegan a la luz del ventrículo, no se encontraron evidencias.

Ultraestructuralmente, los pies y procesos de la GB cercanos al IV ventrículo presentan mayor cantidad de organelos, en contraste con lo reportado para los pies de GB que proyectan hacia la pía lo que sugiere que la GB de esta zona tiene mayor actividad metabólica y traduccional.

La evidencia de las dos subpoblaciones de la GB, sugiere que este tipo de glía es capaz de especializar sus funciones en relación con el microambiente en el que se desenvuelve, de tal manera que, dichos grupos difieren de acuerdo a su ubicación en el parénquima cerebeloso y las estructuras con las que contactan sus pies terminales. Por esto, es importante realizar nuevos experimentos que arrojen más evidencias y sustenten una nueva clasificación.

10. REFERENCIAS

- Araque A, Carmignoto G y Haydon PG. 2001. Dynamic Signaling Between Astrocytes and Neurons. *Annu. Rev. Physiol.* 63: 795-813.
- Bedussi B., Van Lier MGJTB, de Vos J., Siebes M., VanBavel E. y Bakker E.N.T.P. 2015. Clearance from the mouse brain by convection of the interstitial fluid towards the ventricular system. *Fluids Barriers CNS.* 12(23):1-13.
- Buffo A. y Rossi F. 2013. Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Progress in Neurobiology.* 109:42-63.
- Courtemanche R, Robinson JC y Aponte D. 2013. Linking oscillations in cerebellar circuits. *Frontiers in Neural Circuits.* 7:1-16.
- Cui W, Allen ND, Skynner M, Gusterson B y Clark AJ. 2001. Inducible Ablation of Astrocytes Shows That These Cells Are Required for Neuronal Survival in the Adult Brain. *Glia.* 34: 272-282.
- Eliasson C, Sahlgren C, Berthold C-H, Stakeberg J, Celis JE, Betsholtz C, Eriksson JE y Penky M. 1999. Intermediate Filament Protein Partnership in Astrocytes. *The Journal of Biological Chemistry.* 274: 23996-24006.
- Engelhardt S, Patkar S y Ogunshola OO. 2014. Cell-specific blood-brain barrier regulation in health and disease: a focus on hypoxia. *British Journal of Pharmacology.* 171: 1210-1230.
- Goldowitz D y Hamre K. 1998. The cells and molecules that make a cerebellum. *Trends Neurosci.* 21(9): 375-382.
- Gómez González Gabriela Berenice 2014. Caracterización morfológica de la Glía de Bergmann del lóbulo X del Cerebelo de Ratón. Tesis de Maestría. Instituto de Neurobiología, UNAM.

- Grosche J, Matyash V, Möller T, Verkhratsky A, Reichenbach A y Kettenmann H. 1999. Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nature Neuroscience*. 2(2): 139-143.
- Grosche J, Kettenmann H y Reichenbach A. 2002. Bergmann Glial Cells Form Distinct Morphological Structure to Interact With Cerebellar Neurons. *Journal of Neuroscience Research*. 68:138-149.
- Haseloff RF, Blasig IE y Bauer H. 2005. In Search of the Astrocytic Factor(s) Modulating Blood-Brain Barrier Functions in Brain Capillary Endothelial Cells In Vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 25(1): 25-39. DOI: 10.1007/s10571-004-1375-x
- Hashimoto M e Hibi M. 2012. Development and evolution of cerebellar neural circuits. *Dev Growth Differ*. 54(3): 373-89.
- Hermann A, Suess Ch, Mareike F, Kanzler S, Witt M, Fabel K, Schwarz J, Höglinger GU y Storch A. 2009. Rostro-Caudal Gradual Loss of Cellular Diversity Within the Periventricular Regions of the Ventricular System. *Stem Cells* 27:928-941.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum AS y Hudspeth AJ. 2013. *Principles of Neural Science*. 5th ed. McGraw- Hill. pp.: 8, 71- 97, 962-966.
- Kettenmann H, Ransom BR. 2013 *Neuroglia*. 3th ed. Oxford University Press. pp.: 35-47.
- Landis, DMD., y Reese, TS. 1982. Regional organization of astrocytic membranes in cerebellar cortex. *Neuroscience*, 7(4), 937–950.
- Lin Y, Chen L, Lin Ch, Luo Y, Tsai RYL y Wang F. 2009. Neuron-derived FGF9 is Essential for Scaffold Formation of Bergmann Radial Fibers and Migration of Granule Neurons in the Cerebellum. *Dev. Biol*. 329 (1): 44-54.

- Liu X., Zhang Z., Guo W., Burnstock G., He Ch. Y Xiang Z. 2013 The superficial Glia Limitans of Mouse and Monkey Brain and Spinal Cord. *The Anatomical Record*. 296:995- 1007.
- Lowery LA y Sive H. 2009. Totally Tubular: The Mystery behind Function and Origin of the Brain Ventricular System. *Bioessays*. 31(4): 446- 458. Doi:10.1002/bies.200800207
- MacVicar BA y Newman EA. 2015. Astrocyte Regulation of Blood Flow in the Brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 7: 1-14 Doi: 10.1101/cshperspect.a020388
- Marchi S, Paternani S y Pinton P. 2014. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: One touch, multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1837: 461- 469.
- Marzban H, Del Bigio MR, Alizadeh J, Ghavami S, Zachariah RM y Rastegar M. 2015. Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front. Cell. Neurosci*. 8:450. Doi: 10.3389/fncel.2014.00450
- Owens T, Bechmann I y Engelhardt B. 2008. Perivascular Spaces and the Two Steps to Neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 67(12): 1113-1121.
- Pannese E. 1994. *Neurocytology. Fine structure of neurons, nerve processes, and neuroglial cells*. Thieme Medical Publishers, Inc. pp.: 190-194.
- Pekny M y Pekna M. 2004. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *Journal of Pathology* 204: 428-437.
- Pombano LJ y Evans DM. 2012. *Cerebellum: Anatomy, functions and disorders*. Nova Science Publishers, Inc. pp.: 10-12, 101-106.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS y White LE. 2012. *Neuroscience*. Sinauer Associates, Inc. 5th ed. Pp.: 417- 433.

- Ramón y Cajal S. 1893. Manual de Histología Normal y Técnica Micrográfica. 2ed. Valencia. Pp.:607-610. Disponible en línea:
<https://archive.org/stream/b20392941#page/n5/mode/2up>
- Reyes-Haro D, González-González MA, Pétriz A, Rosas-Arellano A, Kettenmann H, Miledi R y Martínez-Torres A. 2013. γ -Aminobutyric Acid- ρ Expression in Ependymal Glial Cells of the Mouse Cerebellum. *Journal of Neuroscience Research*. 91: 527-534.
- Reyes-Haro D, Bulavina L y Pivneva T. 2014. La glía, el pegamento de las ideas. *Ciencia*. Pp: 12-18.
- Riquelme R, Miralles CP y De Blas AL. 2002. Bergmann glía GABA(A) receptors concéntrate on the glial processes that wrap inhibitory synapses. *J Neurosci*. 22(24): 10720-30.
- Saab AS, Neumeier A, Jahn HM, Cupido A, Simek AAM, Boele HJ, Scheller A., Le Meur K, Götz M, Monyer H, Sprengel R, Rubio ME, Deitmer JW, De Zeeuw CI y Kirchhoff F. 2012. Bergmann Glial AMPA Receptors Are Required for Fine Motor Coordination. *Science* 337:749- 753.
- Sievers J, Mangold U, Berry M, Allen C, y Schlossberger HG. 1981. Experimental Studies on Cerebellar Foliation. I. A Qualitative Morphological Analysis of Cerebellar Fissuration Defects After Neonatal Treatment With 6-OHDA in the Rat. *The Journal of Comparative Neurology*. 203: 751-769.
- Sillitoe RV, Fu YH y Watson Ch. Cerebellum. En: Watson Ch, Paxinos G y Puelles L. 2012. *The mouse Nervous System*. Elsevier, Academic Press. Pp.: 360-397.
- Sotelo C. y Changeux JP. 1974. Bergmann fibers and granular cell migration in the cerebellum of homozygous weaver mutant mouse. *Brain Research* 77: 484-491.

- Wang SSH, Kloth AD y Badura A. 2014. The Cerebellum, Sensitive Periods, and Autism. *Neuron*. 83(3): 518-532.
- White J, Arancillo M, Stay TL, George-Jones NA, Levy SL, Heck DH y Sillitoe RV. 2014. Cerebellar Zonal Patterning Relies on Purkinje Cell Neurotransmission. *The Journal of Neuroscience*. 34(24): 8231- 8245.
- Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolberg-Buchholz K y Fallier-Becker P. 2009. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res*. 335:75-96.
- Yamada K y Watanabe M. 2002. Cytodifferentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anatomical Science International*. 77: 94-108.
- Yamada K, Fukaya M, Shibata T, Kurihara H, Tanaka K, Inoue Y y Watanabe M. 2000. Dynamic Transformation of Bergmann Glial Fibers Proceeds in Correlation With Dendritic Outgrowth and Synapse Formation of Cerebellar Purkinje Cells. *The Journal of Comparative Neurology*. 418: 106-120.