

Desarrollo postnatal de neuronas peptidérgicas en el neocórtex del ratón

José A. del Río y E. Soriano

Unidad de Biología Celular, Departamento de Bioquímica y Fisiología,
Facultad de Biología, Diagonal 645, 08028 Barcelona

Abstract

The formation of the cerebral cortex is the result of a sequence of elaborated developmental events. In the present study we examined the postnatal evolution of subsets of interneurons characterized by their different content in neuroactive substances. Pups of NMRI mice, at several ages, were processed for the immunohistochemical visualization of VIP, NPY, SS and SP. Our results indicate that each neuropeptide-containing population followed a distinctive postnatal evolution. Some populations of immunoreactive cells were exclusively present at certain postnatal stages, probably suggesting neuronal cell death. In contrast, other immunopositive neurons showed a progressive increase in their immunoreactivity, according to the maturation of the cerebral cortex.

Introducción

En el sistema nervioso adulto, las interneuronas que utilizan el ácido γ -aminobutírico (GABA) como neurotransmisor son los elementos inhibidores de la corteza cerebral (Krnjevic, 1984; Houser et al, 1984). En muchos casos, su papel modulador sobre el sistema de eferencias corticales está fortalecido por la presencia de una variedad de péptidos neuroactivos o neurohormonas como la sustancia P (SP), neuropéptido Y (NPY), bombesina (BB), somatostatina (SS), péptido vasoactivo intestinal (VIP), colecistokinina (CCK), etc, (Houser et al, 1983, 1984; Hendry y Jones, 1984; Jones y Hendry, 1986).

Los fenómenos de carácter regresivo en el desarrollo de numerosas regiones del sistema nervioso son conocidos desde los años 50. En la corteza cerebral, por el contrario, sólo recientemente se han descrito fenómenos regresivos durante su morfogénesis. En primer lugar, algunos sistemas axónicos presentan un crecimiento exuberante durante fases tempranas del desarrollo, para retraerse posteriormente y adoptar el patrón de distribución adulto (Innocenti, 1981; Goldman-

Rakic, 1981; Cowan et al, 1984). En segundo lugar, recientemente se ha descrito una población de interneuronas transitorias durante las fases tempranas del desarrollo cortical. Al menos en la corteza visual del gato, estas interneuronas se localizan en estratos marginales al esbozo cortical (zona marginal y subplaca) y desaparecen durante el período perinatal (Luskin y Shatz, 1985; Valverde y Facal-Valverde, 1987, 1988; Marin-Padilla, 1982, 1988; Chun et al, 1987; Whale y Meyer, 1987; Shatz et al, 1988).

En el presente estudio examinamos la evolución postnatal de subgrupos de interneuronas en la corteza cerebral del ratón mediante el empleo de técnicas inmunocitoquímicas. Esta metodología permite subdividir las interneuronas en base a su contenido en neuropéptidos y analizar de forma diferencial la neurogénesis y maduración de subpoblaciones neuronales en la corteza cerebral.

Material y métodos

En este trabajo se han utilizado 28 crias de ratón NMRI (Iffa Credo, Lyon, Francia) analizadas en los días postnatales P0, P2, P5, P8, P12, P16, y en adulto. Para cada uno de los días estudiados se procesaron 4 animales provenientes de, al menos, 3 camadas diferentes. Tras perfusión con paraformaldehído al 4 %, se obtuvieron cortes por congelación que fueron procesados para la detección inmunocitoquímica de los siguientes neuropéptidos: SP (Cuello et al, 1979), NPY (Polak y Bloom, 1980), SS (Dakopatts, Glostrup, Dinamarca) y VIP (CRB Immunochemicals, Cambridge, Inglaterra). Tras bloqueo de peroxidasas endógenas, los cortes se incubaron toda la noche en la solución de anticuerpo primario (NPY: 1/2000, VIP: 1/1500, SS: 1/800, SP: 1/1000). Posteriormente, los cortes se procesaron de acuerdo con el método de la peroxidasa-antiperoxidasa (Sternberger et al, 1970) y se revelaron con tetrahidrocloruro de diaminobenzidina y agua oxigenada. En algunos casos los cortes se intensificaron con un 0.2 % de Sulfato amónico de níquel (Scopi y Larsson, 1986). Para la dilución de los anticuerpos se utilizó solución salina tamponada con un 0.2 % de Gelatina y un 2 % de suero normal. Tras montar los cortes

en portaobjetos gelatinizados, las series se deshidrataron y montaron con Eukitt (Merck).

Resultados

Desarrollo postnatal de interneuronas VIP-positivas

Durante los días P0, P2 y P5 no observamos en el neocórtex de ratón fibras o neuronas inmunoreactivas para el VIP. Las primeras neuronas inmunoreactivas aparecen en P8. Fundamentalmente se localizan en las capas altas de la corteza (capa II-III) y en menor medida en capas infragranulares, y presentan un marcaje débil en el soma neuronal y las dendritas.

En los siguientes días embrionarios (P12-P16) se observa una distribución de elementos inmunoreactivos similar al mismo tiempo que se incrementa la intensidad de inmunotinción (Fig. 1A). Este incremento gradual de marcaje alcanza un nivel parecido al del adulto en el día P21 (Fig. 1B). Las neuronas VIP-inmunoreactivas tienen un cuerpo celular ovoide o esferoidal y dendritas orientadas mayoritariamente en el eje vertical (Fig. 1C).

Desarrollo postnatal de interneuronas NPY-positivas.

Durante las primeras fases del período postnatal (P0,P2) observamos un elevado número de células inmunoreactivas en la subplaca y en la zona marginal. Estas neuronas presentan una morfología variable y una arborización dendrítica escasa. En los días siguientes analizados (P5 y P8) existe un incremento notable de la inmunoreactividad (Fig. 1D). Las células NPY-inmunoreactivas se agrupan en las capas infragranulares (capas V y VI) y en la sustancia blanca (neuronas intersticiales). También encontramos algunas células fuertemente inmunoreactivas en la placa cortical. Las células inmunopositivas para el NPY tienen una morfología heterogénea, pudiendo presentar morfologías estrelladas o fusiformes orientadas vertical u horizontalmente. En estos estadios las dendritas se tiñen fuertemente y a menudo aparecen formando

varicosidades (Fig. 1F).

Entre los días P12 y P16 se observa una disminución en el número de neuronas inmunoreactivas. Esta reducción es más patente en capa V y VI y particularmente en la substancia blanca. Las neuronas inmunoreactivas se tiñen más débilmente y las varicosidades de las dendritas han desaparecido (Fig. 1E). A partir del día P21 encontramos el patrón de marcaje adulto: las células NPY-inmunoreactivas aparecen dispersas en la capas II-III, V-VI y exhiben un marcaje poco patente en el soma neuronal.

Desarrollo postnatal de interneuronas SS-positivas

Durante las primeras fases del desarrollo postnatal las células SS-positivas se localizan en la zona marginal y la subplaca (Fig. 2A). Esta subpoblación de interneuronas presenta morfología variada y dendritas escasamente teñidas.

La característica más notable del siguiente día (P5) (Fig. 2B) es la presencia de numerosas células SS-inmunoreactivas que mostraban signos de degeneración: elevada intensidad de inmunomarcaje, contorno irregular del soma neuronal a menudo con límites poco definidos, y expansiones dendríticas atróficas (Fig. 2C). Los figuras de degeneración de neuronas SS-inmunoreactivas son muy patentes en la substancia blanca y en la zona marginal, con una preponderancia por las zonas cercanas a las circunvoluciones (córtex cingular y córtex entorrinal). Además, estas figuras de degeneración están presentes en las capas V y VI y también, aunque en menor medida, en la placa cortical. Adicionalmente, en el día P5 encontramos una segunda población de interneuronas SS-positivas que presenta unas características y localización diferentes a las células degenerativas. Estas neuronas tienen una intensidad de marcaje débil, dendritas poco teñidas y cuerpo celular escasamente marcado. Sólo se localizan en la placa cortical y en capas infragranulares y no manifiestan signos de degeneración.

Las neuronas SS-positivas en proceso de degeración no se

observan en los siguientes períodos postnatales analizados (P8-P21). A partir de P8 también se observa una reducción en el número de neuronas inmunoreactivas del esbozo cortical y la práctica desaparición de elementos inmunoreactivos para la SS en la sustancia blanca. Estos hechos sugieren un proceso de muerte neuronal. Durante los períodos P12, P16 y P21 se adquiere de forma paulatina el patrón de marcaje adulto. Este patrón presumiblemente tiene su origen en la población de neuronas débilmente inmunoreactivas observadas en P5. Las neuronas inmunoreactivas para la SS se localizan principalmente en capas II-III, V y VI del neocórtex adulto y presentan una intensidad de marcaje moderada.

Desarrollo postnatal de interneuronas SP-positivas

La evolución del marcaje para la SP es, a grandes rasgos, similar al descrito para la SS. Durante el período P0-P2 las células SP-inmunoreactivas se localizan en la subplaca y en la zona marginal y presentan dendritas orientadas radialmente (Fig. 2D). En P5, se observan numerosas neuronas SP-inmunoreactivas con las mismas características de degeneración descritas para la SS. Estas figuras se detectan en toda las capas del córtex, pero especialmente en la sustancia blanca (Fig. 2F). En P8 aún observamos neuronas SP-positivas en degeneración localizadas fundamentalmente en la sustancia blanca (Fig. 2E). A partir del día postnatal P12, no se detectan cuerpos neuronales inmunoreactivos para la SP en la corteza cerebral del ratón.

Discusión

Mediante la aplicación de técnicas específicas para péptidos neuromoduladores, hemos demostrado cuatro subpoblaciones de interneuronas que siguen una evolución diferente durante el desarrollo postnatal: a) Las neuronas inmunoreactivas para el VIP siguen un proceso de maduración gradual durante todo el período analizado. b) La población de interneuronas NPY-positivas presenta una evolución fundamentalmente regresiva en la que destaca la desaparición de neuronas inmunoreactivas y un decrecimiento de la

expresión del péptido. No obstante no hemos encontrado signos de degeneración neuronal. c) El subgrupo de neuronas SS-positivas sigue dos procesos claramente diferentes. En primer lugar, una población neuronal expresa tempranamente el neuropéptido y desaparece completamente alrededor del día postnatal P5. Una segunda población de interneuronas SS-inmunoreactivas adquiere progresivamente las características de células adultas. d) Por último, la población de interneuronas SP-positivas que aparece en las etapas postnatales tempranas, es fundamentalmente transitoria ya que desaparece a partir de P8. Estos datos indican la existencia de subgrupos de interneuronas en el neocórtex de ratón que evolucionan de forma diferente durante el desarrollo postnatal y que pueden jugar distintos papeles en la formación y maduración de la corteza cerebral.

En la corteza cerebral, datos recientes indican que ciertas interneuronas localizadas en la zona marginal y en la subplaca desaparecen por muerte neuronal (Chun et al, 1987; Whale y Meyer, 1987; Valverde y Facal-Valverde 1987, 1988; Shatz et al, 1988). Los estudios de ^3H -timidina han demostrado que estas neuronas pertenecen al grupo de células que se originan más tempranamente (Luskin y Shatz, 1985). Nuestro estudio indica que las subpoblaciones de interneuronas NPY, SP y SS-positivas que se encuentran en dichas capas pertenecen a esta población transitoria. Por el contrario, las interneuronas VIP-positivas y un segundo grupo de interneuronas SS y NPY-inmunoreactivas maduran de forma gradual de acuerdo con la evolución del neocórtex y no muestran signos de degeneración. Estudios futuros deben esclarecer el papel de estas poblaciones transitorias, su origen y los factores que determinan su desaparición.

Las neuronas inmunoreactivas para la SS y SP que presentan figuras degenerativas se localizaron en todas las capas del esbozo cortical de ratón, incluida la placa cortical. Esto sugiere que la muerte celular de interneuronas en la corteza cerebral es un fenómeno más extendido que lo sugerido hasta la actualidad. Generalmente, se

ha asumido que las poblaciones neuronales que desaparecen se localizan exclusivamente en las capas marginales (Shatz et al, 1988). Aquí, demostramos que un subgrupo de interneuronas localizadas en el resto de capas corticales también presentan signos de degeneración y desaparecen. Esto es especialmente patente en el caso de la SP donde todas las neuronas inmunoreactivas visibles en el período postnatal no se detectan en el adulto.

¿Cuál es el papel de la muerte neuronal en el desarrollo de la corteza cerebral?. Como han sugerido varios autores, las interneuronas de las zonas marginales originadas tempranamente pueden servir de "target" o diana transitoria para los axones que llegan al córtex ya que ambos elementos se localizan en el denominado "compartimento de espera" (Kostovic y Rakic, 1980; Rakic, 1977, 1982; Shatz y Luskin, 1986; Shatz et al, 1988; Chun y Shatz, 1988). Otras hipótesis indican que estas neuronas podrían ser una fuente de factores tróficos para el establecimiento de dichas conexiones (Chun y Shatz, 1988). Por el contrario, la muerte neuronal de interneuronas en el resto de capas corticales es un fenómeno prácticamente desconocido. Parece poco razonable pensar que esta desaparición responde a un mecanismo general de sobreproducción interneuronal ya que sólo algunos grupos de interneuronas se ven afectados.

El segundo fenómeno regresivo detectado en el presente trabajo se refiere a la expresión del neuropéptido. Todos los grupos de interneuronas estudiados, a excepción de las células VIP-positivas, muestran la mayor intensidad de tinción alrededor de los días P5-P12, para decrecer a continuación y llegar a los niveles adultos. La razón de esta hiperexpresión de péptidos neuroactivos durante un período en el cual se produce la maduración de la corteza cerebral es desconocida, aunque también ha sido citada durante el desarrollo de la corteza visual de mono (Huntley et al, 1988).

Trabajo subvencionado por DGICYT y FIS. José A. del Río es becario predoctoral del FIS.

BIBLIOGRAFIA

- CHUN, J.J.M., NAKAMURA, M.J., y SHATZ, C.J. (1987). Transient cells of the developing mammalian telencephalon are peptide-immunoreactive neurons. Nature 325,617-620.
- CHUN, J.J.M., y SHATZ, C.J. (1988). Redistribution of synaptic vesicle antigens is correlated with the disappearance of a transient synaptic zone in the developing cerebral cortex. Neuron 1,297-310.
- COWAN, W.M., FAWCETT, J.W., O'LEARY, D.D.M. y STANFIELD, B.B. (1984). Regressive events in neurogenesis. Science 255,1258-1265.
- CUELLO, A.C., GALFRE, G.A., y MILSTEIN, C. (1979) Detection of substance P in the central nervous system by a monoclonal antibody. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 7,3532-3536
- GOLDMAN-RAKIC, P.S. (1981). Development and plasticity of primate frontal association cortex. En "The organization of the cerebral cortex". Eds., F.O. Schmitt, F.G. Worden. G. Adelman y S.G., Dennis MIT press. pp, 69-97.
- HENDRY, S.H.C., JONES, E.G., DEFELIPE, J., SCHMECHEL, D., BRANDON, D., y EMSON, P.C. (1984). Neuropeptide-containing neurons of the cerebral cortex are also GABAergic. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6526-6530.
- HOUSER, C.R., VAUGHN, J.E., HENDRY, S.H.C., JONES, E.G., y PETERS, A. (1983). Morphological diversity of immunocytochemically identified GABA neurons in the monkey sensori-motor cortex. J. Neurocytol. 12, 617-638.
- HOUSER, C.R., VAUGHN, J.E., HENDRY, S.H.C., JONES, E.G., y PETERS, A. (1984). GABA neurons in the cerebral cortex. En "Cerebral cortex". Eds. Jones E.G. y Peters A. Vol. 2. pp, 63-89. Plenum Press. NY.
- HUNTLEY, G.W., HENDRY, S.H.C., KILLACKY, H.P., CHALUPA, L.M. y JONES, E.G. (1988). Temporal sequence of neurotransmitter expression by developing neurons of fetal monkey visual cortex. Dev. Brain Res. 43,69-96.
- INNOCENTI, G.M. (1981). Growth and reshaping of axons in the establishment of visual callosal connections. Science 212,824-827.
- JONES, E.G., y HENDRY, S.H.C. (1986). Co-localization of GABA and neuropeptides in corticals neurons. Trends Neurosci. 9,71-76.
- KOSTOVIC, I., y RAKIC, P. (1980). Cytology and time of origin of interstitial neurons in the white matter in infant and adult human and monkey telencephalon. J. Neurocytol. 9,219-242.

KRNJEVIC, K. (1984) Neurotransmitters in cerebral cortex. A general account. En "Cerebral cortex". Eds. Jones E.G. y Peters A. Vol. 2. pp,39-61. Plenum Press. NY.

LUSKIN, M.B., y SHATZ, C.J. (1985). Studies of the earliest generated cell of the cat's visual cortex. Cogeneration of subplate and marginal zones. J. Neurosci. 5,1062-1075.

MARIN-PADILLA, M., y MARIN-PADILLA, M.F. (1982). Origin, prenatal development and structural organization of layer I of the human cerebral (motor) cortex. Anat. Embryol. 164,161-206.

MARIN-PADILLA, M. (1988). Early ontogenesis of the human cerebral cortex. En "Cerebral cortex" Vol VII. Eds. A. Peters y E.G. Jones. Plenum Press. NY. pp,1-34.

POLAK, J.M., y BLOMM, S.R. (1980). En "Current views on hypoglycemia and glucagon". Eds., D. Andreani, P.J. Lefebvre y V. Marks, Academic Press, New York, pp,367-398.

RAKIC, P. (1977). Prenatal development of the visual system in the rhesus monkey. Phil. Trans. R. Soc. B. 278,245-260.

RAKIC, P. (1982). Early development events: Cell lineages, adquisición of neuronal positions, and areal and laminar development. Neurosciences Res. Prog. Bull. 20,439-450.

SCOPSI, L., y LARSSON, L.I. (1986). Increased sensitivity in peroxidase immunocytochemistry. A comparative study of a number of peroxidase visualization methods employing a model system. Histochemistry 84,221-229

SHATZ, C.J., y LUSKIN, M.B. (1986). The relationship between the geniculocortical afferents and their cortical target cells during the development of the cat's primary visual cortex. J. Neurosci. 6,3655-3688.

SHATZ, C.J., CHUN, J.J.M., y LUSKIN, M.B. (1988). The role of the subplate in the development of the mammalian telencephalon. En "Cerebral cortex. Vol VII". Eds. A. Peters y E.G. Jones. Plenum Press. New York, pp,35-57.

STERNBERGER, L.A., HARDY, P.H., CUCULIS, J.J., y MEYER, H.G. (1970). The unlabeled antibody method of immunohistochemistry. Preparation and properties of soluble antigen complex and its use in identification of spirochetes, J. Histochem. Cytochem. 18,315-333.

VALVERDE, F., y FACAL-VALVERDE, M.V. (1987). Transitory populations of cells in the temporal cortex of kittens. Dev. Brain Res. 32,283-288.

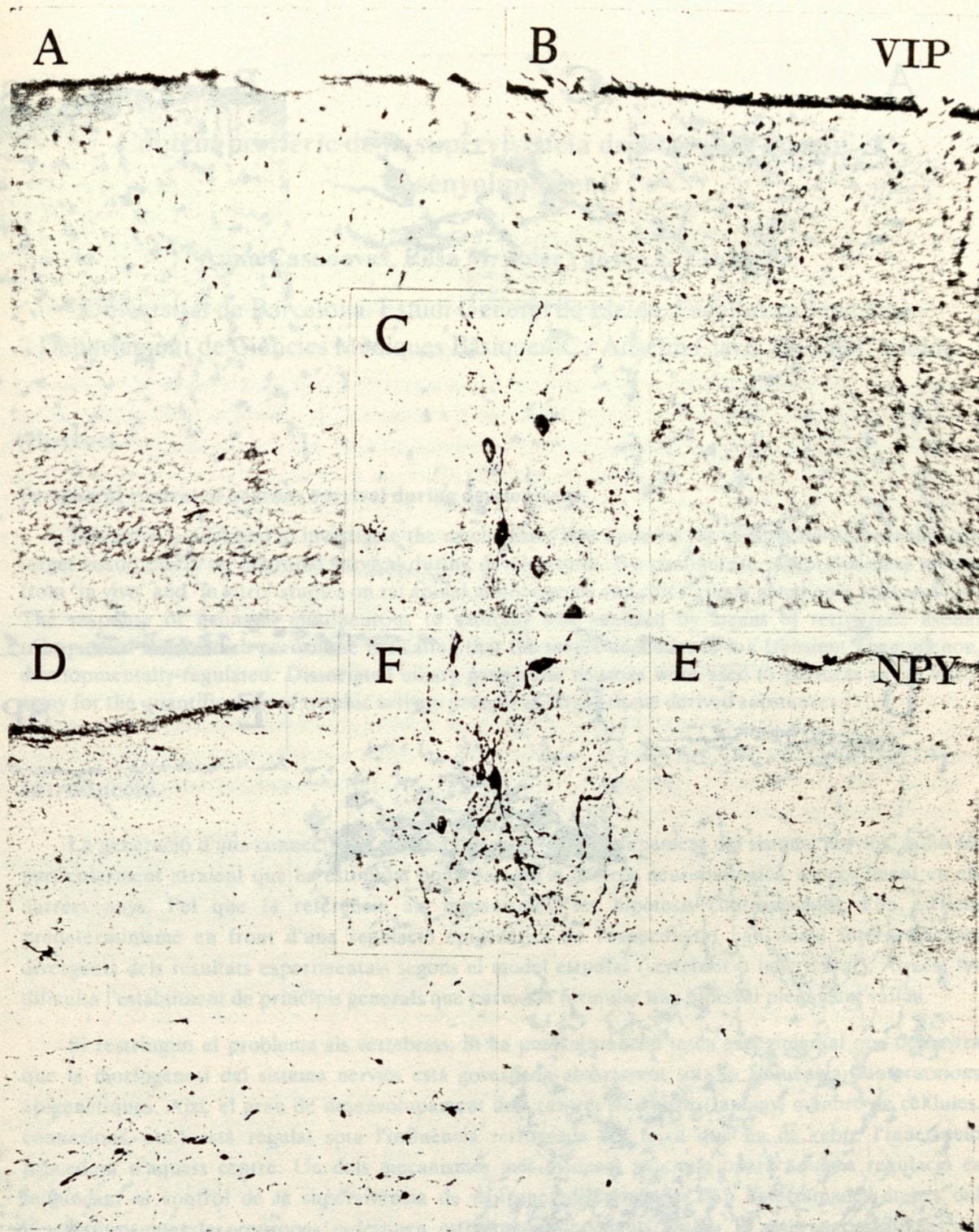


Fig. 1: Evolución postnatal de neuronas VIP (A,B,C,) y NPY-positivas (C,D,E,). A: Neuronas VIP-inmunoreactivas en el día P12. B: Patrón de distribución de VIP en neocórtex adulto. La posición de neuronas positivas es similar en ambos estadios. C: Detalle de una neurona bipolar VIP-positiva en capa II. D: Distribución de células positivas para el NPY en P5. E: Las neuronas NPY-inmunoreactivas del córtex adulto abundan en capas infragranulares. No se observan células en la sustancia blanca. F: Detalle de una neurona intensamente inmunoreactiva para el NPY en P5. Notar las dendritas varicosas. A, D: 110 x; B, E: 80 x; C, F: 340 x.

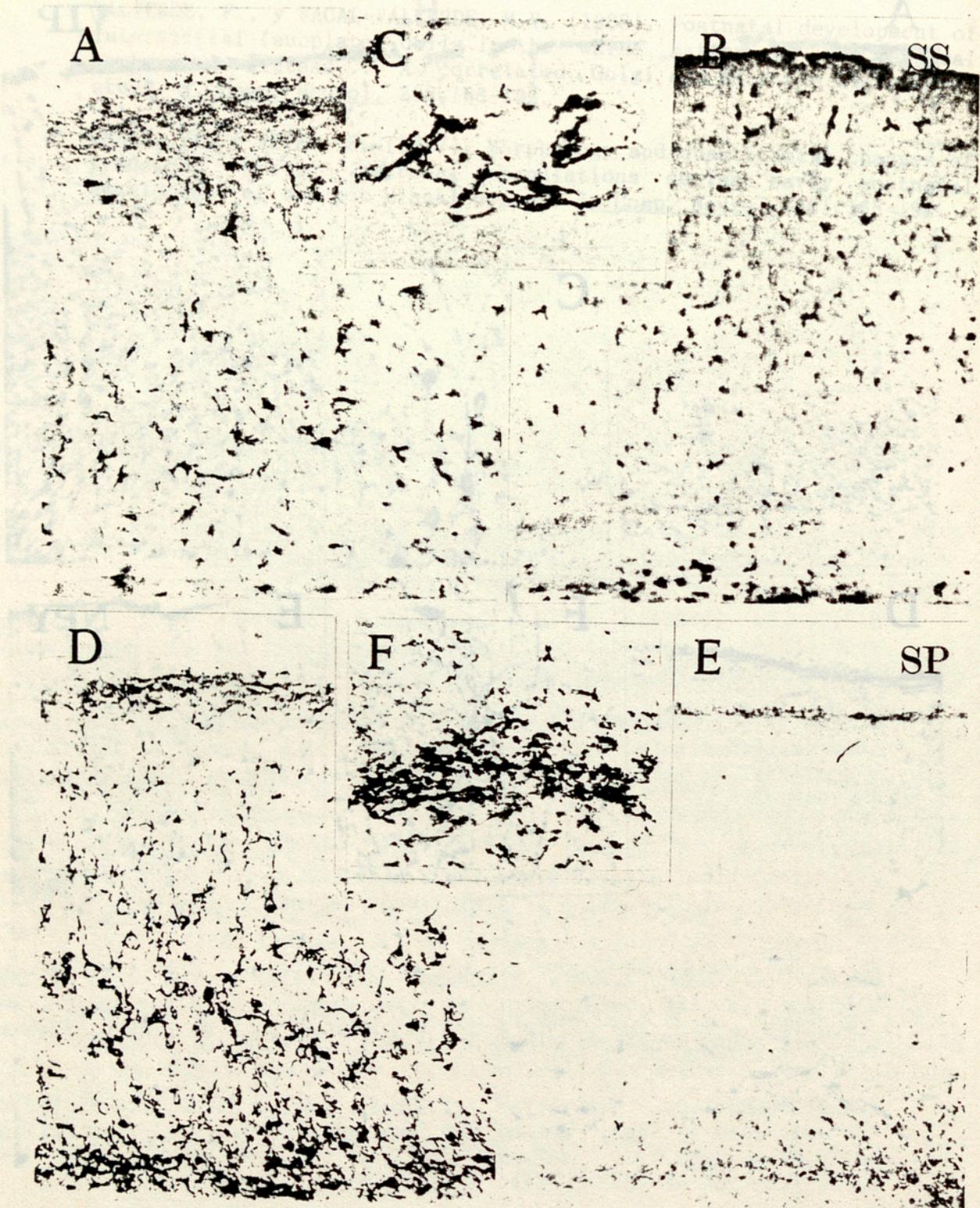


Fig. 2: Patrón de marcaje inmunocitoquímico durante el desarrollo postnatal para SS (A,B,C) y SP (D,E,F). A: Neuronas inmunoreactivas para la SS en P2. B: Patrón de marcaje para la SS en P5. Numerosas células muestran rasgos de degeneración (C). D: Distribución de neuronas SP-positivas en P2. Las células se distribuyen en la subplaca y placa cortical. E: En P8, sólo se detectan neuronas SP-positivas en la sustancia blanca. F: Detalle de degeneración neuronal en la sustancia blanca en estadio P5. A,D: 250 x; B,E; 125 x; C: 640 x; F: 420 x.