

DINAMICA MORFOGENETICA DE LA NEURULACION EN EL CEREBRO MEDIO Y MEDULA ESPINAL DEL POLLO: SU RELACION CON LA DISTRIBUCION MITOCONDRIAL EN LAS CELULAS NEUROEPITELIALES

Por J.G. Fernández (1)
C. A. Chamorro (1)
P. de Paz (1)
M. Fernández (1)
J. M. Villar (1)

INTRODUCCION

El proceso de la neurulación tiene lugar en el embrión de aves y mamíferos en dos fases bien diferenciadas: neurulación primaria y neurulación secundaria. Durante la neurulación primaria se va a formar la mayor parte de estructuras que conformarán el Sistema Nervioso Central¹⁹. Este proceso morfogénico comienza con el espesamiento de un grupo de células ectodérmicas que formarán la placa neural, la cual posteriormente se incurvará dando lugar a la aparición del tubo neural. En la formación de la placa y tubo neural las células neuroectodérmicas sufren cambios de forma determinados por la actividad de los elementos del citoesqueleto. Así, los microtúbulos que se orientan longitudinalmente en las células neuroectodérmicas conducen a la elongación de éstas^{1, 10, 23}, para formar la placa neural, mientras que los microfilamentos localizados en los bordes apicales originan la constricción apical de estas células^{11, 12, 13, 15}, que adoptan una conformación en «botella» o «cuña» cuya presencia se considera básica en el mecanismo de incurvamiento de la placa neural^{2, 21}.

Burguess y Schroeder³ han señalado claramente que los sucesos morfogénicos son reflejo de los cambios que ocurren a nivel ultraestructural en las células. El análisis de los cambios macroscópicos observables en el transcurso de la neurulación deben relacionarse con el estudio de la organización subcelular y su evolución durante este periodo. Si consideramos que la morfogénesis del tubo neural es un proceso activo llevado a cabo por cambios de forma de las células neuroepiteliales, pensamos que el análisis de la distribución de las mitocondrias en dichas células adquiere una importancia relevante en el conocimiento del mecanismo de la neurulación.

En el presente trabajo hemos llevado a cabo dicho estudio de la distribución de mitocondrias en las células neuroepiteliales haciendo hincapié en los patrones de distribución en las regiones del cerebro medio y médula espinal presuntivas. De este modo se

(1) Dpto. de Biología Celular y Anatomía.

pueden establecer relaciones estrechas entre la dinámica de la morfogénesis del tubo neural y la distribución de las mitocondrias en ambas regiones del embrión.

MATERIAL Y METODOS

Como material de trabajo se han utilizado embriones de pollo en los estadios 6, 8, 10 y 12⁸, en los cuales se ha recogido la región presuntiva del cerebro medio, de acuerdo con los criterios de Schoenwolf y Franks²¹. En los estadios 8, 10 y 12 recogemos asimismo la región presuntiva de la médula espinal, tomada a nivel del primer somito. Todas las regiones embrionarias se procesaron para micrografía electrónica de transmisión comenzando por la fijación en una solución de glutaraldehído al 2% con rojo-rutenio al 0.1% en tampón cacodilato durante 1 hora a 4°C, seguida de tres lavados en el mismo tampón. La postfijación se realiza con tetróxido de osmio al 1% y rojo-rutenio al 0.1% en tampón cacodilato durante 3 horas a temperatura ambiente. Seguidamente las piezas se deshidratan en soluciones de alcohol de concentración creciente, se trasladaron a una solución de óxido de propileno y se incluyeron en resina Epon 812. Los bloques de inclusión fueron seleccionados primeramente a 1 μ m de grosor y posteriormente se obtuvieron las secciones ultrafinas (interferencia dorada-plateada) que se recogieron en rejillas de 200 mallas y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo⁷. Las rejillas se examinaron finalmente en un microscopio de transmisión Jeol 100 CX a 60 Kv.

Análisis de la distribución de mitocondrias

Para analizar la distribución de mitocondrias en las células neuroepiteliales hemos partido del muestreo de ocho bloques bien orientados en cada estadio seleccionados mediante Tabla Digital al azar. De cada bloque se obtienen las correspondientes secciones ultrafinas que se recogen en tres rejillas de 200 mallas que contienen cada una 5-6 secciones ultrafinas. Así se obtiene para cada estadio un grupo de rejillas de las que se seleccionan 12 para su observación en el microscopio electrónico mediante Tabla Digital al azar. En cada rejilla que va a ser muestreada se fotografían 10 perfiles celulares nucleados del neuroepitelio siguiendo el método descrito por Hirakow y Gotoh⁹, obteniendo finalmente 120 perfiles celulares neuroepiteliales que se analizan en los positivos fotográficos a 12.000-22.000 x.

El análisis de la distribución de las mitocondrias se hace en base al establecimiento de tres zonas en las células neuroepiteliales siguiendo un criterio de orientación apico-basal (ver figura 1). En cada una de las zonas se cuantifican los perfiles mitocondriales, obteniendo posteriormente los porcentajes de distribución de este orgánulo en cada zona.

Los porcentajes de distribución de mitocondrias en una zona de la célula se comparan entre los cuatro estadios mediante el test de independencia de la G basado en la distribución de chi-cuadrado²² empleando un nivel de significación $P < 0.05$.

RESULTADOS

Las mitocondrias que presentan las células neuroepiteliales del embrión de pollo muestran una distribución dentro de dichas células que evoluciona típicamente durante la neurulación (ver tablas n.º 1 y 2).

En las células neuroepiteliales correspondientes a la región presuntiva del cerebro medio (tabla n.º 1), las mitocondrias se encuentran preferentemente en la zona basal de la célula, alcanzando casi el 50% del total de mitocondrias de la célula en el estadio 10. Dicho porcentaje en los estadios 6, 8 y 12 es ligeramente más reducido, alrededor del 40%. En la zona media sin embargo, el porcentaje de mitocondrias no llega al 30% en ningún estadio, y por último en la zona apical, evidenciamos una diferencia notable entre los porcentajes de mitocondrias del estadio 10 (24.7%) y los estadios 6, 8 y 12.

En cuanto a la distribución de las mitocondrias en las células neuroepiteliales de la región somítica de los estadios 8, 10 y 12 observamos (tabla n.º 2) la ausencia de diferencias significativas ($P < 0.05$) entre dichos estadios en las tres zonas celulares. Así podemos indicar que en la zona basal se encuentra un 40%, en la media un 20% y en la apical un 40% de las mitocondrias en los tres estadios mencionados.

DISCUSION

Las células neuroepiteliales que conforman primeramente la placa neural y posteriormente el tubo neural durante el proceso de la neurulación, son células notablemente polarizadas apicobasalmente. En base a las observaciones realizadas previamente³ que involucran algunos cambios específicos de la organización subcelular de las células neuroepiteliales en la morfogénesis del tubo neural¹⁷, hemos considerado oportuno realizar el estudio de la polaridad de orgánulos en este tipo celular embrionario⁶.

El análisis de la distribución de mitocondrias en las células neuroepiteliales revela una diferencia notable entre las células de la región anterior (cerebro medio) y somítica (médula espinal) (ver tablas n.º 1 y 2). Así mientras en la región presuntiva de la médula espinal (región somítica) el patrón de distribución no varía durante la neurulación, en la región cefálica disminuye drásticamente el porcentaje de mitocondrias en la zona apical del estadio 10 con respecto a estadios más tempranos. Según nuestra opinión, este patrón de distribución debe relacionarse con un hecho característico que ocurre durante la neurulación: la constricción apical de las células neuroepiteliales por acción de los microfilamentos.

Las mallas apicales de microfilamentos (ver figura n.º 2) son las responsables de la constricción de los ápices de las células neuroepiteliales^{11, 12, 13, 15}. Mediante técnicas de inmunofluorescencia se ha demostrado que estos microfilamentos contienen actina^{16, 18} y miosina¹¹ de modo que pueden contraerse de forma similar a lo que ocurre en el músculo esquelético¹¹. La contracción de los microfilamentos apicales exige una demanda energética local que es proporcionada por las mitocondrias, las cuales tienden a acumularse en las localizaciones con altos requerimientos energéticos, como se puede comprobar en otros tipos celulares (células musculares, conos y bastones de la retina, espermatozoides, etc.⁵). De esta manera se puede esperar que las mitocondrias se localicen preferentemente en la zona apical de las células neuroepiteliales de la región anterior durante la formación del tubo neural, y una vez que éste se ha formado (estadio 10), el porcentaje de mitocondrias de esa zona apical disminuye notablemente. En este sentido, Burnside⁴ ha señalado en el embrión de anfibios la tendencia de las mitocondrias a acumularse en el polo apical de las células neuroepiteliales durante la neurulación, proporcionando así la energía necesaria para la contracción de los microfilamentos. Asimismo, Nagele y Lee¹⁴ indicaron que en las células neuroepiteliales del embrión de pollo las mitocondrias se encuentran preferentemente en la zona apical de la célula.

En las células neurepiteliales de la región somítica la distribución de las mitocondrias no varía durante los tres estadios considerados. Para interpretar este patrón de distribución, debemos considerar la distinta dinámica morfogénica de la neurulación en las regiones anterior (cerebro) y somítica (médula espinal) según la descripción de Shoenwolf y Franks²¹. En la región del encéfalo del embrión de pollo, el canal neural aparece en los estadios 6-7 y presenta forma de «V» de modo que las células de la línea media constituyen el área sobre la que rotan los pliegues neurales. Posteriormente tiene lugar la convergencia gracias a la formación de dos pequeños surcos en las caras luminales de las paredes dorsolaterales del canal neural (surcos bilaterales), con lo que el canal neural adopta una conformación a modo de rombo, produciéndose primero la convergencia y finalmente la fusión de los pliegues.

En la región de la médula espinal, los pliegues neurales se elevan durante los estadios 8 y 10, y los surcos bilaterales se forman muy precozmente apareciendo a veces antes del comienzo de la elevación, de modo que la convergencia y la fusión de los pliegues ocurre simultáneamente¹⁹. La fusión de los pliegues neurales en la región somítica se lleva a cabo mediante la emisión de las prolongaciones apicales de las células con forma de huso de ambos pliegues que se unen en la línea media²⁰. Este proceso de fusión es activo y requiere un aporte energético directo en la zona apical, aporte que es proporcionado por las mitocondrias. Por ello, en nuestros resultados concernientes a la distribución de este orgánulo en las células de las regiones somíticas, el porcentaje de mitocondrias en la zona apical se mantiene constante durante los tres estadios. Probablemente en los estadios 8 y 10 dichos porcentajes se relacionan con la constricción apical que originará la elevación y convergencia de los pliegues neurales, mientras que en el estadio 12 la proporción de mitocondrias en la zona apical está involucrada en el proceso de fusión de los pliegues neurales.

RESUMEN

El estudio del proceso de la neurulación implica el conocimiento de los cambios que ocurren a nivel ultraestructural en las células neuroepiteliales. En el presente trabajo, hemos llevado a cabo el análisis de los patrones de distribución de las mitocondrias en las células neuroepiteliales del embrión de pollo, con el propósito de relacionarlos con la morfogénesis del tubo neural. Dicho estudio se ha realizado en dos regiones embrionarias significativas desde el punto de vista de la dinámica morfogénica: la región del cerebro medio y la región de la médula espinal presuntivas. Nuestros resultados muestran que la distribución de las mitocondrias en las células neuroepiteliales se encuentra condicionada a las localizaciones intracelulares con altos requerimientos energéticos durante la constricción apical y la fusión de los pliegues neurales.

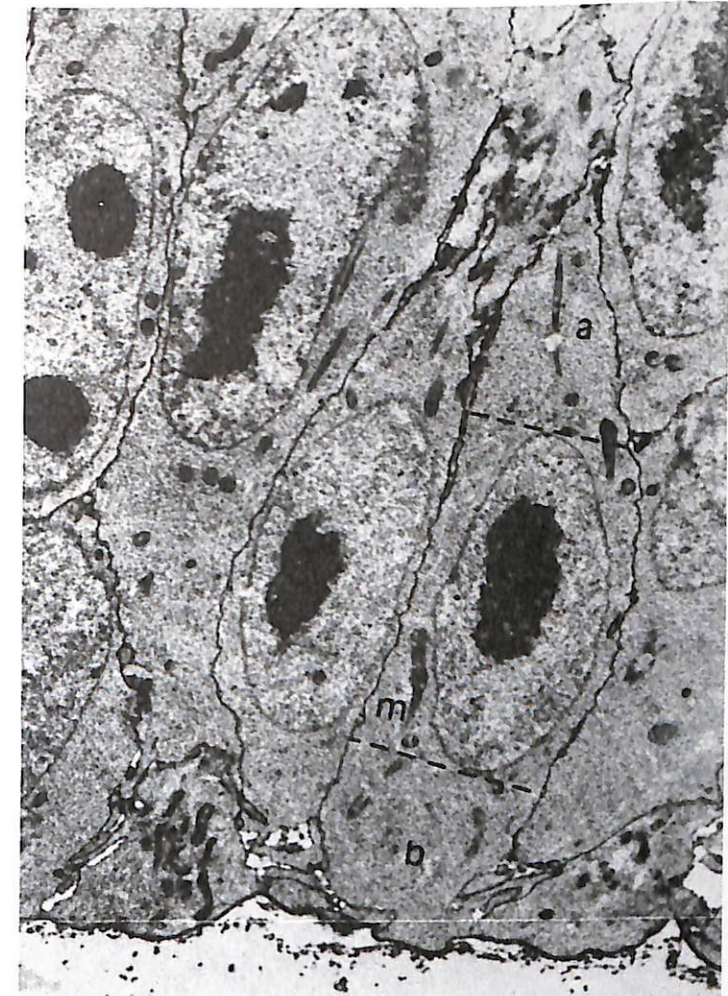


Fig. 1.- Imagen de una célula neuroepitelial en la que se muestra la zona basal (b) media (m), apical (a), establecidas para realizar el análisis de la distribución de las mitocondrias. 1.200 x.

MORPHOGENETIC DYNAMIC OF NEURULATION AT THE PRESUMPTIVE MIDBRAIN AND SPINAL CORD REGIONS OF THE CHICK.- ITS RELATIONSHIPS WITH THE MITOCHONDRIAL DISTRIBUTION INTO NEUROEPITHELIAL CELLS

SUMMARY

The study of neurulation process implies a knowledge of the changes occurring into neuroepithelial cells at ultrastructural level. In the present work we have carried out an analysis of the mitochondrial distribution patterns into neuroepithelial cells in an attempt to relate them with the neural tube morphogenesis. Such study was made at the midbrain and spinal cord presumptive regions, since both regions have distinct morphogenetic dynamic. Our results show a mitochondrial distribution related with the high energetic demand during the apical constriction of neuroepithelial cells and neural folds fusion.

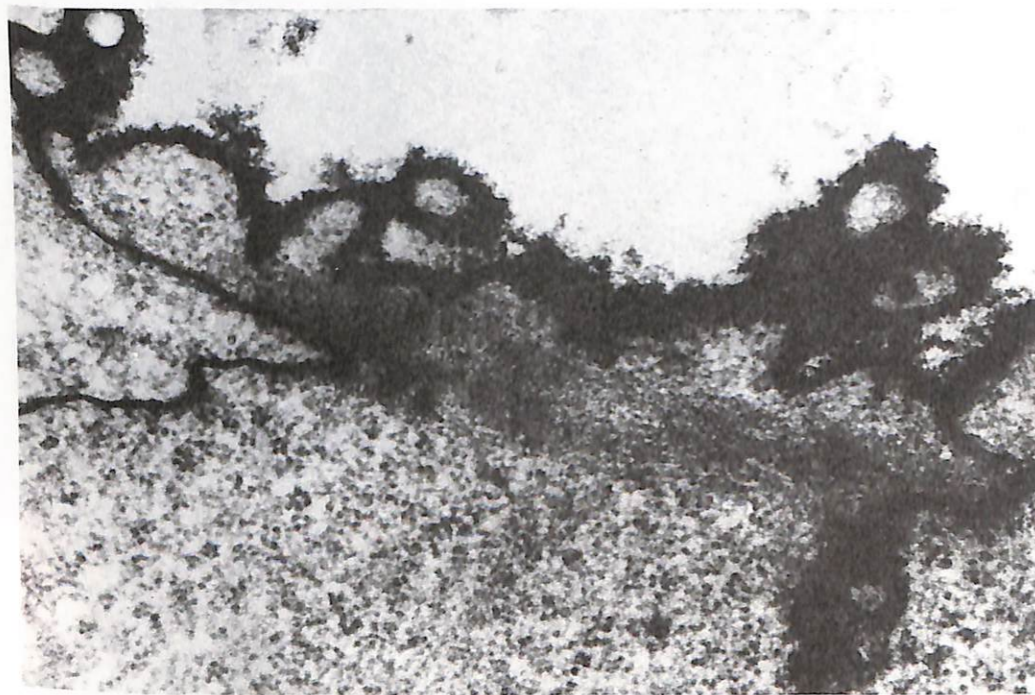


Fig. 2.- Malla apical de microfilamentos presente en las células neuroepiteliales del embrión de pollo durante la neurulación. 40.000 x.

TABLA I
Porcentajes de distribución de mitocondrias en las células neuroepiteliales de la región anterior del embrión de pollo, de los estadios 6, 8, 10 y 12.

	6	8	10	12
B	39.0 ^a	42.0 ^{ab}	48.4 ^b	41.4 ^{ab}
M	29.0 ^a	21.0 ^a	26.9 ^a	28.4 ^a
A	32.0 ^a	37.0 ^a	24.7 ^b	30.2 ^{ab}

B: zona basal. M: zona media. A: zona media.

Las letras a y b señalan diferencias significativas ($P < 0.05$) dentro de una zona celular entre los estadios desarrollo. Letras distintas indican la existencia de diferencias significativas.

TABLA II
Porcentajes de distribución de mitocondrias en las células neuroepiteliales de la región somítica del embrión de pollo de los estadios 8, 10 y 12.

	8	10	12
B	41.8	40.5	37.3
M	20.0	18.1	23.2
A	38.2	41.4	39.5

B: zona basal. M: zona media. A: zona media.

No hay diferencias significativas entre los tres estadios de desarrollo

BIBLIOGRAFIA

- 1) BANCROFT, M., y BELLAIRS, R. (1975). Differentiation of the neural plate and neural tube in the young chick embryo. A study by scanning and transmission electron microscopy. *Anat. Embryol.*, 147: 309-335.
- 2) BRUN, R.B. y GARSON, J.A. (1983). Neurulation in the mexican salamander (*Ambystoma mexicanum*): a drug study and cell shape analysis of the epidermis and the neural plate. *J. Embryol. exp. Morph.*, 74: 275-295.
- 3) BURGUESS, D.R. y SCHROEDER, T.E. (1979). The cytoskeleton and the cytomusculature. An overview. En Jasmin, C. y Cantin, M.: *Methods and achievements in experimental Pathology*. Karger, Basel, vol. 8, pp. 171-189.
- 4) BURNSIDE, B. (1971). Microtubules and microfilaments in newt neurulation. *Dev. Biol.*, 26: 416-441.
- 5) FAWCETT, W. (1981). *The cell*. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- 6) FERNANDEZ, J.G. (1986). *Análisis de los patrones de forma celular y polaridad de orgánulos durante la neurulación en el embrión de pollo*. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- 7) GLAUERT, A.M. (1975). *Fixation, dehydration and embedding of biological specimens*. North-Holland, Amsterdam.
- 8) HAMBURGER, V. y HAMILTON, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryos. *J. Morph.*, 88: 49-92.
- 9) HIRAKOW, R. y GOTOH, T. (1975). A quantitative ultrastructural study on the developing rat heart. En Lieberman, M. y Sano, T.: *Developmental and physiological correlates of cardiac muscle*. Raven Press, New York.
- 10) KARFUNKEL, P. (1972). The activity of microtubules and microfilaments in neurulation in the chick. *J. Exp. Zool.*, 181: 289-302.
- 11) LEE, H.; KOSCIUK, M.C.; NAGELE, R.G. y ROISEN, F.J. (1983). Studies on the mechanisms of neurulation in the chick: Possible involvement of myosin in elevation of neural folds. *J. Exp. Zool.*, 225: 449-457.
- 12) LEE, H.Y. y NAGELE, R.G. (1985). Studies on the mechanisms of neurulation in the chick. Interrelationships of contractile proteins, microfilaments and the shape of neuroepithelial cells. *J. Exp. Zool.*, 235: 205-217.
- 13) LEE, H.Y. y NAGELE, R.G. (1985). Possible involvement of calmodulin in apical constriction or neuroepithelial cells and elevation of neural folds in the chick. *Experientia*, 41: 1.186-1.188.
- 14) NAGELE, R.G. y LEE, H. Y. (1979). Ultrastructural changes in cells associated with interkinetic nuclear migration in the developing chick neuroepithelium. *J. Exp. Zool.* 210: 89-106.
- 15) NAGELE, R.G. y LEE, H.Y. (1980). Studies on the mechanisms of the neurulation in the chick: Microfilament-mediated changes in cell shape during uplifting of neural folds. *J. Exp. Zool.*, 213: 391-398.
- 16) OSTROVSKY, D.; SANGER, J.W. y LASH, J.W. (1983). Light microscope observations on actin distribution during morphogenetic movements in the chick embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 78: 23-32.
- 17) PAZ, P.; ZAPATA, A.; FERNANDEZ, J.G.; CHAMORRO, C.; VILLAR, J.M. (1985). Evidence of non-early ultrastructural regionalization in the neural epithelium of the chick by stereological methods. *Acta Anat.*, 124: 227-233.
- 18) SADLER, T.W.; GREENBERG, D.; COUGHILN, P. y LESSARD, J.L. (1982). Actin distribution patterns in the mouse neural tube during neurulation. *Science*, 215: 172-174.
- 19) SCHOENWOLF, G.C. (1982). On the morphogenesis of the early rudiments of the developing central nervous system. *Scanning Electron Microsc.*, 1982, 1: 289-308.
- 20) SCHOENWOLF, G.C. y DESMOND, M.E. (1984). Descriptive studies of occlusion and reopening on the spinal canal of the early chick embryo. *Anat. Rec.*, 209: 251-263.
- 21) SCHOENWOLF, G.C. y FRANKS, M.V. (1984). Quantitative analysis of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate. *Dev. Biol.*, 105: 257-272.
- 22) SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. (1969). *Biometry*. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- 23) TRINKAUS, J.P. (1984). *Cells into organs. The forces that shape the embryo*. Prentice-Hall Inc., New Jersey. pp. 22-26.

EFFECTOS DE FACTORES FETO-PLACENTARIOS EN EL TEJIDO MAMARIO DE LA RATA - UTILIZACION DEL CONTENIDO MAMARIO DE ACIDOS NUCLEICOS COMO INDICE LACTOGENICO

Por Luis-Ariel García-Pardo (1)

INTRODUCCION

La existencia de un eje adreno-hipofisario funcional, durante las últimas etapas de la gestación, ha sido puesto de manifiesto en los fetos de varias especies animales. Ingle y Fisher¹³ realizaron la primera demostración de que la adrenalectomía, practicada en ratas gestantes, producía un aumento del tamaño de la corteza de las suprarrenales de los fetos. Esta observación fue, más tarde, ampliamente confirmada por otros autores^{3,6,12,15,21}. La inyección de cortisona a la madre anulaba el efecto⁶, y cuando se inyectaba esta hormona a ratas gestantes, no adrenalectomizadas, se obtenía una reducción importante del peso de las adrenales de los fetos^{3,4,6}. Recientemente se han aportado evidencias histoquímicas e histoenzimológicas, que revelan la capacidad de las adrenales fetales para aumentar su secreción hormonal frente a condiciones de estrés, aplicadas a ratas durante las últimas fases de la gestación¹⁸. Asimismo se ha demostrado, en fetos de ovino, la capacidad de respuesta de las suprarrenales, a la administración de CRF, con producción de cortisol, a los 95 días de gestación¹¹. Las experiencias realizadas «in vitro» también han puesto de manifiesto la capacidad funcional de las adrenales fetales de rata, conejo, bóvidos y humanos^{1,2,19,23,24,27}. Por otra parte, los factores hormonales de la corteza adrenal son imprescindibles para desencadenar la actividad secretora del tejido mamario, al término de la gestación^{7,10,5}.

La contribución de los factores hormonales de la corteza suprarrenal^{1,2,3}, de los fetos al proceso de la lactogénesis ha sido sugerida por algunos investigadores^{8,28}. Aun cuando este planteamiento no está exento de un marcado sentido teleológico, la exploración de una posible participación de los corticoesteroides fetales, en un proceso cuyo fin último es proporcionar los nutrientes necesarios para el desarrollo de los recién nacidos, resulta de gran interés desde un punto de vista estrictamente fisiológico.

En el presente trabajo se compara el contenido mamario de ADN y ARN así como

(1) Departamento de Bioquímica, Biología Molecular, Fisiología y Farmacología