

1924  
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VALORACION ESTRUCTURAL, NUMERICA Y DE LOCALIZACION  
DE LOS GRANOS CEREBELOSOS EN RATAS WISTAR DE 0, 6 Y 12 DIAS  
DE EDAD, TRATADAS PRENATALMENTE CON CORTICOSTERONA.

TESIS DE LICENCIATURA

BIOLOGIA

CONCEPCION DE LA ROSA RUGERIO

MEXICO, DISTRITO FEDERAL

1992

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

# INDICE

## INTRODUCCION

EMBRIOGENESIS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	1
Neurulación	1
Mecanismo de Formación del Tubo Neural y el	
Origen del Sistema Nervioso Central	3
Arquitectura Tisular del Sistema Nervioso Central	7
DESARROLLO DEL CEREBELO	11
Histogénesis de la Corteza Cerebelosa	13
CARACTERISTICAS HISTOFISIOLOGICAS DEL CEREBELO	26
LA GLANDULA SUPRARRENAL	34
HORMONAS COSTICOSUPRARRENALES	37
Regulación de la Secreción de Cortisol	39
Caracteres Químicos	40
JUSTIFICACION	45
OBJETIVO	47
HIPOTESIS	47
MATERIAL Y METODO	48
RESULTADOS	53
0 DIAS DE EDAD	53
6 DIAS DE EDAD	56
12 DIAS DE EDAD	60

<b>DISCUSION</b>	<b>69</b>
<b>0 DIAS DE EDAD</b>	<b>71</b>
<b>6 DIAS DE EDAD</b>	<b>73</b>
<b>12 DIAS DE EDAD</b>	<b>76</b>
<b>FOTOMICROGRAFIAS</b>	<b>80</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>90</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	
<b>APENDICE</b>	

## RESUMEN

Los corticoides son utilizados frecuentemente en el tratamiento de diversas enfermedades. La experiencia en la clínica sugiere que se presentan secuelas neurológicas como resultado de la terapia con esteroides. Estudios realizados en cerebelo de rata, demuestran que la acción prenatal de corticosterona produce disminución temprana de la capa granulosa externa, paralela al aumento de la capa molecular. En este trabajo se llevó a cabo la valoración estructural, numérica y de localización de las doce fases de desarrollo de los granos cerebelosos, con objeto de conocer si el tratamiento prenatal con corticosterona influye en la diferenciación posnatal de estas células. Se estudiaron cerebelos de rata cepa Wistar de 0, 6 y 12 días de edad tratados con corticosterona a los 17, 18 y 19 días de gestación (2  $\mu$ g de corticosterona por gramo de peso de la madre), debido a que este periodo es trascendental en el desarrollo del Sistema Nervioso Central. Se efectuó el mismo estudio en un lote control al que se aplicó el diluyente de la hormona y en un lote testigo, sin tratamiento. Para identificación de las células se utilizó la técnica de Golgi-Kopsch, realizando el conteo de las mismas en toda el área del corte, la cual se determinó por digitalización.

En el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas en las fases 1, 5, 9, 10 y 11 de desarrollo, a los 6 días de edad en los animales experimentales. Sin encontrarse diferencias significativas a los 0 y 12 días de edad.

La corticosterona aplicada prenatalmente no produce cambios morfológicos, ni de diferenciación en los granos cerebelosos. Provoca desfaseamiento en los tiempos de diferenciación, numéricamente significativo a los 6 días de edad y esta acción se observa principalmente en las etapas: proliferativa (Fase 1), premigratoria (Fase 5) y de diferenciación (Fases 9, 10 y 11).

## INTRODUCCION



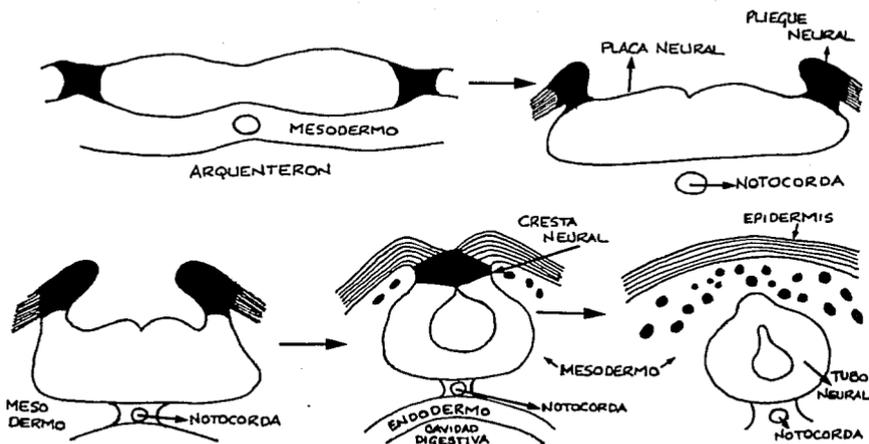
## EMBRIOGENESIS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

### NEURULACION

Existe un patrón común para el desarrollo de los vertebrados. Tres hojas blastodérmicas dan lugar a órganos diferentes: El Endodermo, el Mesodermo y el Ectodermo, de las cuales, esta última es la que da lugar al Sistema Nervioso.

En los vertebrados la gastrulación origina un embrión que posee una hoja endodérmica interna, una hoja mesodérmica intermedia y un ectodermo externo. Además, un cordón de células mesodérmicas, la notocorda, queda directamente por debajo de la porción más dorsal del ectodermo. La interacción entre la notocorda y su ectodermo superior es una de las interacciones más importantes de todo el desarrollo, ya que la notocorda dirige al ectodermo a la formación de un tubo neural hueco, que se diferenciará en el encéfalo y la médula espinal. La acción por la que la notocorda instruye al ectodermo para que se convierta en tubo neural, se denomina INDUCCION EMBRIONARIA PRIMARIA, y la respuesta celular por la que una capa plana de células ectodérmicas se transforma en un tubo hueco se denomina NEURULACION. (Gilbert, 1988)

**EVENTOS DE LA NEURULACION:**



**REPRESENTACION DIAGRAMATICA DE LA FORMACION DEL TUBO NEURAL. LAS CELULAS ECTODERMICAS SE REPRESENTAN COMO PRECURSORAS DE LA CRESTA NEURAL (NEGRO) O PRECURSORAS DE LA EPIDERMIS (GRIS). EL ECTODERMO SE INVAGINA EN EL PUNTO MAS DORSAL, FORMANDO UNA EPIDERMIS EXTERNA Y UN TUBO NEURAL INTERIOR CONECTADOS POR LAS CELULAS DE LA CRESTA NEURAL. (Gilbert, 1989)**

El ectodermo original se divide en 3 conjuntos de células:

a) El tubo neural colocado en el interior; b) La epidermis de la piel; y c) Las células de la cresta neural, que migran desde la región que había conectado el tubo neural con los tejidos epidérmicos. Es decir, el ectodermo se invagina en el punto más dorsal, formando una epidermis externa y un tubo neural en el interior conectados por las células de la cresta neural. Un embrión que esté sufriendo estos cambios se denomina **NEURULA**.

La primera indicación de que una región del ectodermo está destinada a convertirse en un tubo neural es un cambio en la forma celular. Las células ectodérmicas medias se alargan, mientras que

las células destinadas a formar la epidermis se hacen más aplanadas. El alargamiento de las células ectodérmicas dorsales hace que esta región neural prospectiva se eleve por encima del ectodermo que la rodea, originando así la PLACA NEURAL. Poco después, los bordes de la placa neural se engrosan y se mueven hacia arriba para formar los PLIEGUES NEURALES, mientras aparece un SURCO NEURAL en forma de "U" en el centro de la placa, dividiendo al embrión en los futuros costados derecho e izquierdo. Los pliegues neurales migran hacia la línea media del embrión, fusionándose a la larga para formar el tubo neural por debajo del ectodermo superior. Las células de la unión entre el ectodermo externo y el tubo neural se convierten en células de la CRESTA NEURAL. Estas células de la cresta migran por todo el embrión y dan lugar a varias poblaciones celulares, entre ellas las células del Sistema Nervioso Periférico.

#### MECANISMO DE FORMACION DEL TUBO NEURAL Y EL ORIGEN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La formación del tubo neural no tiene lugar simultáneamente por todo el ectodermo. Esto se observa mejor en mamíferos, en los que los ejes corporales se alargan antes de la neurulación. La neurulación en la región cefálica avanza de manera más rápida que en la región caudal que se encuentra aún en la etapa de gastrulación. La regionalización del tubo neural tiene lugar también como resultado de cambios en la forma del tubo:

En el extremo cefálico (donde se formará el encéfalo) el tubo es ancho, y aparecen una serie de ensanchamientos y constricciones

que definen los diferentes compartimentos del encéfalo. Sin embargo, posterior a la región cefálica se forma un tubo sencillo que va disminuyendo hacia la cola. Los dos extremos abiertos del tubo neural se denominan NEUROPORO ANTERIOR y NEUROPORO POSTERIOR. En los mamíferos, estos poros permiten que el líquido amniótico fluya a través del tubo neural durante cierto tiempo.

La formación del tubo neural está íntimamente ligada a los cambios en la forma celular, y están implicados tanto los microtúbulos como los microfilamentos. Las células ectodérmicas se alargan a medida que los microtúbulos dispuestos al azar se alinean paralelamente al eje principal que se alarga. Un segundo cambio en la forma de las células implica la constricción apical de éstas para formar un cilindro; este cambio se debe a un anillo de microfilamentos contráctiles que rodea el margen apical de las células, construyendo de este modo el extremo apical de cada célula.

FORMACION DE LAS REGIONES DEL ENCEFALO. La diferenciación del tubo neural en las diferentes regiones del sistema nervioso central tiene lugar simultáneamente a tres niveles diferentes. A nivel anatómico, en el tubo neural se forman constricciones que van a dar lugar a las vesículas primordiales y a las cámaras del encéfalo. A nivel tisular, la pared del tubo neural se redistribuye de diferente manera para formar las distintas regiones funcionales del encéfalo y la médula espinal. Finalmente, a nivel celular, las mismas células neuroepiteliales se diferencian en los numerosos tipos diferentes de neuronas que hay en el cuerpo.

El tubo neural temprano de los mamíferos es una estructura recta. Sin embargo, incluso antes de que se haya formado la porción posterior del tubo, la porción más anterior de este está sufriendo cambios drásticos. En esta región, anterior, el tubo neural forma tres vesículas primarias:

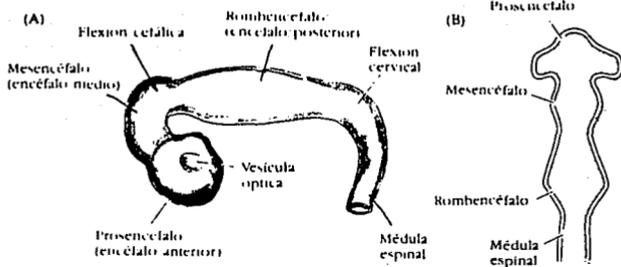
Encéfalo Anterior (PROSENCEFALO)

Encéfalo Medio (MESENCEFALO) y

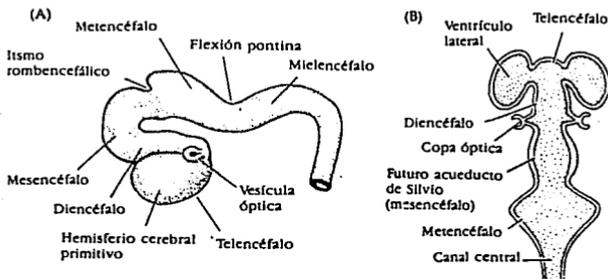
Encéfalo Posterior (ROMBENCEFALO).

Hacia el momento en que se cierra el extremo posterior del tubo neural, se han extendido unas protuberancias secundarias - las VESICULAS OPTICAS - a cada lado del encéfalo anterior en desarrollo. Además, el futuro encéfalo se ha curvado de manera que los pliegues demarcan las fronteras de las cavidades del encéfalo. Los pliegues principales son la Flexión Cefálica y la Flexión Cervical.

El Encéfalo Anterior queda subdividido en el TELENCEFALO anterior y el DIENCEFALO más caudal. El Telencéfalo da lugar a los Hemisferios Cerebrales, y el Diencefalo formará las regiones del Tálamo e Hipotálamo del cerebro así como la región que recibe los impulsos nerviosos de los ojos. El Rombencéfalo queda subdividido en un MIELENCEFALO posterior y un METENCEFALO más anterior. El Mielencéfalo se convierte a la larga en la MEDULA OBLONGA, cuyos nervios regulan los movimientos respiratorios, gastrointestinales y cardiovasculares; el Metencéfalo da lugar al CEREBELO, la parte del encéfalo responsable de la coordinación de los movimientos, postura y equilibrio. El Mesencéfalo no se subdivide, y su lúmen se convierte a la larga en el Acueducto Cerebral. (Gilbert, 1988)

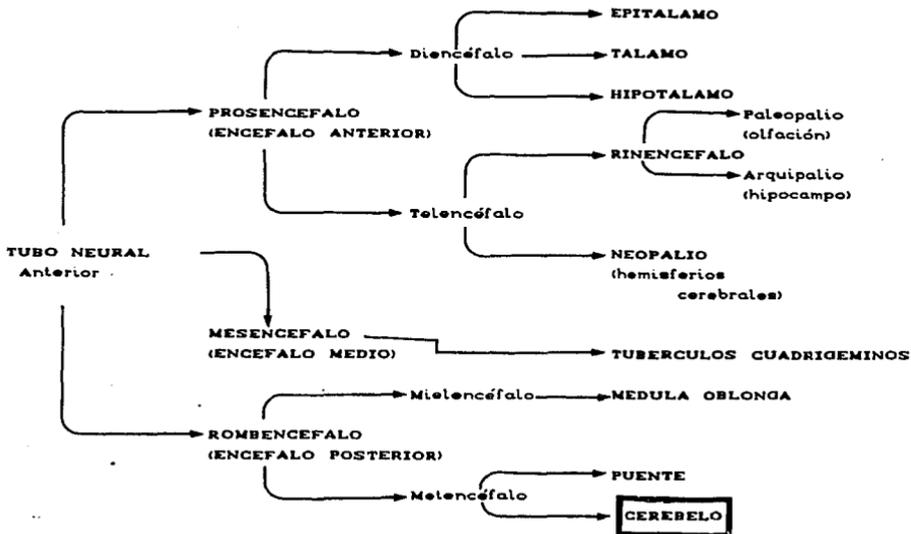


**DESARROLLO TEMPRANO DEL ENCEFALO EN UN EMBRION HUMANO DE 4 SEMANAS. (A) VISTA LATERAL. (B) DIAGRAMA EXTENDIDO PARA ILUSTRAR LAS PROTRUSIONES DEL TUBO NEURAL.**



**DESARROLLO POSTERIOR DEL ENCEFALO HUMANO. VISTA LATERAL (A) Y DIAGRAMA EXTENDIDO SAGITAL (B) DE UN ENCEFALO HUMANO DE 6 SEMANAS MOSTRANDO LAS PROTRUSIONES SECUNDARIAS DEL TUBO NEURAL. (Gilbert, 1968)**

## ESQUEMA EN TERMINOS DE ESPECIALIZACION REGIONAL



## ARQUITECTURA TISULAR DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El tubo neural original se compone de un neuroepitelio germinal, el cual consta de una sola capa de células. Esta es una población celular en rápida división. Sauer (1935) y otros han demostrado que todas estas células son continuas del lumen del tubo neural a sus bordes pero que los núcleos de estas células están a diferentes niveles, dando así la falsa impresión de que el tubo neural tiene numerosas capas de células. La posición de un núcleo entre el lumen y el borde del tubo neural depende del

estadio del ciclo celular. La síntesis de ADN (Fase S) tiene lugar mientras el núcleo está en el borde del tubo, y el núcleo migra hacia el lumen a medida que prosigue la mitosis. Durante el desarrollo temprano, el 100% de las células del tubo neural incorporan Timidina radioactiva al ADN (Fujita 1964). Poco después, algunas células dejan de incorporarla, indicando así que ya no están participando en la síntesis de ADN ni en la mitosis. Estas son las jóvenes células neuronales y de la glía que migran a la periferia del tubo neural para diferenciarse (Fujita 1966; Jacobson 1968). La diferenciación neural subsiguiente depende de la posición que ocupen estos neuroblastos una vez fuera de la región en que se dividen las células (Jacobson 1978; Letourneau 1977).

A medida que las células adyacentes al lumen continúan dividiéndose, las células que migran forman una segunda capa alrededor del tubo neural original. Esta capa se hace progresivamente más gruesa a medida que se añaden más células a ella desde el epitelio germinal. Esta nueva capa se denomina ZONA DEL MANTO, y el epitelio germinal se denomina ahora EPENDIMO. Las células de la ZONA DEL MANTO se diferencian tanto en neuronas como en glía. Las neuronas establecen conexiones entre ellas y envían axones ~~hacia~~ allá del lumen, creando así una ZONA MARGINAL pobre en células. A la larga, células de la glía cubren cada uno de estos axones dando una vaina de mielina, la cual proporciona un aspecto blanquecino. Por lo tanto, la zona del manto, que contiene los cuerpos celulares dará origen a la MATERIA GRIS; y la capa marginal, axonal, a la MATERIA BLANCA.

En la médula espinal y el bulbo raquídeo, este patrón básico

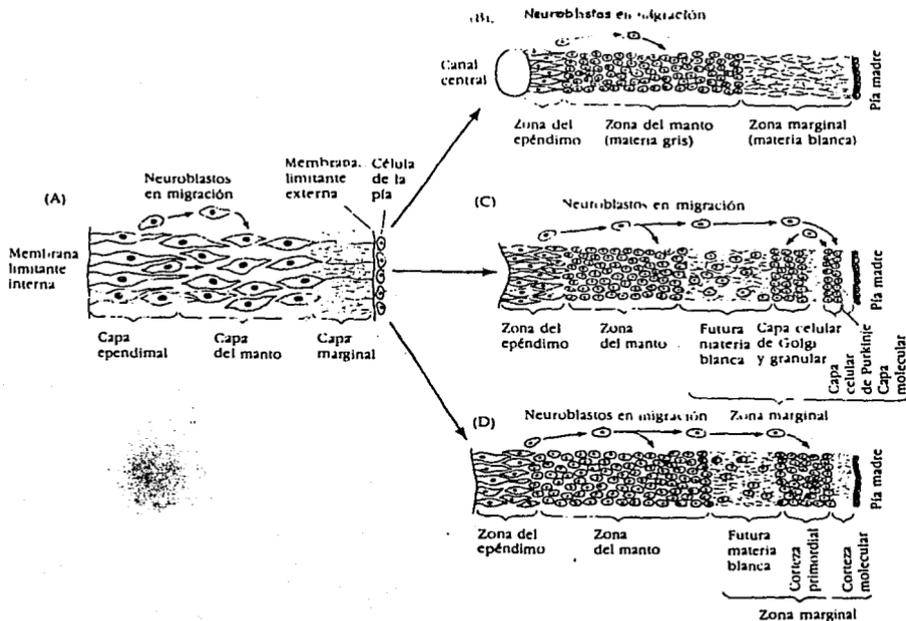
tripartito de capas ependimal, del manto y marginal se retiene durante todo el desarrollo. La materia gris (manto) se convierte gradualmente en una estructura en forma de H rodeada por materia blanca; y ambas quedan encerradas por las meninges. Durante su maduración un surco longitudinal - el SULCUS LIMITANS - divide el tubo en las mitades dorsal y ventral. La mitad dorsal recibe neuronas sensitivas y la mitad ventral está implicada en la emisión de funciones motoras.

Sin embargo, en el encéfalo, la migración celular, el crecimiento diferencial y la muerte celular selectiva producen modificaciones en este patrón tripartito, especialmente en el cerebro y CEREBELO. En el interior de la materia gris del cerebelo, algunos neuroblastos se reúnen en grupos denominados núcleos. Cada núcleo representa una unidad funcional. Otros neuroblastos de la materia gris migran a través de la materia blanca, y después de varios movimientos constituyen la corteza cerebelosa, invirtiéndose la relación de sustancia gris y sustancia blanca del tubo neural. En la corteza cerebelosa destaca uno de los más complejos de todos los tipos neuronales: la célula de Purkinje. Cada neurona de Purkinje posee un enorme aparato dendrítico, que se expande como un abanico por encima de una zona bulbosa. Una célula de Purkinje típica puede formar hasta 100,000 sinápsis con otras neuronas, mucho más que cualquier otra neurona estudiada. Cada neurona de Purkinje emite un delgado AXON, que conecta con una célula de un núcleo cerebelar de la materia gris en la materia blanca.

El desarrollo de la organización espacial es, pues, crítico para el funcionamiento correcto del cerebelo. Todos los impulsos

regulan a la larga la actividad de las células de Purkinje, que son las únicas neuronas de salida de la corteza del cerebelo. Para que esto ocurra, se han de diferenciar las células correctas en el lugar y tiempo apropiados.

**DIFERENCIACION DE LAS PAREDES DEL TUBO NEURAL. (A) TUBO NEURAL HUMANO DE CINCO SEMANAS MOSTRANDO LA ESTRUCTURA TRIPARTITA: CAPAS DEL EPENDIMO, DEL MANTO Y MARGINAL. (B) SECCION DE LA MEDULA ESPINAL Y OBLONGA DE TRES MESES MOSTRANDO LA DIVISION TRIPARTITA. MODIFICACION DE LA ESTRUCTURA TRIPARTITA EN UN CEREBELO (C) Y CEREBRO (D) DE 3 MESES, ORIGINADA POR LA MIGRACION DE NEUROBLASTOS A REGIONES ESPECIFICAS DE LA ZONA MARGINAL. (Gilbert, 1968)**



## DESARROLLO DEL CEREBELO

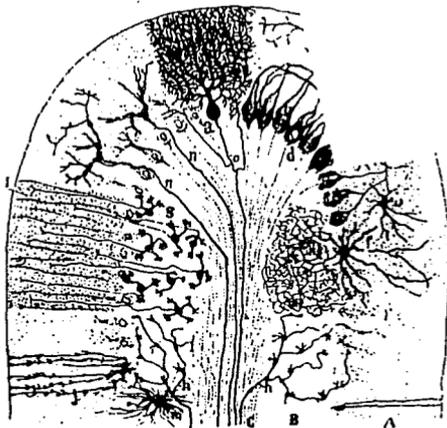
El cerebello adulto tiene 3 capas corticales, las cuales nombradas en orden desde la superficie externa son:

LA CAPA MOLECULAR

LA CAPA DE CELULAS DE PURKINJE

LA CAPA GRANULOSA

Las relaciones que existen entre las células de estas capas se muestran en el corte de cerebello ilustrado por Cajal. Las conexiones del cerebello y las funciones de los 5 tipos de neuronas que existen en el cerebello se conocen actualmente en considerable detalle.



CORTE TRANSVERSAL SEMIESQUEMATICO DE UNA CIRCUNVOLUCION CEREBELOSA DE MAMIFERO. -A,ZONA MOLECULAR; B,ZONA DE LOS GRANOS; C,ZONA DE LA SUSTANCIA BLANCA; a/Célula de Purkinje vista de plano; b/Células Estrelladas pequeñas de la Zona Molecular; d/arborizaciones finales descendentes que rodean las Células de Purkinje; e/Células Estrelladas Superficiales; g/Granos con sus cilindros ejes ascendentes bifurcados en i; h/Fibras musgosas; j/Célula neuróglica de penacho; n/Fibras trepadoras; m/Célula neuróglica de la zona de los granos; f/Células estrelladas grandes de la zona de los granos. (Ramón y Cajal, 1902)

El cerebelo deriva del labio rúbico que se forma en la parte dorsal de la placa alar a nivel del metencéfalo. Hacia el estadio de 15 somitas se produce un engrosamiento en el labio rúbico a cada lado de la línea media, que constituye el primordio de los hemisferios cerebelosos, la cual avanza hacia el cuarto ventrículo. Poco después se acumulan células en la parte media y rostral del tectum mesencefálico, que darán origen al vermis. En etapa posterior se fusionan los brotes cerebelosos y se produce la extroversión del cerebelo en desarrollo, el cual abandona la cavidad ventricular y se expande dorsolateralmente ocupando las futuras fosas cerebelosas del craneo. (López, 1979).

El desarrollo de la corteza cerebelosa se lleva a cabo en un orden similar pero a diferentes velocidades en los distintos vertebrados. (Nieuwenhuys, 1964; Larsell, 1967). Un ejemplo extremoso es la Rana catesbeiana, durante los estadios premetamórficos que duran aproximadamente 2 años, el cerebelo permanece en la forma de una lámina cerebelar conteniendo células de Purkinje indiferenciadas y no existe una capa granulosa externa. Sólo hasta que se realiza la metamorfosis se forma la capa granulosa externa y las dendritas de las células de Purkinje crecen y se ramifican.

El estado de desarrollo del cerebelo al nacimiento está correlacionado con las capacidades de locomoción y coordinación motora del animal recién nacido. En animales precoces que son capaces de caminar pronto después del nacimiento (tales como el pollo, conejillo de indias y ungulados) el cerebelo está bien desarrollado al nacer, mientras que en animales (tales como el ratón, la rata y el hombre) que son indefensos al nacer, el

cerebelo se encuentra en un estado correspondiente de inmadurez, y su histogénesis y morfogénesis principalmente ocurre después del nacimiento. Existen datos, sin embargo, de que los eventos postnatales de neurogénesis y morfogénesis cerebelosa no son disparados por el nacimiento. En fetos de rata en los cuales la gestación fué prolongada por 3 días después de su duración normal, dichos eventos ocurrieron al tiempo normal y anticipados al nacimiento (Zagon, 1975).

#### HISTOGENESIS DE LA CORTEZA CEREBELOSA

El momento y la ubicación del origen de los 5 tipos de neuronas del circuito cerebelar local, así como sus rutas de migración a posiciones específicas de la corteza, sus patrones distintivos de diferenciación y crecimiento y su sinaptogénesis han sido descritos en muchas especies. Estas observaciones muestran que el ensamble de tan complejo sistema no es en ninguna forma azarosa, sino sigue un horario invariante y preciso.

La histogénesis de las neuronas más grandes principales ocurre primero, seguida de la génesis de las neuronas del circuito local. Las zonas germinales bien definidas pueden ser demarcadas, las cuales dan origen a diferentes tipos de neuronas a un tiempo establecido fijo. El patrón de histogénesis de las neuronas corticales cerebelares es complicado por el hecho de que las células se originan de dos zonas germinales separadas. Una zona en el techo del 4<sup>o</sup> ventrículo da origen a las células de

Purkinje y a las Golgi II así como a algunas células gliales; todas ellas migran, hacia afuera, para formar la capa del manto de la lámina cerebelosa. Algo después otra zona germinal, denominada CAPA GRANULOSA EXTERNA, es formada inmediatamente bajo la Pía que cubre la lámina cerebelosa, la cual da origen a las CELULAS GRANULOSAS, Estrelladas, en Canasta y a algunas células gliales, todas las cuales migran después hacia adentro de la corteza cerebelosa.

La migración de los neuroblastos hacia afuera de la zona ventricular germinal para formar la zona del Manto en la lámina cerebelosa ocurre antes del día 17 de gestación en el feto de rata albina (Addison, 1911) y de los días 60 a 80 de gestación en el feto humano. Aproximadamente por el día 17 de gestación en la rata, la lámina cerebelar está compuesta de una capa interna, germinal ventricular, un manto intermedio o capa intermedia y por una capa marginal externa. La capa del manto de la lámina cerebelar está compuesta de 2 estratos. El estrato más profundo de neuronas inmaduras más grandes se diferencia para formar las grandes neuronas del techo de los núcleos. Las neuronas jóvenes de el estrato más superficial del manto se diferencian para formar las células de Purkinje.

Las células de Purkinje, en todos los vertebrados, se derivan de la zona ventricular germinal y migran hacia afuera a las capas superficiales de la lámina cerebelar del manto; son ellas inicialmente pequeñas y están arregladas en filas irregulares que tienen hasta 12 células de grosor, las cuales posteriormente se adelgazan a 1 sola fila o hilera durante el crecimiento subsecuente del cerebelo. Las células de Purkinje se originan de

los días 14 al 17 de gestación en el feto de rata, en todos los casos comenzando y cesando su producción antes que cualquier otro tipo de célula en la corteza cerebelosa; así mismo, crecen muy lentamente hasta que ocurre la proliferación de las células de la capa GRANULOSA EXTERNA. Las células de Purkinje se comienzan a diferenciar rápidamente después de que los GRANOS CEREBELOSOS migran pasando por su capa de la GAPA GRANULOSA EXTERNA a la GAPA GRANULOSA INTERNA. Este evento ocurre de 4 a 20 días después del nacimiento tanto en el ratón como en la rata albina, y del 4° mes fetal al 11° mes postnatal en humanos. Las células de Purkinje forman una sola fila aproximadamente a los 4 días postnatales en la rata (Addison, 1911; Altman y Winfree, 1977), y su núcleo continúa aumentando en tamaño hasta el día postnatal 14.

En la rata, el axón de la célula de Purkinje puede ser visto al momento del nacimiento, y las ramificaciones colaterales que se extienden transversalmente de una célula de Purkinje a los cuerpos celulares de las células de Purkinje vecinas se desarrollan poco después del nacimiento.

En los primeros 21 días postnatales en la rata, las células de Purkinje experimentan los cambios bellamente ilustrados por Ramón y Cajal (1909 - 1911). El crecimiento de las dendritas en la célula de Purkinje y el incremento en su ramificación ha sido descrito en detalle en la rata por Addison (1911) y por Altman (1972). En la rata recién nacida las células de Purkinje tienen un proceso apical dendrítico, el cual puede o no tener unas pocas ramificaciones. Los primeros brotes de su polo apical llegan a ser reabsorbidos y el crecimiento de sus dendritas es retrasado, hasta después del nacimiento, por un período prolongado durante el

cual la capa GRANULOSA EXTERNA dá origen a los GRANOS CEREBELOSOS. Las puntas de las dendritas de las células de Purkinje llegan sólo hasta la parte interna de la capa GRANULOSA EXTERNA y así como la capa GRANULOSA EXTERNA se reduce, también la ramificación de las dendritas de las células de Purkinje. En la rata, las puntas de las dendritas alcanzan la Pía a los 20 ó 25 días después del nacimiento, al tiempo de la desaparición de la capa GRANULOSA EXTERNA. De acuerdo con Addison (1911), el número de ramificaciones terminales de las dendritas de las células de Purkinje continúa aumentando durante 110 días después del nacimiento en la rata.

La relación entre la migración de los GRANOS CEREBELOSOS, el crecimiento de las dendritas de las células de Purkinje y las sinapsis entre los axones de los granos cerebelosos (FIBRAS PARALELAS), y las espinas dendríticas de las células de Purkinje ha sido tratado por Ramón y Cajal (1929). El propuso la "hipótesis tentativa", en la que señala que "el crecimiento de las dendritas de las células de Purkinje es estimulado por la aparición de las fibras paralelas y la migración de los granos cerebelosos." Esto es quizá similar a la noción de Sidman (1968) de que una interacción puede ocurrir entre las células de Purkinje y las células granulosas que migran, resultando la formación de conexiones específicas entre ellas. Este hecho no es tan simple como lo sugiere la hipótesis y esto se demuestra debido a que en el feto humano el crecimiento de las dendritas de las células de Purkinje comienza antes de la 1ª migración de las células granulosas, así que esto demuestra un aspecto de la autonomía de las células de Purkinje (Rakic y Sidman, 1970). Por otro lado,

las dendritas de la célula de Purkinje no se desarrollan normalmente, sino que permanecen sin crecer si los granos cerebelosos de la capa granulosa externa son destruidos por Rayos X (Purpura *et. al.*, 1964), o por virus (Kilham y Margolis, 1964,1965,1966). Esto no demuestra la causa de la malformación dendrítica, la cual puede deberse a la acción directa de la radiación o del virus en las dendritas o puede ser indirectamente debida a la destrucción de los granos cerebelosos. Estos últimos pueden ser requeridos para estimular el crecimiento y la ramificación de las dendritas de las células de Purkinje, ya sea cuando las células granulosas migran pasando por la capa de células de Purkinje o ya que sus fibras paralelas forman sinapsis con las dendritas de las células de Purkinje.

Los granos cerebelosos, las células estrelladas, las células en canasta y probablemente algunas de las células gliales cerebelosas, se derivan de la CAPA GRANULOSA EXTERNA. Los granos cerebelosos son generados en la capa granulosa externa y migran a través de la capa Molecular y de la capa de células de Purkinje para formar la capa GRANULOSA INTERNA (Obersteiner, 1883; Ramón y Cajal, 1890; Schaper, 1894). Las células de la granulosa externa migran sobre la superficie del cerebelo desde la parte rostral del rombencéfalo, una zona germinal en la placa alar que forma la pared del 4° ventrículo (Schaper, 1894, 1895; Ramón y Cajal 1909-1911; Addison, 1911; Raaf y Kernohan, 1944). Las células que migran desde el rombencéfalo, forman una lámina continua que se extiende rostralmente sobre la placa cerebelosa y medialmente en el tallo cerebral. La zona germinal que da lugar a la capa granulosa externa es la parte más rostral del rombencéfalo, y es

así mismo de las partes más caudales que dan lugar a las células que migran para formar el Núcleo Olivar Inferior, Núcleo Coclear y Núcleo Pontino.

La síntesis de DNA y la mitosis en la zona ventricular germinal disminuyen durante el período fetal que va del día 13 al 15 en el ratón, mientras que al mismo tiempo el número de células se incrementa en la capa granulosa externa (Miale y Sidman, 1961).

La histogénesis de los GRANOS CEREBELOSOS en la capa granulosa externa ha sido descrita en el pollo (Ramón y Cajal, 1890; Saetersdal, 1956,1959; Forströner, 1963; Hanaway, 1967; Mugnaini y Forströner, 1967), el ratón (L.L. Uzman, 1960; Miale y Sidman, 1961; S. Fujita, *et.al.*, 1966; S. Fujita, 1967; Mares, *et. al.*, 1970), LA RATA (Addison, 1911; Altman y Das, 1966; Altman, 1972), el perro (Ramón y Cajal, 1929; Phemister y Young, 1968), el gato (Púrpura, *et.al.*, 1964), el mono (Kornguth, *et.al.*, 1967,1968), y el humano (Ellis, 1920; Raaf y Kernohan, 1944; J.S. Woodard, 1960, Rakic y Sidman, 1970).

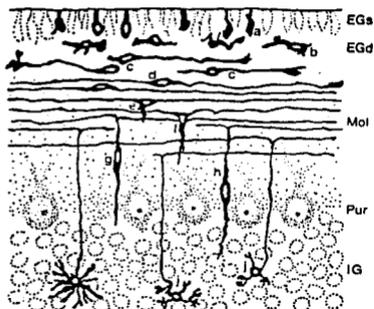
La CAPA GRANULOSA EXTERNA aparece primero sobre la parte posterolateral del cerebelo y se extiende anteromedialmente para cubrir la placa cerebelar entera. En todos los vertebrados la capa granulosa externa aumenta en grosor de una sola hilera de células a una capa de seis a ocho células de profundidad como un resultado de la proliferación de las células de la granulosa externa. Aspectos mitóticos están esparcidos por toda la capa granulosa externa durante el período del aumento en grosor. A este respecto la capa granulosa externa no se parece a la zona ventricular germinal en la cual las células se retractan hacia el ventrículo durante la mitosis. Por lo tanto, parece no

característico que la migración nuclear interquinética ocurra en las células de la granulosa externa. La capa granulosa externa persiste por un período que varía de acuerdo con la especie, pero eventualmente se llega a reducir en grosor a una sola capa de células para finalmente desaparecer. La capa granulosa externa desaparece aproximadamente al momento del nacimiento o muy pronto después del nacimiento. Por ejemplo, la capa granulosa externa desaparece desde los días 20 a 25 después del nacimiento en el ratón albino y en la rata; aproximadamente a los 60 días postnatales en el gato, aproximadamente a los 75 días postnatales en el perro y aproximadamente a los 600 días postnatales en humanos.

Durante el período inicial de incremento en grosor de la capa granulosa externa, un marcaje acumulativo con Timidina Tritiada resulta en un marcaje del 100% de las células de la granulosa externa (S. Fujita, *et al.*, 1966). Esto muestra que todas las células están comprometidas en síntesis de DNA y mitosis. Sin embargo, en la 2<sup>o</sup> mitad del período de desarrollo de la capa granulosa externa, una zona de células sin representaciones mitóticas yace entre las células activamente proliferativas de la granulosa externa y la capa molecular. (Ramón y Cajal, 1909-1911; Addison, 1911). Las células en esta zona no incorporan Timidina Tritiada, de esta manera mostrando que han cesado la mitosis (S. Fujita, 1967).

La migración de los granos cerebelosos, plantea un difícil problema debido a que ellos surgen tarde en el desarrollo; además tienen que migrar a lo largo de senderos aparentemente bloqueados por obstáculos celulares que se han desarrollado en una etapa más

temprana, y aún así, como Ramón y Cajal mostró, siguen un patrón radial recto. Este problema ha sido ahora resuelto con el descubrimiento de que la glía de Bergmann actúa como guía para los granos cerebelosos migratorios (Mugnaini y Forströner, 1967; Rakic, 1971). En preparaciones, con la Técnica de Golgi, Ramón y Cajal reconoció los cambios en forma y posición de los granos cerebelosos conforme van migrando desde la capa granulosa externa. Las células en la mitad superficial de la capa granulosa externa, las cuales se encuentran en varias fases del ciclo de generación, fueron denominadas FASE EMBRIONARIA O INDIFERENCIADA por Ramón y Cajal (1909-1911). En la parte más profunda de la capa granulosa externa (zona premigratoria) las células son bipolares, con dos procesos orientados paralelamente a la superficie en la dirección del folio, similares a las fibras paralelas de la corteza madura (FASE DE LA BIPOLARIDAD HORIZONTAL). Ramón y Cajal reconoció que éstas eran células granulosas postmitóticas al comienzo de su migración hacia el interior. Por medio del uso de autorradiografía con Timidina Triteriada, ha sido demostrado que éstas células granulosas han cesado la síntesis de DNA, ya que permanecen sin marcaje después del período de exposición a la Timidina; sin embargo todas las células en la zona superficial de la capa granulosa externa sí resultaron marcadas (S. Fujita, et. al., 1966; S. Fujita, 1967).



Fases en la migración y diferenciación de los Granos Cerebelosos (a-j) de la zona superficial de la capa granulosa externa (EGs), a la zona profunda de la capa granulosa externa (EGd), pasando por la capa molecular (Mol) y la capa de células de Purkinje (Pur) a la capa granulosa interna (IG) del cerebelo de mamífero.

Modificado de S. Ramón y Cajal (1909-1911). (Jacobson, 1978)

Un tercer proceso citoplásmico (prolongación guía) crece de los granos cerebelosos verticalmente hacia abajo, dentro de la capa molecular. Las células asumen una forma de "T" (FASE DE LA BIPOLARIDAD VERTICAL), mientras el núcleo migra dentro del proceso citoplásmico vertical y a través de la capa molecular y la capa de células de Purkinje. Cuando el grano alcanza su posición en la capa granulosa interna, su migración termina, y algunas telodendritas cortas con forma de "garra" brotan del cuerpo celular. Esto fue denominado la FASE DEL GRANO PROFUNDO O JOVEN por Ramón y Cajal (1909-1911). La telodendria de los granos y de las células de Golgi, juntas con las terminales de las fibras musgosas, forman el GLOMERULO CEREBELOSO. Las fibras musgosas son vistas en un principio en la capa nuclear interior a los días 12-14 después del nacimiento en la rata (Addison, 1911). Conforme las células granulosas continúan su formación hacia la 3ª semana, y con un tiempo adicional tomado por su migración y el crecimiento de sus dendritas, la formación del glomérulo continúa por más de 30 días postnatales (Altman, 1972c).

Al parecer, del arreglo de las células granulosas internas, se puede definir su orden de migración ya que los granos cerebelosos más profundos son generados primero y la capa granulosa interna se forma en un orden "de adentro hacia afuera". Conforme migran los granos cerebelosos, dejan atrás sus fibras paralelas, en la parte superior de la capa Molecular. De esta manera manteniéndose un gradiente por toda la capa Molecular con fibras paralelas maduras en la parte más interna y fibras paralelas inmaduras en la parte superior. (C.A. Fox, *et al.*, 1967; Altman, 1972).

Mugnaini y Forströner (1967) estudiaron los cambios ultraestructurales que ocurren en la corteza cerebelosa del embrión de pollo a los días 17-20 de desarrollo y encontraron continuamente series de formas transicionales de granos cerebelosos entre las capas granulosas externas e internas. Así mismo, un detallado análisis con microscopía electrónica mostró la relación entre los granos cerebelosos y las prolongaciones de la glía de Bergmann en el cerebelo de Macacus rhesus; Rakic (1971b) sugiere que los granos cerebelosos migran a través de toda la capa Molecular junto a las prolongaciones de la glía de Bergmann las cuales se extienden desde sus cuerpos celulares en la capa de células de Purkinje hasta la superficie pial desde las etapas tempranas del desarrollo cerebeloso. Rakic argumenta que sin la permanencia de una senda preformada que guíe a los granos cerebelosos sería difícil concebir el cómo pueden migrar entre las fibras paralelas densamente acomodadas, particularmente en los estadios tardíos de desarrollo del cerebelo. En el cerebelo adulto se han encontrado axones de granos cerebelosos que

continúan asociados con las prolongaciones de la glía de Bergmann. La microscopía electrónica de esta manera ha confirmado la descripción de la migración de los granos cerebelosos ilustrada por Ramón y Cajal (1890, 1909-1911) y ha mostrado que la glía de Bergmann radialmente orientada es usada como guía por los granos cerebelosos conforme ellos migran desde la capa granulosa externa a la interna. La microscopía electrónica de barrido recientemente ha mostrado en cerebelo de ratón en desarrollo, que los granos pueden estar ligados a las prolongaciones de la glía de Bergmann a través de componentes de la matriz extracelular. (revisado por Sidman y Rakic, 1973).

En la rata, la mayoría de los granos cerebelosos se generan postanatalmente por medio de la división celular de la CAPA GRANULOSA EXTERNA (CGE). La CGE persiste en la rata hasta aproximadamente el día 21 postnatal (P21). La CGE consiste de dos zonas, la zona superficial proliferativa y la zona subyacente premigratoria. En las ratas inyectadas con timidina tritiada en el P6 se encontró que los granos cerebelosos se translocaron hacia la zona premigratoria a las 6 Hrs después de su división celular final. Después de 24 Hrs., los granos cerebelosos aparecen en la capa Molecular y a los 3 días ya han alcanzado la capa Granulosa Interna. Los granos cerebelosos inmaduros por lo tanto, migran alguna distancia desde su lugar de origen a su lugar finalmente definitivo en la capa Granulosa Interna. Este proceso de proliferación y migración de los granos cerebelosos ocurre todo el tiempo durante las primeras tres semanas postnatales en el cerebelo de rata.

Los granos comienzan a transportar vesículas sinápticas por

sus fibras paralelas y forman varicosidades desde antes de que el contacto sináptico con células blanco es iniciado. Las varicosidades son escasas en la zona premigratoria de la CGE. Sin embargo, un antígeno a vesículas sinápticas puede ser detectado en los axones que yacen entre las células granulosas premigratorias del cerebelo P6 y P9 de rata. Con la tinción inmunocitoquímica para este antígeno se observa una distribución por toda la capa Molecular, sin graduación entre las fibras paralelas maduras e inmaduras, desde el P6 en adelante y las varicosidades llenas de vesículas pueden ya ser identificadas con microscopía electrónica. (Altman, 1972; Cambray, 1987). A pesar del desarrollo temprano de gran número de especializaciones presinápticas, las especializaciones postsinápticas en las espinas dendríticas de las células de Purkinje no son frecuentes y durante la primera semana postnatal la mayoría de las sinapsis de las fibras paralelas que se forman es en las protuberancias de las dendritas de las células de Purkinje. Un aspecto interesante de la formación de la sinapsis de las fibras paralelas en las dendritas de las células de Purkinje es la aparición de vesículas cubiertas en las dendritas que aparentan estar endocitando la membrana de la fibra paralela. Ahora es ya una clara evidencia de que los componentes glucoprotéicos del axolema de la fibra paralela es endocitado y degradado por las células de Purkinje. El significado de estos hallazgos y la pregunta de si la endocitosis es un evento clave en la sinaptogénesis no es claro aún.

La aferencia de las fibras musgosas hace su primera aparición en la capa Granulosa de la rata en aproximadamente el P5. En este momento unas pocas dendritas de los granos cerebelosos pueden

ser encontradas con microscopía electrónica. En el P12 es detectable la primera indicación clara de la formación sináptica de las terminales de las fibras musgosas en las dendritas de los granos cerebelosos. En este momento las células de Golgi comienzan a hacer sus conexiones inhibitorias sinápticas en las dendritas de los granos cerebelosos en el glomérulo. Durante la 3<sup>a</sup> semana postnatal el glomérulo aumenta en complejidad y la tinción inmunocitoquímica para el antígeno a las vesículas sinápticas revela un marcado incremento en las terminales de las fibras musgosas hasta el P18. (Cambray, 1987; Altman, 1972b).

La formación de los contactos sinápticos en las células de Purkinje puede ser necesario para la continua supervivencia de los granos cerebelosos. En el ratón mutante denominado "staggerer" los granos cerebelosos migran y forman fibras paralelas pero las células de Purkinje muestran un restringido crecimiento dendrítico y ausencia de las espinas dendríticas. Ha sido sugerido que la falla de los granos cerebelosos para realizar sus contactos sinápticos normales debido a la ausencia de estructuras postsinápticas puede ser la causa de la gran mortalidad de los granos que ocurre en este mutante. Una vez que las fibras paralelas han hecho contacto sináptico, la presencia continua de las células de Purkinje no parece ser esencial para la supervivencia del grano cerebeloso. La mutación "Nervous" resulta en la muerte de las células de Purkinje pero sólo después del P23 cuando la mayor parte de los contactos sinápticos han sido realizados. En este mutante muchos de los granos cerebelosos continúan sobreviviendo por muchos meses después de la muerte de las células de Purkinje.

## GARACTERISTICAS HISTOFISIOLOGICAS DEL CEREBELO

La región del encéfalo en donde la relación de estructura y función ha sido determinada con el mayor éxito es la corteza del cerebelo. Las células de esta estructura han sido clasificadas de acuerdo a su forma, a su posición y orientación en el tejido.

El cerebelo está situado en la parte posterior del cráneo detrás de la base del cerebro y por atrás de los grandes hemisferios del cerebro. Como en el cerebro, las más importantes funciones en el cerebelo están confinadas a la delgada capa de materia gris que conforma la corteza, la cual está elaboradamente plegada con el objeto de aumentar el área. Los folios así formados, son profundos y cercanos. Si el cerebelo es dividido justo a la mitad, los folios forman un patrón que recuerda al de un árbol, por lo cual los anatomistas medievales lo denominaron arbor vitae o árbol de la vida.

Los fundamentos de anatomía del cerebelo fueron establecidos en 1888 por Santiago Ramón y Cajal en España. El empleó una técnica de impregnación que fué creada en 1873 por Camilo Golgi, en la cual el tejido es impregnado con sales de plata. Por medio del estudio de muchos cortes de tejido impregnado, Ramón y Cajal identificó a las principales neuronas de la corteza cerebelosa y describió su arreglo en dicho espacio. Así mismo, determinó la naturaleza de las conexiones entre las neuronas y reconoció en ellas un patrón estereotipado, repetido a través de toda la corteza. La esencial exactitud de sus observaciones ha sido

repetidamente confirmada, y el circuito neuronal que describió ha sido encontrado como una característica universal del cerebelo desde en los vertebrados más primitivos hasta en los más avanzados o superiores.

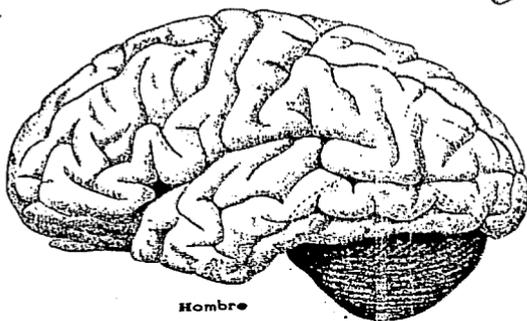
Una razón por la que el cerebelo sea tan bien comprendido hoy día, es la de que su organización es mucho más simple que la mayor parte del cerebro. El circuito básico de la corteza involucra sólo siete elementos nerviosos. Dos de ellos conducen impulsos nerviosos hacia adentro de la corteza (vía aferente): Las Fibras Trepadoras, originadas en la OLIVA INFERIOR y las Fibras Musgosas, las cuales son en su mayor parte las terminales de las fibras espinocerebelares y pontocerebelares. Otro sirve como la única vía eferente del sistema: El Axón de la célula de Purkinje. Los cuatro elementos nerviosos restantes son neuronas de asociación (GRANOS CEREBELOSOS, células de Golgi, células en Canasta y células Estrelladas).



Rana



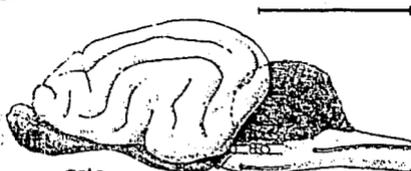
Cocodrilo



Hombre

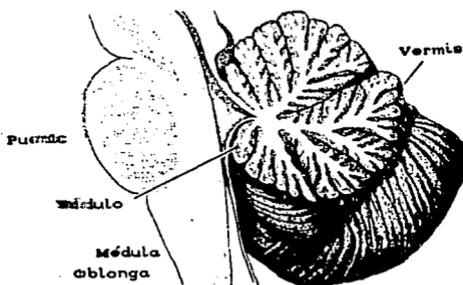
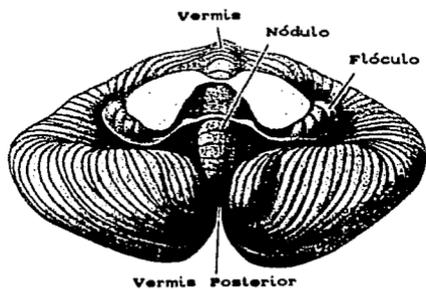


Ganso

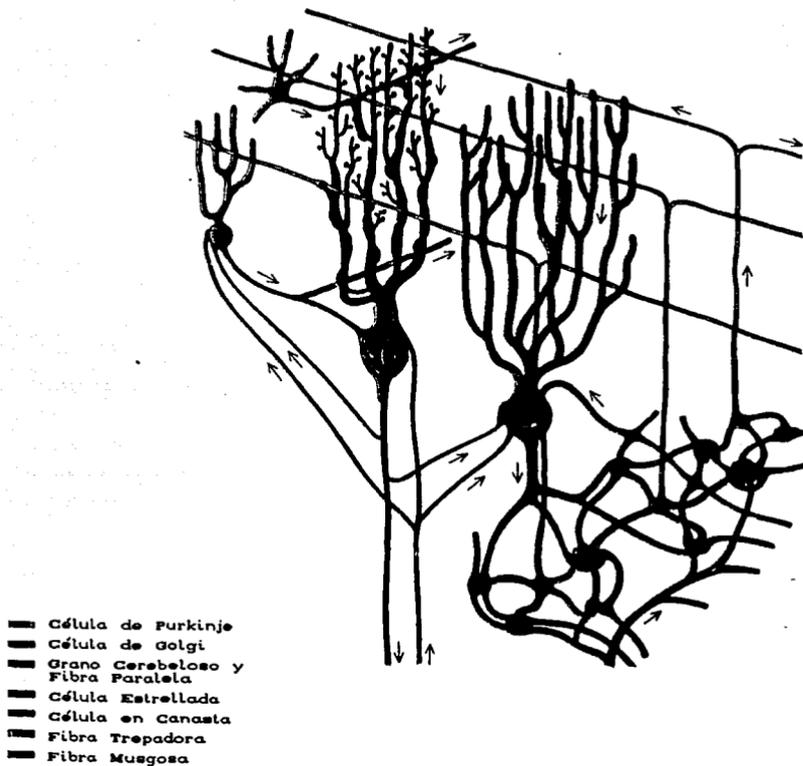


Gato

**EVOLUCION DEL CEREBELO.** Nótese el aumento de circunvoluciones con respecto a la escala filogenética.



**CEREBELO HUMANO** (Llinda, 1975).



INTERCONEXION DE NEURONAS EN LA CORTEZA CEREBELOSA, LA CUAL SIGUE UN PATRON ESTEREOTIPADO. (Llinda, 1975)

Cada célula de Purkinje está asociada con una sólo Fibra Trepadora. Dicha fibra termina en las espinas de la gran rama dendrítica de la célula de Purkinje y forma muchas uniones sinápticas con ella. La Fibra Trepadora también se ramifica hacia las células en Canasta y células de Golgi. Las Fibras Musgosas hacen contacto con las "garritas" terminales de las dendritas de los Granos Cerebelosos y con los axones de las células Golgi tipo II en una estructura llamada GLOMERULO CEREBELOSO. Los axones de los Granos se ponen en contacto con muchas células de Purkinje pero generalmente forma una sólo sinapsis con cada célula. Las células Estrelladas conectan con las Fibras Paralelas y con las dendritas de las células de Purkinje, las células en Canasta se ponen en contacto con las de Purkinje principalmente en el soma o cuerpo. La mayoría de las dendritas de la célula de Golgi forma uniones con las Fibras Paralelas pero algunas se unen a las Fibras Musgosas.

Las células de Purkinje son el elemento eje en la red neuronal de la corteza cerebelosa. Se les encuentra en toda la corteza, sus cuerpos constituyen una cubierta continua denominada capa de las células de Purkinje. Sus dendritas se extienden densamente por encima de esta capa, hacia el límite de la corteza; esta región se denomina Capa Molecular. Los axones se extienden en la dirección opuesta, hacia la porción profunda de la corteza denominada Capa Granulosa, y posteriormente salen de la corteza por completo, pasando por la sustancia blanca en el centro del cerebelo y eventualmente alcanzan bulbos aislados de sustancia gris denominados núcleos cerebelosos.

El arreglo aplanado y ordenado de las dendritas de las células de Purkinje determina la naturaleza y el número de contactos realizados con otros tipos celulares. Como ha sido puntualizado por Clement A. Fox (1967), las dendritas están organizadas como una red para "recibir" tantas señales arribantes como les sea posible. Las fibras orientadas de este modo de hecho constituyen uno de los sistemas aferentes en la corteza.

Así como la Fibra Trepadora genera muchas conexiones a una sólo célula de Purkinje, la Fibra Musgosa excita a muchas células de Purkinje, pero a través de unos pocos contactos con cada una de ellas. De todo el sistema nervioso central, las Fibras Musgosas estimulan al mayor número de células que son activadas por una sólo fibra aferente.

Las Fibras Musgosas no terminan directamente en las células de Purkinje, tal como lo hacen las Fibras Trepadoras, sino en interneuronas, denominadas GRANOS CEREBELOSOS, los cuales se localizan inmediatamente por debajo de la capa de las células de Purkinje. Los Granos Cerebelosos sirven como intermediarios, los cuales aumentan en una gran proporción el número de células de Purkinje estimuladas por una sólo fibra aferente. Una razón de que los Granos Cerebelosos pueden intersectar tantas células de Purkinje, es que son por ellos mismos numerosísimos. Valentino Britenberg (En: Llinás, 1975) ha calculado que el número de Granos Cerebelosos en la corteza cerebelosa humana puede ser 10 veces mayor que el número de células que, se creía, conformaban al cerebro entero.

El axón del grano se proyecta hacia arriba, pasa la capa de

células de Purkinje hacia la capa molecular. Ahí se divide en dos, y las dos ramas toman direcciones opuestas diametralmente, de modo que el axón asume la forma de una T mayúscula. Las fibras que representan la porción horizontal de la "T" son paralelas y ocupan todos los niveles de la capa Molecular.

El blanco sináptico mayor del grano cerebeloso son las dendritas de las células de Purkinje; sus otros blancos son las dendritas de las células de Golgi, las de Canasta y las Estrelladas. El neurotransmisor liberado por las fibras paralelas es de caracter EXCITATORIO: El aminoácido glutamato.

Las Fibras Paralelas se ponen en contacto con las células de Purkinje a través de numerosas espinas que emergen de la regiones terminales de las dendritas de las células de Purkinje, denominadas espinas dendríticas. La unión es formada entre la punta de una espina y una expansión globular de la Fibra Paralela.

Eccles, Sasaki y Llinás (En: Llinás, 1975) determinaron que tanto la Fibra Trepadora como la Musgosa son excitatorias. También el Grano Cerebeloso es considerado como estimulador.

Las células en Canasta y las células Estrelladas son consideradas interneuronas inhibitoras. Ambas reciben impulsos de las Fibras Paralelas y actúan, a través de sus axones sobre las células de Purkinje. Las primeras actúan a nivel de las dendritas bajas y en el soma y las segundas más bien están confinadas a las dendritas superiores. Sus axones son perpendiculares a las Fibras Paralelas.

El cerebelo de rata contiene aproximadamente  $1.1 \times 10^8$  granos cerebelosos cuyos cuerpos celulares miden de 5 a 6  $\mu\text{m}$ . de

diámetro. Las cortas dendritas de los granos residen en la capa granulosa, donde reciben aferencia de las fibras musgosas; uno de los dos caminos aferentes al cerebelo, como se mencionó anteriormente.

El citoesqueleto del grano cerebeloso ha llamado especial atención debido a las diversas fases morfológicas características, que sufre durante su migración. Los componentes citoesqueléticos son estructuras importantes en la división celular, la migración celular y en la formación de la compleja morfología neuronal. La biología celular del grano cerebeloso y su morfología característica cuando maduro involucra una compleja regulación de la composición y las interacciones entre los componentes que forman su citoesqueleto. La diferenciación de las prolongaciones del grano en sus axones o dendritas características requiere de la aparición de dos ensamblajes citoesqueléticos diferentes destinados para los axones o para las dendritas.

La idea de que los axones y las dendritas del grano cerebeloso tiene diferentes agregados citoesqueléticos comenzó con el hallazgo de Matus (1981): ciertas proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP) de alto peso molecular están presentes en los microtúbulos del cuerpo y las dendritas del grano pero no en los microtúbulos de las fibras paralelas. Trabajos posteriores han permitido establecer que estas proteínas asociadas (MAP) muestran una localización preferencial.

**DISTRIBUCION DIFERENCIAL DE LAS PROTEINAS CITOESQUELETICAS  
EN LOS GRANOS CEREBELOSOS**

<u>REGION CELULAR</u>	<u>PROTEINA CITOESQUELETICA</u>
FIBRA PARALELA	$\alpha$ - TUBULINA ACETILADA $\alpha$ - TUBULINA DETIROSINADA ESPECTRINA 240/295 POLIPEPTIDOS
CUERPO CELULAR	$\alpha$ - TUBULINA ACETILADA $\alpha$ - TUBULINA TIROSINADA $\alpha$ - TUBULINA DETIROSINADA MAP 1A MAP 2 ESPECTRINA 240/295 ESPECTRINA 240/295 E POLIPEPTIDOS
DENDRITA	$\alpha$ - TUBULINA TIROSINADA MAP 1A MAP 2 ESPECTRINA 240/295 E

En contraste un grupo de MAP de bajo peso molecular (polipéptidos) son muy abundantes en las fibras paralelas y aparentemente están ausentes en las dendritas y presentes en bajos niveles en los cuerpos de los granos cerebelosos.

Dichas modificaciones parece que están relacionadas de alguna manera en la especificación de las redes de microtúbulos estables y es posible que los microtúbulos de los axones de los granos sean mucho más estables que los microtúbulos de las dendritas. También, al parecer, las diferencias en la composición de los microtúbulos axonales y dendríticos están relacionadas con los componentes transportados, las interacciones entre microtúbulos y otros componentes citoesqueléticos o simplemente diferencias en los requerimientos estructurales para el mantenimiento de las largas fibras paralelas y a su muy pequeño diámetro, comparados con las dendritas cortas y anchas.

## LA GLANDULA SUPRARRENAL

Las glándulas suprarrenales son un par de masas aplanadas y amarillentas que, como su nombre lo señala, están en contacto con el borde superointerno de los riñones. La glándula derecha ocupa el espacio entre el riñón derecho y la vena Cava inferior. La glándula izquierda cubre la porción superior del borde interno del riñón izquierdo.

En el hombre cada glándula tiene unos 5 cm de largo, 3 a 4 cm de ancho y un poco menos de 1 cm de espesor. Están constituidas por una parte cortical y una medular, cada una con características estructurales y funcionales totalmente diferentes, así como un desarrollo embriológico distinto.

Se desarrolla la glándula a partir del mesodermo. Al avanzar el desarrollo embrionario, la masa original de células que comprende la corteza queda rodeada por una segunda masa de células derivadas del mismo sitio que la primera. La masa original que es la interna, forma lo que se conoce como corteza provisional o fetal de la glándula, y la segunda masa o externa integra la corteza permanente.

Las células que formarán la médula en cambio tiene un origen neuroectodérmico.

La corteza fetal queda dispuesta en cordones separados por vasos sanguíneos y su estructura global alcanza un alto grado de desarrollo en la vida fetal, formando sus células la mayor parte del tejido cortical que existe para esa etapa. Las células de la

corteza permanente no muestran un desarrollo tan extraordinario en ese momento. Sin embargo, después del nacimiento, la corteza provisional experimenta involución rápida. Al tener lugar ésta, comienzan a diferenciarse las células de la corteza permanente.

El hecho de que la corteza provisional muestre un desarrollo tan grande en el feto y después sufra involución en la vida extrauterina, es indicativo de que, a semejanza de la placenta, tiene una función especial en la vida intrauterina. Se sabe que la corteza suprarrenal se vuelve muy activa en la producción de corticosteroides durante la vida fetal. Aún más, en dicho lapso colabora funcionalmente con la placenta para producir estrógeno.

La corteza suprarrenal definitiva quedará compuesta de tres zonas conocidas como GLOMERULAR, FASCICULADA y RETICULAR, términos descriptivos que señalan la disposición de las células epiteliales secretoras.

En la zona glomerular, la más externa, las células son relativamente pequeñas y dispuestas en grupos más o menos esféricos. En la Fasciculada que es la más ancha y gruesa, las células son de mayor tamaño y vacuoladas, y están dispuestas en forma de columnas angostas de orientación radial, que en algunos sitios tienen una célula de espesor. En la zona reticular, la más interna, de espesor similar a la glomerular, los cordones de células un poco menores están dispuestos en forma de una red anastomótica irregular.

Las células epiteliales secretoras de las tres zonas están en íntima cercanía con capilares fenestrados. Por producir hormonas esteroides, todas contienen retículo endoplásmico liso notable.

En la zona fasciculada, además, hay una gran abundancia de gotitas de lípido que contienen ésteres de colesterol, precursores de las hormonas esteroides, lo que le da un aspecto vacuolado.

Se ha demostrado que las células en esta zona contienen cantidades considerables de ácido ascórbico. La corticotropina, si se administra en cantidades suficientes, hace que en estas células se agote en gran medida el colesterol y el ácido ascórbico.

Las células poseen mitocondrias abundantes que difieren de las formas típicas en que sus crestas son tubulares y no en "anaquel" (Ham, 1979).

## HORMONAS CORTICOSUPRARRENALES (CORTICOSTEROIDES)

La corteza suprarrenal con función apropiada (o en caso de deficiencia, la reposición a base de corticosteroides exógenos) es esencial para la vida, porque algunas de las hormonas esteroides que produce intervienen de manera importante para regular las actividades metabólicas del organismo.

La corteza suprarrenal produce dos clases importantes de hormonas esteroides, llamadas GLUCOCORTICOIDES y MINERALOCORTICOIDES. Además también se producen cantidades pequeñas de hormonas sexuales.

El principal glucocorticoide es el CORTISOL también conocido como Hidrocortisona. En la rata el glucocorticoide más importante es la corticosterona.

El cortisol actúa como una hormona catabólica en el metabolismo de proteínas; en el hígado estimula la conversión de proteínas a carbohidratos. El cortisol y la insulina hacen que los hepatocitos acumulen glucógeno, llevando cada una a cabo mecanismos muy diferentes para ejercer dicho efecto. La insulina, producida en los Islotes de Langerhans del páncreas, hace que los hepatocitos almacenen glucosa sanguínea en forma de glucógeno; por lo tanto la actividad insulínica disminuye la glucemia. Por otra parte, el cortisol produce carbohidratos a partir de proteínas o sus precursores, por lo que estimula la síntesis de glucógeno en los hepatocitos, sin utilizar la glucosa sanguínea y, de este modo, no disminuye la glucemia. Su acción en la formación de

carbohidratos a partir de proteínas acrecenta en la sangre la cantidad de glucosa, con lo que aumenta la glucemia. La insulina tiene así un efecto antidiabetógeno, porque tiende a aminorar la glucemia y el cortisol tiene un efecto diabetógeno al producir hiperglucemia. Los dos efectos están equilibrados, pero en caso de faltar una u otra hormona, se manifiestan los efectos de la contraria. Sin cortisol, el sujeto muere por hipoglucemia, es decir, disminuye la glucosa en la sangre, por la producción inadecuada de glucosa en el hígado.

El efecto catabólico del cortisol también se manifiesta por su acción en el tejido linfático. La administración de dosis farmacológicas de la hormona hace que disminuya rápidamente el tamaño de las poblaciones de linfocitos de timo, bazo y otros tejidos linfáticos. El cortisol inhibe la síntesis de DNA y con ello la mitosis, por lo que el agotamiento de los depósitos de linfocitos en gran parte depende de un decremento en el recambio rápido de las poblaciones de dichas células en tales depósitos.

El cortisol ejerce efectos inhibitorios en la síntesis proteínica con lo que disminuye la producción de linfocitos T citotóxicos, plasmacitos y anticuerpos. Posee potente acción inmunosupresora.

Por otra parte el cortisol es útil porque alivia reacciones inflamatorias y suprime respuestas alérgicas. Sin embargo, actúa en las manifestaciones y no en la causa del trastorno, por lo que se utiliza para anular la inflamación aguda en situaciones en que este cuadro es esencial para superar una infección. Un efecto observado de la administración de cortisol es que hace que los

eosinófilos salgan de la circulación y penetren en el tejido conectivo laxo, produciendo eosinopenia.

Otros dos efectos importantes del cortisol son que (1) altera la distribución y eliminación de agua, por diversos mecanismos y (2) retarda la cicatrización de heridas, por el efecto supresor en la proliferación de fibroblastos.

El cortisol constituye la principal señal de retroalimentación que suprime la secreción de corticotropina de la hipófisis. (Ham, 1979)

#### REGULACION DE LA SECRECION DE CORTISOL

El cortisol es secretado por la zona FASCICULADA, haciendo la zona RETICULAR una pequeña contribución a su síntesis. Su secreción es regulada por retroalimentación negativa en que participan las células corticotropas de la adenohipófisis. Cuando disminuyen los niveles sanguíneos de la hormona, las células corticotropas reaccionan y secretan más corticotropina, lo que estimula una mayor producción de cortisol por la corteza suprarrenal. En esta situación, los niveles crecientes de cortisol suprimen la producción de corticotropina de las células corticotropas. El ciclo de actividad secretora guarda relación con las horas de sueño y vigilia no correspondiendo obligadamente con horas del día o de la noche. Dicha variación diurna es regulada además por el factor liberador de corticotropina del hipotálamo.

Los efectos de la corticotropina en la corteza suprarrenal

son de dos clases generales. En primer lugar, es esencial para conservar la masa de la corteza; de este modo, después de una hipofisectomía, o en respuesta a la inhibición retroalimentaria duradera por parte del cortisol, la corteza se adelgaza notablemente por depleción substancial de la zona fasciculada, principalmente la administración de ACTH restaura el espesor normal de esta zona y también su función adecuada, en términos de la producción de cortisol. Por lo tanto la corticotropina es la encargada de conservar la magnitud de la población de células epiteliales secretoras de la corteza suprarrenal.

El segundo efecto general de la corticotropina sobre la corteza suprarrenal es su efecto estimulante en la secreción hormonal, promoviendo un incremento en la producción de cortisol por las zonas fasciculada y reticular (Ham, 1979).

#### CARACTERES QUIMICOS

La corticosterona tiene en su molécula 21 átomos de carbono. Es un derivado del Pregnano. Su nombre sistemático es 4-pregneno-11-( $\beta$ ), 21-diol-3,20-diona. Posee doble ligadura en C4-5; grupo cetónico (C=O) en C-3 (esto es: un grupo cetónico  $\alpha,\beta$ -insaturado) y un grupo cetónico en C20.



Sus características estructurales tienen una influencia notable en la actividad biológica:

1. Un radical hidroxilo (OH) en C21 aumenta la retención de sodio y es indispensable para la activación en el metabolismo de los carbohidratos.
2. La presencia de Oxígeno en forma de -OH, en el carbono 11 es indispensable para su actividad con relación a los carbohidratos y disminuye la retención de sodio.

Fundándose en estas relaciones entre la estructura y la actividad biológica a la corticosterona tanto como al cortisol o hidrocortisona se les denomina y clasifica como corticosteroides 11-oxigenados u 11 oxiesteroides, debido a que como se mencionó poseen Oxígeno en posición C11, con actividad en el metabolismo de los carbohidratos y proteínas y efecto relativamente secundario en el metabolismo de electrolitos y agua.

Se puede presentar en dos estados fisicoquímicos: unida a proteínas y no unida. Si su concentración en el plasma es normal, está unida a globulinas  $\alpha$  (transcortinas). A mayores concentraciones, 70-80% del incremento está unido a albúmina; el resto no se combina.

Además de facilitar el transporte de este esteroide en un medio acuoso, la unión con proteínas limita su actividad a nivel celular al restringir su difusión a través de las paredes capilares. Por el mismo mecanismo se las protege de la inactivación metabólica excesivamente rápida.

Aún así, las hormonas corticosuprarrenales experimentan

rápida modificaciones en el organismo y pierden por tanto su actividad biológica.

Durante su excreción la corticosterona experimenta reducción, lo que origina trihidroderivados y tetrahidroderivados de C<sub>21</sub>, que carecen de actividad biológica por haber perdido el agrupamiento 3-cetona  $\alpha,\beta$ -insaturado en el anillo A.

Los estudios de la sangre de la vena suprarrenal indican que los productos corticosteroides más importantes en los mamíferos son cortisol, corticosterona y aldosterona. En el ser humano, el cortisol es el glucocorticoide principal (corticosterona en roedores), y la aldosterona el mineralocorticoide más importante (Cantarow, 1964).

El interés por los glucocorticoides inicialmente fue neurofarmacológico, debido a que se observaban frecuentemente manifestaciones epileptiformes y desórdenes psiquiátricos en humanos, cuando éstos producían hiper o hipofuncionamiento de las glándulas suprarrenales (i.e. Enfermedad de Cushing; Enfermedad de Addison). También se observaron desórdenes o alteraciones similares en pacientes tratados con dosis altas de glucocorticoides para una diversidad de padecimientos no endocrinos.

Durante algún tiempo se realizaron intensas investigaciones neurofisiológicas relacionadas con la acción del cortisol y los glucocorticoides sintéticos sobre las neuronas hipotalámicas, con el propósito de dilucidar el mecanismo que regula el control del eje hipotálamo-hipofisiario-adrenal. En la década pasada, el interés por los efectos principales de los glucocorticoides se

renovó, debido esencialmente al hecho demostrado del elevado nivel de cortisol (hidrocortisona) en el plasma de individuos que padecen depresión endógena. Unido al hecho de que pueden ocurrir desórdenes del área afectiva, como un efecto colateral de una intensa terapia con glucocorticoides, ha sido considerado el papel del cortisol en la patofisiología de enfermedades depresivas, realizándose por ello un sinnúmero de estudios sobre la acción neurofisiológica y neuroquímica de los glucocorticoides.

Una razón adicional para investigar los efectos de los glucocorticoides sobre la función del Sistema Nervioso Central (SNC), concierne a la extensa, aunque aún empírica, terapia en la que interviene el uso de glucocorticoides, en el trauma del SNC y en Stroke, así como en el tratamiento de enfermedades que se presentan en el período gestacional de la mujer y en infantes recién nacidos.

La necesidad de comprender los mecanismos de la probable acción terapéutica es indispensable con el objeto de que el tratamiento con esteroides sea adecuadamente racionalizado (Hall, 1982).

## JUSTIFICACION

En el desarrollo del Sistema Nervioso Central, la corticosterona tiene un papel muy importante debido a que se requieren niveles apropiados de hormonas corticoides para la diferenciación y el crecimiento de las neuronas, la excrecencia axonal y dendrítica y el número adecuado de contactos sinápticos.

El uso frecuente de corticoides para el alivio de padecimientos inflamatorios o alérgicos y el requerimiento de ciertos niveles de éstos para el desarrollo normal del Sistema Nervioso Central (Bohn, 1978, 1980; Gremo, 1984; Lauder y Krebs, 1984; Oda y Huttenlocher, 1974; Sandquist, 1978; Schappiro, 1968, 1973; Stastny, 1973, 1986) ha estimulado el estudio de sus efectos en el desarrollo de las células nerviosas.

El cerebelo ha sido elegido por neurobiólogos del desarrollo debido a su estructura laminada, la presencia de un número limitado de tipos celulares neuronales y el conocimiento detallado de las transformaciones morfológicas que ocurren durante el desarrollo. Esto lo hace un modelo ideal para el estudio de los mecanismos básicos relacionados con la diferenciación neuronal.

Los granos cerebelosos han sido un foco particular de estudio debido a que tienen un acomodo ordenado y secuencial de sus axones, las fibras paralelas, en la capa Molecular del cerebelo. Sus rutas de migración a posiciones específicas en la corteza, sus patrones distintivos de diferenciación y crecimiento así como su sinaptogénesis no se llevan a cabo en forma azarosa sino siguen un horario invariante y preciso. Es por ello que en el presente

trabajo se han elegido como un modelo que permite observar postnatalmente su grado de diferenciación en los animales tratados con corticosterona y controles estudiados.

La aplicación prenatal de corticosterona en la última semana de gestación, produce en el cerebelo de rata en desarrollo, modificaciones relacionadas con el patrón de diferenciación celular, ocasionando disminución temprana del grosor de la capa granulosa externa, aumento en el grosor de la capa Molecular y también aumento de los niveles totales de proteínas, siendo esto más aparente a los 12 días de edad (Velázquez, 1987).

El objeto de este estudio es conocer por medio de la Técnica de Impregnación Argéntica, la única que proporciona la información más completa sobre la morfología neuronal, si existe alguna modificación tanto numérica como en la diferenciación de los granos cerebelosos en ratas tratadas prenatalmente con corticosterona.

## OBJETIVO GENERAL

REALIZAR LA VALORACION ESTRUCTURAL, NUMERICA Y DE LOCALIZACION DE LOS GRANOS DE LA CORTEZA CEREBELOSA EN RATAS TRATADAS PRENATALMENTE CON CORTICOSTERONA A PARTIR DE CORTES IMPREGNADOS CON LA TECNICA DE GOLGI-KOPSCH.

## HIPOTESIS

Si los glucocorticoides son capaces de producir cambios en la función celular, entonces producirán alteraciones metabólicas, morfológicas y/o numéricas, en la población de Granos Cerebelosos, algunas de la cuales podrán ser evaluadas con las técnicas de Impregnación Argéntica, sabiendo que existe relación entre el metabolismo celular y la apetencia por la plata. -

## MATERIAL Y METODO

## MATERIAL Y METODO

Se utilizaron 30 ratas cepa Wistar, 20 machos y 10 hembras, las cuales fueron solicitadas al Bioterio Central de la Facultad de Medicina, UNAM. Las hembras con un peso de 250 grs. y los machos de 300 grs, con una edad aproximada de 3 meses; tuvieron libre acceso al agua y al alimento. Se permitió que se ambientaran por una noche a la estación de Bioterio del Departamento de Histología, que fue en donde se realizó esta parte práctica del experimento. Para asegurar el apareamiento se mantuvieron 2 hembras y un macho en cada jaula (standard).

Para poder registrar con exactitud el inicio de la gestación el control se llevó a cabo de la siguiente manera:

**Citología Vaginal.** Se tomaron muestras diariamente con cánulas (jeringas para insulina acondicionadas con una punta de Tubo Médico de Polietileno con un diámetro de 1.40 mm. y un largo de 3.5 cm. flameadas y redondeadas, desinfectadas en benzal). La citología se realizó por medio de la inyección de 0.2 ml de solución salina isotónica a la vagina. La muestra obtenida se colocó en portaobjetos y cubreobjetos desengrasados y limpios. Se observaron con la Técnica Microscópica de Contraste de Fases.

El inicio de la gestación se determinó cuando las observaciones revelaron una imagen de estro ó proestro con la presencia de espermatozoides y posteriormente una imagen de diestro durante todo el proceso de gestación.

Control de Peso. Se pesaron las hembras en una balanza granataria en un recipiente acondicionado a su tamaño, comenzando en el momento en que salieron de el Bioterio Central y diariamente hasta el día 17 de gestación, fecha en la que se comenzó el tratamiento a las experimentales. El aumento de peso fué gradual durante toda la gestación y en los últimos días también se podían palpar los fetos en el vientre.

Las condiciones de temperatura, ciclos luz/obscuridad y el libre acceso al agua y alimento, fueron las mismas para los grupos tratados con corticosterona y para los controles.

#### Tratamiento.

A las ratas madre experimentales se les aplicó la Corticosterona por vía intraperitoneal (2  $\mu$ g./gr. de peso corporal) diluida en etanol-propilenglicol-agua, tal como se describe en el apéndice 1. A los controles de propilenglicol se les inyectó la misma cantidad de solución (vehículo), preparada de igual manera y proporción, únicamente sin la adición de la hormona. Así mismo a los controles normales no se les aplicó solución alguna. Las inyecciones en su caso se realizaron cada 24 horas, en la última semana de gestación (días 17, 18 y 19).

En el momento del nacimiento, se ajustaron las camadas a 6 animales por camada, con la intención de que los grupos controles y tratados tengan las mismas condiciones medioambientales y de alimentación.

Se consideraron 3 lotes de ratas, uno experimental (con la aplicación prenatal de corticosterona) y dos controles (Control con la aplicación prenatal de Propilenglicol y Control Normal).

Cada lote está formado por 15 ratas:

5 Recién Nacidas

5 de 6 Días de Edad

5 de 12 Días de Edad

Se distribuyen las muestras de la siguiente manera:

5 0d Ex	5 6d Ex	5 12d Ex
5 0d CP	5 6d CP	5 12d CP
5 0d CN	5 6d CN	5 12d CN

Donde      Ex = Experimental  
            CP = Control Propilenglicol  
            CN = Control Normal

Se sacrificaron por decapitación con el objeto de que el Tejido Nervioso no sufriera alteraciones por la acción de algún agente químico que llegue al Sistema Nervioso como Eter o Cloroformo.

Se disecó el encéfalo cortando la piel de atrás hacia adelante hasta la nariz, se hizo una incisión en el cráneo entre los ojos cortando por la línea media hacia atrás y posteriormente lateralmente hasta los oídos, lo cual permite desarticular esta parte del cráneo. Una vez expuesto se cortan los lóbulos ópticos y se desprende completo el encéfalo desde la parte anterior a la posterior. Se colocaron en solución salina balanceada. Se dividieron los encéfalos en dos mitades iguales

TABLA 1. Número de células impregnadas por unidad de área ( $\text{mm}^2$ ) en cortes sagitales de Cerebelo de rata a los 0 días de edad.

GRUPOS	FASES DE MADURACION											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TESTIGO	24.5	5.5	1.8	0.6	2.8	3.0	6.7	2.2	0	0	0	0
PROPILENGLICOL	32.7	11.3 <sup>1</sup>	2.3 <sup>2</sup>	0.6	5.1	2.1	2.3	2.8	0	0	0	0
CORTICOSTERONA	13.2	1.3	0.6	0.3	3.3	6.6	1.6	0	0	0	0	0

Los resultados están representados en  $\bar{x}/\text{mm}^2$  ;  $n=5$

1  $p = .008$  en ANOVA

2  $p = .029$  en ANOVA

(2 hemisferios) con navaja de afeitar; el corte pasa por el Vermis del cerebelo.

Después de este proceso se sumergieron en Gelatina al 10% en solución acuosa para evitar que el precipitado grueso de Cromato de Plata se depositara directamente sobre el tejido, ya que de todas formas penetra bien la solución de plata.

Posteriormente se impregnaron las muestras.

#### MODIFICACION A LA TECNICA DE GOLGI - KOPSCH

(Rugerio, C. y Rivas, P., 1989)

1. Endurecer el tejido durante 8 días de 21°C a 26°C (Temperatura ambiente del Laboratorio) en la SOLUCION FIJADORA DE GOLGI-KOPSCH

En 10 ml. de esta solución se coloca un encéfalo de 0 y 6 días de nacido y para guardar la proporción tejido-fijador, al de 12 días se le hace un corte frontal en la parte media del cerebro, la que se elimina; se fija la porción que contiene al cerebelo.

2. Lavar en Agua Bidestilada. Dos pasos en caja de Petri, para eliminar el exceso de fijador.

3. Impregnar en 10 ml de Nitrato de Plata al 0.75% durante 6 días a temperatura ambiente en la obscuridad. (En frasco vial cubierto con papel aluminio).

4. Lavar en Agua Bidestilada, 2 pasos. Eliminar con un pincel suave el exceso de precipitado en el primer paso.

5. Deshidratar en alcoholes graduales de 50, 60 y 70% durante 5 minutos en cada uno. Dejarlo en Alcohol de 70% y pasarlo al Histoquinet.

6. Incluir en parafina.

Las muestras se cortaron en microtomo de deslizamiento a 60  $\mu\text{m}$  de grosor.

Se hicieron 12 cortes seriados y se eligieron aquellos que fueran equivalentes y correspondieran al mismo nivel en las distintas muestras.

En los cortes seleccionados se contaron las diferentes fases de desarrollo de los Granos Cerebelosos.

El conteo se realizó en toda el área del corte, la cual se determinó por digitalización en un digitalizador HP-9874A incorporado a una computadora Hewlett-Packard modelo 9825T.

El estudio estadístico se realizó por medio del Análisis de Varianza (ANOVA) para un diseño completamente aleatorio (Comparaciones Múltiples por el Método de Bonferroni).

## RESULTADOS

## RESULTADOS

### 0 DIAS DE EDAD

Fases observadas (células impregnadas):

Grupos:	Testigo	}	1 - 8
	Vehículo		
	Tratado	}	1 - 7

No hubo impregnación de las Fases 9-12 en ninguno de los 3 grupos.

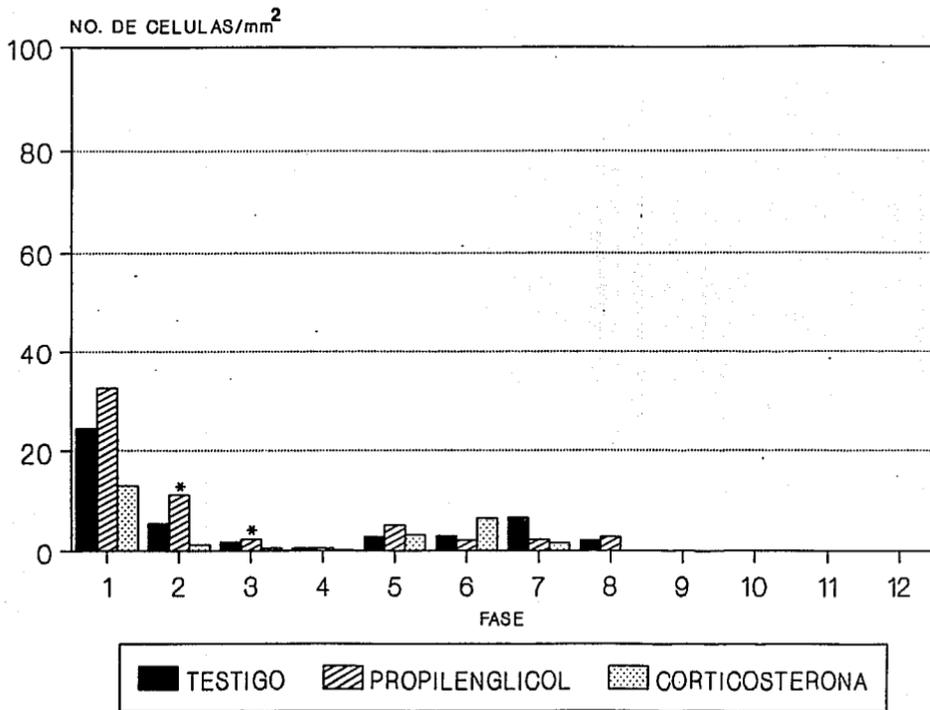
En general hubo un mayor número de células impregnadas en el Grupo Testigo que en el Tratado con excepción de las Fases 5 y 6 en las que la relación se invirtió.

Se encontraron diferencias significativas en 2 fases con respecto a la cantidad de células impregnadas:

Fase 2	donde	Grupo Propilenglicol $\neq$
		Grupos Testigo y Corticosterona ( $p < 0.05$ )
Fase 3	donde	Grupo Propilenglicol $\neq$
		Grupos Testigo y Corticosterona ( $p < 0.05$ )

En ambas fases hubo una mayor impregnación en el Grupo del Vehículo.

# GRANOS CEREBELOSOS. Fases de Maduracion 0 DIAS



\* P < 0.05

GRAFICA 1



FASE 10 donde Grupos Testigo y Propilenglicol  $\neq$   
Grupo Corticosterona ( $p < 0.01$ )  
Se encontró un mayor número de células en el Grupo  
Tratado.

FASE 11 donde Grupos Testigo y Propilenglicol  $\neq$   
Grupo Corticosterona ( $p < 0.001$ )  
Se encontró un mayor número de células en el Grupo  
Tratado.

El resto de las fases no mostraron significancia y el número de células impregnadas fue similar en dichas fases entre el Grupo Tratado y Testigo. Sin embargo en el Grupo de Propilenglicol se observa una mayor impregnación en la Fase 7 de desarrollo.

TABLA 2. Número de células impregnadas por unidad de área ( $\text{mm}^2$ ) en cortes sagitales de Cerebelo de rata a los 6 días de edad.

GRUPOS	FASES DE MADURACION											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TESTIGO	6.2	5.6	3.1	2.1	54.4 <sup>2</sup>	3.3	1.3	3.6	21.3 <sup>3</sup>	3.5	0.05	0
PROPILENGLICOL	5.6	5.7	5.4	3.6	11.6	2.7	12.7	4.6	6.3	1.5	0.07	0
CORTICOSTERONA	37.6 <sup>1</sup>	4.6	2.9	1.6	8.7	4.3	4.0	2.4	3.1	14.3 <sup>4</sup>	1.08 <sup>5</sup>	0.03

Los resultados están representados en  $x/\text{mm}^2$ ;  $n=5$

1  $p = .0009$  en ANOVA

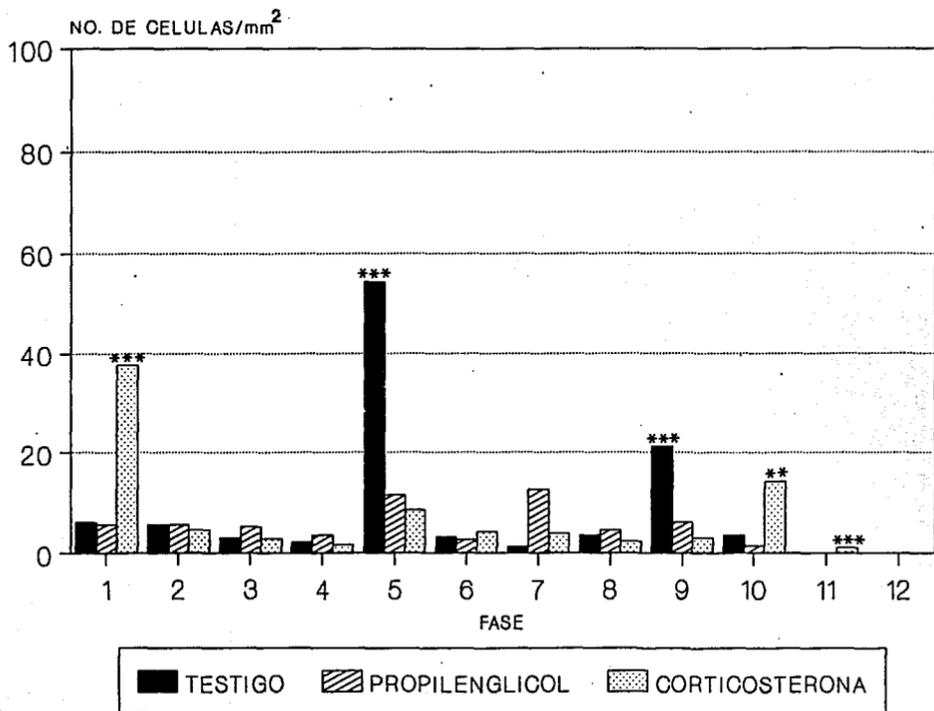
4  $p = .003$  en ANOVA

2  $p = .0001$  en ANOVA

5  $p = .0002$  en ANOVA

3  $p = .0004$  en ANOVA

## GRANOS CEREBELOSOS. Fases de Maduración 6 DIAS



\*\* P < 0.01  
\*\*\* P < 0.001

GRAFICA 2

## 12 DIAS DE EDAD

Fases observadas (células impregnadas):

Grupos:	Testigo	}	1 - 12
	Vehículo		
	Tratado		

La significancia se manifiesta en la:

FASE 10 donde Grupo Propilenglicol  $\neq$  Grupos Testigo y  
Corticosterona ( $p < 0.05$ )

Se encontró un mayor número de células en el Grupo del Vehículo.

En el resto de las fases no se encontraron diferencias significativas en esta edad. Sin embargo se observó una mayor impregnación en el Grupo Testigo principalmente en la Fase 1 y de la Fase 6 a la 12 con respecto al Grupo Tratado. De las Fases 2 - 5 esta relación se invierte.

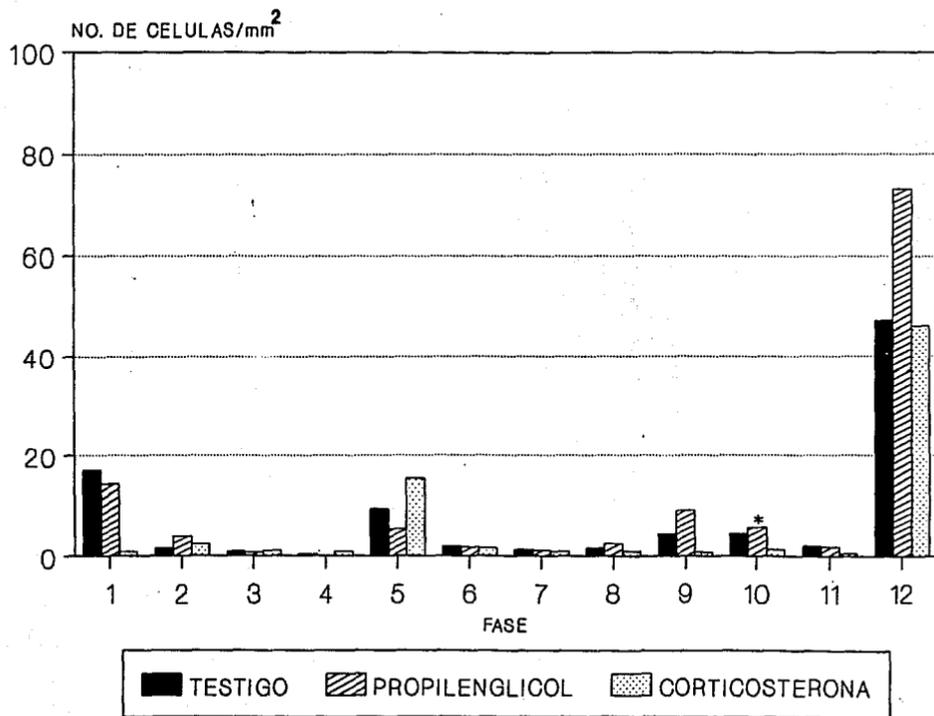
TABLA 3. Número de células impregnadas por unidad de área ( $\text{mm}^2$ ) en cortes sagitales de Cerebelo de rata a los 12 días de edad.

GRUPOS	FASES DE MADURACION											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
TESTIGO	17.1	1.6	0.9	0.4	10.1	2.0	1.3	1.7	4.6	4.7	2.0	47.2
PROPILENGLICOL	14.4	4.3	0.8	0.1	5.9	1.8	1.2	2.6	9.7	6.0 <sup>1</sup>	1.9	73.3
CORTICOSTERONA	0.9	2.5	1.2	1.0	15.6	1.6	1.0	0.9	0.7	1.3	0.6	46.1

Los resultados están representados en  $\bar{x}/\text{mm}^2$  ; n=5

1 p = .025 en ANOVA

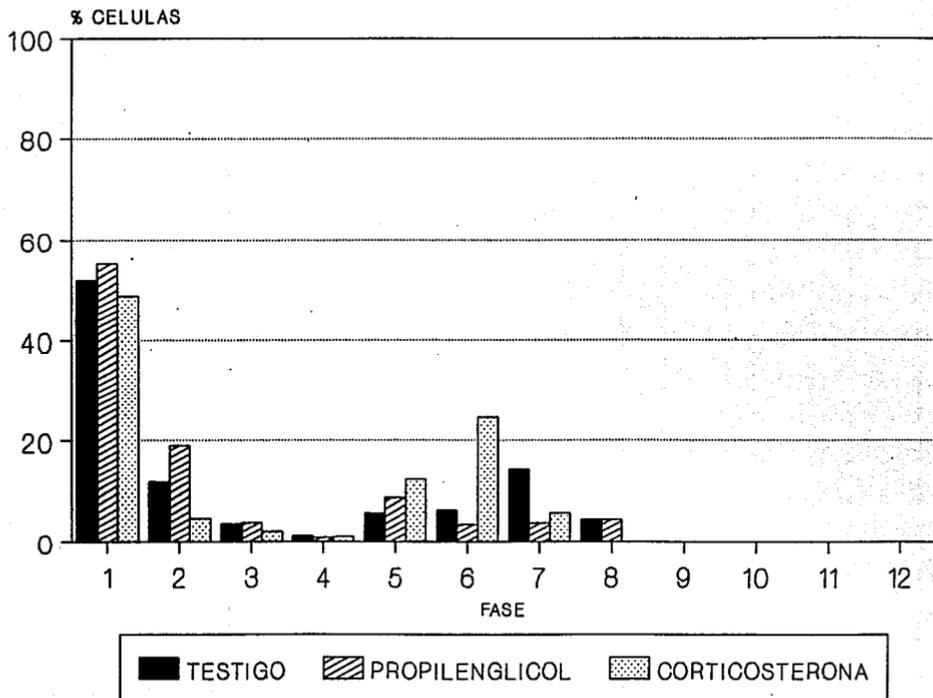
# GRANOS CEREBELOSOS. Fases de Maduración 12 DIAS



\* p < 0.05

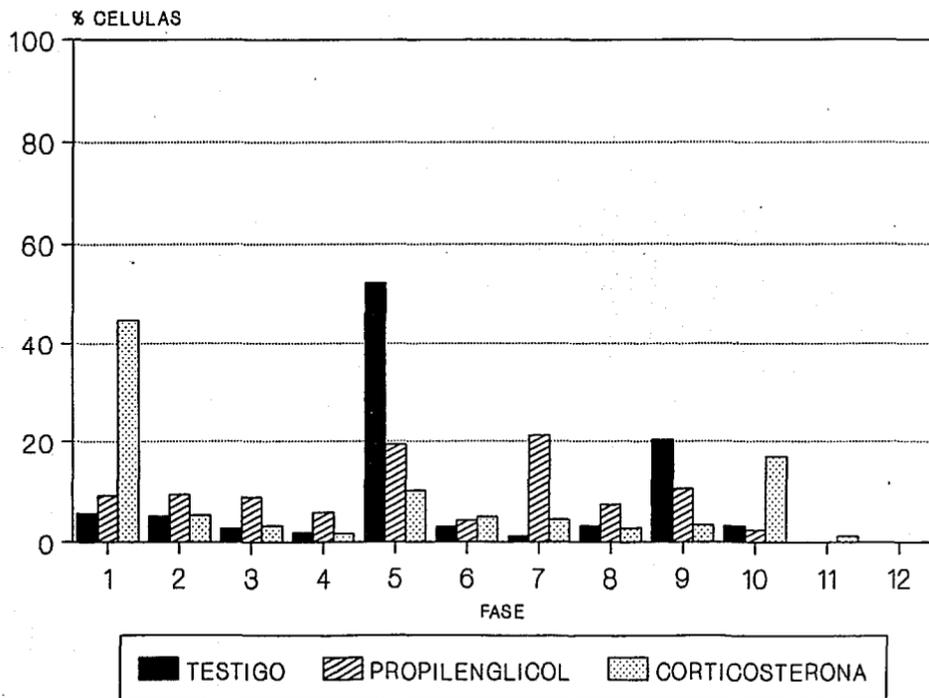
GRAFICA 3

# GRANOS CEREBELOSOS. Fases de Maduración 0 DIAS



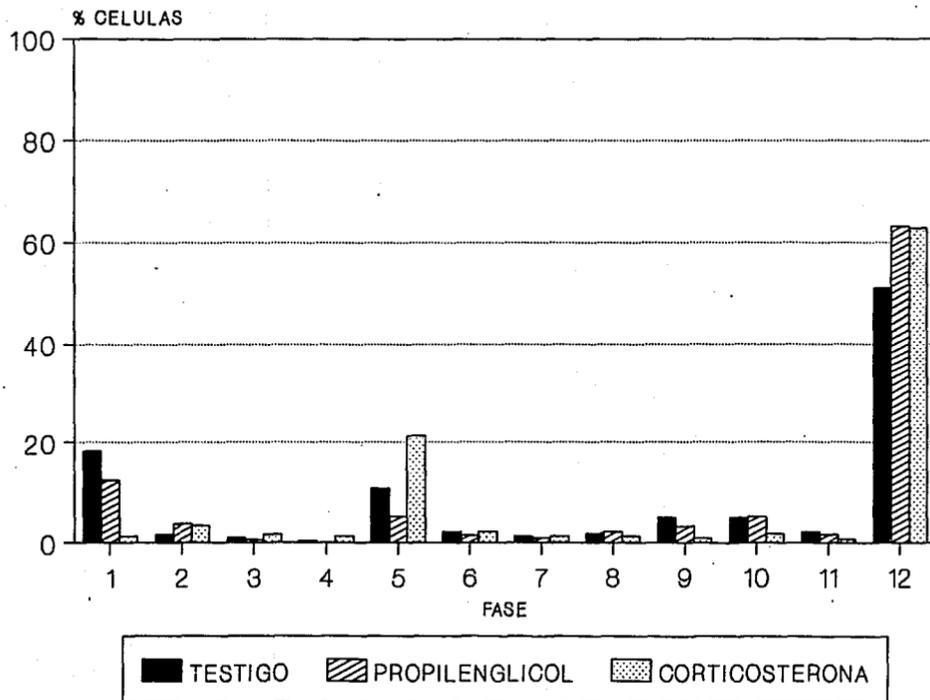
GRAFICA 4

## GRANOS CEREBELOSOS. Fases de Maduración 6 DIAS



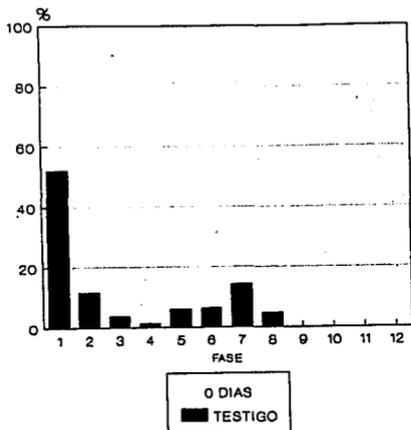
GRAFICA 5

# GRANOS CEREBELOSOS. Fases de Maduracion 12 DIAS

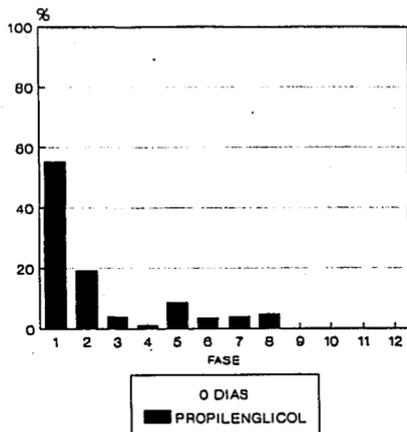


GRAFICA 6

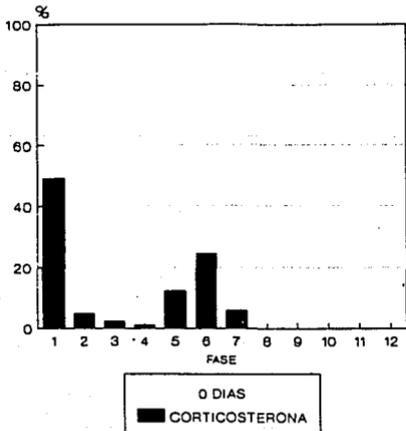
**GRANOS CEREBELOSOS.  
FASES DE MADURACION**



**GRANOS CEREBELOSOS  
FASES DE MADURACION**



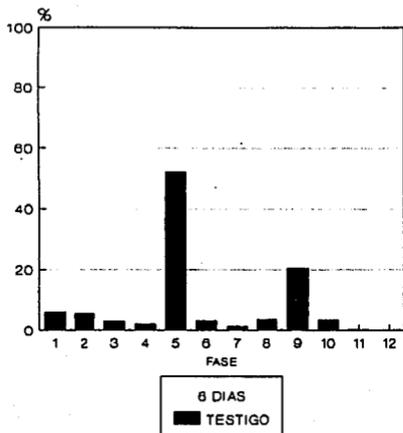
**GRANOS CEREBELOSOS  
FASES DE MADURACION**



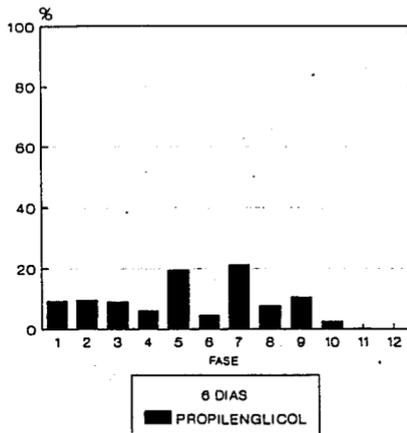
**GRAFICAS QUE MUESTRAN EL  
PORCENTAJE DE CELULAS IM  
PREGNADAS POR FASE A LOS  
0 DIAS DE EDAD EN LOS 3  
DIFERENTES GRUPOS.**

**GRAFICA 7**

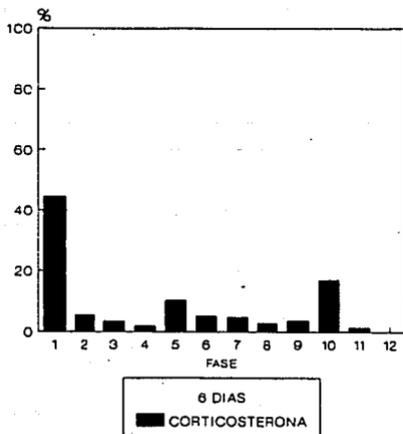
**GRANOS CEREBELOSOS  
FASES DE MADURACION**



**GRANOS CEREBELOSOS  
FASES DE MADURACION**



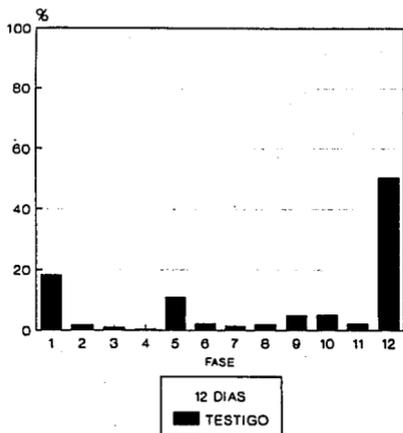
**GRANOS CEREBELOSOS  
FASES DE MADURACION**



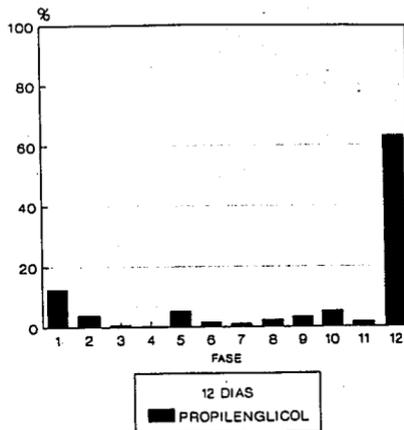
**GRAFICAS QUE MUESTRAN EL PORCENTAJE DE CELULAS IMPREGNADAS POR FASE A LOS 6 DIAS DE EDAD EN LOS 3 DIFERENTES GRUPOS.**

**GRAFICA 8**

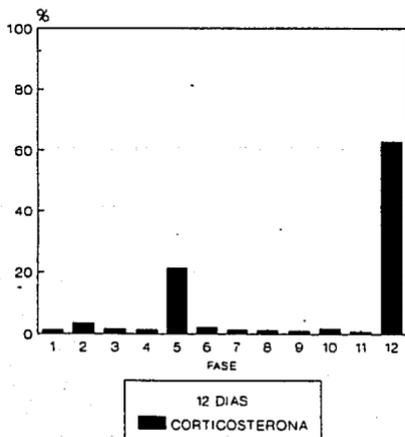
**GRANOS CEREBELOSOS  
FASES DE MADURACION**



**GRANOS CEREBELOSOS  
FASES DE MADURACION**



**GRANOS CEREBELOSOS  
FASES DE MADURACION**



**GRAFICAS QUE MUESTRAN EL PORCENTAJE DE CELULAS IM PREGNADAS POR FASE A LOS 12 DIAS DE EDAD EN LOS 3 DIFERENTES GRUPOS.**

**GRAFICA 9**

## DISCUSION

## DISCUSION

"En embriones de mamífero a las células nerviosas se las observa con tímidos ensayos de creación de expansiones, frecuentemente rectificadas y hasta reabsorbidas. Posteriormente se observa la organización definitiva del axón y dendritas. Esto último aclaró la concepción mono-celular del crecimiento continuo del axón y demás expansiones neuronales. En relación con esto, un curioso fenómeno de emigración y metamorfosis, en virtud de irresistibles impulsos y a pesar de los mayores obstáculos, ofrecen los granos jóvenes o indiferenciados del cerebelo de los mamíferos recién nacidos." (Cajal, 1981).

En el presente estudio se pudo observar, en todos los casos, que se llevó a cabo el fenómeno de migración de los granos cerebelosos. Así mismo, se pudieron identificar las distintas etapas morfológicas descritas originalmente por Santiago Ramón y Cajal (1890). Se localizó al grano joven o indiferenciado (FASE GERMINAL) en la zona superficial del cerebelo (CAPA GRANULOSA EXTERNA SUPERFICIAL) con forma poliédrica irregular (FOTOMICROGRAFIA (FM) D), posteriormente el grano sale de este estado indiferente para tornarse primeramente en bipolar horizontal, es decir emitiendo dos largas expansiones contrapuestas que marchan en dirección de las láminas cerebelosas (FM G): después, del lado profundo del soma, proyecta la célula una expansión descendente, que atrayendo hacia sí buena parte del protoplasma, incluyendo al núcleo, transformó a la célula de bipolar horizontal en bipolar radial o vertical (FM H - K).

Finalmente, con el arribo laborioso del soma a las regiones profundas, coincidió la aparición de las finas dendritas (FM L - N) y el modelamiento definitivo del grano cerebeloso maduro (FM O).

Todas estas particulares evoluciones parecen estar regidas por un protocolo basado en tiempos de ocurrencia precisos que demuestran que estos eventos no se llevan a cabo de ninguna manera en forma azarosa, sino siguen un horario definido (Jacobson, 1978). Dichas evoluciones parecen encaminadas a fijar, sobre las partes correspondientes de las dendritas de las células de Purkinje, la posición de las fibras paralelas. Se puede notar que las primeras expansiones del grano en fase bipolar tangencial no son otra cosa que las delicadas ramas terminales del futuro cilindroeje (fibras paralelas), de tal modo que la diferenciación axonal precede a la de las dendritas (Llinás, 1975).

## 0 DIAS

Se observa en el Grupo Control un fenómeno de migración que coincide con lo reportado por Cajal, 1890 y por Burgoyne, 1988. Se encontraron células impregnadas que abarcaron de acuerdo a su estructura morfológica y a su localización de las Fases 1 a la 8, ubicándose al mayor número de células impregnadas en la Fase 1, la cual se considera que se encuentra en etapa proliferativa, decreciendo en número en las Fases 2, 3 y 4. Después en la Fase 5 se observó con respecto a la Fase 4 un nuevo incremento en número, el cual fue ascendiendo hasta la Fase 7 y un menor número de células impregnadas en la Fase 8 con relación a la 7 (GRAFICA 1).

Se piensa de acuerdo con Altman, 1972, que las células que corresponden a las Fases de la 5 - 7 se encuentran en una etapa de expansión de su cilindroeje permaneciendo por un tiempo sin migrar a etapas posteriores. Por otro lado las células impregnadas correspondientes a la Fase 8 representan a las primeras células que continúan su ruta migratoria después de haber llevado a cabo dicha expansión.

En el Grupo Tratado con Corticosterona se observa prácticamente el mismo fenómeno de migración que en el Grupo Control. La relación que guarda la Fase 1 con las Fases 2, 3 y 4 es la misma que en el Control, una mayor cantidad de células impregnadas en la Fase 1 y un decremento en las siguientes 3 Fases. Después le sigue un aumento en la Fase 5. Sin embargo existe un retraso en el Grupo Tratado debido a que hay un mayor

número de células impregnadas en la Fase 6 similar a la Fase 7 Control, y con un menor número de células en la Fase 7, similar a la Fase 8 Control. Esto se argumenta como retraso debido a que no se encontraron células en la Fase 8 ni en las posteriores que hubiesen indicado una migración temprana con respecto al Grupo Control; obsérvese en las Gráficas 1 y 4, que en general el Grupo Tratado muestra menor número de células impregnadas, siendo prácticamente un 40% menos con respecto al Control (GRAFICA 4).

Así mismo, analizando el número de células impregnadas en la Fase 1 coincidimos con Velázquez y Romano, 1987, al considerar que la diferencia se debe probablemente a un decremento en el contenido de DNA en el Grupo Tratado con Corticosterona al compararlo con el Grupo Control.

## 6 DIAS

En esta edad encontramos el mayor número de diferencias significativas entre el Grupo Control y el Tratado (GRAFICA 2 / TABLA 2).

De acuerdo con los resultados obtenidos con respecto al Grupo Control, continúa el fenómeno de migración, debido a que se pueden observar 11 fases impregnadas. Se encontró un mayor número de células impregnadas en las Fases 5 y 9, las cuales corresponden a la primera etapa migratoria y a la primera etapa en la que se lleva a cabo la diferenciación respectivamente (Cajal, 1890). Consideramos que las células que se reprodujeron en edades más tempranas para ahora han migrado y se han diferenciado, lo que se demuestra con la observación de células que corresponden a 11 fases diferentes impregnadas.

Debido a que las fases 5 y 9 de desarrollo son consideradas de gran actividad ya que implican cambios morfológicos importantes (Altman, 1972; Jacobson, 1978; Burgoyne, 1988) como una mayor cantidad de proteínas citoesqueléticas presentes en la Fase 5 (Hall, 1982), y como la presencia en la Fase 9 de proteínas específicas y vesículas sinápticas detectables por inmunocitoquímica en las fibras paralelas (Altman, 1972; Cambay, 1987); y sabiendo que existe una relación directa entre las sustancias presentes y su afinidad por la plata (Peters, 1955; Tandler, 1954), consideramos que las células de estas fases se impregnan en mayor número. (GRAFICA 2).

Por otro lado en el Grupo Tratado, en general, el número de células impregnadas fue menor, y el fenómeno de distribución de dichas células fue significativamente diferente como se puede observar (GRAFICA 2) en las Fases 1 ( $p < 0.001$ ), 5 ( $p < 0.001$ ), 9 ( $p < 0.001$ ), 10 ( $p < 0.01$ ) y 11 ( $p < 0.001$ ). Al contrario de lo que sucedió en el Grupo Control, en el Tratado se impregnaron en la Fase 1, 6 veces más células, siendo esto semejante en la Fase 10, casi 5 veces más, en la Fase 11, por arriba del doble y en este caso sí encontramos en el Grupo Tratado células correspondientes a la Fase 12 impregnadas, que aunque pocas nos demuestran que ya algunas de las células han alcanzado el mayor grado de desarrollo y que han llegado a la zona de la capa Granulosa Interna que corresponderá al final de la migración para dichas células y a su lugar definitivo como células diferenciadas (GRAFICA 2).

Consideramos que la corticosterona provoca de alguna manera que exista una mayor actividad en la fase proliferativa, de ahí la diferencia tan grande con respecto al Grupo Control; y que para esta edad hubieran las células del Grupo Tratado superado la etapa que se manifiesta en las Fases 5 y 9 del Grupo Control. Aparentemente la migración y diferenciación a este nivel ha sido acelerada por el tratamiento, basándonos en el hecho de que se encuentra un mayor número de células impregnadas, significativo, en el Grupo Tratado en las Fases 10 y 11 y que mayor demostración que el hecho de encontrar células impregnadas de la Fase 12 de desarrollo, que aunque no es significativo, no se observaron en el Grupo Control en ninguna de las muestras (TABLA 2).

Con respecto al aumento de células impregnadas en la Fase 1 en el Grupo Tratado y considerando las observaciones de Bohn y Lauder, 1978, con respecto a un incremento en la tasa de muerte celular en la capa Granulosa Externa, podría deberse a una respuesta del organismo (plasticidad neuronal), es decir un incremento en la actividad mitótica que pretendiese reponer las células que hubieran muerto por acción de la Corticosterona.

## 12 DIAS

No se observa ninguna diferencia significativa entre el Grupo Control y el Grupo Tratado con corticosterona.

Se identificaron en los 3 grupos de tratamiento células impregnadas que correspondieron a todas y cada una de las 12 fases de desarrollo.

Por lo que respecta al Grupo Control, continuó la proliferación celular, ya que las células de la Fase 1 demostraron tener algún tipo de actividad debido a que se impregnaron en mayor número que en el Grupo Tratado, es decir, es en esta Fase en la que hay actividad mitótica y por ende una mayor cantidad de ácidos nucleicos que facilita que se impregnen en mayor número (Peters, 1955; Tandler, 1954). (Gráfica 3 / Tabla 3) que en el Grupo Tratado.

Destacan también en el Grupo Control la Fase 5 (Migratoria) y las Fases 9 - 12, las cuales corresponden a las células que están en proceso de diferenciación, es decir creando sus dendritas provisionales (Fases 9 - 10) o modelando sus expansiones definitivas (Fase 11) y en el caso de la Fase 12 realizando un acomodo final con respecto a su localización definitiva e iniciando el proceso de sinaptogénesis (Cajal, 1890; Altman, 1972b; Ambray, 1987). Así mismo, consideramos el hecho de que la plata impregna en mayor número a las células nerviosas eléctricamente activas (Bertram, 1964). En otras palabras, las células que en edades más tempranas se encontraban activas en

fases iniciales de desarrollo han continuado con su propia diferenciación, encontrándose ahora activas en la última fase, es decir, a punto de completar su diferenciación y madurar.

En el Grupo Tratado presenta, como se mencionó anteriormente, poca actividad la Fase 1; consideramos que el desarrollo se ha acelerado ya que hay una mayor actividad en la Fase 5 que en las fases iniciales y prácticamente más del 60% de células que se impregnaron en este grupo corresponden a la Fase 12 de desarrollo (Gráfica 9) lo que probablemente significa que la mayor parte de las células se encuentran ya localizadas en la capa Granulosa Interna a punto de completar su diferenciación.

Coincidimos, por lo tanto, con lo observado por Velázquez y Romano, 1987, a los 12 días de edad, en lo referente a la disminución de la capa Granulosa Externa, ya que encontramos un menor número de células impregnadas en las Fases iniciales, localizadas en la capa Granulosa Externa (Fases 1 - 4, FM C - F / Gráfica 3).

Con respecto al Grupo Tratado con el Vehículo (Propilenglicol - Etanol - Agua) en general podemos decir que:

De acuerdo a lo observado tiene, ya sea el propilenglicol y/o el etanol, algún efecto sobre la impregnación como se puede constatar en los resultados obtenidos, que representan diferencia significativa:

- 0 DIAS → Fase 2, en donde el Grupo Vehículo mostró tener un mayor número de células impregnadas que en los otros 2 grupos (Gráfica 1).
  
- 6 DIAS → Fases 5 y 9 en donde el Grupo Vehículo muestra un comportamiento similar al Grupo de Corticosterona y distinto al Grupo Control (Gráfica 2).
  
- 12 DIAS → Fase 10, en donde el Grupo Vehículo muestra un mayor número de células impregnadas que en los otros 2 grupos (Gráfica 3).

Así mismo, también a los 12 días de edad, aunque sin ser significativo, se observó una gran cantidad de células impregnadas de la Fase 12 que supera a los Grupos Control y Tratado. Dicha diferencia, sin embargo cuando fue analizada por porcentajes (el porcentaje que ocupa cada fase dentro de las 12 estudiadas, Gráfica 9), mantuvo un comportamiento similar al Grupo Tratado con respecto a la Fase 12, y por el contrario un comportamiento similar al Grupo Control en la Fase 1 aunque en general el

desarrollo se inclina, al igual que en los otros 2 grupos a presentar un mayor número de células hacia la última fase de desarrollo.

Por lo tanto se puede decir que el Vehículo tuvo un comportamiento que no fue constante y consideramos que abre un campo de estudio que permitirá observar que tanto afectan individualmente ya sea el propilenglicol o el etanol la función celular y por lo tanto la impregnación celular. Así mismo, de ser posible debe intentarse aplicar la corticosterona, con un vehículo que resulte inocuo.

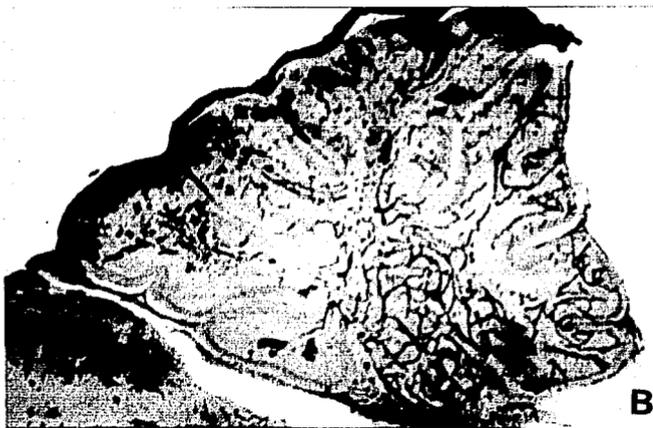
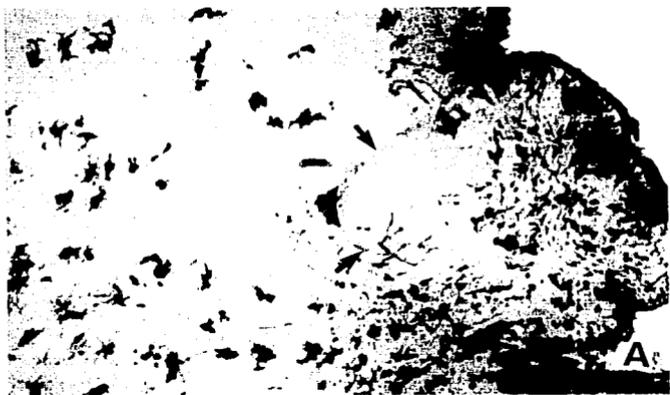
## FOTOMICROGRAFIAS

Fotomicrografías de cortes de cerebelo de ratas normales, impregnados con la Técnica de Golgi-Kopsch y de 60  $\mu\text{m}$  de grosor, representativos del material estudiado. (Aumento 35.2X)

**A** Cerebelo de rata de 0 días de edad. En esta edad la foliación y la organización celular se encuentran en su etapa inicial, el cerebelo es pequeño. El límite con el cerebro está marcado por las flechas.

**B** Cerebelo de rata de 6 días de edad. El número de folios es mayor y la organización de la corteza es más definida.

**C** Cerebelo de rata de 12 días de edad. El tamaño del cerebelo es considerablemente mayor así como el número de folios, las tres capas de la corteza se observan con claridad, en esta edad la capa Granulosa Externa aún no ha desaparecido.

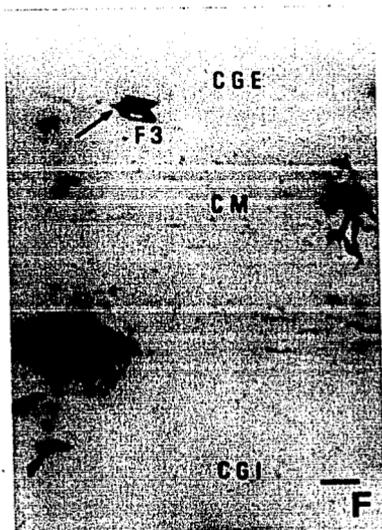
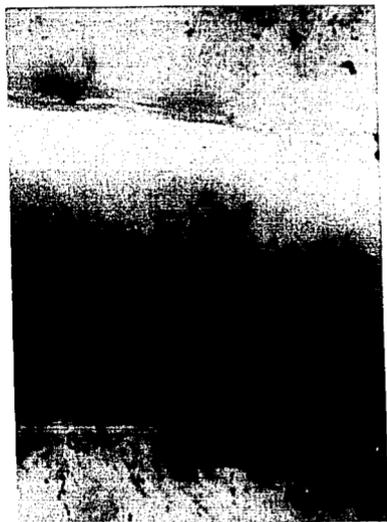
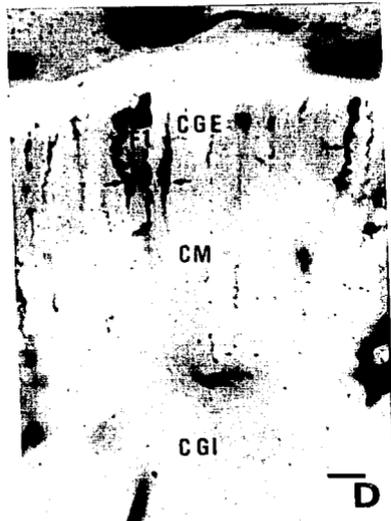


Fotomicrografías de cortes de cerebelo de rata, en las que se muestran, las diferentes fases de diferenciación de los granos cerebelosos. Escala igual a 10  $\mu$ m.

**D** Grano cerebeloso en Fase 1 (F1), ubicado en la región subpial de la capa Granulosa Externa (CGE), se observan prolongaciones de células de Bergmann  $\rightarrow$  Capa Molecular (CM). Capa Granulosa Interna (CGI). En el grupo de ratas de 6 días de edad tratadas con corticosterona, el análisis estadístico mostró diferencias significativas en esta fase,  $p < 0.001$  con respecto al grupo control.

**E** Fase dos (F2), la célula se ha desprendido de la región subpial y se encuentra en una zona inferior. En esta fase  $p < 0.05$ , en ratas de 0 días de edad tratadas con el vehículo de la hormona.

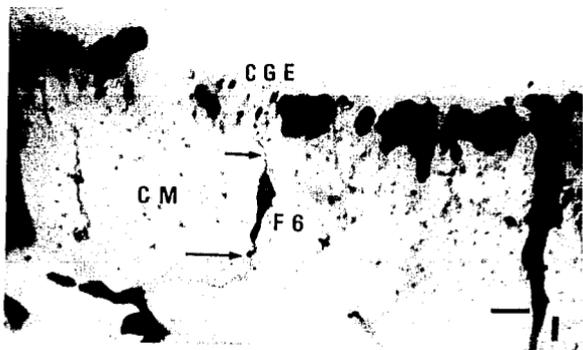
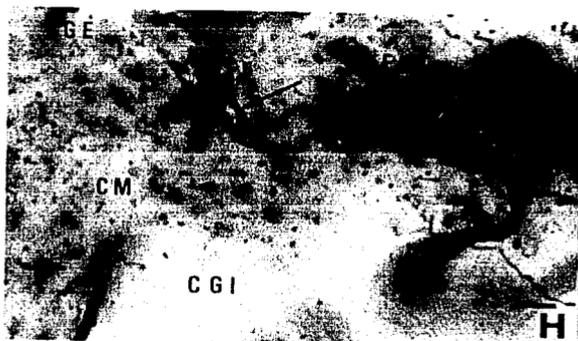
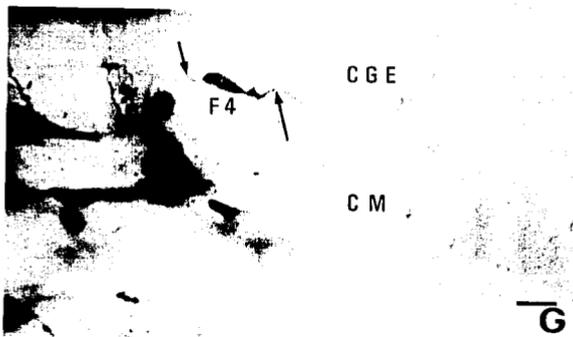
**F** Aún localizada en la CGE se encuentra la Fase Tres (F3), que presenta el inicio de las expansiones  $\rightarrow$  polares. Diferencias significativas se presentaron en el grupo de ratas de 0 días tratadas con el vehículo.



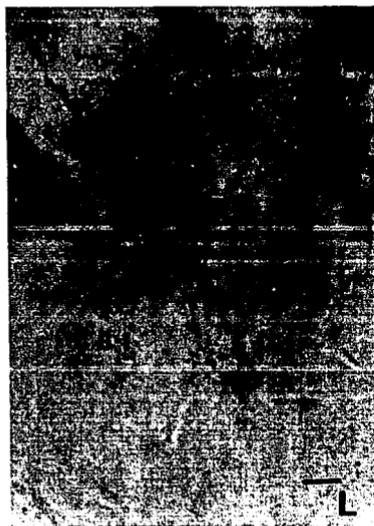
**G** Célula en la Fase Cuatro (F4), muestra polaridad horizontal  
—————> distintiva de esta fase, situada en la CGE.

**H** Grano cerebeloso en Fase Cinco (F5), con su expansión  
descendente, —————> situado en el límite superior de la  
CM. La diferencia estadística mostrada en esta fase  
 $p < 0.001$ , se observó en ratas de 6 días de edad tratadas  
con corticosterona. Fase Seis (F6).

**I** Fase seis (F6) se señalan sus prolongaciones —————> ,  
característica de la bipolaridad vertical presente en esta  
fase así como la ubicación en la sección medial de la CM.



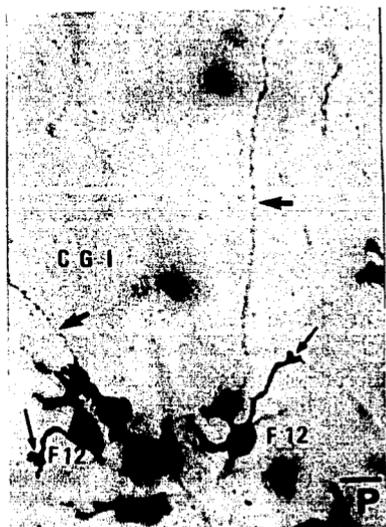
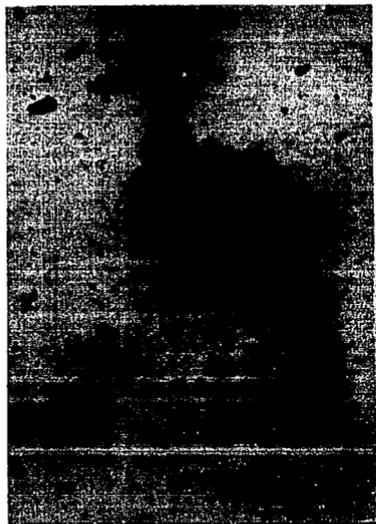
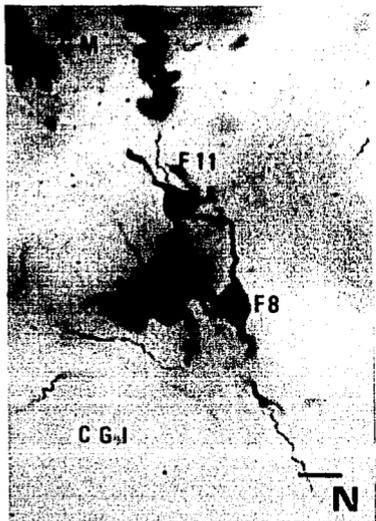
- J** En este corte un grano cerebeloso en fase siete (F7), también con bipolaridad vertical, terminando su migración por la CM.
- K** Esta célula se encuentra en la CGI cercana a la CM, en su prolongación inferior se advierte una bifurcación que dará origen a las dendritas provisionales. Su ubicación y morfología nos indican que corresponde a la Fase Ocho (F8) de diferenciación.
- L** Un grano cerebeloso con prolongaciones en los polos de la célula, lo que es característico de la Fase Nueve (F9), fase de creación de dendritas provisionales. Esta fase en ratas de 6 días del Grupo Experimental mostró diferencia significativa  $p < 0.001$ . La célula (FT) se encuentra en etapa de transición de la Fase Ocho a la Nueve. Ambas en la CGI.
- M** El grano cerebeloso en Fase Diez (F10) presenta prolongaciones alrededor del soma, continúa la creación de dendritas provisionales. Célula en Fase Doce (F12). Se encuentran en la CGI. En ratas de 6 días de edad, tratadas con corticosterona la Fase Diez presentó diferencia significativa  $p < 0.01$ .



**N** Se observan células en las Fases Ocho (F8), Once (F11) y Doce (F12) en la CGI, mostrando ésto que en el cerebelo en desarrollo coinciden las fases de diferenciación de los Granos Cerebelosos.

**O** El Grano Cerebeloso mostrado, representa la Fase Once (F11), se observa menor número de prolongaciones y se encuentra en la etapa de modelación de dendritas definitivas. Esta fase en el Grupo de Ratas de 6 días, presentó diferencia significativa  $p < 0.0001$  cuando fueron tratadas con corticosterona.

**P** Granos cerebelosos en la Fase Doce (F12). Estas células muestran las características de un grano maduro, tres o cuatro dendritas con sus terminaciones digitiformes  $\longrightarrow$  y el axón  $\rightarrow$  que asciende hacia la CM en donde da origen a las Fibras Paralelas. Esta fase no se encontró en las ratas Control ni Testigo de 6 días de edad, si bien el resultado no fue significativo, si se observaron en las ratas tratadas con corticosterona en la misma edad.



## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

1. LA APLICACIÓN PRENATAL DE CORTICOSTERONA NO PRODUCE CAMBIOS MORFOLÓGICOS NI DE LOCALIZACIÓN DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE LOS GRANOS CEREBELOSOS, LA CUAL SIGUE EL PATRÓN DESCRITO POR SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL.
2. LA APLICACIÓN PRENATAL DE CORTICOSTERONA PROVOCA UN DESFASAMIENTO EN LOS TIEMPOS DE DIFERENCIACION DE LOS GRANOS CEREBELOSOS, NUMÉRICAMENTE SIGNIFICATIVO A LOS 6 DIAS DE EDAD.
3. A LOS 6 DÍAS DE EDAD LA ACCIÓN DE LA CORTICOSTERONA SE OBSERVA PRINCIPALMENTE EN LA ETAPA PROLIFERATIVA (FASE 1), EN LA ETAPA PREMIGRATORIA (FASE 5) Y EN LA ETAPA DE DIFERENCIACIÓN (FASES 9, 10 Y 11).

## BIBLIOGRAFIA

## BIBLIOGRAFIA

---

- 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).
- Altman J. Postnatal Development of the Cerebellar Cortex in the Rat. I. The External Germinal Layer and the Transitional Molecular Layer. *J COMP NEUROL* 145: 353 – 398 (1972).
- Altman J. Postnatal Development of the Cerebellar Cortex in the Rat. II. Phases in the maturation of Purkinje Cells and of the Molecular Layer. *J COMP NEUROL* 145: 399 – 464 (1972 b).
- Altman J. Postnatal Development of the Cerebellar Cortex in the Rat. III. Maturation of the Components of the Granular Layer. *J COMP NEUROL* 145: 465 – 514 (1972 c).
- Altman J, Das GD. Autoradiographic and Histological Studies of Postnatal Neurogenesis. I. *J COMP NEUROL* 126: 337 – 390 (1966).
- Altman J, Winfree AT. Postnatal Development of the Cerebellar Cortex in the rat. V. Spatial Organization of Purkinje Cell Perikarya. *J COMP NEUROL* 171: 1 – 16 (1977).
- Bertram EG, Sheppard C. A Possible Explanation for the Golgi Impregnation of Neurons. *ANAT REC* 148: 413 (1964).
- Bohn MC, Lauder JL. The Effects of Neonatal Hydrocortisone on Rat Cerebellar Development. *DEVL NEUROSCI* 1: 250 – 266 (1978).
- Bohn MC, Lauder JM. Cerebellar Granule Cell Genesis in the Hydrocortisone Treated Rat. *DEVL NEUROSCI* 1: 81 – 89 (1980).
- Burgoyne RD, Cambray-Deakin MA. The Cellular Neurobiology of Neuronal Development: The Cerebellar Granule Cell. *BRAIN RESEARCH REVIEWS* 472 (1): 77 – 101 (1988).
- Cambray-Deakin MA, Norman KM, Burgoyne RD. Differentiation of the Cerebellar Granule Cell: Expression of a Synaptic Vesicle Protein and the Microtubule-Associated Protein MAP1A. *DEV BRAIN RES* 34: 1 – 7 (1987).
- Cantarow A, Schepartz B. 1964. *BIOQUIMICA. Interamericana. México.* 3a Ed. 791 pp.
- Ellis RS. Norms for Some Structural Changes in the Human Cerebellum from Birth to Old Age *J COMP NEUROL* 32: 1 – 33 (1920).
- Forströner PF. The Origin and the Morphogenetic Significance of the External Granular Layer of the Cerebellum as Determined Experimentally in Chick Embryos. *ACTA NEUROL SCAND* 39: 314 – 316 (1963).
- Fox CA, Hillman DE, Siegesmund KA, Dutta CR. The Primate Cerebellar Cortex: A Golgi and Electron Microscopy Study. *PROGR BRAIN RES* 25: 174 – 225 (1967).
- Fujita S. Analysis of Neuron Differentiation in the Central Nervous System by Tritiated Thymidine Autoradiography. *J COMP NEUROL* 122 (3): 311 – 327 (1964).

## BIBLIOGRAFIA

---

- Fujita S, Shimada M, Nakamura T. H3--Thymidine Autoradiographic Studies on the Cell Proliferation and Differentiation in the External and the Internal Granular Layers of the Mouse Cerebellum. *J COMP NEUROL* 128: 191 - 208 (1966).
- Fujita S. Quantitative Analysis of Cell Proliferation and Differentiation in the Cortex of the Postnatal Mouse Cerebellum. *J CELL BIOL* 32: 277 - 287 (1967).
- Gilbert SF. 1988. *BIOLOGIA DEL DESARROLLO*. Omega. España. pp: 149 - 165, 502 - 503.
- Gremo F, Porru S, Vemadakis A. Effects of Corticosterone on Chick Embryonic Retinal Cells in Culture. *DEV BRAIN RES*. 15: 45 - 52 (1984).
- Hall ED. Glucocorticoid Effects on Central Nervous Excitability and Synaptic Transmission. *INTERNATIONAL REVIEW OF NEUROBIOLOGY* 23: 165 - 195 (1982).
- Ham AW, Cormack DH. 1979. *HISTOLOGY*. Lippincott Co. U.S.A. 8a Ed. 966 pp.
- Hanaway J. Formation and Differentiation of the External Granular Layer of the Chick Cerebellum. *J COMP NEUROL* 131: 1 - 14 (1967).
- Jacobson M. Cessation of DNA Synthesis in Retinal Ganglion Cells Correlated with the Time of Specification of the Central Connections. *DEV BIOL* 17: 219 - 232 (1968).
- Jacobson M. 1978. *DEVELOPMENTAL NEUROBIOLOGY*. Plenum Press. U.S.A. 2a Ed. 560 pp.
- Kilham L, Margolis G. Cerebellar Ataxia in Hamsters Inoculated with Rat Virus. *SCIENCE* 143: 1047 - 1048 (1964).
- Kilham L, Margolis G. Cerebellar Disease in Cats Induced by Inoculation of Rat Virus. *SCIENCE* 148: 244 - 246 (1965).
- Kilham L, Margolis G. Viral Etiology of Spontaneous Ataxia of Cats. *AM J PATHOL* 48: 991 - 1011 (1966).
- Kornuth SE, Anderson JW, Scott G. Observations on the Ultrastructure of the Developing Cerebellum of the Macaca mulatta. *J COMP NEUROL* 130: 1 - 24 (1967).
- Kornuth SE, Anderson JW, Scott G. The Development of Synaptic Contacts in the Cerebellum of Macaca mulatta. *J COMP NEUROL* 132: 531 - 546 (1968).
- Larsell O. 1967. *THE COMPARATIVE ANATOMY AND HISTOLOGY OF THE CEREBELLUM FROM MYXINOIDS THROUGH BIRDS*. Minnesota University Press. Minneapolis, U.S.A.
- Lauder JM, Krebs H. Humoral Influences on Brain Development. *ADV CELL NEUROBIOL* 5: 3 - 51 (1984).

## BIBLIOGRAFIA

---

- Letormeau PC. Regulation of Neuronal Morphogenesis by Cell-Substratum Adhesion. SOC NEUROSCI SYMP 2: 67 - 81 (1977).
- Llinás RR. The Cortex of the Cerebellum. SCI AM 1 (2): 56 - 67 (1975).
- López-Antúnez L. 1979. ANATOMIA FUNCIONAL DEL SISTEMA NERVIOSO. Limusa. México. 784 pp.
- Mares V, Lodin Z, Srajer J. The Cellular Kinetics of the Developing Mouse Cerebellum. I. The Generation Cycle, Growth Fraction and Rate of Proliferation of the External Granular Layer. BRAIN RES 23: 323 - 342 (1970).
- Matus A, Bernhardt R, Hugh-Jones T. High Molecular Weight Microtubule-Associated Proteins are Preferentially Associated with Dendritic Microtubules in Brain. PROC NATL ACAD SCI USA 78: 3010 - 3014 (1981).
- Miale IL, Sidman RL. An autoradiographic Analysis of Histogenesis in the Mouse Cerebellum. EXPTL NEUROL 4: 277 - 296 (1961).
- Mugnaini E, Forströen PF. Ultrastructural Studies on the Cerebellar Histogenesis. I. Differentiation of Granule Cells and Development of Glomeruli in the Chick Embryo. Z ZELLFORSCH MIKROSK ANAT ABT HISTOCHEM 77: 115 - 143 (1967).
- Nieuwenhuys R. Comparative Anatomy of the Cerebellum. PROG BRAIN RES 25: 1 - 93 (1964).
- Obersteler H. Der Feinere Bau der Kleinhirnrinde beim Menschen und bei Tieren. BIOL ZENTRALBL 3: 145 - 155 (1883).
- Oda MAS, Huttenlocher PR. The Effect of Corticosteroids on Dendritic Development in the Rat Brain. YALE J BIOL MED 3: 155 - 165 (1974).
- Peters A. Experiments on the Mechanism of Silver Staining. STAINING QUART J MICR SCI 96: 84 - 115 (1955).
- Phemister RD, Young S. The Postnatal Development of the Canine Cerebellar Cortex. J COMP NEUROL 134: 243 - 254 (1968).
- Purpura DP, Shofer RJ, Houseplan EM, Noback CR. Comparative Ontogenesis of Structure-Function Relations in Cerebral and Cerebellar Cortex. PROGR BRAIN RES 4: 187 - 221 (1964).
- Raaf J, Kemóhan JW. A Study of the External Granular Layer in the Cerebellum. AM J ANAT 75: 151 - 172 (1944).
- Rakic P. Guidance of Neurons Migrating to the Fetal Monkey Neocortex. BRAIN RES 33: 471 - 476 (1971).
- Rakic P. Neuron-Glia Relationship During Granule Cell Migration in Developing Cerebellar Cortex: A Golgi and Electron Microscopic Study in Macacus rhesus. J COMP NEUROL 141: 283 - 312 (1971 b).

## BIBLIOGRAFIA

- Rakic P, Sidman RL. Histogenesis of Cortical Layers in Human Cerebellum, Particularly the Lamina Dissecans. *J COMP NEUROL* 139: 473 – 500 (1970).
- Ramón y Cajal S. Sur les fibres nerveuses de la couche granuleuse du cervelet et sur l'évolution des éléments cérébelleux. *Internationale Monatschrift für Anat. u. Physiol.* Bd VII, H.I. (1890) In: Ramón y Cajal S. 1981. *Recuerdos de mi vida: Historia de mi Labor Científica*. Alianza. España. 386 pp.
- Ramón y Cajal S. 1909. *HISTOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX DE L'HOMME ET DES VERTÉBRÉS. VOL I.* Maloine, Paris.
- Ramón y Cajal S. 1911. *HISTOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX DE L'HOMME ET DES VERTÉBRÉS. VOL II.* Maloine, Paris.
- Ramón y Cajal S. 1929. *STUDIES ON VERTEBRATE NEUROGENESIS.* Translated by L. Guth, Thomas CC. Springfield, Ill. U.S.A. (1960).
- Ramón y Cajal S. 1981. *RECUERDOS DE MI VIDA: HISTORIA DE MI LABOR CIENTÍFICA.* Alianza. España. 386 pp.
- Saetersdal TAS. On the Ontogenesis of the Avian Cerebellum. Part II. Measurements of the Cortical Layers. *UNIV BERGEN ARBOK NATURVITENSKAP. REKKE 3:* 1 – 53 (1956).
- Saetersdal TAS. On the Ontogenesis of the Avian Cerebellum. Part IV. Mitotic Activity in the External Granular Layer with a Summary of Certain Aspects of Cortical Development. *UNIV BERGEN ARBOK NATURVITENSKAP. REKKE 4:* 1 – 39 (1959).
- Sandquist D, Williams A, Saho K, Kataoka S. Morphological Differentiation of a Murine Neuroblastoma Clone in Monolayer Culture Induced by Dexamethasone. *EXP CELL RESEARCH* 113: 375 – 381 (1978).
- Sauer FC. Mitosis in the Neural Tube. *J COMP NEUROL* 62: 377 – 405 (1935).
- Schaper A. Die morphologische und histologische Entwicklung des Kleinhirns der Teleostier *ANAT ANZ* 9: 489 – 501 (1894).
- Schaper A. Einige kritische Bemerkungen zu Lugaro's Aufsatz; Ueber die Histogenese der Kömer der kleinhirnrinde. *ANAT ANZ* 10: 422 – 426 (1895).
- Schappiro S. Some Physiological, Biochemical and Behavioral Consequences of Neonatal Hormone Administration: Cortisol and Thyroxine. *GEN COMP ENDOCR* 10: 214 – 228 (1968).
- Schappiro S, Vukovich K, Globus A. Effects of Neonatal Thyroxine and Hydrocortisone Administration on the Development of Dendritic Spines in the Visual Cortex of Rats. *EXP NEUROL* 40: 286 – 296 (1973).
- Sidman RL. Development of Interneuronal Connections in Brains of Mutant Mice. pp 163 – 193. In: *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration* (FD Carlson ed.) Prentice-Hall, Englewood Cliffs, U.S.A. (1968).

## BIBLIOGRAFIA

---

- Sidman RL, Rakic P. Neuronal Migration, with Special Reference to Developing Human Brain: A Review. *BRAIN RES* 62: 1 – 35 (1973).
- Stasny F, Svoboda J. Influence of Hydrocortisone on DNA, RNA and Protein in the Chick Embryo Cerebral Hemisphere. *ACTA UNIVERSITATIS CAROLINAE MEDICA* 18: 229 – 242 (1973).
- Stasny F, Pokorny J, Lisy V, Krechler T. A Morphometric Study of Cortisol Induced Changes in the Development of Neuronal Process Out-Growth in Telencephalon. *EXP CLIN RES* 88 ( 1 ): 39 – 44 (1986).
- Tandler CJ. An Argentaffin Component of the Nucleolus. *J HISTOCHEM* 2: 165–166 (1954).
- Uzman LL. The Histogenesis of the Mouse Cerebellum as Studied by Its Tritiated Thymidine Uptake. *J COMP NEUROL* 114: 137 – 160 (1960).
- Velázquez PN, Romano MC. Corticosterone Therapy During Gestation: Effects on the Development of Rat Cerebellum. *INT J DEVL NEUROSCIENCE* 5 (3): 189–194 (1987).
- Woodard JS. Origin of the External Granule Layer of the Cerebellar Cortex. *J COMP NEUROL* 115: 65 – 73 (1960).
- Zagon IS. Prolonged Gestation and Cerebellar Development in the Rat. *EXP NEUROL* 46: 69 – 77 (1975).

## APENDICE

## A P E N D I C E 1

### PREPARACION DE LA CORTICOSTERONA

Corticosterona	0.001 gr.
Etanol Absoluto	100 $\mu$ l.
Propilenglicol	200 $\mu$ l.
H <sub>2</sub> O Bidestilada	3.7 ml.

Después de dejar ambientar la hormona se pesó y se disolvió en el Etanol calentando ligeramente el tubo de ensayo que los contenía, tapado con Parafilm con el objeto de que no se evaporara el alcohol. Una vez disuelta se agregó el Propilenglicol y posteriormente el Agua Bidestilada. La esterilización de la solución de trabajo se llevó a cabo en Campana de Flujo Laminar con filtros de Millipore (0.45), colocándola en frascos estériles y flameados.

### GELATINA AL 10% EN SOLUCION ACUOSA

Gelatina en Polvo	10 grs.
H <sub>2</sub> O Bidestilada	100 ml

Se colocó en un cristalizador la gelatina en polvo y se va agregando el Agua fría con una pipeta Pasteur hasta que se hidrate. Una vez hidratada se agrega el resto del Agua previamente calentada (tibia) hasta la dilución total de la

gelatina, agitando suavemente en la platina de calentamiento sin hacer burbujas. Se conserva en el refrigerador a 4°C. Tiene una duración de aproximadamente 15 días en muy buen estado. Antes de utilizarla se revisó que no estuviera contaminada y se dejó ambientar para que pudiera tomar el estado líquido.

SOLUCION FIJADORA DE GOLGI-KOPSCH:

Solución de Dicromato de Potasio al 2.22%<sup>1</sup> 54 ml.

| Dicromato de Potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) 2.22 grs.

| Agua Bidestilada 100 ml.

De esta solución se prepararon aproximadamente 250 ml., conservándolo en frasco ambar bien tapado, ya que dura por tiempo indefinido

Glutaraldehído al 25%<sup>2</sup> 6 ml.

SOLUCION FIJADORA DE GOLGI-KOPSCH\* 60 ml

SE MEZCLAN 54 ml. DE LA SOLUCION PREPARADA DE DICROMATO DE POTASIO AL 2.22%<sup>1</sup> Y 6 ml. DE GLUTARALDEHIDO AL 25%<sup>2</sup> (PRESENTACION COMERCIAL), LO QUE NOS DA UN TOTAL DE \*60 ml. DE SOLUCION FIJADORA DE GOLGI-KOPSCH.

#### **HISTOQUINET:**

Las muestras se procesaron de la siguiente manera:

- **Deshidratación en alcoholes graduales:**

70%, 80%, 96% y Absoluto, permanencia de 1 hora en cada uno.

- **Aclaración en dos cambios de Xilol, 1 hora en cada uno.**

- **Se pasaron las muestras a dos vasos de Paraplast a 52°C, 1 hora en cada uno.**

#### **INCLUIDOR:**

- **Inclusión en cassettes de plástico hasta que el bloque endureció.**