

Canvis en l'expressió del pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP) durant el desenvolupament de motoneurons espinals.

Josep E. Esquerda, Dolors Ciutat, Jordi Calderó i Joan X. Comella.

Universitat de Barcelona. Estudi General de Lleida. Facultat de Medicina.

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques. C./ Anselm Clavé, 22. 25007 Lleida.

Abstract.

Changes in the expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) during development of spinal motoneurons.

A physiological neuronal death that implicates about 50% of the motoneuron population occurs in the chick embryo between the 6th (E-6) and 9th (E-9) day of incubation. This natural death can be prevented by application of neuromuscular blocking agents (e.g. d-Tubocurarine (d-Tc)). In this study a calcitonin gene-related peptide (CGRP)-immunoreactivity was studied in spinal cord motoneurons from normal and d-Tc-treated chick embryos. In normal embryos, a positive CGRP-immunoreactivity was found in a neuronal subpopulation of the spinal cord lateral motor column (LMC) that was maximal between 14th (E-14) and 16th (E-16) embryonic days with a subsequent decrease. In LMC neurons from d-Tc-treated chick embryos examined at 14-16 embryonic days no histochemically detectable CGRP-immunoreactivity could be observed.

Introducció.

La columna motora lateral (CML) de la medulla espinal de l'embrió de pollastre és una de les poblacions neuronals on la mort neuronal fisiològica que té lloc durant el desenvolupament, ha estat més àmpliament estudiada (Oppenheim, 1981a). La regulació d'aquest procés sembla mostrar una estricta dependència relativa a la massa de teixit perifèric disponible per la innervació (Hamburger, 1958; Hollyday i Hamburger, 1976; Oppenheim et al., 1978). A més, la mort fisiològica de les motoneurons en la CML del pollastre pot ésser evitada mitjançant l'aplicació d'agents blocants de la sinapsi neuromuscular durant el període principal de la mort cel.lular en aquest nucli (dies 6-9) (Laing i Prestige, 1978; Pittman i Oppenheim, 1978; Creazzo i Sohal, 1979). Igualment, l'administració exògena de dibutiril GMP cíclic, provoca una inhibició de la mort fisiològica de les neurones motores (Weill i Green, 1984). Les motoneurons rescatades de la mort continuen el procés normal de diferenciació i no es poden distingir de les normals, al menys segons els criteris estructurals i bioquímics explorats fins el moment (Pittman i Oppenheim, 1979; Oppenheim, 1981b).

Pel que fa referència a la histoquímica dels neuropèptids, hom s'ha evidenciat actualment que les neurones de la CML no poden ésser considerades una població homogènia. S'ha demostrat que el pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP) és present només en una subpoblació d'aquestes

motoneurons colinèrgiques (New i Mudge, 1986). També, recentment s'han aportat dades que mostren l'expressió transitòria i la coexistència del CGRP amb d'altres neuropèptids en les motoneurons del pollastre durant el desenvolupament (Villar et al., 1988). Per tant, és d'interès explorar de quina manera aquestes diferències intrínseques es veuen afectades quan la mort neuronal és previnguda experimentalment.

En aquest treball nosaltres aportem dades de l'existència d'una important deplecció de la immunoreactivitat al CGRP quan s'evita la mort de les motoneurons mitjançant l'aplicació de d-Tubocurarina (d-Tc). A més aportem resultats sobre la localització ultraestructural de la immunoreactivitat del pèptid en les motoneurons de la CML del pollastre.

Material i mètodes.

Animals i tractament.

Per aquest estudi s'han utilitzat embrions de pollastre de la soca Arbor-acres. Aquests s'han tractat diàriament amb una dosi de 2 mg de d-Tubocurarina (d-Tc) (Sigma, St. Louis, MO, USA) disolta en sèrum fisiològic (250 μ l), la qual s'ha aplicat sobre la membrana corioalantoïda a través d'una obertura en la closca. El tractament s'ha efectuat entre els dies 6 (E-6) i 10 (E-10) d'incubació. Els controls s'han realitzat injectant solament sèrum fisiològic. Els embrions s'han sacrificat en distints intervals fins el dia 21 d'incubació. S'han estudiat també les medulles de 2 pollastres de 7 dies posteriors al naixement (P-7); aquests animals, 24 h abans del sacrifici, han rebut una dosi única intratecal de 3 μ g de colquicina disolta en 3 μ l de sèrum fisiològic.

Comptatge de neurones.

El comptatge de motoneurons s'ha realitzat amb l'ajut d'un sistema de morfometria computeritzada tipus MOP-Videoplan. Els comptatges s'han efectuat sobre seccions seriades de 12 μ m de gruix, de tota la porció lumbo-sacra de la medulla embrionària (Hamburger, 1975). Per la qual cosa els embrions s'ha fixat amb solució de Carnoy, i posteriorment inclosos en parafina, seccionats i tenyits pel procediment de Nissl al violeta de cresil.

Immunocitoquímica.

a. Microscòpia òptica.

Les medulles s'han fixat amb paraformaldehid al 4% en tampó fosfat 0,1 M, pH 7,4, crioprotegides en sucrosa al 20% en el mateix tampó i seccionades a 20 μ m amb un criostat. Les seccions, adherides sobre porta-objectes galatinitzats, s'han incubat amb un antisèrum de conill contra CGRP de rata (Serotec, Oxford, England) diluït 1/500 en tampó fosfat salí (PBS) a 4°C durant 12 h. Un cop rentades, les seccions s'han incubat amb sèrum de porc fluoresceïnat contra IgG de conill (Nordic, Tilburg, Netherlands) diluït 1/40 en PBS durant 45 min. Posteriorment s'han rentat i s'han montat amb Fluoprep (Biomerieux, Charboniers les Bains, France) i s'han examinat amb un microscopi dotat d'epifluorescència.

b. Microscòpia electrònica.

Pels estudis ultraestructurals s'han assajat distints tipus de fixadors i els resultats òptims s'han obtingut amb una solució que contenia: 3% de glutaraldehyd-3% de paraformaldehyd-0,1% d'àcid pícric en tampó fosfat 0,1 M, pH 7,4, durant 4 h a 4°C. Una vegada rentades les mostres, s'han realitzat seccions de 40 µm amb un vibratom. Posteriorment s'ha blocat l'activitat de la peroxidasa endògena amb bohidrid sòdic 1% en tampó fosfat al 0,1 M, pH 7,4, abans de realitzar les incubacions amb l'anticòs primari diluït 1/500 en PBS-0,1% de Tritó X-100) durant 3 dies a 4°C. Després s'han fet les operacions habituals per visualitzar els llocs d'unió de l'anticòs primari mitjançant el sistema PAP (Sternberger, 1979). A continuació, les peces s'han osmificat, deshidratat i s'han inclòs en Durcupan ACM (Fluka) entre porta i cubre per tal de permetre l'observació prèvia al microscopi òptic. Les regions seleccionades s'han montat en blocs i, després de piramidar-les acuradament, s'han seccionat amb l'ultramicrotòtom.

Resultats.

D-Tubocurarina i mort neuronal.

El tractament amb d-Tc ha evitat en gran manera el procés de mort neuronal fisiològica (Taula 1, Fig. 1a-c). L'increment del nombre de neurones s'ha mantingut més enllà de E-10, malgrat que no s'hagi aplicat més la droga a partir d'aquest dia, sempre i quan el tractament entre E-6 i E-10 proporcioni una acumulació suficient del fàrmac (més de 2 mg), capaç de mantenir deprimida la motilitat embrionària fins l'eclosió.

Desenvolupament de la immunoreactivitat al CGRP i efecte de la d-Tubocurarina.

A nivell de la microscòpia òptica, les motoneurones dels embrions control han mostrat una immunoreactivitat positiva al CGRP a nivell dels cossos cel.lulars. La reacció ha estat en forma de grànuls dispersos pel citoplasma que presenten una certa agrupació al voltant del nucli. Aquesta reactivitat s'ha detectat, malgrat que dèbilment, en espècimens de E-10. En E-14 i E-16, la immunoreactivitat ha estat molt més intensa i s'ha observat només en una subpoblació de motoneurones (59,7% a E-16, en una mostra de 426 neurones de la CML presents en seccions seleccionades arbitràriament de 4 embrions) (Fig. 2a). En els dies següents (E-18, E-21), s'ha manifestat un decrement progressiu de la intensitat de fluorescència en les motoneurones de la CML de la banya anterior, però moltes fibres localitzades en la banya posterior, algunes neurones dels ganglis espinals sensorials i cossos cel.lulars neuronals del nucli marginal de Hofmann mostren una forta reactivitat a l'antisèrum CGRP.

Les medul.les espinals dels 2 pollastres P-7 que han estat tractats amb colquicina presentaven una reactivitat al CGRP molt baixa en les motoneurones de la CML; malgrat això, en les mateixes seccions, les fibres de la banya posterior, els cossos cel.lulars del nucli de Hofmann i algunes cèl.lules localitzades en el gangli espinal sensorial eren intensament CGRP positives. En les neurones dels pollastres P-30, la reactivitat al CGRP ha estat també dèbil, i només un 19,2% de les motoneurones (135 cèl.lules comptades en 2 animals) es mantien positives.

Taula 1. Efecte de la d-tubocurarina sobre el contingut total de motoneurons de la regió lumbosacra en el embrió de pollastre

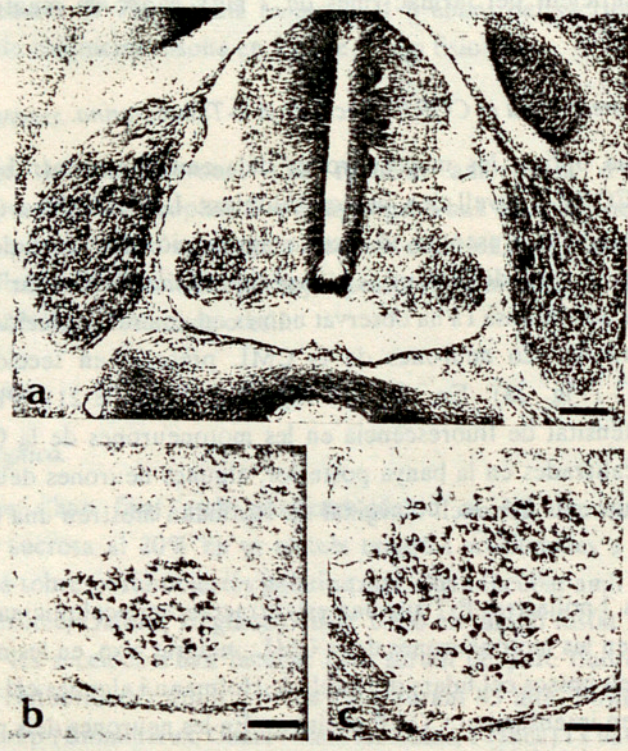
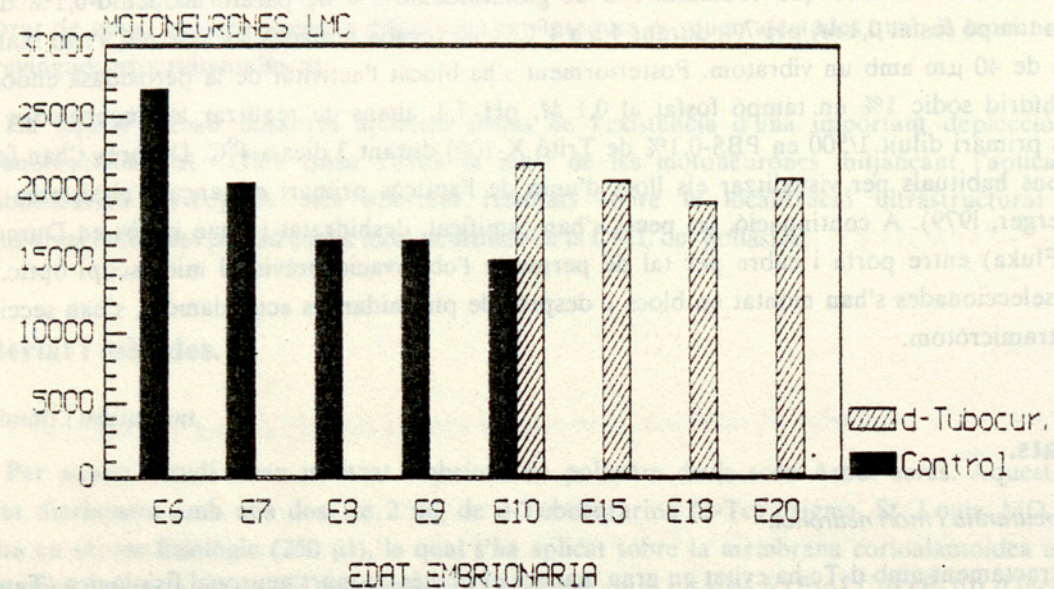


Fig. 1a-c. Efecte de la d-Tc sobre el desenvolupament de la CML de l'embrió de pollastre. Seccions tenyides amb el mètode de Nissl. (a) E-6, (b) E-10-control i (c) E-10-curare. Es pot observar l'increment de neurones en (b) com a conseqüència de la inhibició del procés de mort natural. Barres a = 187 μm, b i c = 75 μm.

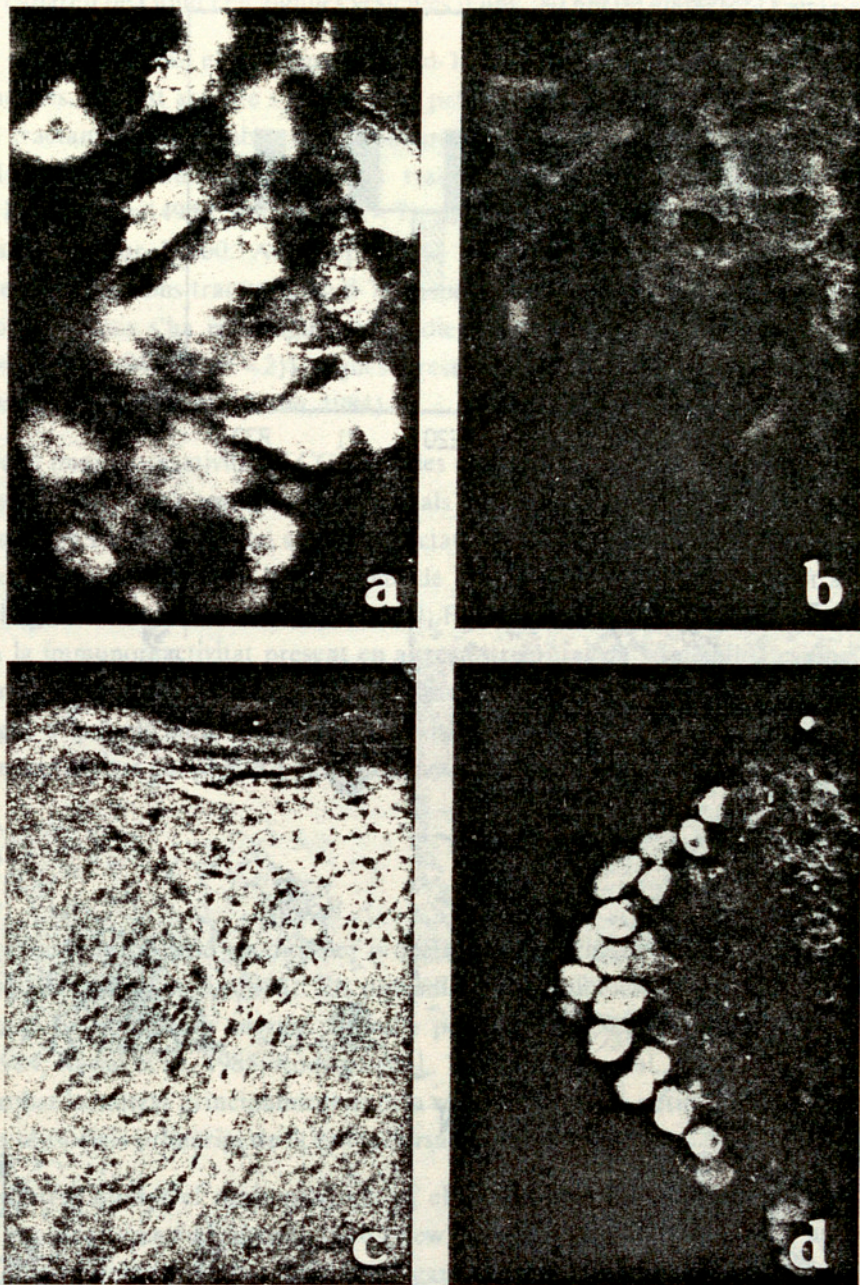


Fig. 2a-d. Detecció per immunofluorescència de la reactivitat al CGRP en la medulla espinal de l'embrió de pollastre de 16 dies. En a s'observa la reactivitat al CGRP en motoneurons d'un embrió control de 16 dies (x 395). b, c i d mostren distintes regions de la mateixa secció d'un embrió tractat amb d-Tc (2mg/dia entre E-6 i E-9) on es reflecteix la presència de immunoreactivitat normal en les neurones situades en les fibres de la banya posterior (c) (x 200) i en les neurones del gangli sensorial espinal (d) (x 200) i la manca de reactivitat en les motoneurons del nucli anterior (b) (x 395).

Taula 2. Immunoreactivitat a CGRP en motoneurons espinals d'embrió de pollastre

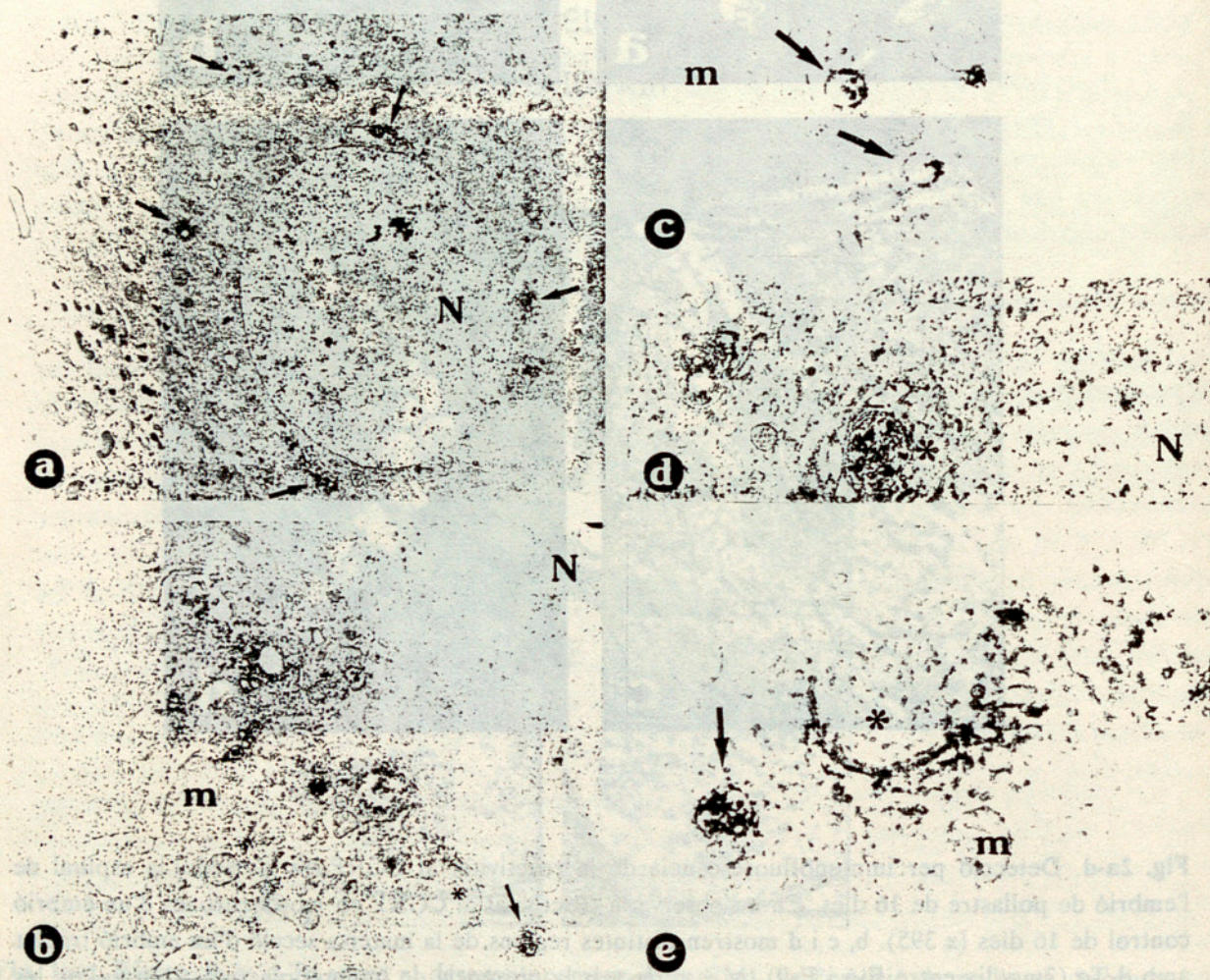
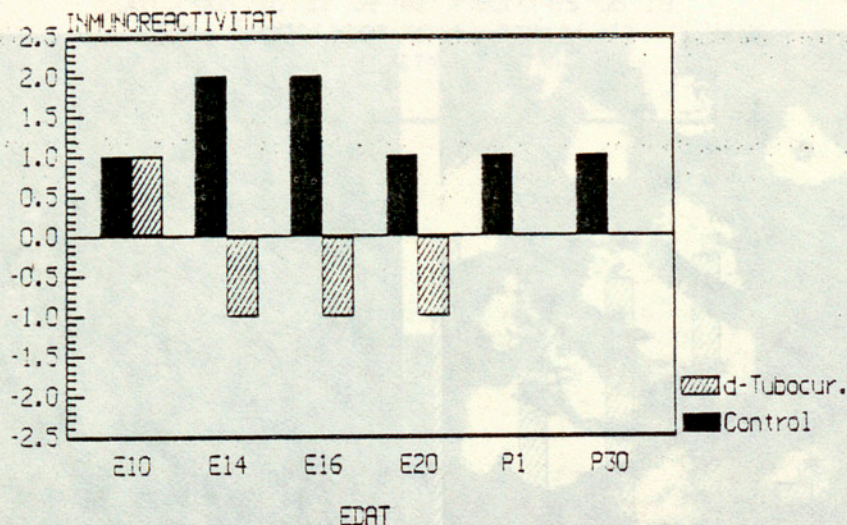


Fig. 3a-e. Detecció a nivell ultraestructural de la immunoreactivitat al CGRP en motoneurons d'embrió de pollastre a E-16. En a, s'observen els dipòsits de localització perinuclear (*fletxa*); en b s'identifiquen els dipòsits a nivell de l'aparell de Golgi (*) i en formacions vesiculars (*fletxa*); en c, d i e es mostren, amb detall, els dipòsits en l'aparell de Golgi i en vesícules d'uns 280 nm. Les fotografies han estat obtingudes de talls no-contrastats. (N) nuclis, (m) mitocondris. Les magnificacions són: a x 2875; b x 7240; c, d i e x 18390.

La microscòpia electrònica demostra que la immunoreactivitat al CGRP es localitza selectivament en cisternes de l'aparell de Golgi i en algunes vesícules d'uns 280 nm de diàmetre (Fig.3a-e).

Com hem esmentat abans, el tractament amb d-Tc ha reduït significativament la mort fisiològica de les motoneurons. Aquest aspecte s'ha fet palès pel comptatge de les neurones de la CML. En E-6 (dia d'inici del tractament) el nombre de motoneurons ha estat de 26950 \pm 2343 (n=3) en cada CML. En E-10, els embrions que han estat tractats amb sèrum salí (controls) el nombre de motoneurons ha estat de 14932 \pm 1376 (n=7), mentre que en els embrions tractats amb d-Tc el nombre ha estat superior 21600. Això representa quasi un 50% d'increment en el nombre de motoneurons en els embrions tractats amb d-Tc respecte als embrions control. Aquest augment en el nombre de motoneurons s'ha mantingut en els dies següents (E-15=21644 (n=1); E-18=19080 (n=1) i E-20=20664 \pm 1328 (n=2)). Aquests resultats són concordants amb altres estudis previs (Pittman i Oppenheim, 1979; Oppenheim, 1984).

L'estudi de la immunoreactivitat al CGRP en les neurones de la CML dels embrions E-10 tractats amb d-Tc no ha mostrat canvis aparents en relació als embrions control. No obstant això, observacions similars realitzades en embrions d'edat superior tractats amb d-Tc mostren una absència de l'increment normal de la reactivitat al CGRP en les neurones de la CML. En E-16, la reactivitat al CGRP en les motoneurons ha estat molt baixa o absent (Taula 2; Fig. 2b). No obstant això, el tractament amb d-Tc no ha afectat a la immunoreactivitat present en altres estructures de la medulla espinal (fibres de la banya posterior (Fig. 2c), neurones del nucli de Hofmann i neurones dels ganglis sensorials espinals (Fig. 2d)). Degut a que els animals no han sobreviscut després del naixement, no ha estat possible avaluar l'immunoreactivitat del pèptid a partir d'aquesta època.

Discussió.

El CGRP és un neuropèptid produït per processament alternatiu dels transcrits primaris del gen de la calcitonina (Rosenfeld et al., 1983). Els procediments immunocitoquímics han demostrat la seva àmplia distribució en el sistema nerviós central i perifèric dels vertebrats (Rosenfeld et al., 1983; Gibson et al., 1984; Kawai et al., 1985; Rodrigo et al., 1985; Carlton et al., 1987). En la medulla espinal el pèptid s'ha trobat localitzat principalment en una xarxa de fibres de petit diàmetre, que corresponen a fibres aferents sensorials primàries de la banya dorsal.

En els pollastres durant el desenvolupament, el CGRP ha estat detectat com més aviat en una sub població de motoneurons d'embrions de 6 (New i Mudge, 1986) o 9 (Fontaine et al., 1986) dies. Estudis "in vitro" suggereixen que el CGRP pot jugar un paper important com un "factor anterògrad" lliurat pels terminals motors, els quals regulen la síntesi i la inserció sinàptica "local" de receptors de l'acetilcolina (AChRs) en les cèl·lules musculars (Fontaine et al., 1987; Laufer i Changeux, 1987). També, recentment s'han aportat dades que indiquen que el CGRP pot jugar una acció reguladora en la capacitat de "sprouting" dels nervis motors terminals (Tsujimoto i Kuno, 1988).

En l'actualitat, és difícil explicar l'absència d'immunoreactivitat al CGRP com a conseqüència del bloqueig de l'activitat neuromuscular durant l'època embrionària. Aquest fet podria reflectir un decrement en la síntesi del pèptid o una mera deplecció del CGRP intracitoplasmàtic deguda a un increment de la lliberació per part dels terminals motors.

La hipòtesi de competició en relació al teixit diana, constitueix una de les explicacions més convincents per comprendre el mecanisme de la mort neuronal fisiològica. Però, el principal punt feble d'aquesta hipòtesi és la manca de definició del substracte pel qual s'ha de competir. La formulació de la hipòtesi involucra l'existència: a) d'alguna característica present en un grup reduït de neurones pertanyents a una població particular que presenti un avantatge sobre d'altres i/o b) d'un abastiment limitat d'un factor imprescindible per la supervivència derivat del teixit diana.

Donada la possible activitat fisiològica del CGRP com factor neuronal origen de senyals reguladores per a la síntesi de AChRs en la placa motora, cal preguntar-se si hi ha alguna relació entre el contingut del pèptid i el procés de la mort de les motoneurons durant el desenvolupament embrionari. Acceptant la validesa de la hipòtesi competitiva, l'acció dels agents blocants neuromusculars durant l'ontogènia neuromuscular pot ésser hipotèticament reduïda a un increment de la quantitat de l'activitat tròfica present en el teixit diana (però no hi han dades experimentals positives que donin suport a aquest pronunciament (Tanaka, 1987)), o bé a l'eliminació d'una entitat discriminativa intrínseca dins de la població de motoneurons. Donat que les subpoblacions de motoneurons definides pel CGRP en la CML dels embrions de pollastre és ben establerta a la fi del "període crític" de la mort fisiològica, no sembla probable que el contingut en CGRP pugui reflectir un fenotip cel·lular específic lligat a la destinació cap a la mort. Més racionalment, l'absència de CGRP en la CML tractada amb curare es podria deure a un increment d'ús perifèric com a conseqüència de la inducció d'un nombre incrementat d'agregats de AChR i de sinapsis. Una altra possibilitat és que la manca de diferenciació del CGRP indiqui un canvi fenotípic secundari resultant de l'abolició dels mecanismes dependents d'activitat, que són essencials per iniciar la cursa competitiva.

Agraïments.

Aquest treball ha estat realitzat amb l'ajut de la beca n^o PB86-0684 otorgada per la "Direcció General de Investigación Científica y Técnica" del "Ministerio de Educación y Ciencia". Els autors volem donar les gràcies a "COPAGA" per haver aportat generosament els embrions de pollastre.

Bibliografia.

- Carlton S.M., McNeil D.L., Chung K., Coggeshall R.E. (1987). A light and electron microscopic level analysis of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the spinal cord of the primate: an immunohistochemical study. *Neurosci. Lett.* 82:145-150.
- Creazzo T.L., Sohal G.S. (1979) Effects of chronic injections of α -bungarotoxin on embryonic cell death. *Exp. Neurol.* 66:135-145.
- Gibson S.J., Polak J.M., Blomm S.R., Sabate I.M., Mulderry P.M., Ghatei M., McGregor G.P., Morrison J.F.B., Kelly J.S., Evans R.M., Rosenfeld M.G. (1984). Calcitonin gene related peptide immunoreactivity in the spinal cord of man and eight other species. *J. Neurosci.* 4:3101-3111.
- Fontaine B., Klarsfeld A., Hökfelt T., Changeux J.P. (1986). Calcitonin gene-related peptide, a peptide present in the spinal cord motoneurons, increases the number of acetylcholine receptors in primary cultures of chick embryo myotubes. *Neurosci. Lett.* 71:59-65.

- Fontaine B., Klarsfeld A., Changeux J.P. (1987). Calcitonin gene-related peptide and muscle activity regulate acetylcholine receptor α -subunit mRNA levels by distinct intracellular pathways. *J. Cell Biol.* 105:1337-1342.
- Hamburger V. (1958). Regression versus peripheral control of differentiation in motor hypoplasia. *Am. J. Anat.* 102:365-409.
- Hamburger V. (1975). Cell death in the development of the lateral motor column of the chick embryo. *J. Comp. Neurol.* 160:535-546.
- Hollyday M., Hamburger V. (1976) Reduction of naturally occurring motor neuron loss by enlargement of the periphery. *J. Comp. Neurol.* 170:311-320.
- Kawai Y., Takami K., Shiosaka S., Emson P.C., Hillyard C.J., Girgis S., McIntyre I, Tohyama M. (1985) Topographic localization of calcitonin gene-related peptide in the rat brain: A immunohistochemical analysis. *Neurosci.* 15:747-763.
- Laing N.G., Prestige M.C. (1978). Prevention of spontaneous motoneurone death in chick embryos. *J. Physiol.* (London) 282:33-34P.
- Laufer R., Changeux J.P. (1987). Calcitonin gene-related peptide elevated cyclic AMP levels in chick skeletal muscle: possible neurotrophic role for a coexisting neuronal messenger. *EMBO J.* 6:901-906.
- New H.V., Mudge A.W. (1986). Calcitonin gene-related peptide regulates muscle acetylcholine receptor synthesis. *Nature* (London) 323:809-811.
- Oppenheim R.W. (1981a). Neuronal death and some related regressive phenomena during neurogenesis: a selective historical review and progress report. In: Cowan W.M. (ed). *Studies in developmental neurobiology. Essays in honor of Viktor Hamburger*, Oxford University Press, New York pp. 74-133.
- Oppenheim R.W. (1981b). Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. V. Evidence of the role of cell death and neuromuscular function in the formation of specific peripheral connexions. *J. Neurosci.* 1:141-151.
- Oppenheim, R.W. (1984). Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord: VIII. Motoneurons prevented from dying in the embryo persist after hatching. *Develop. Biol.* 101:35-39.
- Oppenheim R.W., Chu-Wang J.W., Maderdrut J.L. (1978). Cell death of motoneurons in chick embryo spinal cord. III. The differentiation of motoneurons prior to their induced degeneration following limb-bud removal. *J. Comp. Neurol.* 177:87-112.
- Pittman R., Oppenheim R.W. (1978). Neuromuscular blockade increases motoneurone survival during normal cell death in the chick embryo. *Nature* (London) 271:364-366.
- Pittman R., Oppenheim R.W. (1979). Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. IV. Evidence that a functional neuromuscular interaction is involved in the regulation of naturally occurring cell death and the stabilization of synapses. *J. Comp. Neurol.* 187:425-446.
- Rodrigo J, Polak J.M., Frenández L., Ghatei M.A., Mulderry P.M., Bloom S.R. (1985). Calcitonin gene-related immunoreactive sensory and motor nerves of the rat, cat and monkey esophagus. *Gastroenterology* 88:444-451.
- Rosenfeld M.G., Mermod J.J, Amara S.G., Swanson L.W., Sawchenko P.E., Rivier J., Vale W.W., Evan R.M. (1983). Production of a novel neuropeptide encoded by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature* (London) 304:129-135.
- Sternberger I.A. (1979). *Immunocytochemistry*. 2a edició. John Wiley. New York.
- Tanaka H. (1987). Chronic application of curare does not increase the level of motoneuron survival-promoting activity in limb muscle extracts during the naturally occurring motoneuron cell death period. *Develop. Biol.* 124:347-357.

