

Diferencias y semejanzas en el desarrollo de las
interneuronas del hipocampo y de la corteza cerebral del
raton

Eduardo Soriano

Unitat de Biologia Cel.lular, Facultat de Biologia,

Universitat de Barcelona

Abstract

Differences and similarities in the neurogenesis of
interneurons in the hippocampus and neocortex of the mouse

Using a combination of immunocytochemistry for the detection of glutamic acid decarboxilase (GAD), the synthesizing enzyme of GABA, and 3(H)thymidine autoradiography, the patterns of neurogenesis of GAD-positive and GAD-negative (non immunoreactive) neurons were studied. In the neocortex GAD-positive and GAD-negative neurogenesis take place simultaneously; in addition we have confirmed that GAD-negative neurogenesis follows an "inside-out" pattern of positioning similarly to GAD-negative neurons. In the hippocampus, the peaks of neurogenesis for GAD-positive neurons occur before the peaks of neurogenesis of GAD-negative cells. Additionally, GAD-positive neurons in the hippocampus follow a "sandwich" sequence of positioning in that GAD-positive neurons in or close to the pyramidal layer are more delayed in their onset and their production extends longer than for GAD-positive neurons in plexiform layers.

Diferencias y semejanzas en el desarrollo de las interneuronas del hipocampo y de la corteza cerebral del ratón

INTRODUCCION

Eduardo Soriano

Clásicamente las neuronas se han subdividido en dos grandes grupos: las neuronas de proyección (NP) o neuronas principales, y las neuronas de circuito local (NCL) o interneuronas. Las primeras son las encargadas de transmitir información entre áreas o regiones cerebrales distintas a través de un axón de gran longitud. Las interneuronas poseen un axón corto que arboriza en las cercanías del cuerpo celular y son las encargadas de modular la actividad de las NP. En la corteza cerebral, las NP están representadas exclusivamente por las células piramidales. Por el contrario, las NCL corticales constituyen una población muy heterogénea, atendiendo a su morfología (Fairén y cols., 1984) y contenido en neuropéptidos (Hendry y cols., 1984). Casi todas las NCL corticales utilizan ácido γ -amino butírico (GABA) como neurotransmisor y constituyen el único mecanismo inhibitorio con que cuenta la corteza cerebral (Houser y cols., 1984).

Debido a la ausencia de métodos de estudio apropiados, el desarrollo de las NCL corticales y los mecanismos celulares que regulan su enorme diversidad han permanecido durante mucho tiempo prácticamente desconocidos. En el presente trabajo analizamos la neurogénesis de las NCL en dos áreas de la corteza cerebral que representan diferentes niveles de

evolución y organización. La corteza somato-sensorial primaria (SMC) del ratón constituye el área sensorial de mayor desarrollo en dicho animal y la región del Neocortex que tiene un nivel de organización estructural más complejo y evolucionado (Woolsey y Van der Loos, 1970; Van der Loos y Woolsey, 1973). El hipocampo (HFC), por el contrario, forma parte del Arquicortex y es una región cortical con una organización relativamente sencilla y primitiva (Blackstad, 1956). En este estudio hemos combinado la autoradiografía de 3(H)timidina y la inmunocitoquímica de la glutamato decarboxilasa (GAD), el enzima biosintético del GABA. Con la primera técnica se determina el periodo de "nacimiento neuronal", es decir, el periodo en el cual el neuroblasto abandona la zona ventricular y se incorpora al parénquima cortical embrionario (Sidman, 1970). La inmunocitoquímica de GAD nos permite definir inequívocamente la población de NCL de la corteza cerebral (Houser y cols, 1984).

MATERIAL Y METODOS

Las hembras preñadas de ratón C57B1 recibieron un único pulso de 3(H)timidina (5 μ Ci/g) durante el periodo embrionario E10-E17. Cuando las crías fueron adultas (3 meses), se inyectaron intracerebralmente con colchicina (20 μ g colchicina en 1 μ l de salina) para inhibir el transporte axonal e incrementar el inmunomarcage de los cuerpos

neuronales (Riback y cols., 1978). Tras 24 h. de supervivencia, se perfundieron con paraformadehído y se obtuvieron cortes por congelación de 20 μ m de grosor. A continuación, los cortes se procesaron "free floating" para la detección inmunocitoquímica de GAD según el método indirecto de la peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (Sternberger y cols., 1970). Brevemente, los cortes se incubaron toda una noche con suero anti-GAD (Oertel y cols., 1981) obtenido en oveja a una dilución 1:2000, 1h en suero anti-cabra (cruza con IgG de oveja) diluido 1:100 y 90 min en el complejo PAP (obtenido en cabra) diluido 1:200. Tras el revelado con diaminobenzidina, los cortes se procesaron para autoradiografía con emulsión NTB-2 (Kodack) y revelador D-19. Para el análisis del material, se confeccionaron mapas del SMC y HPC correspondientes a todos los días de inyección; en ellos se anotó la posición de las células marcadas con autoradiografía (fig. 1A y 1B), tanto si presentaban marcaje inmunocitoquímico (GAD+) como si no (GAD-). Para incrementar la resolución radial del análisis, ambas regiones corticales se subdividieron en capas de acuerdo a la terminología y criterios comunmente utilizados. En el hipocampo, además, se consideraron las siguientes regiones: Area Dentata (AD), Regio Superior (RS) y Regio Inferior (RI). Los datos se presentan en forma de densidad numérica (número de células por mm^2).

RESULTADOS Y DISCUSION

Periodo de neurogénesis.

En las autoradiografías de 3(H)timidina (3HT) teñidas con una técnica histológica convencional resulta imposible distinguir los tipos neuronales a los que está asociado el marcaje de 3HT. La tinción inmunocitoquímica GAD permite definir la población de NCL corticales; en ocasiones, la técnica inmunocitoquímica también nos da información acerca de la geometría dendrítica de la neurona (Fig. 1C). La presencia de granos de plata autoradiográficos en el núcleo de neuronas inmunoreactivas nos permite estudiar inequívocamente la neurogénesis de las NCL (Fig. 1D y 1E). El marcaje autoradiográfico sobre estructuras no inmunoreactivas es interpretado como neuronas de proyección (Flechas en Fig. 1E).

En la figura 2 se resume el patrón de marcaje autoradiográfico observado en las diferentes áreas corticales (Fairén y cols, 1985; Fairén y cols, 1986; Soriano y cols, 1985, Soriano y cols, 1986). En el Neocortex, la evolución de la neurogénesis de las neuronas GAD(+) (NCL) y GAD(-) (NP) sigue un curso paralelo; no obstante el pico máximo de neurogénesis es ligeramente anterior en las GAD(-) (E13) que en las GAD(+) (E14). En la Regio Superior e Inferior del Hipocampo, la neurogénesis de las NCL precede claramente a la neurogénesis de las NP. Así

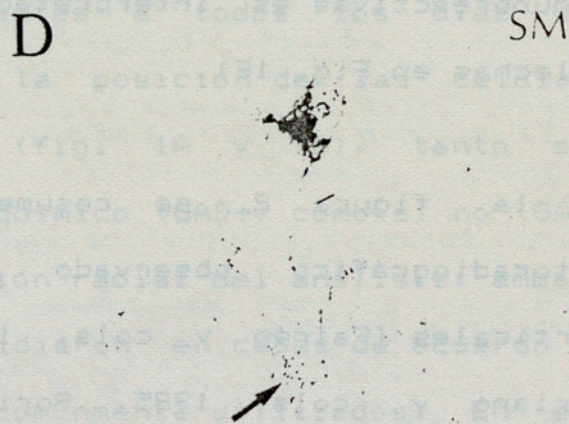
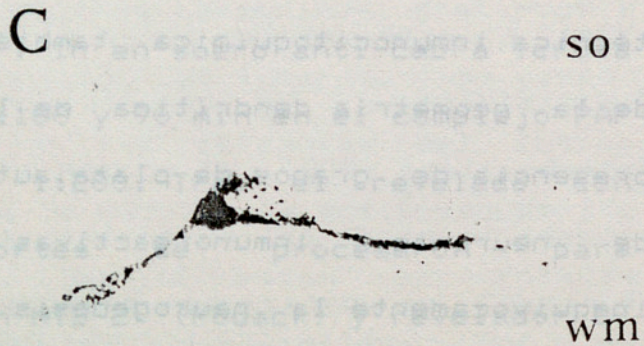
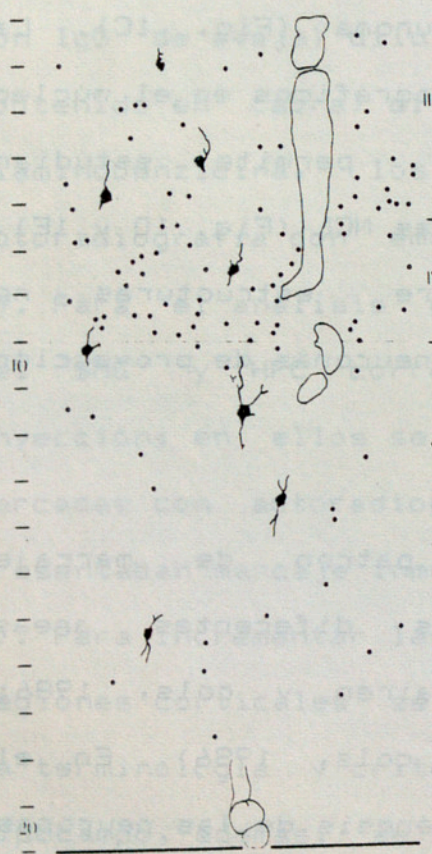
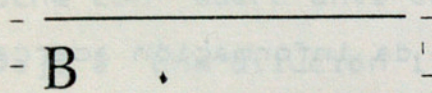
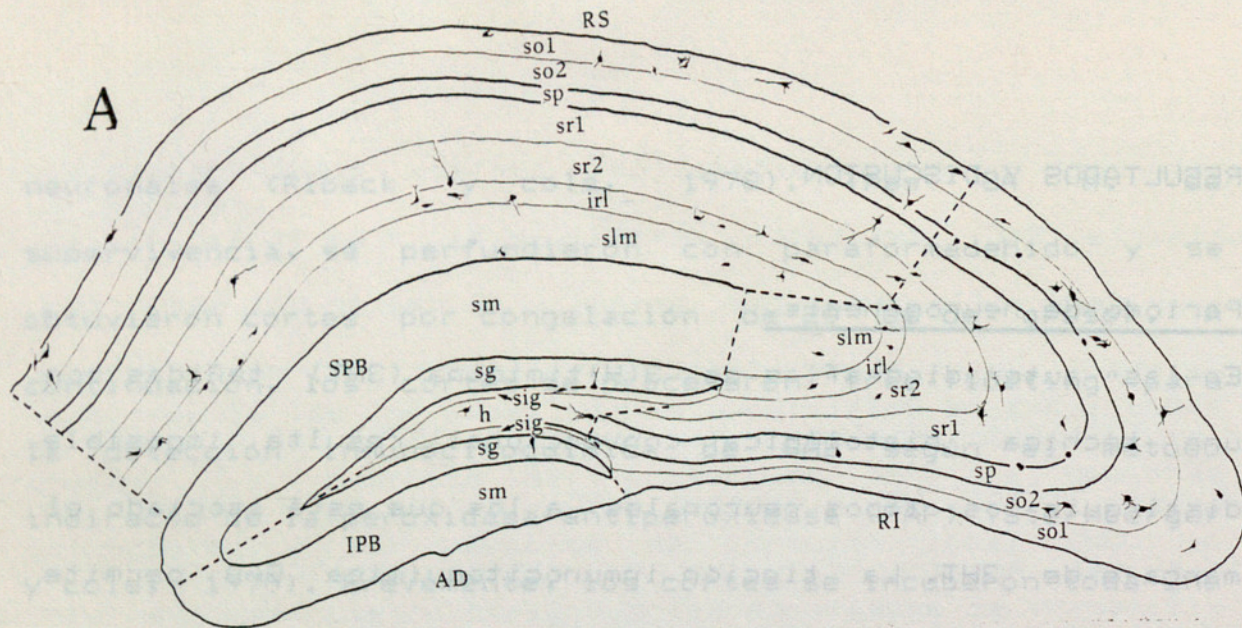


Fig. 1: Dibujos de la corteza hipocámpica (A) y somato-sensorial (B) de ratón en los que se ha anotado la posición de las neuronas GAD-positivas marcadas con 3HT. Es evidente el sistema de laminación utilizado. En C, D y E, se muestran ejemplos de neurona inmunoreactivas marcadas con granos de autoradiografía. Las flechas en D y E señalan acumulaciones de granos de plata sobre estructuras no inmunomarcadas, interpretadas como células GAD-negativas.

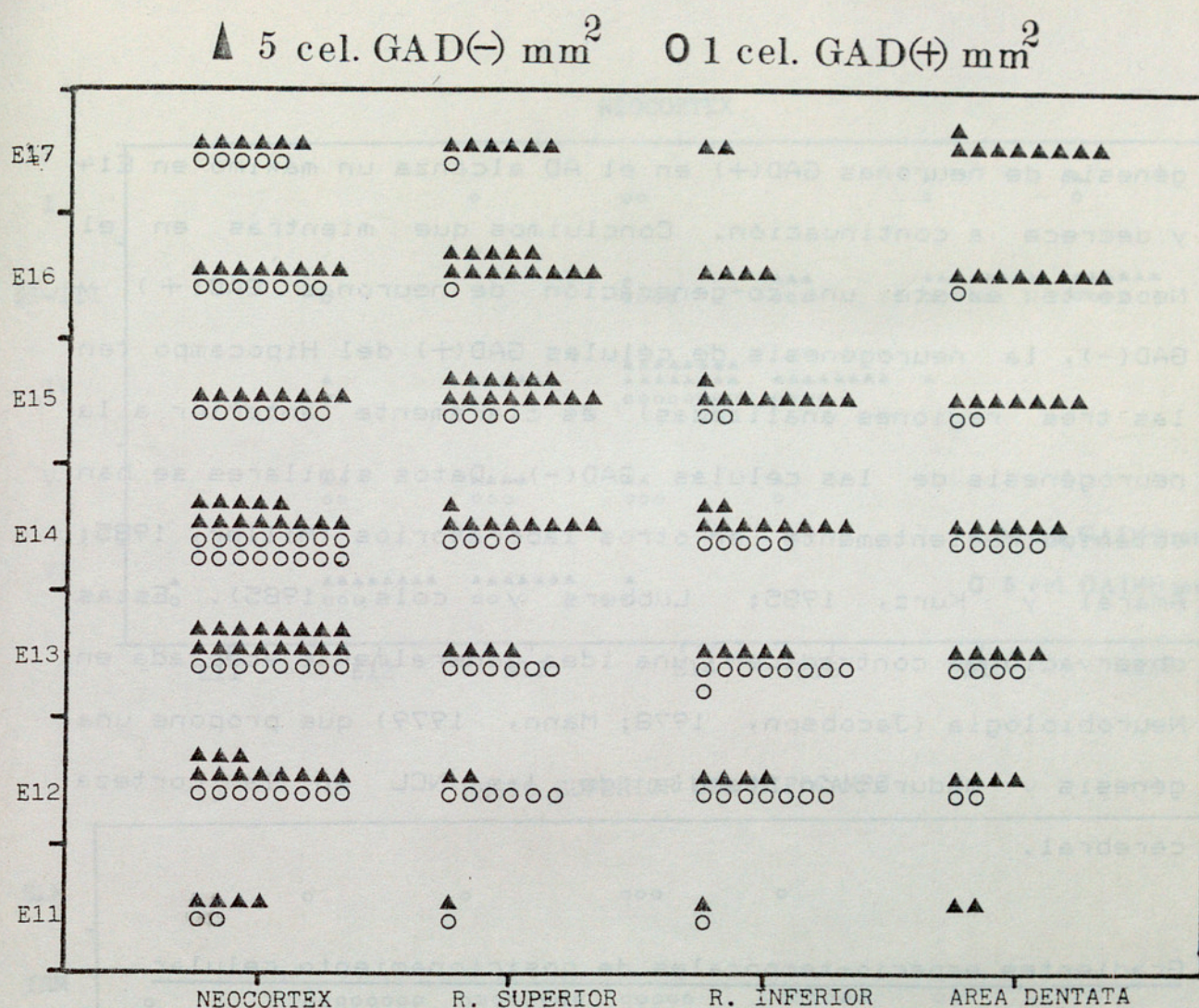


Fig. 2: Patrón de neurogénesis de neuronas GAD-positivas y GAD-negativas en el Neocórtex y en las tres regiones (RS, RI y AD) del hipocampo.

por ejemplo, en la RS la fase de máxima neurogénesis GAD(+) abarca el periodo E12-E15, mientras que para las células GAD(-) sólo cubre los días E15 y E16. En la RS, la fase máxima de neurogénesis GAD(+) también se alcanza dos días (E12-E13) antes que en las células GAD(-) (E14-E15). En el AD la distribución de NF marcadas con 3HT se incrementa constantemente a lo largo de todo el periodo embrionario; la génesis de estas neuronas se completará durante las tres primeras semanas de vida posnatal (Angevine, 1965). La

génesis de neuronas GAD(+) en el AD alcanza un máximo en E14 y decrece a continuación. Concluimos que mientras en el Neocortex existe una co-generación de neuronas GAD(+) y GAD(-), la neurogénesis de células GAD(+) del Hipocampo (en las tres regiones analizadas) es claramente anterior a la neurogénesis de las células GAD(-). Datos similares se han obtenido recientemente en otros laboratorios (Miller, 1985; Amaral y Kurz, 1985; Lubbers y cols, 1985). Estas observaciones contradicen una idea generalmente aceptada en Neurobiología (Jacobson, 1978; Mann, 1979) que propone una génesis y maduración tardía de las NCL en la corteza cerebral.

Gradientes espacio-temporales de posicionamiento celular

La figura 3 ilustra el patrón de posicionamiento que sigue la neurogénesis de células GAD(+) y GAD(-) en el Neocortex (Fairén y cols, 1986) y en la Regio Superior del Hipocampo (Soriano y cols, 1985; Soriano y cols, 1987a). En la corteza somato- sensorial la neurogénesis de ambas poblaciones neuronales sigue un gradiente tipo "inside-out" o "de dentro a fuera". Las neuronas originadas en los primeros días embrionarios tienden a situarse en las capas inferiores de la corteza cerebral (capas V y VI); las células que nacen en siguientes generaciones, adoptan de forma progresiva posiciones cada vez más superficiales.

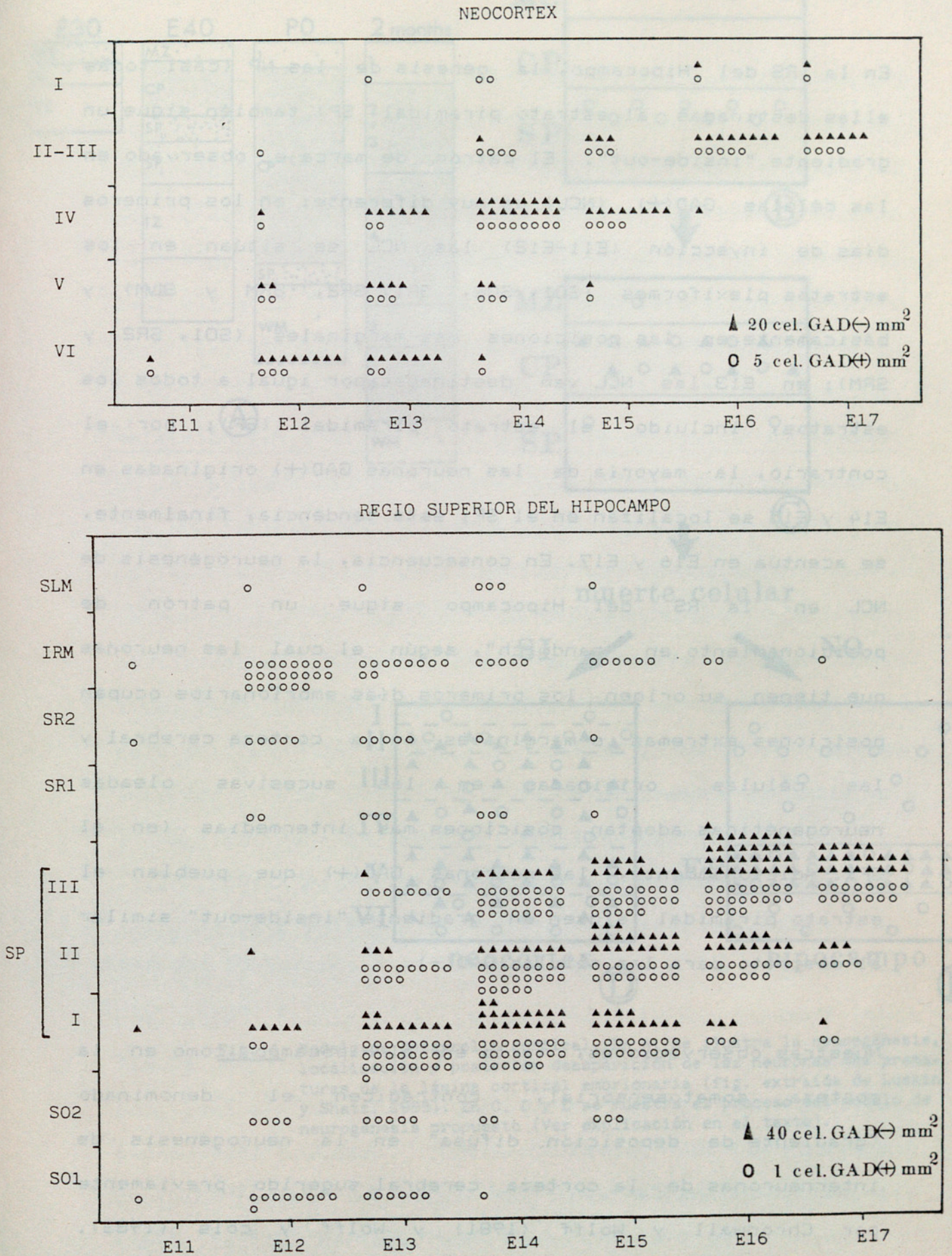


Fig. 3: Patrón espaciotemporal de neurogénesis GAD-positiva en el Neocórtex y en la Regio Superior del Hipocampo

En la RS del Hipocampo, la génesis de las NP (casi todas ellas destinadas al estrato piramidal, SP) también sigue un gradiente "inside-out". El patrón de marcaje observado en las células GAD(+) (NCL) es muy diferente: en los primeros días de inyección (E11-E12) las NCL se sitúan en los estratos plexiformes (SO1, SO2, SR1, SR2, SRM y SLM) y básicamente en las posiciones más marginales (SO1, SR2 y SRM); en E13 las NCL van destinadas por igual a todos los estratos, incluido el estrato piramidal (SP); por el contrario, la mayoría de las neuronas GAD(+) originadas en E14 y E15 se localizan en el SP; esta tendencia, finalmente, se acentúa en E16 y E17. En consecuencia, la neurogénesis de NCL en la RS del Hipocampo sigue un patrón de posicionamiento en "sandwich", según el cual las neuronas que tienen su origen los primeros días embrionarios ocupan posiciones extremas o marginales en la corteza cerebral y las células originadas en las sucesivas oleadas neurogenéticas adoptan posiciones más intermedias (en el SP). Adicionalmente, las neuronas GAD(+) que pueblan el estrato piramidal siguen un gradiente "inside-out" similar al descrito para las células GAD(-).

Nuestras observaciones, tanto en el Hipocampo como en la corteza somatosensorial, contradicen el denominado "gradiente de deposición difusa" en la neurogénesis de interneuronas de la corteza cerebral sugerido previamente por Chronwall y Wolff (1981) y Wolff y cols (1983).

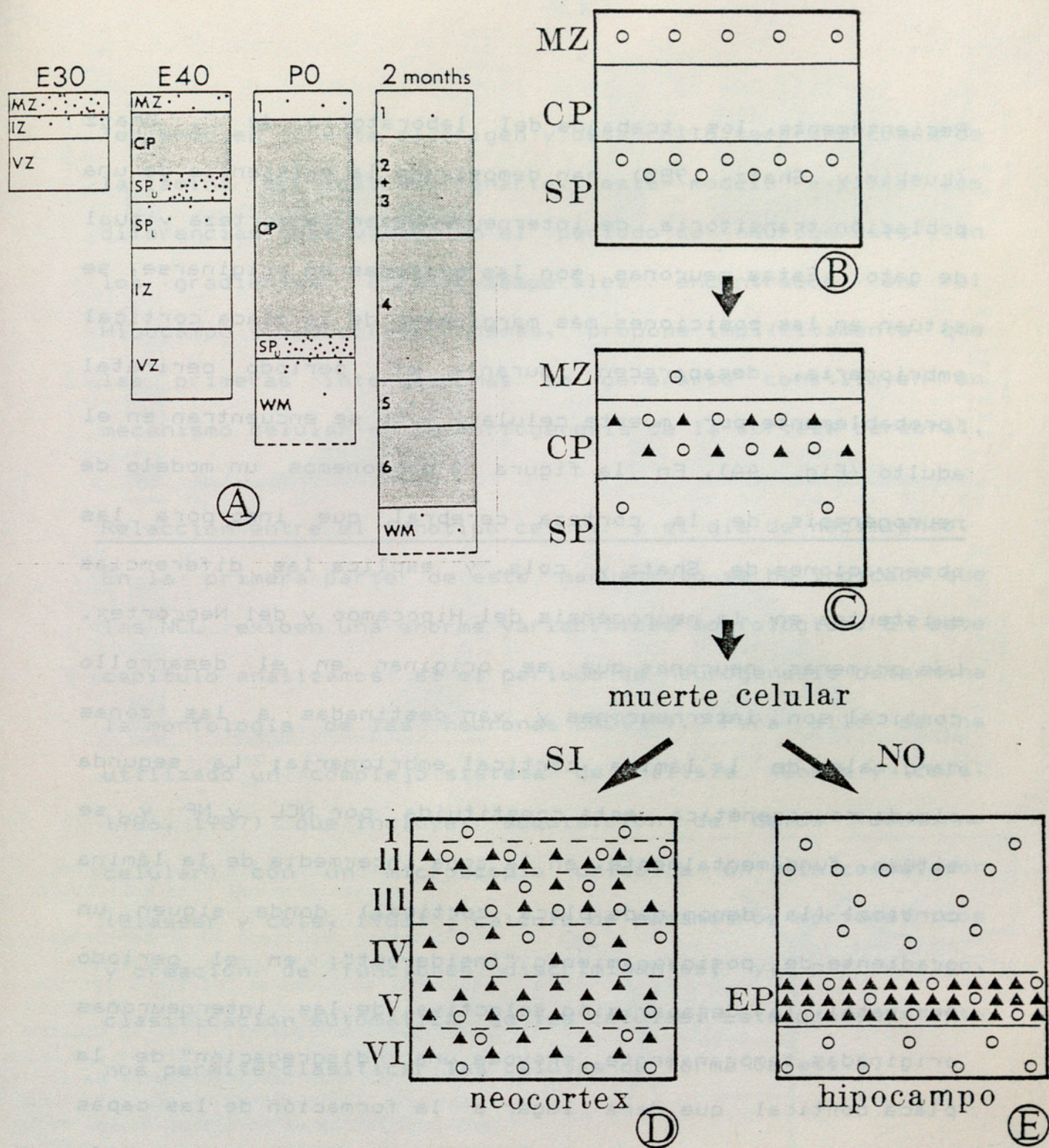


Fig. 4: Modelo de desarrollo cortical. En A, se ilustra la neurogénesis, localización y posterior desaparición de las neuronas más prematuras de la lámina cortical embrionaria (fig. extraída de Luskin y Shatz, 1985). En C, D y E se muestra el proceso del modelo de neurogénesis propuesto (Ver explicación en el texto).

Recientemente, los trabajos del laboratorio de C. Shatz (Luskin y Shatz, 1985) han demostrado la existencia de una población transitoria de interneuronas en la corteza visual de gato. Estas neuronas son las primeras en originarse, se sitúan en las posiciones más marginales de la placa cortical embrionaria, desaparecen durante el periodo perinatal (probablemente por muerte celular) y no se encuentran en el adulto (Fig. 4A). En la figura 4 proponemos un modelo de neurogénesis de la corteza cerebral que incorpora las observaciones de Shatz y cols. y explica las diferencias existentes en la neurogénesis del Hipocampo y del Neocórtex. Las primeras neuronas que se originan en el desarrollo cortical son interneuronas y van destinadas a las zonas marginales de la lámina cortical embrionaria; La segunda oleada neurogenética está constituida por NCL y NF y se sitúan, fundamentalmente, en la zona intermedia de la lámina cortical (la denominada placa cortical) donde siguen un gradiente de posicionamiento "inside-out"; en el periodo perinatal, la desaparición selectiva de las interneuronas originadas tempranamente provoca una "disgregación" de la placa cortical que dará lugar a la formación de las capas del Neocortex adulto (II, III, IV, V y VI) excepto capa I. En el Hipocampo no se produce la desaparición de las NCL y la placa cortical primitiva permanece "condensada" en el adulto constituyendo una estructura de organización primitiva, el estrato piramidal (SP); en ambos lados del SP, permanece una población rica de interneuronas en el adulto.

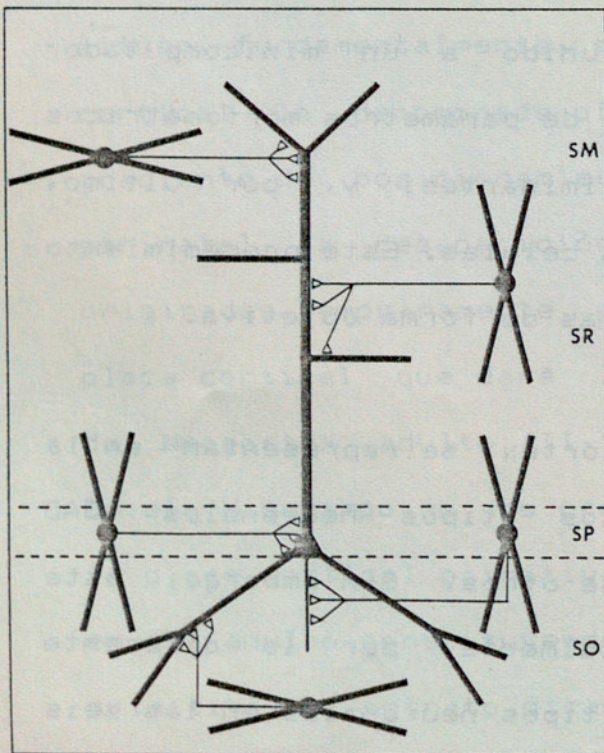
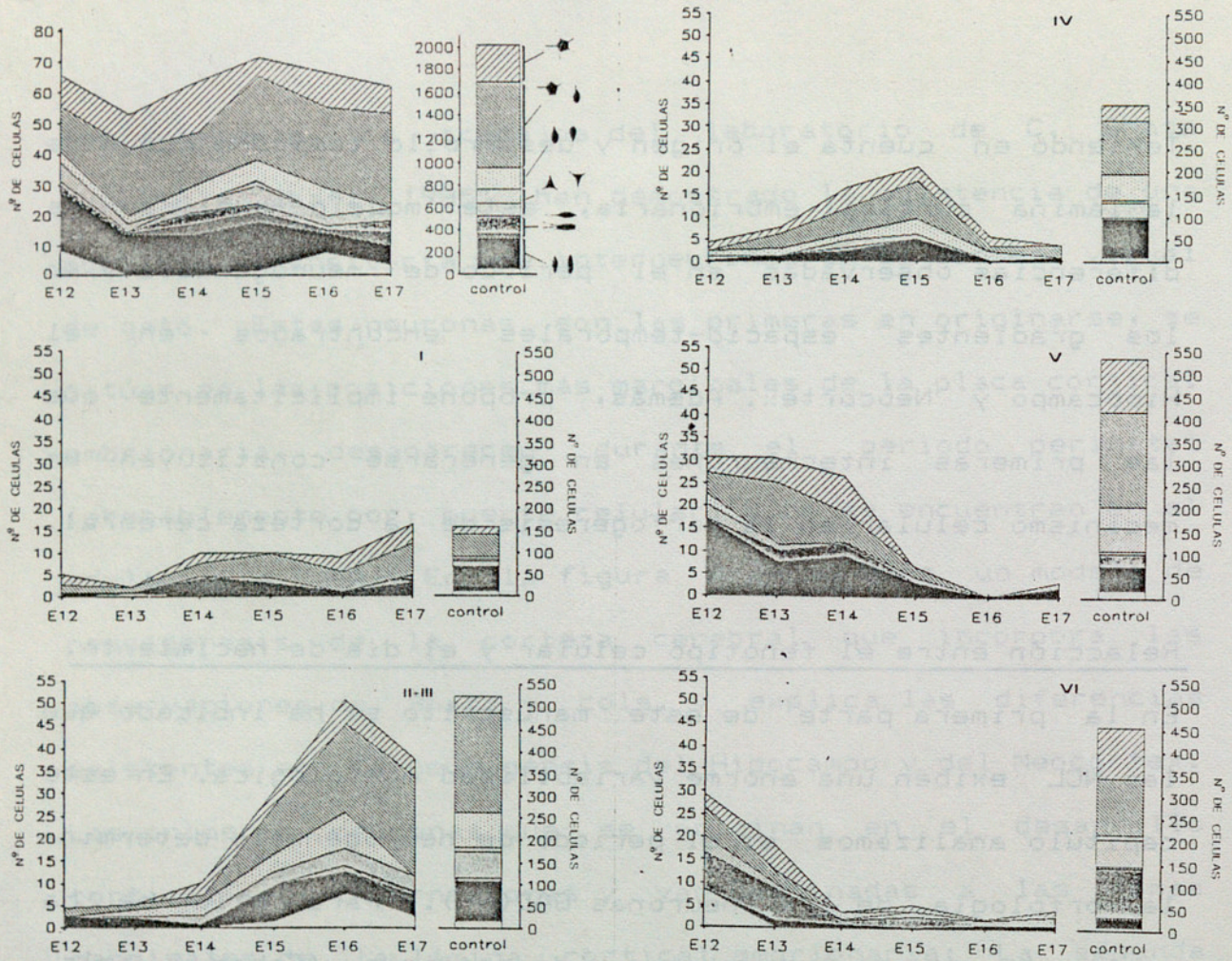
Teniendo en cuenta el origen y desarrollo temprano común de la lámina cortical embrionaria, este modelo explica las diferencias observadas en el periodo de neurogénesis y en los gradientes espacio-temporales encontrados en el Hipocampo y Neocortex. Además, propone implícitamente que las primeras interneuronas en generarse constituyen un mecanismo celular en la morfogénesis de la corteza cerebral.

Relación entre el fenotipo celular y el día de nacimiento.

En la primera parte de este manuscrito se ha indicado que las NCL exhiben una enorme variabilidad morfológica. En este capítulo analizamos si el periodo de neurogénesis determina la morfología de las neuronas GAD(+). Para ello se ha utilizado un complejo sistema de análisis (Cobas y cols, 1986, 1987) que incluye: adquisición de datos (contorno celular) con un microscopio unido a un minicomputador (Glasser y cols, 1982); cálculo de parámetros morfométricos y creación de funciones discriminantes; y, por último, clasificación automática de las células. Este procedimiento nos permite clasificar las células de forma objetiva.

Los datos obtenidos en el Neocortex se representan en la figura 5. Globalmente, ciertos tipos neuronales GAD positivos se originan antes que otros. Sin embargo, este hecho está causado, fundamentalmente, por la diferente posición radial que ocupan los tipos neuronales en las seis capas de la corteza que, como hemos visto siguen un

(A)



(B)

Fig. 5: Relación entre el día de nacimiento neuronal y la morfología celular. En A se ilustra un estudio cuantitativo realizado en el neocortex. En la gráfica superior de la columna izquierda se muestran los tipos neuronales analizados globalmente; en el resto, por capas individuales. En B, se ilustra un esquema de la distribución de los tipos de interneuronas más importantes en el Hipocampo. Las neuronas de circuito local axo-dendríticas se localizan en las capas marginales; las interneuronas axo-axónicas y axo-somáticas se ubican en el estrato piramidal.

gradiente "inside-out". Así pues, si analizamos la neurogénesis de los tipos celulares que pueblan una misma capa, se observa que el periodo de neurogenesis es el mismo para todos los tipos neuronales. Estos resultados indican que la determinación del fenotipo celular en las neuronas GAD(+) estaría controlada en gran medida por factores genéticos más que por el día de nacimiento. Los resultados de un estudio similar en la Regio Superior del Hipocampo actualmente en curso de realización (Soriano y cols, 1987c y 1987d) parecen apuntar hacia las mismas conclusiones: dentro de cada capa, el periodo de neurogénesis de los distintos tipos neuronales GAD (+) es el mismo, si bien un análisis preliminar indica pequeñas diferencias en cuanto a tamaño. Dada la particular laminación del Hipocampo se pueden hacer, además, algunas consideraciones adicionales. En la figura 5B se muestra la disposición básica de interneuronas en la Regio Superior del Hipocampo; las NCL que tienen un axón altamente especializado (i.e. células "basket" y "chandelier", que establecen conexiones axo-somáticas y axo-axónicas, respectivamente) tienden a situarse en el SP; por el contrario, las NCL con un axón más generalizado (interneuronas axodendríticas) se sitúan preferentemente en los estratos plexiformes. Basándonos en las características del gradiente en "sandwich", parece evidente que las interneuronas de axón más especializado tienen un desarrollo más precoz que las interneuronas de axón generalizado.

AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo ha sido realizado en estrecha colaboración, fundamentalmente, con los doctores A. Fairén y A. Cobas del Inst. Cajal. Agradezco a la Prof. M. Dürfort su desinteresada ayuda y apoyo contante durante la elaboración de este trabajo; al Prof. H. Van der Loos y al Dr. E. Welker, sus orientaciones y hospitalidad en las visitas a Lausanne; al Dr. M. Tappaz (Lyon) la generosa donación del anticuerpo anti-GAD.

Este trabajo ha sido financiado parcialmente con un Ajut a la Recerca de la CIRIT (AR85-209), una ayuda a la investigación de la CAICYT (CSIC/CAICYT 154/1985) y un Short-term Fellowship de la European Science Foundation (ETP/ STF/ 86-2937).

BIBLIOGRAFIA.

- AMARAL, D.G., J. KURZ, (1985), *Neurosci. Lett.* 59: 33-39
- ANGEVINE, J.B.Jr, (1985), *Exp. Neurol.*, Suppl. 13: 1-70
- BLACKSTAD, T.W., (1956), *J. Comp. Neurol.*, 105: 417-538
- CHRONWALL, B.M., J.R. WOLFF (1981), *Bibl. Anat.* 19: 147-151
- COBAS, A., E. WELKER, A. FAIREN, R. KRAFTSIK, H. VAN DER LOOS (1986), *Neurosci. Lett. Suppl.* 26: 270
- COBAS, A., E. WELKER, A. FAIREN, R. KRAFTSIK, H. VAN DER LOOS (1987), enviada a *J. Neurocytol.*
- FAIREN, A., A. COBAS, M. FONSECA, M.L. TAPPAZ (1985), *Neurosci. Lett. Suppl.* 22: 38
- FAIREN, A., J. DEFELIPE, J. REGIDOR, (1984), en "Cerebral cortex", A. Peters y E.G. Jones eds., New York, Plenum, pp. 201-253
- FAIREN, A. A. COBAS, M. FONSECA (1986), *J. Comp. Neurol.*, 251: 67-88
- GLASSER, E.M., M. TAGAMETS, N.T. MCMULLEN, H. VAN DER LOOS, (1983), *J. Neurosci. Methods*, 8: 17-32

anàlisi citofotomètrica del cicle cel·lular durant la regeneració de la

HENDRY, S.H.C., E.G. JONES, J. DEFELIPE, J.E. VAUGHN, (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 81: 6526-6530

HOUSER, C.R., J.E. VAUGHN, S.H.C. HENDRY, E.G. JONES, A. PETERS, (1984), en "Cerebral cortex", A. Peters y E.G. Jones eds., New York, Plenum, pp. 63-89

JACOBSON, M., (1978), Developmental Neurobiology, Plenum, New York

LUBBERS, K., J.R. WOLFF, M. FROTSCHER, (1985), Neurosci. Lett. 62: 317-322

LUSKIN, M.B., C.J. SHATZ, (1985), J. Neurosci., 5: 1062-1075

MANN, M.D., (1979), Brain Res. Rev., 1:3-45

MILLER, M.W., (1985), Dev. Brain Res., 23: 187-192

OERTEL, W.H., D.E. SMECHEL, E. MUGNAINI, M.L. TAPPAZ, I.J. KOPIN, (1981), Neuroscience, 6: 2715-2735

RIBAK, C.E., J.E. VAUGHN, K. SAITO, (1978), Brain Res., 140: 315-332

SIDMAN, R.L., (1970), en "Contemporary research methods in neuroanatomy", W.J.H. Nauta y S.O.E. Ebbesson eds., Springer, New York, pp. 252-274

SORIANO, E., A. COBAS, M.L. TAPPAZ, A. FAIREN, (1985), Neurosci. Lett. Suppl. 22: 330

SORIANO, E., A. COBAS, A. FAIREN, (1986), Dev. Brain Res., 30: 88-93

SORIANO, E., A. COBAS, A. FAIREN, (1987a), enviada a J. Comp. Neurol.

SORIANO, E., A. COBAS, A. FAIREN, (1987b), enviada a J. Comp. Neurol.

SORIANO, E., A. COBAS, E. WELKER, A. FAIREN, H. VAN DER LOOS (1987c), en preparació

SORIANO, E., A. COBAS, A. FAIREN, (1987d), en preparació

STERNBERGER, L.A., P.H. HARDY, J.J. CUCULIS, H.G. MEYER, (1970), J. Histochem. Cytochem., 18: 315-333

VAN DER LOOS, H., T.A. WOOLSEY, (1973), Science 179: 395-399

WOLFF, J.R., B.M. CHRONWALL, M. RICKMANN, (1983), Intl. J. Develop. Neurosci., 1: 246

WOOLSEY, T.A., H. VAN DER LOOS, (1970), Brain res., 17:205 - 242