

Efecte de la 4-Aminopiridina sobre la diferenciació de la columna motora lumbar i els músculs de l' extremitat en l'embrió de pollet.

Josep E. Esquerda, Jordi Calderó, Joan X. Comella i Joan Ribera.

Departament d'Histologia i Biologia Cel.lular. Facultat de Medicina. Estudi General de Lleida.(1)

Abstract

We have investigated the developmental effects of pharmacological activation by 4-aminopyridine (4-AP) of the neuromuscular junction at the chick embryo. Drug was applied at the time of a major establishment of definitive spinal cord motoneuron pool and stabilization of peripheral neuromuscular synapses (days 6th-9th). Cell counts in the lumbar lateral motor column do not change in 4-AP treated embryos, whereas neuromuscular blockade of developing synapses by d-tubocurarine, in creases the total number of motoneurons. 4-AP treated embryos, showed, in addition, a volumetric increase of leg muscular tissue. These results indicate that the activation of neuromuscular synapses "per se" is not enough to increase the natural motoneuron death.

Introducció

Es ben establert, que el desenvolupament de connexions neuromusculars estables, està sota la influència de l'activitat funcional dels contactes sinàptics primitius (BENNET, 1983; COWAN i cols. 1984). En l'embrió de poll, entre els dies 6 i 10 d'incubació, té lloc un fenomen de mort fisiològica de gran part de les motoneurons contingudes a la mèdulla espinal; els axons que no poden establir contactes perifèrics, sofreixen una degeneració retrògrada natural, amb destrucció dels seus pericària (HAMBURGER, 1975; LAING, 1982).

(1) Aquest treball ha estat subvencionat per la CIRIT (Generalitat de Catalunya).

El control de la població neuronal que ha de sobreviure durant el desenvolupament embrionari, sembla que està molt relacionat amb l'activitat de les seves connexions neuromusculars perifèriques. Es pot evitar la mort de les motoneurons, amb procediments experimentals que bloquegen o redueixen l'activitat de les sinapsis en desenvolupament (LAING i PRESTIGE, 1978; PITTMAN i OPPENHEIM, 1979; DING i cols., 1983), el qual suggereix que les sinapsis inactives lliberen un factor essencial per la supervivència de les motoneurons, d'una forma més utilitzable o en més quantitat (HILL i BENNET, 1983). D'altra banda, ha estat descrit un increment de la mort natural de motoneurons, en embrions de pollet sotmesos a estimulació elèctrica o a tractament amb agonistes neuromusculars, com el carbacol o l'esrina (OPPENHEIM i MADERDRUT, 1981; OPPENHEIM i NUÑEZ, 1982). El mateix estudi realitzat amb d'altres agents farmacològics relacionats, en canvi, no provoca un increment d'aquesta mort natural.

El propòsit del nostre treball, ha estat examinar la mort cel.lular de les motoneurons espinals i la diferenciació de les cèl.lules musculars, en una situació experimental d'activació de la lliberació d'acetilcolina induïda per l'administració de 4-aminopiridina. Els mateixos experiments s'han realitzat en condicions de bloqueig de l'activitat neuromuscular per l'administració de curare.

Material i Mètodes

Els ous de la varietat Arbor acres, ens han estat ^bsumministrats per COPAGA (Lleida) i foren incubats en el nostre laboratori a 38°C. Els agents farmacològics es van administrar diàriament durant el període de mort natural de les motoneurons de la mèdul·la espinal (dies 6-9). Els fàrmacs han estat disolts amb sol·lució fisiològica de Hanks equilibrada finalment a pH 7, i injectats damunt la membrana corioalantoidea. Unes experiències prèvies ens van fer veure que 100 nM diaris de 4-AP eren efectius i no letals pels embrions. El curare (d-tubo curarina -Sigma-), es va aplicar a una dosi de 3-4 mg diaris de forma igual a la abans descrita. La motilitat dels embrions es va observar diàriament durant el període de tractament. Els embrions foren sacrificats al dia 10. Les potes es van extreure, i foren pesades i fixades amb formaldehid al 4% durant 24 h a 4°C, per, finalment, ésser processades per estudi histoquímic de l'acetilcolinesterasa (AChE) segons el mètode de Karvovsky i també incloses en reïna plàstica (KULZER), per estudi histològic amb microscopia òptica. La resta del cos dels embrions va ésser fixat amb Carnoy, processat per inclusió en parafina i tallat de forma seriada a 12 micres. Les seccions han estat tenyides amb el mètode de Nissl-violeta de cresil. Els recomptes de motoneurons s'han realitzat a la columna motora lateral lumbar, cada 10 talls.

Resultats i Discussió

Tal com era d'esperar, els embrions tractats amb curare, restaven poc mòbils i no estaven paralitzats de forma continuada. Les seves potes, pesaven menys que els animals control i el seu nombre de motoneurons fou un 50% més elevat que els

controls. Aquests embrions contenen plaques motones que poden ésser identificades amb la coloració de l'acetilcolinesterasa i la densitat d'unions neuromusculars sembla superior als músculs controls. Les característiques citològiques de les cèl.lules musculars no sembla ésser diferent de la observada en els embrions controls de 10 dies.

Els embrions que varen rebre 4-AP, presentaven un nivell normal d'activitat motora però els seus moviments de les potes o les contraccions corporals eren incoordinades i a vegades convulsives. El pes de les potes va ésser un 24% superior al controls, (veure Taula 1).

La figura 1, mostra una anàlisi de la distribució rostrocaudal del nombre de motoneurons a la columna lateral lumbar, en un embrió control, tractat amb curare i tractat amb 4-AP. No veiem diferències en el nombre de motoneurons que sobreviuen al dia 10 d'incubació entre els embrions controls i els embrions tractats amb 4-AP, pel que deduem que la 4-AP no afecta al mecanisme que controla la mort cel.lular natural durant l'ontogènia. La morfologia de les plaques motores dels embrions tractats amb 4-AP és normal al visualitzar-s per l'activitat de l'acetilcolinesterasa. La morfologia dels músculs dels embrions tractats amb 4-AP no ofereix canvis citològics en relació als grups controls, en canvi, la superfície ocupada pels distins grups musculars, en les seccions transversals de les potes, és sempre més gran en els embrions tractats amb 4-AP. Per tant l'increment volumètric del teixit muscular induït per la 4-AP, es deu a un augment en el seu contingut en fibres musculars.

En aquest estudi, els resultats que hem obtingut en els embrions tractats amb curare, està d'acord amb les dades d'altres publicacions rellevants (GORDON i cols, 1974; LAING i PRESTIGE, 1978; PITTMAN i OPPENHEIM, 1979; DING i cols, 1983). El nostre treball, però, és la primera aportació en relació a la mort cel·lular natural en presència de 4-AP i les nostres observacions estan contraposades a altres estudis en els que l'estimulació elèctrica i alguns agonistes neuromusculars, provoquen un increment de la mort cel·lular neuronal en l'embrió de pollastre (OPPENHEIM i NUÑEZ, 1982). Encara que no hem realitzat comprovacions electrofisiològiques de l'efecte de la 4-AP en els nostres experiments, la possibilitat de que la 4-AP no sigui activa en el nostre sistema, no sembla probable, ja que la droga modifica l'activitat muscular dels embrions i incrementa el desenvolupament del teixit muscular.

Hi ha prou evidència experimental de que l'eliminació dels terminals nerviosos redundants a la placa motora, la mort neuronal natural i la diferenciació postsinàptica estan estretament lligades al grau d'activitat de la cèl·lula postsinàptica i al tamany del camp perifèric d'innervació. (CHANGUEUX i DANCHIN, 1976; SRIHARI i VRBOVA, 1978).

Però la hipòtesi de que l'activitat incrementada del nervi i/o del múscul provoqui també un increment de la mort natural neuronal no està prou establerta. Per exemple; alguns agonistes neuromuscular no alteren la mort neuronal (OPPENHEIM i MADERDRUT, 1981). A més, en cultius de medulla espinal, la síntesi i/o alliberament de material neurotròfic es depenen de l'activitat elèctrica i, en absència d'aquesta activitat, els material tròfics estan reduïts i s'incrementa la mort (BRENNEMAN i cols, 1984).

Nosaltres interpretem que l'activitat del sistema neuromuscular durant el desenvolupament, pot accelerar la velocitat d'estabilització dels contactes primitius però no ha de modificar la constant del tamany de les unitats motores determinada per la relació entre el nombre de motoneurons i el nombre de fibres musculars. El efecte de la 4-AP al terminal nerviós, pot ésser importat en aquest període, donant lloc a una estabilització avançada del contactes primitius i a una acceleració del creixement i diferenciació musculars.

El mecanisme pel qual l'estimulació elèctrica i l'administració de 4-AP a l'embrió de pollet, donen resultats diferents respecte a la pèrdua de motoneurons a la mèdulla espinal, no està clar. Deixant de banda les possibles crítiques metodològiques que podríem fer sobre el treball d'estimulació elèctrica, una interpretació que podria explicar aquesta discordança, seria l'aplicació d'una freqüència d'estimulació molt més alta que la fisiològica. S'ha dit que els patrons fisiològics de freqüència de descarrega de les neurones en desenvolupament, poden ésser determinants per conduir aquesta cap una determinada evolució sinaptogenètica (CHANGEUX i MIKOSHIBA, 1978), i les motoneurons lumbosacres de l'embrió de pollet tenen un patró de descarrega ben definit (LANDMESSER i O'DONOVAN, 1984). Per tant, la modificació experimental del patró natural de descarrega de les motoneurons, podria modificar el seu programa de diferenciació cap un circuit definit. La aplicació de 4-AP, incrementa l'alliberament de neurotransmissor sense afectar al patró normal de descarrega de les motoneurons i això ens suggereix que l'activació d'aquestes sinapsis "per se" no és suficient per augmentar la mort natural neuronal.

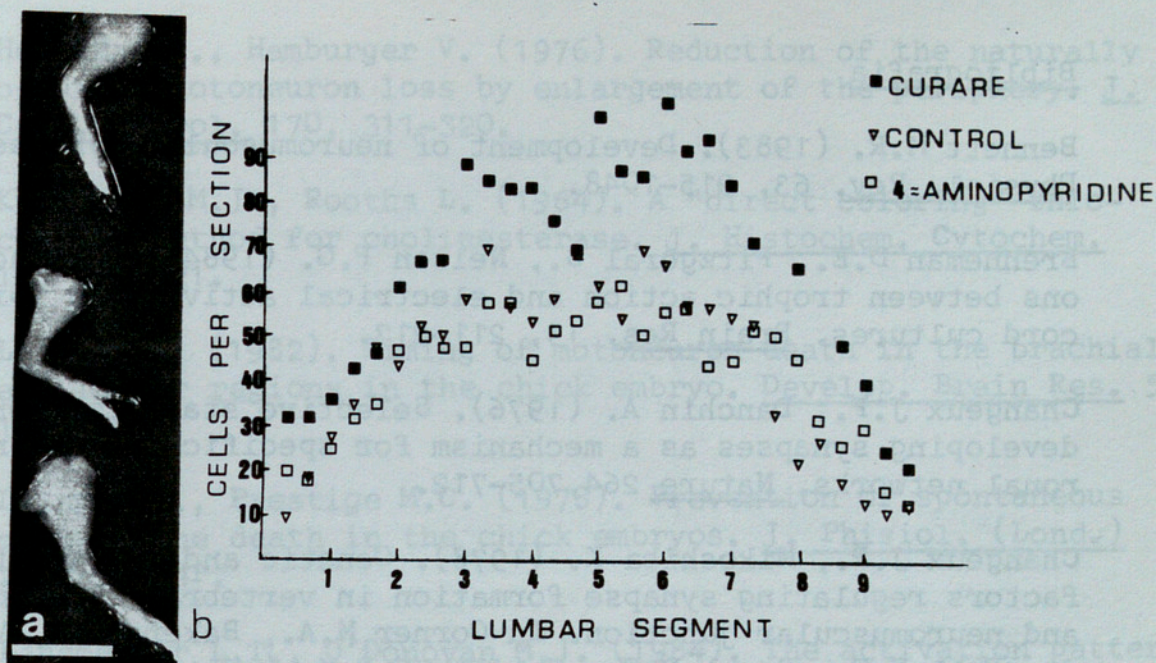


Fig 1 (a). Aspecte macroscòpic de les extremitats inferiors dels embrions de polllet als 10 dies: a dalt, grup control, al mitg, grup curare i a baix grup 4-AP. (b) Distribució rostrocaudal de les motoneurons a la columna lumbar en embrions de 10 dies. Hi ha un increment de la supervivència de motoneurons en els embrions tractats amb curare.

Taula I

	Pes de les potes en g. (mitja±D.S.)		Nombre total de cel. (mitja±D.S.)		Moviments/min. (mitja±D.S.)
Control	0,1241±0,020 (8)		14.382±1.228 (4)		38,40±5,94 (5)
Curare	*0,1147±0,018 (4)		*22.566±2.859 (2)		*7,75±3,86 (4)
4-AP	*0,1535±0,037 (12)		13.044±1.155 (6)		31,30±12,0 (10)

Taula: Dades agrupades dels embrions en el dia 10 d'incubació que han rebut solució de Hanks (control), curare (3-4 mg.) o 4-AP (100nM) diàriament durant els dies 6-9 d'incubació. Els números entre parèntesi indiquen el nombre d'animals estudiats en cada situació. Els (*) són significatius respecte al control ($P < 0,001$).

Bibliografia

- Bennett M.R. (1983). Development of neuromuscular synapses. Physiol. Rev. 63, 915-1048.
- Brenneman D.E., Fitzgerald S., Nelson P.G. (1984). Interactions between trophic action and electrical activity in spinal cord cultures. Brain Res. 15, 211-217.
- Changeux J.P., Danchin A. (1976). Selective stabilization in developing synapses as a mechanism for specification of neuronal networks. Nature 264, 705-712.
- Changeux J.P., Mikoshiba K. (1978). Genetic and "epigenetic" factors regulating synapse formation in vertebrate cerebellum and neuromuscular junction. In Corner M.A., Baker R.E., Van der Poll N.E., Swaab D.F., Uylings H.B.M. (editors) Maturation of the Nervous System. Prog. Brain Res. 48. Elsevier, Amsterdam, 43-66.
- Cowan W., Fawcett J.W., O'Leary D.D.M., Stanfield B.B. (1984). Regressive events in neurogenesis. Science 225, 1258-1265.
- Ding R., Jansen J.K.S., Laing N.G., Tonnensen H. (1983). The innervation of skeletal muscles in chickens curarized during early development. J. Neurocytol. 12, 887-919.
- Gardahaut M.F., Rouaud T., Renaud D., Le Dourain G. (1983). Developmental change in choline acetyltransferase activity in nerve endings of latissimus dorsi muscles in the chick embryo: effects of chronic spinal cord stimulation. Neurosci. Lett. 43, 299-302.
- Gordon T., Perry R., Tuffery A.R., Vrbová G. (1974). Possible mechanisms determining synapse formation in developing skeletal muscles of the chick. Cell Tissue Res. 155, 13-25.
- Hamburger V. (1958). Regression versus peripheral control of differentiation in motor hypoplasia. Am J. Anat. 102, 365-410.
- Hamburger V. (1975). Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. J. Comp. Neurol. 160, 535-546.
- Hill M.A., Bennett M.R. (1983). Cholinergic growth factor from skeletal muscle elevated following denervation. Neurosci. Lett. 35, 31-35.

Hollyday M., Hamburger V. (1976). Reduction of the naturally occurring motoneuron loss by enlargement of the periphery. J. Comp. Neurol. 170, 311-320.

Karnovsky M.J., Rootes L. (1964). A "direct coloring" thiocholine method for cholinesterase. J. Histochem. Cytochem. 12, 219-221.

Laing N.G. (1982). Timing of motoneuron death in the brachial and lumbar regions in the chick embryo. Develop. Brain Res. 5, 181-186.

Laing N.G., Prestige M.C. (1978). Prevention of spontaneous motoneurone death in the chick embryos. J. Physiol. (Lond.) 282, 33-34P.

Landmesser L.T., O'Donovan M.J. (1984). The activation patterns of embryonic chick motoneurons projecting to inappropriate muscles. J. Physiol. (Lond.) 347, 205-224.

Molgó J., Lemeignant M., Lechat P. (1977). Effects of 4-aminopyridines at the frog neuromuscular junction. J. Pharmacol. Expt. Therap. 203, 653-666.

Oppenheim R.W., Maderdrut J. (1981). Pharmacological modulation neuromuscular transmission and cell death in the lateral motor column of the chick embryo. Soc. Neurosci. Abstr. 7, 291.

Oppenheim R.W., Nuñez R. (1982). Electrical stimulation of hindlimb increases neuronal cell death in chick embryo. Nature 295, 57-59.

Pittman R., Oppenheim R.W. (1979). Cell death of motoneurons in the chick spinal cord. IV. Evidence that a functional neuromuscular interactions is involved in the regulation of naturally occurring cell death and the stabilization of synapses. J. Comp. Neurol. 187, 425-446.

Srihari T., Vrbová G. (1978). The role of muscle activity in the differentiation of neuromuscular junctions in slow and fast chick muscles. J. Neurocytol. 7, 529-540.

Toutant N., Bourgeois J.P., Toutant J.P., Renaud D., Le Dourain G., Changueux J.P. (1980). Chronic stimulation of the spinal cord developing chick embryo causes differentiation of multiple clusters of acetylcholine receptor in the posterior latissimus dorsi muscle. Develop. Biol. 76, 384-395.