

ULTRAESTRUCTURA DE LA CAPA GRANULOSA
DE LA CORTEZA CEREBELOSA HUMANA.

1. ORGANIZACION DE LAS CELULAS GRANULOSAS

— **Dr. Orlando J. Castejón.**

Instituto de Investigación Clínica.
Apartado Postal 1151.
Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela.

INTRODUCCION

Gray (1961) y Herndon (1964) publicaron las primeras descripciones submicroscópicas de las células granulosas a propósito de un estudio panorámico de los elementos celulares y de la organización sináptica de la corteza cerebelosa de la rata^{14, 15}. Recientemente, Fox y colaboradores (1967) describieron las características básicas de las células granulosas de los primates¹⁷. La primera descripción, al microscopio electrónico, de la capa granulosa de la corteza cerebelosa humana, fue realizada por Dahl y colaboradores (1962), quienes reportaron algunas observaciones sobre la estructura de las células granulosas y los glomérulos cerebelosos⁷. Los estudios publicados fueron realizados empleando tetraóxido de osmio como fijador primario. El advenimiento de los aldehídos, especialmente del glutaraldehído²¹, y la escasa información existente, ameritan nuevos estudios sobre la organización estructural de estas microneuronas, las cuales actúan como interneuronas entre las fibras aferentes (fibras musgosas) y las macroneuronas de la corteza cerebelosa (células de Purkinje), sobre las cuales ejercen una influencia excitatoria².

El presente trabajo describe la organización de las células granulosas y las características ultraestructurales del citoplasma y del núcleo, según la fijación primaria con glutaraldehído y secundaria con tetraóxido de osmio.

MATERIAL Y METODO

Se tomaron muestras, de aproximadamente 5 a 8 mm, de zonas aparentemente normales de la corteza cerebelosa de cuatro

pacientes operados por diferentes estados patológicos del cerebelo y del tronco cerebral (méduloblastoma del vermis, aracnoiditis del ángulo pontocerebeloso, aneurisma de la cerebelosa anterior y tumor mesencefálico), las cuales se fijaron inmediatamente, por una a dos horas, en glutaraldehído al 4%, en solución reguladora 0.1M de fosfato de sodio, a pH de 7,3 - 7,4 y osmolaridad de 730 mOs/litro. Las muestras fueron luego divididas en bloques pequeños, de 1 - 2 mm, los cuales presentaron zonas hemorrágicas cuando se examinaron con microscopio estereoscópico. Los bloques de tejidos se continuaron fijando en glutaraldehído fresco, por períodos de 2 a 24 horas; se lavaron en solución reguladora de fosfato de sodio y se fijaron posteriormente en solución al 2.5% de tetraóxido de osmio en fosfato de sodio 0.1M, pH de 7.4 y osmolaridad de 240 - 260 mOs/litro. Se hizo deshidratación en concentraciones crecientes de etanol y óxido de propileno e inclusión en Epón. Para estudiar la histología de la capa granulosa se hicieron secciones gruesas, de 0.2 - 0.5 micras de espesor, antes de realizar las secciones ultrafinas. Estas últimas se obtuvieron con ultramicrotomo LKB, provisto de cuchilla de vidrio; se recogieron sobre rejillas de cobre sin película de soporte, se estabilizaron con carbón, se tiñeron con solución acuosa saturada de acetato de uranilo y se observaron con microscopio electrónico Siemens Elmiskop I. Las estructuras submicroscópicas se midieron con una máquina Universal Cambridge.

RESULTADOS

Las células granulosas se disponen en grupos, separados entre sí por los glomérulos cerebelosos. A nivel de estos grupos celulares, las células granulosas se yuxtaponen, estando separadas frecuentemente por un espacio que varía entre 40 - 105 Å, con un valor promedio de 80 Å. Las células granulosas son redondeadas u ovals y miden de 3.7 - 4.8 micras de diámetro (Fig. 1). Se observan también en menor proporción, células granulosas pequeñas de 2.5 a 3 micras de diámetro (Fig. 2). Entre las células granulosas se encuentran oligodendrocitos y células con núcleo ovalado o poligonal, citoplasma abundante con cuerpos de inclusión de densidad variable, los cuales presumiblemente corresponden a microglía o a neuronas oscuras.



Fig. 1. Microfotografía electrónica de cinco células granulosas, cuyas membranas celulares se hallan íntimamente adosadas, separadas por un espacio de aproximadamente 105 Å de ancho. El citoplasma forma una banda estrecha alrededor del núcleo (N) y contiene muy escasos canaliculos del retículo endoplasmático rugoso, ribosomas libres, mitocondrias (M) con aparente extracción de los componentes de su matriz. El núcleo (N) muestra abundante heterocromatina adosada a la membrana nuclear interna. El nucleoplasma es electrónicamente transparente. La flecha señala la emergencia de una prolongación dendrítica con abundantes microtúbulos. En la parte superior de la figura se observa un segmento de citoplasma glial (G). Magnificación: 30.000 X.

Citoplasma.— Forma una banda estrecha alrededor del núcleo y se ensancha generalmente hacia los polos de la célula. Muestra escasos canalículos del retículo endoplasmático granular o rugoso, una cantidad moderada de ribosomas libres dis-

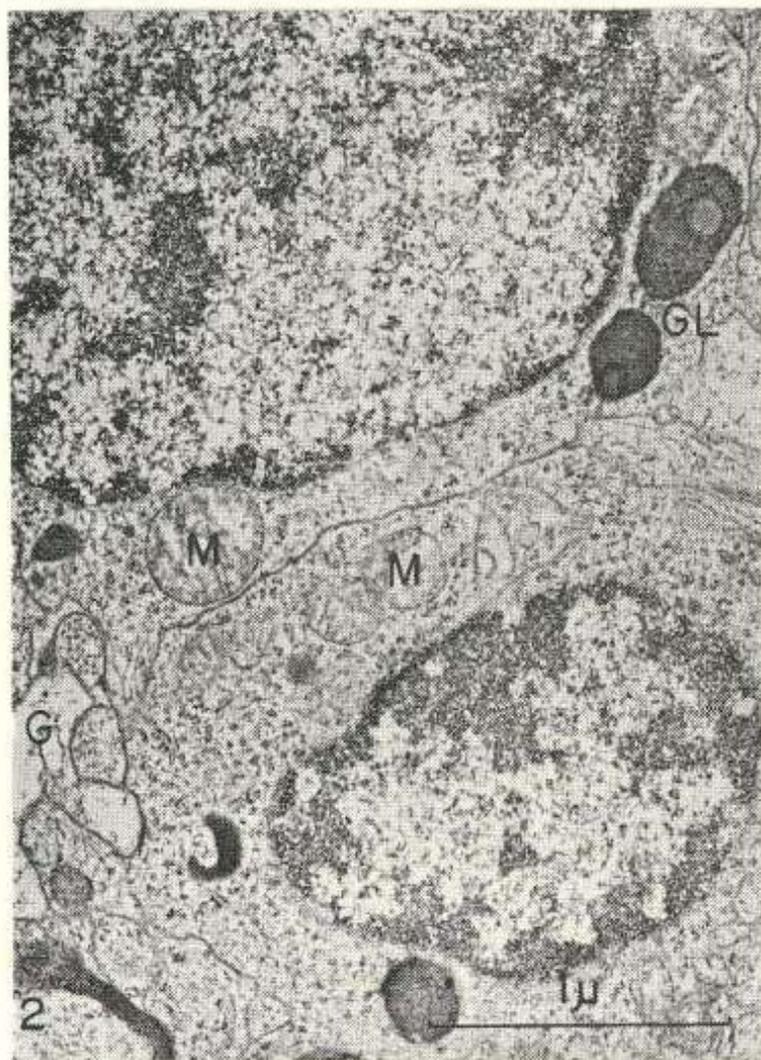


Fig. 2. Microfotografía electrónica de dos células granulosas mostrando mitocondrias (M), polirribosomas, y gránulos de lipofuscina (GL). Se observa, además, citoplasma glial (G). Magnificación: 48.000 X.



Fig. 3. Microfotografía electrónica mostrando dos células granulosas. El núcleo (N) de una de ellas muestra un nucléolo pequeño (nl) con abundante cromatina asociada (Ca). Ambos constituyentes se hallan separados por un halo claro. El nucleoplasma contiene elementos granulares y fibrilares. Las flechas señalan dos vesículas de centro denso en el citoplasma. Se observa un segmento de citoplasma glial perineuronal (G). Magnificación: 30.000 X.

puestos en rosetas, mitocondrias, complejo de Golgi, cuerpos de inclusión densos y gránulos de lipofucsina (Figs. 1 - 4).

El complejo de Golgi y las mitocondrias muestran el patrón submicroscópico ya descrito en otros tipos celulares. Las mitocondrias muestran la matriz clara e hinchada. Las vacuolas de Golgi



Fig. 4. Célula granulosa mostrando el núcleo (N), el complejo de Golgi (CG) y un cuerpo de inclusión denso o lisosoma (L). Este último muestra una porción de aspecto cristalino (flecha). En el lado izquierdo de la figura se aprecia un axón miélinico (A). Magnificación: 48.000 X.

están moderadamente dilatadas. Estos dos últimos hallazgos representan presumiblemente cambios patológicos del tejido (Véase discusión).

Los cuerpos de inclusión densos muestran una membrana limitante; su matriz es granular y de alta densidad electrónica. Son redondeados u ovals y de 0.4 - 0.5 micras de diámetro. Muestran zonas de menor densidad electrónica, de 0.05 a 0.1 micras de diámetro. Contienen en su interior una estructura multilaminar, de aspecto cristaloide (Figs. 4 y 5a). Estos cuerpos representan, presumiblemente, lisosomas. Los gránulos de lipofucsina son alargados, redondeados u ovals, de 0.29 a 1 micra de largo y de 0.22 a 0.29 micra de ancho. Contienen una estructura globular, grisácea, homogénea, de contornos precisos, de 0.1 micra de diámetro. Estos gránulos se distribuyen al azar en el citoplasma (Figs. 2, 5b y 5c).

Se observan, además, microvesículas de aproximadamente 420 - 470 Å de diámetro con un centro denso, altamente osmio-

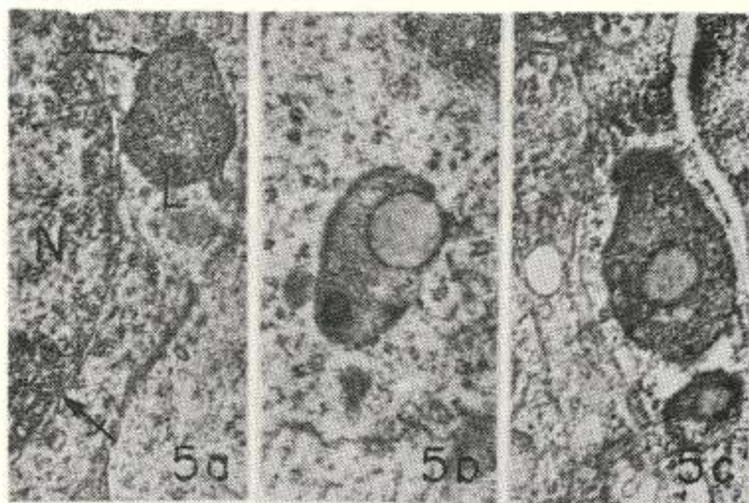


Fig. 5a. El núcleo (N) de una célula granulosa mostrando la doble membrana nuclear y los poros nucleares (flecha en cruz). La figura muestra un lisosoma (L) con una estructura cristaloide (flecha) y granulaciones densas. Magnificación: 30.000 X.

Figs. 5b y 5c. Inclusiones de lipofucsina mostrando granulaciones gruesas, densas y una estructura globular. Magnificación: 30.000 X y 36.000 X.

filico (Fig. 3), de aspecto similar a las vesículas sinápticas granulares encontradas en el sistema nervioso autónomo¹³.

El citoplasma contiene microtúbulos de 200 - 210 Å de diámetro, sin orientación precisa en el citoplasma y especialmente abundantes a nivel del sitio de emergencia de las dendritas, en



Fig. 6. Microfotografía electrónica de dos células granulosas mostrando el nucléolo (nl) y su cromatina asociada (Ca), y gránulos pericentriolares (flechas). La parte inferior de la figura muestra una prolongación dendrítica (D) con microtúbulos. Magnificación: 36.000 X.

las cuales penetran formando haces paralelos al eje de la prolongación (Figs. 1, 2 y 6). La presencia de estos canaliculos permite identificar fácilmente a las dendritas de las células granulosas, especialmente a nivel de los glomérulos cerebelosos. Las células granulosas emiten generalmente 4 a 6 dendritas. El sitio de emergencia del axón es difícil de observar en las microfotografías electrónicas.

Núcleo.— Es voluminoso, redondeado u oval y sin invaginaciones de la envoltura nuclear. La membrana nuclear externa muestra ribosomas adheridos a su superficie citoplasmática. La cisterna perinuclear mide de 150 a 200 Å de ancho. Las membranas nucleares externa e interna se unen a nivel de los poros nucleares (Fig. 5a).

La heterocromatina se dispone en grumos gruesos o cariosomas adosados a la membrana nuclear interna o dispersos en el nucléoplasma. Se observan, además, gránulos de cromatina dis-



Fig. 7. Microfotografía electrónica mostrando el nucléolo de una célula granulosa. Se aprecia la cromatina asociada al nucléolo (Ca), el nucleolonema (n) y la "pars amorpha" (flecha). Magnificación: 30.000 X.

persos en la matriz nuclear. Esta última contiene gránulos y fibrillas nucleoplásmicas, y gránulos pericromatínicos, caracterizados por un centro osmiofílico, rodeado por un halo claro y de un diámetro aproximado de 55 milimicras (Fig. 6).

El nucléolo se observó en un escaso número de células granulosas. Está poco desarrollado y los componentes nucleolares no son fácilmente distinguibles en todas las microfotografías. El nucléolonema está formado por un material granular o fibrilar muy osmiofílico (Figs. 3 y 6) que circunscribe un material granular o fibrilar, más fino y de menor densidad electrónica, que aparentemente corresponde a la "pars amorpha" (Fig. 7). En todos los casos se observó abundante cromatina asociada al nucléolo. Esta última aparece, en algunos casos, separada del nucléolonema por zonas de nucléoplasma claro.

DISCUSION

Las células granulosas de la corteza cerebelosa humana muestran una organización submicroscópica similar a las células granulosas del cerebelo de la rata y de los primates^{10, 12, 15} y del hipocampo de la rata¹⁷. Estas células no poseen sustancia de Nissl o retículo endoplasmático granular, en la forma descrita para las macroneuronas²²; observándose sólo una moderada cantidad de ribosomas libres. Se encuentran íntimamente adosadas, aparentemente, sin la existencia de neuroglía satélite. El espacio que las separa es de aproximadamente 40 - 105 Å y difiere del valor ya reportado, de 200 Å, para tejidos animales normales¹². Consideramos que la diferencia en los valores se debe a la existencia de un edema celular moderado, asociado a los tumores intracraneales¹. El grado de compactación de estas células, separadas solamente por el reducido espacio existente entre sus membranas celulares, sugiere, desde el punto de vista puramente estructural, la idea de transmisión efática¹⁴ entre ellas. El aspecto que ofrecen las mitocondrias y el complejo de Golgi, se atribuye también al edema perifocal. Observaciones similares han sido realizadas por el autor en la corteza cerebral humana⁴. Queda por esclarecer aún la influencia ejercida por el fijador empleado, el glutaraldehído, sobre la preservación de estas células. En ese sentido, no hemos encontrado en la literatura mun-

dial, estudios submicroscópicos de la corteza cerebelosa realizados mediante la fijación con aldehídos. Es necesario, además, tomar en consideración, como causa de edema celular, el trauma mecánico producido por las maniobras quirúrgicas antes de la toma de la biopsia.

La presencia de gránulos de lipofucsina en estas células fue demostrada por Dahl y colaboradores, quienes describieron algunas de sus propiedades citoquímicas⁷. Gray no reporta la presencia de estas inclusiones en las células granulosas del cerebelo de la rata¹². Los gránulos de lipofucsina, descritos en el presente trabajo, semejan en configuración a los descritos por Samorajski y colaboradores en el sistema nervioso central de ratones seniles²⁴.

Los cuerpos de inclusión densos han sido identificados como lisosomas debido a la presencia de una membrana limitante y una estructura laminar o cristalóidea. Esta última revela presumiblemente la presencia de fosfatasa ácida²⁰ o de fosfolípidos¹⁹. Los lisosomas y los gránulos de lipofucsina tienen en común propiedades fluorescentes, morfológicas y citoquímicas, por lo cual se ha propuesto que los lisosomas podrían tener papel en la formación y acumulación de los gránulos de lipofucsina.²⁴

Las microvesículas con centro denso encontradas en el citoplasma de estas neuronas, sugieren la existencia de noradrenalina. Vesículas similares han sido encontradas por el autor en los terminales sinápticos de las fibras musgosas (observaciones no publicadas) y por Hökfelt en el locus coeruleus de la rata¹⁴, región rica en noradrenalina.

Se observó la presencia de microtúbulos en el citoplasma, siendo muy abundantes a nivel de las dendritas de estas células, en contraste con el escaso desarrollo del retículo endoplásmico; lo cual sugiere que en las microneuronas, no existe una relación directa entre ambas estructuras, como la sugerida por Palay²¹ y Gray¹¹ para las macroneuronas. La existencia de microtúbulos en estas células fue reportada por Gray en cerebelo de rata¹² y por Fox y colaboradores en *Macaca mulatta*¹⁰. Sandborn y colaboradores reportaron también la existencia de microtúbulos en neurona y neuroglía de cerebelo de rata²⁵. Su demostración en el presente trabajo, en material fijado con glutaraldehído, representa un hallazgo hasta ahora no reportado en el cere-

belo humano. Es necesario, sin embargo, tener en consideración que en células fijadas con aldehídos, especialmente con glutaraldehído, se ha encontrado un aumento en las estructuras filamentosas y tubulares²⁵. No obstante, la presencia de microtúbulos en diferentes células de vertebrados² y en el axoplasma de los mamíferos⁶, tiende a demostrar que se trata de estructuras citoplasmáticas existentes en la célula viva.

Se ha prestado hasta ahora poca atención a la estructura del núcleo de las células granulosas^{12, 15}. La estructura submicroscópica del núcleo de las células granulosas del cerebelo humano no ha sido hasta ahora reportada en detalles. El único estudio realizado⁷, no describe la envoltura nuclear ni concluye sobre la existencia del nucléolo. El presente trabajo presta especial atención a la estructura del núcleo, empleando la fijación con glutaraldehído, que muestra un patrón cromatínico diferente al de la fijación con tetraóxido de osmio²¹, y la tinción con acetato de uranilo, que tiene afinidad por las nucleoproteínas¹⁸.

Herndon¹⁵ atribuye la disposición en grumos de la cromatina de estas células, a una fijación defectuosa. Sin embargo, este aspecto se observa comúnmente en diferentes tipos celulares que cumplen con criterios de fijación satisfactoria para los aldehídos²³. Las células granulosas muestran el mismo patrón de distribución cromatínica utilizando el tetraóxido de osmio^{12, 15} y el glutaraldehído como fijador primario. Es necesario estudiar el aspecto de la cromatina con fijadores diferentes a los ya empleados.

Los componentes nucleolares de estas células, especialmente el nucléolonema y la "pars amorph", muestran escaso desarrollo, en comparación con el observado por el autor en otras microneuronas: las neuronas estrelladas de la capa molecular⁵. La cantidad de cromatina asociada al nucléolo es en cambio abundante, característica de células con alta biosíntesis de proteína³. No hemos observado hasta el presente la existencia de un nucléolo en la forma descrita por Dutta y colaboradores⁹.

RESUMEN

Se estudiaron al microscopio electrónico cuatro muestras de la corteza cerebelosa de pacientes operados por diferentes alte-

raciones patológicas de la fosa posterior y del tronco cerebral. La corteza cerebelosa se fijó primariamente en glutaraldehído, luego en tetraóxido de osmio y se incluyó en Epon.

Las células granulosas forman grupos separados por los glomérulos cerebelosos. Su diámetro es de 3.7 - 4.8 micras. Se observan, en menor proporción, células más pequeñas de 2.5 - 3 micras. Su citoplasma forma una banda estrecha alrededor del núcleo y muestra escaso desarrollo del retículo endoplásmico rugoso y cantidad moderada de ribosomas libres. Contiene mitocondrias, complejo de Golgi, lisosomas y gránulos de lipofucsina. Las mitocondrias muestran la matriz clara e hinchada y las vacuolas del complejo de Golgi están moderadamente dilatadas. Se observan además microvesículas de centro denso, de 420 - 470 Å de diámetro, y microtúbulos de 200 Å de diámetro. El núcleo es voluminoso con cariosomas gruesos, gránulos y fibrillas nucleoplásmicas y gránulos pericromatínicos, de 55 milimicras de diámetro, dispersas en el nucléoplasma. El nucléolo muestra escaso desarrollo del nucléolonema y abundante cromatina nucleolar asociada.

Las membranas de las células granulosas se hallan frecuentemente separadas por un espacio de 40 - 110 Å de ancho.

Se discute el papel ejercido por las maniobras quirúrgicas, el proceso de fijación y el edema perifocal en el aspecto de las mitocondrias, el complejo de Golgi y las dimensiones del espacio extracelular.

SUMMARY

Four specimens of the cerebellar cortex of patients operated on for different pathological alterations of the posterior fossa and the cerebral stem were studied under the electron microscope. The cerebellar cortex was primarily fixed in glutaraldehyde, re-fixed in osmium tetroxide and embedded in Epon.

The granule cells form groups separated by the cerebellar glomeruli. Their diameter is from 3.7 - 4.8 micra. A lesser proportion of smaller cells, 2.5 - 3 micra is observed. The cytoplasm forms a narrow band around the nucleus and shows poor development of the rough endoplasmic reticulum as well as a moderate

quantity of free ribosomes. It contains mitochondria, Golgi complex, lysosomes and lipofuscin granules. The mitochondria show a clear and swollen matrix and the Golgi complex vacuoles are moderately dilated. Furthermore, dense cored microvesicles 420 - 470 A and microtubules 200 A in diameter are also observed. The bulky nucleus shows thick karyosomes, nucleoplasmic granules and fibrils, and perichromatinic granules, 55 millimicra in diameter, dispersed in the cytoplasm. The nucleolus shows poor development of the nucleolonema and abundant nucleolar associated chromatin.

The membranes of the closely packed granule cells appear separated by a space 40 - 110 A in width.

The role exercised by surgical manipulations as well as the fixation process and the perifocal edema are discussed in relation to the aspect of mitochondria, Golgi complex, and the dimensions of the extracellular space.

AGRADECIMIENTO

Nuestra gratitud al Dr. José R. Guzmán, por el suministro de las muestras de la corteza cerebelosa humana; a la Sra. Zoila de Mejía y al Sr. José Espinoza, por su asistencia técnica; a la Srta. Marina Medrano, por su asistencia secretarial; y al Sr. Eduardo Añez, por su ayuda en la preparación del material fotográfico.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 — BAKAY, L.; LEE, J. C. "Pathophysiology of human brain edema". Brain Edema. Págs. 69-95. Charles C. Thomas. Springfield. U.S.A. 1965.
- 2 — BEHNKE, O. "A preliminary report on "microtubules" in undifferentiated and differentiated vertebrate cells". J. Ultrastruct. Res. 11: 139-146. 1964.
- 3 — BENHARD, W. "Ultrastructural aspects of the normal and pathological nucleolus in mammalian cells". International Symposium, The Nucleolus. Its structure and function. Págs. 13-38. National Cancer Institute Monograph. Maryland. 1966.

- 4 — CASTEJON, O. J.; GUZMAN, J. R. "Aspecto submicroscópico de las neuronas de la corteza cerebral humana en el síndrome de hipertensión endocraneana ocasionado por tumor cerebral". *Acta Cient. Venezolana*. 19: 11. 1968. (Resumen).
- 5 — CASTEJON, O. J. "Ultraestructura de la capa molecular de la corteza cerebelosa humana". *Invest. Clín.* N° 28: 41-66. 1968.
- 6 — CRAVIOTO, H. "Filamentous and tubular structures in mammalian axoplasm. An electron microscopic study". *J. Comp. Neurol.* 126: 453-462. 1966.
- 7 — DAHL, V.; OLSEN, S.; BIRCH-ANDERSEN, A. "The fine structure of the granular layer in the human cerebellar cortex". *Acta Neurol. Scand.* 38: 83-97. 1962.
- 8 — DUTTA, C. R.; SIEGESMUND, K. A.; FOX, C. A. "Light and electron microscopic observations of an intranucleolar body in nerve cells". *J. Ultrastruct. Res.* 8: 542-551. 1963.
- 9 — ECCLES, J. "Functional meaning of the patterns of synaptic connections in the cerebellum". *Perspect. Biol. Med.* 8: 289-310. 1965.
- 10 — FOX, C. A.; HILLMAN, D. E.; SIEGESMUND, K. A.; DUTTA, C. R. "The primate cerebellar cortex. A Golgi and electron microscopic study". *Progr. Brain Res.* 25: 174-225. 1967.
- 11 — GRAY, E. G. "Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: An electron microscope study". *J. Anat. (Lond.)* 93: 420-433. 1959.
- 12 — GRAY, E. G. "The granule cells, mossy synapses and Purkinje spine synapses of the cerebellum: Light and electron microscope observations". *J. Anat. (Lond.)* 95: 345-356. 1961.
- 13 — GRILLO, M.; PALAY, S. L. "Granule-containing vesicles in the autonomic nervous system". *Electron microscopy*, Breese, S. S. (Ed). Vol. 2, U-1. Academic Press. New York. 1962.
- 14 — GRUNDFEST, H. "Synaptic transmission", McGraw-Hill Yearbook of Science and Technology. Pág. 545-548. New York. 1963.
- 15 — HERNDON, R. M. "The fine structure of rat cerebellum. II. The stellate neurons, granule cells and glia". *J. Cell Biol.* 23: 277-293. 1964.
- 16 — HÖKFELT, T. "On the ultrastructural localization of noradrenaline in the central nervous system of the rat". *Z. Zellforsch.* 79: 110-117. 1967.
- 17 — LAATSCH, R. H.; COWAN, W. M. "Electron microscopic studies of the dentate gyrus of the rat. I. Normal structure with special reference to synaptic organization". *J. Comp. Neurol.* 128: 359-396. 1966.
- 18 — MARINOZZI, V.; GAUTIER, A. "Fixations et colorations. Etude des affinités des composants nucleoprotéiniques pour l'hydroxyde de plomb et l'acetate d'uranyle". *J. Ultrastruct. Res.* 7: 436-461. 1962.

- 19 — MERCER, E. H. "The evolution of intracellular phospholipid membrane systems". The interpretation of Ultrastructure, Págs. 369-384. Harris, J. C. (Ed), Academic Press. New York. 1962.
- 20 — NOVIKOFF, A. B. "Lysosomes and related particles". The Cell. Vol. II. Págs. 423-488. Brachet, J.; Mirsky, A. E. (Eds). Academic Press. New York. 1961.
- 21 — PALAY, S. L. "Synapses in the central nervous system". J. Biophys. Biochem. Cytol. Suppl. 2: 193-206. 1956.
- 22 — PALAY, S. L. "The structural basis for neural action". Brain Function, Vol. II. Brazier, M. A. B. (Ed). Págs. 69-108. University of California Press. Berkeley. 1964.
- 23 — SABATINI, D. D.; BENSCH, K.; BARNETT, R. J. "Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation". J. Cell Biol. 17: 19-58. 1963.
- 24 — SAMORAJSKI, T.; ORDY, J. M.; KEEFE, J. R. "The fine structure of lipofuscin age pigment in the nervous system of aged mice". J. Cell Biol. 26: 779-795. 1965.
- 25 — SANDBORN, E.; KOEN, P. F.; McNABB, J. D.; MOORE, G. "Cytoplasmic microtubules in mammalian cells". J. Ultrastruct. Res. 11: 123-138. 1964.

"La investigación científica puede planearse a grandes líneas y no en detalle, y aún menos puede ser regimentada".

Mario Bunge

"La Ciencia. Su método y su Filosofía".