

SELECTIVIDAD DE LAS ISOFORMAS DE 140-180 KDA DE NCAM EN LA PAPILA ÓPTICA DEL EMBRIÓN DE POLLO.

JA. Prada Oliveira*, C. Verástegui Escolano, M. González Moreno,
N. Pérez Ríos y FJ. Fdez-Trujillo.

Recibido: 21 diciembre 1996

Aceptado: 15 enero 1999

SUMMARY

140-180 KDA NCAM Specific immunoreactivity in the chicken embryo optic disk.

During embryonic development of chicken retina and retinotectal projection, neural cells showed spatio-temporal patterns in the glycosidic residues located in the plasmatic membranes. Those glycidic components are related with adhesion and recognition cellular behaviours during the generation of nervous system cytoarchitecture. Thus those sugars are included both in usual glycoproteins as in a group of molecules called as cell adhesion molecules (CAM). The first isolated molecule in this group was the neural cell adhesion molecule (NCAM). This glycoprotein has a proteic core with diverse isoforms and it has a variable sialic acids chain. It was able to determine that 120 kDa NCAM isoform shows scarcely sialized chains in intermediate stages by using conventional techniques, lectins and immunohistochemistry. Meanwhile 140-180 kDa NCAM isoforms possess high content in sialic acid and they are present both in early and final stages. Other authors reported that human 120 kDa NCAM isoform was similar to that observed in the Gallus domesticus retina. Our results showed that 140-180kDa isoforms were only presented in the nerve optic fibers when they were left the optic disc.

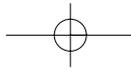
Key words: NCAM, chicken, retina, embryo.

RESUMEN

Durante la embriogénesis de la retina del Gallus domesticus, los neuroblastos muestran variaciones temporales y espaciales de los residuos glucosilados a nivel de sus membranas plasmáticas. Se considera que estos componentes glucídicos están implicados en la organización de estructuras neurales inmaduras, mediante su participación en mecanismos de reconocimiento y adhesión celulares. Los componentes glucosilados van a formar parte de glucoproteínas convencionales, así como de un grupo de moléculas a las que genéricamente se han denominado moléculas de adhesión celular. La primera de estas moléculas aislada fue la neural cell adhesion molecule (NCAM), glucoproteína compuesta por un armazón proteico con diversas isoformas y una cadena más o menos variable de polímeros de ácidos siálicos. La combinación de técnicas convencionales his-

Departamento de Ciencias Morfológica. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz. Plaza de Fragela s/n 11003. Cádiz.
E-mail: grupo.diferenciacion@uca.es

*Autor a quien se le puede remitir la correspondencia



toquímicas, de lectinas e inmunocitoquímicas han permitido determinar que las moléculas de NCAM de 120 kDa presentan cadenas pobremente sializadas en estadios intermedios del desarrollo, mientras en estadios tempranos y finales los ácidos siálicos están más abundantemente representados en las isoformas de 140-180 kDa. Algunos autores han determinado que la isoforma de NCAM presente durante el desarrollo de la retina del *Gallus domesticus* es similar a la humana de 120 kDa. Nuestros resultados indican que las isoformas de 140-180 kDa sólo se presentan en las fibras del nervio óptico una vez que estas abandonan la papila óptica.

Palabras claves: NCAM, pollo, retina, embrión.

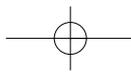
INTRODUCCIÓN

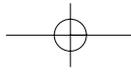
La retina ha sido ampliamente usada como modelo de diferenciación del sistema nervioso al presentarse en él todos los procesos genéricos que organizan esta estructura altamente organizada. Parte de este proceso está basado en mecanismos de reconocimiento y adhesión celular a través de los cuales se producen los diversos cambios diferenciativos y organizativos que generarán circuitos neuronales perfectamente funcionantes.

Se sabe que en la organización y desarrollo embriológico de todo el SNC intervienen, como elementos bioquímicos fundamentales las glucoproteínas (EGGENS *et al.*, 1989; LEMMON *et al.*, 1992; LIS & SHARON, 1993). Además está suficientemente comprobado que en las membranas celulares y matriz extracelular de la neuroretina primitiva existen a lo largo de toda la escala filogenética, bien sea de forma transitoria, o de forma estable, diversos radicales glucídicos que se ha hipotetizado están relacionados con los diversos procesos organoformadores que se dan en los derivados neuroectodérmicos (McLAUGHLIN *et al.*, 1980; BLANKS & JOHNSON, 1983; WHITELEY & SCOTT, 1990; CASTAGNA & LANDA, 1994; UEHARA *et al.*, 1994; PRADA, 1995).

Estas cadenas glucoprotéicas van a tener un papel fundamental no sólo desde el punto de vista estructural, sino también como parte de los mecanismos de reconocimiento y adhesión celular. En 1976 fue aislada la primera glucoproteína implicada directamente en funciones de reconocimiento entre células embrionarias,

la NCAM (neural-cell adhesion molecule). Junto con la NCAM existen otras moléculas relacionadas con el crecimiento axonal, entre las que se encuentran diversas proteínas de la matriz intercelular como la laminina, vimentina y fibronectina y las cadherinas, moléculas de adhesión dependientes del ion calcio (EDELMAN, 1988; MATSUNAGA *et al.*, 1988; RUTISHAUSER & JESSEL, 1988; LAGUNOWICH & GRUNWALD, 1989; INUZUKA *et al.*, 1991). La importancia de la NCAM en el crecimiento axonal fue puesto en duda durante algunos años, asignándosele una actividad relativa de incremento de la función frente a los otros dos factores (NEUGEBAUER *et al.*, 1988). Actualmente se considera que la acción sobre el crecimiento axonal refleja una respuesta primaria y no una actitud facilitadora de los otros promotores axonales (DRAZBA & LEMMON, 1990; LEMMON *et al.*, 1992). La glucoproteína NCAM presenta un funcionamiento independiente de la presencia de ion calcio. De ella se reconocen dos variantes en función de su alto o bajo contenido glucídico, denominándose formas H y L respectivamente, y que se diferencian por el tamaño de la cadena de ácidos siálicos que las integran y que representa el componente carbohidratado terminal de estas moléculas. Además, la cadena peptídica que integra esta glucoproteína, presenta en humanos cuatro isoformas diferenciadas en sus pesos moleculares (180, 140, 120 y 110 kDa) (BRADFORD, 1986). Las formas de 180 y 140 kDa son proteínas transmembrana con una longitud del extremo intracelular diferente, y la isoforma de 120 kDa no es considerada como proteína integral





debido a que es fácilmente extraíble de la membrana celular. El extremo amino terminal es común para estas tres últimas formas, que además es el extremo extracelular (RUTISHAUSER & JESSEL, 1988). La isoforma de 120 kDa se relaciona con cadenas pobremente sializadas en su fracción glucídica, en cambio los ácidos siálicos son más abundantes en las isoformas de 140-180 kDa.

El estudio filogenético de las NCAM demuestra que estas han estado presentes en los vertebrados desde hace más de 600 millones de años. Estas participan en la adhesión celular mediante interacciones homofílicas entre las cadenas más o menos elongadas de ácidos siálicos presentes en la superficie celular. Por tanto, para su actuación es preciso que los neuroblastos interactuantes presenten dichas moléculas en su superficie. Aún así, esta asociación no parece completamente conocida, ni se sabe si participan otras sustancias en su formación, aunque se sospecha que se trata de una participación más compleja que la simple interacción de polímeros. Las consecuencias de la unión de cadenas homofílicas parece que podría conllevar actuaciones sobre el citoesqueleto vía dominios intracelulares. El mecanismo por el que los ácidos siálicos actúan sobre la adhesividad no se conoce. Podrían intervenir mecanismos de repulsión de cargas o cambios conformacionales (RUTISHAUSER & JESSEL, 1988). Aún así, se conoce que el incremento en la cantidad de residuos glucídicos disminuye la actividad de interacción homofílica (SCHLOSSHAUER, 1991).

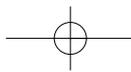
Los ácidos siálicos sirven como reguladores negativos de las interacciones celulares, limitando la adhesión y, por tanto, permitiendo el crecimiento axonal. La elongación del cono de crecimiento o del axón requiere la formación y ruptura de contactos, y en este sentido parecen intervenir los ácidos siálicos. Por tanto, estos azúcares no son esenciales para el crecimiento pero sí lo optimizan (ZHANG *et al.*, 1992).

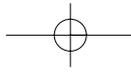
El propósito del presente estudio es deter-

minar la posible evolución temporal que presentan los componentes sializados a partir de la presencia de las isoformas de 140-180 kDa a nivel de las prolongaciones axonales de las células ganglionares de la neuroretina primitiva. Su presencia nos ofrecería, indirectamente, a partir sólo de la fracción proteica, información de los cambios que se generan en la incorporación de terminales más o menos elongados en las cadenas sializadas en relación con cambios dinámicos de los componentes bioquímicos.

MATERIAL Y MÉTODO

Se han utilizado embriones de pollo obtenidos de una granja avícola e incubados en una cámara húmeda a 36°C. Se seleccionaron tres muestras para cada uno de los periodos estudiados, los cuales incluyeron desde el séptimo día de incubación al primer día post-eclosión, secuencialmente cada dos días. El estadio al que correspondían los embriones seleccionados en los periodos estudiados fue establecido según la clasificación propuesta por HAMBURGER & HAMILTON, 1951. Los embriones fueron decapitados inmediatamente para preservar las concentraciones basales de péptidos. Las muestras fueron fijadas en líquido de Bouin durante 4-6 h, deshidratadas en soluciones de alcohol de concentración creciente, aclaradas en xilol e incluidas en parafina semisintética (Histowax, punto de fusión 57°C). Se obtuvieron secciones de 6 µm, que fueron guardadas en una cámara húmeda a 36°C. La desparafinización e hidratación se realizó mediante inmersión en xilol durante 5 min tres veces y posteriormente en una mezcla 1:1 xilol-alcohol y en soluciones de alcohol de concentración decreciente hasta llevarlas a agua destilada. Las secciones permanecieron en cada solución 5 min. Como control morfológico utilizamos secciones teñidas con hematoxilina modificada de Harris-VOF de Gutierrez (GUTIERREZ *et al.*, 1963).





Las técnicas inmunocitoquímicas para detectar la isoforma de NCAM fueron llevadas a cabo mediante el empleo de un antisuero monoclonal (Sigma, C-9672) frente a la isoforma de 180 kDa. Secciones, desparafinadas e hidratadas, fueron tratadas con una solución al 3% de peróxido de hidrógeno, con objeto de inhibir la actividad peroxidasa endógena y pseudoperoxidasa. Las muestras fueron incubadas en el antisuero primario a una dilución 1/100 durante 18 h a 4°C. Tras la incubación las secciones fueron bañadas en tampón fosfato salino -PBS, pH 7.2- durante dos periodos de cinco minutos cada uno. Como método indirecto de detección empleamos el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Biogenex Supersensitive Multilink HRP) según el siguiente protocolo: 30 min de incubación con el antisuero secundario biotinilado a una concentración de 1/50 a temperatura ambiente; dos lavados en PBS durante 5 min; 30 min de incubación en el complejo avidina-peroxidasa a una dilución 1/50 a temperatura ambiente. El revelado se realizó con una solución de 3,3-Diaminobencidina (DAB, Sigma D-5905) a una concentración de 0'3-0'6 mg/ml de PBS en presencia de 2 µ/ml de peróxido de hidrógeno al 3%, a temperatura ambiente durante 20-30 min. Como controles de negatividad se utilizaron secciones incubadas en PBS sin el antisuero primario y secciones tratadas excluyendo algún paso del complejo avidina-biotina.

RESULTADOS

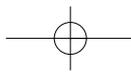
Los controles histológicos han mostrado un desarrollo normal de las distintas capas retinianas. El proceso embrionario de segregación y diferenciación de los diferentes neuroblastos a las capas retinianas definitivas se desarrolló conforme a las descripciones realizadas en estudios clásicos y recientes sobre organización histológica de la retina. Los periodos de estudio seleccionados, que comienzan al final de la primera semana de incubación, aseguran la

observación de las células ganglionares a partir del momento en que estas comienzan a segregarse de la neuroblástica interna y a ocupar la posición definitiva en la neuroretina. Por tanto, observamos todo el trayecto de las fibras axonales de las ganglionares, desde que comienzan a desprenderse de dichas células ganglionares como conos de crecimiento, hasta que ocupan y organizan la capa de fibras del nervio óptico. Los controles de negatividad de las reacciones inmunohistoquímicas no dieron reactividad alguna.

Mediante el uso de antisuero monoclonal anti-NCAM, que presenta una reacción fuerte a la isoforma 180, pero que también muestra reacción frente a la isoforma NCAM-140, hemos observado que durante todo el proceso embriológico no se detecta reactividad en la neuroretina. Las fibras procedentes de las células ganglionares incluidas en la capa de fibras del nervio óptico son negativas en todos los periodos embriológicos estudiados. Sin embargo dichas fibras aparecen reactivas en posición extraretiniana. A nivel del nervio óptico, una vez que las fibras nerviosas que lo componen abandonan la papila y son prácticamente extraoculares, muestran inmunoreactividad. Esto tiene lugar en el último día del desarrollo embriológico, justo antes de la eclosión.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos del estudio inmunocitoquímico nos permiten concluir, en relación a la presencia de moléculas de NCAM en la retina del embrión de pollo, que durante todo el desarrollo embriológico de la neuroretina en la especie estudiada las isoformas de 180 y 140 kDa están ausentes. El antisuero usado reconoce las mencionadas isoformas de NCAM, no presentando reactividad frente a la de 120 kDa de peso molecular. Estos resultados parecen estar en contradicción con los obtenidos por DOHERTY *et al.* (1990). Estos autores emplearon antisuero específico contra la isoforma humana de 120



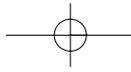
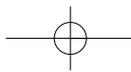
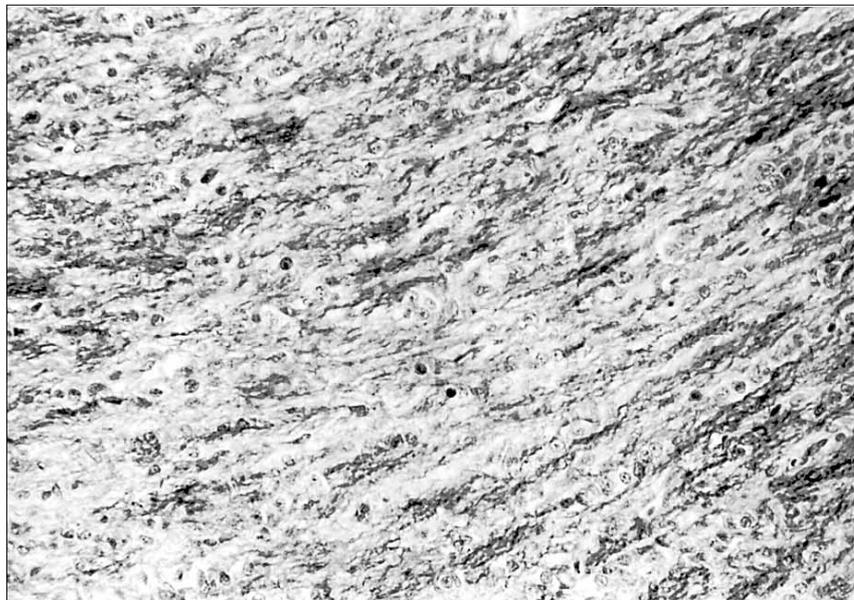


FIGURA 1: Neuroretina primitiva de pollo de 21 días de incubación. Observamos la porción retiniana cercana a la papila óptica, con los cuerpos neuronales teñidos con hematoxilina-VOF y ausencia de reactividad en el espesor de la retina. Las fibras de las células ganglionares se hacen reactivas al antisuero frente NCAM a partir de que estas abandonan dicha papila óptica. X250.

Pre-hatching chicken retina. We observe the retina next to the optic disc. The cellular bodies were stained with haematoxylin-VOF, meanwhile the nerve fibers were unstained with the antiserum against NCAM. Thus the ganglion cell axonal fibers appeared positive when they were located at the optic nerve. X250.

FIGURA 2: Detalle de la Figura 1 a nivel del nervio óptico mostrando la reactividad de las fibras axonales. Cuerpos celulares gliales teñidos con hematoxilina-VOF. X400.

Portion of the figure 1. The axonal fibers were positive at the optic nerve level, meanwhile the glial cells were stained with haematoxylin-VOF. X400.

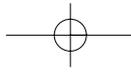


kDa. En cambio, las proteínas transmembrana de 180-140 kDa sí que se encuentran a nivel de las fibras del nervio óptico, una vez que estas abandonan el globo ocular a nivel de la papila. Dichas consideraciones están relacionadas con la fracción proteica de la NCAM; su riqueza relativa en ácidos siálicos puede ser inferida a partir de que la isoforma de 120 kDa posee cadenas pobremente sializadas frente a las isoformas de mayor peso molecular en las que el contenido en ácidos siálicos es mayor.

SUNSHINE *et al.* (1987) y DOHERTY *et al.* (1990) reconocen la importancia de la actuación ejercida por los ácidos siálicos en la maduración de los elementos neurales, pero sobre todo en el crecimiento y elongación de sus prolongaciones neuríticas. En este sentido, los tejidos neurales en proceso de maduración presentan secuencialmente periodos de baja o alta concentración en ácidos siálicos. La presencia de alta concentración se sitúa en los periodos intermedios del desarrollo, cuando la alta plasticidad que provocan estos ácidos siálicos permiten la formación de las estructuras sinápticas y la movilidad de los neuroblastos (SUNSHINE *et al.*, 1987; DOHERTY *et al.*, 1990). Las formas de bajo contenido en ácidos siálicos se presentan en estadios tempranos del desarrollo y fases finales cercanas a la madurez, lo que permitiría mantener la integridad del neuroepitelio durante la morfogénesis y estabilizar la estructuras formadas en el adulto. En el periodo central de histogénesis las formas de NCAM predominantes son las de alto contenido siálico, y así permiten mayor plasticidad entre las células durante sus migraciones y formación de circuitos neurales por crecimientos axonales, como se desprende de nuestros resultados y de los obtenidos por otros autores (SUNSHINE *et al.*, 1987).

REFERENCIAS

- BLANKS, J.C. & JOHNSON, L.V. 1983. Selective lectin binding of the developing mouse retina. *J. Comp. Neurol.*, 221: 31-41.
- BRADFORD, H.F. 1986. *Chemical Neurobiology. An introduction to neurochemistry.* W.H. Freeman and Co. New York.
- CASTAGNA, L.F. & LANDA, C. 1994. Distribution of an endogenous 16-kd S-lac lectin in the chicken retina. *Inv. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 85: 4310-6.
- DOHERTY, P.; COHEN, J. & WALSH, F.S. 1990. Neurite outgrowth in response to transfected N-CAM changes during development and is modulated by polysialic acid. *Neuron*, 5: 209-19.
- DRAZBA, J. & LEMMON, V. 1990. The role of cell adhesion molecules in neurite outgrowth on Müller cells. *Dev. Biol.*, 138: 82-93.
- EDELMAN, G.M. 1988. *Topobiology. An introduction to molecular embryology.* Basic Books, Inc. Washington.
- EGGENS, I.; FENDERSON, B.A.; TOYOKUNI, T. & HAKOMORI, S. 1989. A role of carbohydrate-carbohydrate interaction in the process of specific cell recognition during embryogenesis and organogenesis: a preliminary note. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 158: 913-20.
- GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ, M.; MONTERO, C. & GARCÍA, J.D. 1963. Coloración histológica policroma de embriones. *Anat. Desarr.*, 11: 53-56.
- HAMBURGUER V. & HAMILTON, H.L. 1951. A series of normal stages in the development of normal chick embryo. *J. Morphol.*, 88: 49-92.
- INUKUZA, H.; MIYATANI, S. & TAKEICHI M. 1991. R-cadherin: a novel Ca²⁺ dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. *Neuron*, 7: 69-79.
- LAGUNOWICH, L.A. & GRUNWALD, G.B. 1989. Expression of calcium-dependent cell adhesion during ocular development: a biochemical, histochemical and functional analysis. *Dev. Biol.*, 135: 158-71.
- LEMMON, V.; BURDEN, S.M.; PAYNE, H.R.; ELMSLIE, G.J. & HLAVIN, M.L. 1992. Neurite growth on different substrates: per-



- missive versus instructive influences and the role of adhesive strength. *J. Neurosc.*, 12: 818-26.
- LIS, H. & SHARON, N. 1993. Protein glycosylation. Structural and functional aspects. *Eur. J. Biochem.*, 218: 1-27.
- MATSUNAGA, M.; HATTA, K. & TAKEICHI, M. 1988. Role of N-cadherin cell adhesion molecules in the histogenesis of neural retina. *Neuron*, 1: 289-95.
- MCLAUGHLIN, B.J.; WOOD J.G. & GURD J.W. 1980. The localization of lectin binding sites during photoreceptors synaptogenesis in the chick retina. *Brain Res.*, 191: 345-57.
- NEUGEBAUER, K.M.; TOMASELLI, K.J.; LILLIEN, J. & REICHARDT, L.F. 1988. N-cadherin, NCAM and integrins promote retinal neurite outgrowth on astrocytes in vitro. *J. Cell. Biol.*, 107: 1177-87.
- PRADA, JA. 1995. Estudio de los glucoconjugados y péptidos presentes durante el desarrollo embriológico de la retina del *Gallus domesticus*, L. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.
- RUTISHAUSER, U. & JESSEL, T.M. 1988. Cell adhesion molecules in vertebrates neural development. *Physiol. Rev.*, 3: 819-57.
- SCHLOSSHAEUR, B. 1991. Neurothelin: molecular characteristics and developmental regulation in the chick CNS. *Development.*, 113: 129-40.
- SUNSHINE, J; BALAK, K.; RUTISHAUSER, U. & JACOBSON, M. 1987. Changes in neural cell adhesion molecule (NCAM) structures during vertebrates neural development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84: 5986-90.
- WHITELEY, H.E. & SCOTT, J.R. 1990. Lectin binding patterns in developing canine retina. *Exp. Eye Res.*, 51: 383-91.
- ZHANG, H.; MILLER, R.H. & RUTISHAUSER, U. 1992. Polysialic acid is required for optimal growth of axons on a neuronal substrate. *J. Neurosc.*, 12: 3107-14.

