

ASPECTOS SUBCELULARES DE LA INERVACIÓN DE LAS CÉLULAS INTERSTICIALES DEL OVARIO DE EMBRION DE POLLO CULTIVADO CON LH O hCG

Rodolfo Ávila (1), María E. Samar (1), Ricardo Ferraris (2), Claudio Centurión (1).

(1) II Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología. Cátedra de Informática Médica.

(2) II Cátedra de Patología, Hospital de Urgencias, Facultad de Ciencias Médicas.

Resumen

Abstract

Diversos autores han demostrado el efecto de LH y hCG sobre la secreción esteroidea del ovario del embrión de pollo. Sin embargo, no se ha investigado el efecto de las hormonas luteinizante y gonadotrofina coriónica humana sobre su inervación. El propósito del presente trabajo fue estudiar los aspectos subcelulares de la inervación de las células intersticiales de ovarios de embrión de pollo cultivados con LH o hCG. Explantos de ovarios izquierdo (funcionante) y derecho (regresivo) de 14 embriones de pollo de 7, 11, 15 y 19 días de desarrollo in ovo de raza Cobb's White Rock fueron cultivados por separado durante 4 días en: 1- Medio básico (control): minimum essential medium (MEM-GIBCO) con 10% de suero fetal bovino, 2- Medio básico con el agregado de LH o hCG (problemas). Los ovarios fueron seccionados en trozos de 2 a 3 mm de diámetro, lo que permitió realizar aproximadamente 30 cultivos de cada ovario. Controles: las características de las células intersticiales y la aparición de las fibras y terminaciones nerviosas observadas en los explantos de ambos ovarios 11 días cultivados durante cuatro días eran similares a los 15 días "in ovo". Problemas: con LH o hCG las fibras y terminaciones nerviosas fueron observadas en el ovario derecho y la médula del ovario izquierdo de 7 días cultivados durante cuatro días, en íntimo contacto con las células intersticiales productoras de esteroides. El presente estudio se correspondía con los 11 días de desarrollo "in ovo". Estos hallazgos sugieren que la inervación de los ovarios estaría controlada por un mecanismo indirecto vía hipotálamo-hipofisario y por otro local con la producción de factores neurotróficos modulada por LH.

Several authors have shown the effect of LH or hCG gonadotrophins on steroid secretion in the chick embryo ovary. However, the effects of luteinising hormone or human chorionic gonadotropin on chick embryo ovary innervation have not been studied. The purpose of the present work was to study the subcellular aspects of interstitial cells innervation in chick embryo ovaries cultured with LH or hCG. Coob's White Rock female chick embryos at 7, 11, 15 and 19 days of incubation (in ovo) were employed. Explants of the left and right ovaries were cultured separately for 4 days in: 1- Basic medium (control): minimum essential medium (MEM-GIBCO) with 10% bovine fetal serum, 2- Basic medium with added LH or hCG (problems). The cultures were processed to be studied ultrastructurally (TEM). Left and right ovary explants were fixed two hours at room temperature in Karnovsky's fixative. The tissues were then post-fixed in osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer for one hour and after a rinse in buffer were dehydrated in acetone; afterwards they were embedded in Araldite resin. Thick sections stained with 1 % Toluidine blue were examined and photographed using a Zeiss Photo II microscope. Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined in a Siemens Elmiskop 101 electron microscope.

Controls: In both ovaries the isolated interstitial cells and the appearance of nerve fibers and nerve endings were observed in the explants of 11 day cultured during four days and in a similar way at the age of 15 days of *in ovo* development. Problems: With LH or hCG nerve fibers and nerve endings were observed both in the right gonad and in the médula of the left ovary in close contact with the steroid-producing interstitial cells. Ultrastructurally, the interstitial cells are recognized by their typical organoids: SER, Golgi apparatus, mitochondria

Palabras clave: Ultraestructura - Células Intersticiales- Inervación - Ovario - Embrión-Pollo- In vitro - LH- hCG

with tubular crests and abundant lipidic droplets. The innervation of these cells were seen in ovaries at 7 days development, cultured during 4 days. The present state corresponds to that of 11 days development *in ovo*. The nerve endings had mitochondria, microtubules and small and medium-sized vesicles, some with an electrodense content. These results *in vitro* suggest that innervation of the ovaries is controlled by an indirect mechanism via the hypothalamic-pituitary system and another local with production neurotrophic factors modulated by LH.

Key words: Ultrastructure-Interstitial Cells- Innervation- Chick embryo ovary- *In vitro*- LH- hCG.

Introducción

Diversos autores estudiaron el efecto *in vitro* de la hormona luteinizante (LH) y gonadotropina coriónica humana (hCG) sobre la secreción esteroidea por parte del ovario de embrión de pollo (9,15,16,17,24,25,26)

En trabajos previos nosotros demostramos la regresión de las células germinales y epiteliales en el ovario derecho atrófico y en la médula del ovario izquierdo funcionando durante el desarrollo del embrión de pollo. Sin embargo, las células intersticiales, productoras de hormonas esteroideas no sufren modificaciones. Estas células se localizan aisladas o agrupadas en los cordones del ovario derecho y en la médula del ovario izquierdo. (1, 3, 5, 6, 21, 22).

Se conoce que la esteroidogénesis está controlada no sólo por las gonadotropinas pituitarias sino también por la actividad de los nervios del ovario. (13)

Woods y col. (27) describieron que el eje hipofisogonadal en el embrión de pollo comienza a actuar en la tercera semana del desarrollo. Por lo tanto, la secreción de esteroides por parte del ovario no estaría bajo el control de las gonadotropinas antes de los quince días en «ovo».

Por otro lado, las neurotrofinas promueven no solamente la supervivencia y diferenciación neuronal sino también la de otros tipos de células tales como las productoras de esteroides en el ovario. (11,19)

Nosotros en trabajos previos describimos fibras y terminaciones nerviosas cercanas a las células intersticiales recién a partir de los 15 días del desarrollo *in ovo*. (1,5) También cuando cultivamos explantos de ovarios de embriones de pollo y los estudiamos a nivel ultraestructural observamos que las terminaciones nerviosas cercanas a las células intersticiales se desarrollaban de acuerdo al patrón «*in ovo*». (2)

Sin embargo, demostramos la aparición de fibras y terminaciones nerviosas en ovarios de embriones de pollo de 7 días cultivados por cuatro días con 17- β -estradiol, a diferencia de los controles donde se identificaban en los cultivos de ovarios de 11 días mantenidos durante cuatro días. (8)

Puesto que no ha sido investigado el efecto de las hormonas luteinizante y gonadotropina coriónica humana sobre la inervación del ovario de embrión de pollo, el propósito del presente trabajo fue estudiar los aspectos subcelulares de la inervación de las células intersticiales de ovarios de embrión de pollo cultivados con LH o hCG.

Material y Métodos

Explantos de ovarios izquierdo y derecho de 14 embriones de pollo de 7, 11, 15 y 19 días de desarrollo *in ovo* de raza Cobb's White Rock obtenidos de un criadero local, fueron cultivados por separado durante 4 días en: 1- Medio básico (control): minimum essential medium (MEM-GIBCO) con 10% de suero fetal bovino, medio básico. 2- Medio básico con el agregado de LH, (30 mg/ml) o hCG (15 UI/ml) (problemas). Los ovarios fueron seccionados en trozos de 2 a 3 mm de diámetro, lo que permitió realizar aproximadamente 30 cultivos de cada órgano.

Los explantos de ovarios controles y problemas se fijaron para su estudio con microscopía electrónica de transmisión, separadamente, por inmersión en una mezcla de glutaraldehído al 2,5% y formaldehído al 0,5%, con buffer cacodilato de sodio 0,2 M a pH 7,4, con cloruro de calcio al 0,05 %, durante 2 horas a temperatura ambiente.

Luego de esta primera fijación, el material lavado en buffer cacodilato, se postfijó

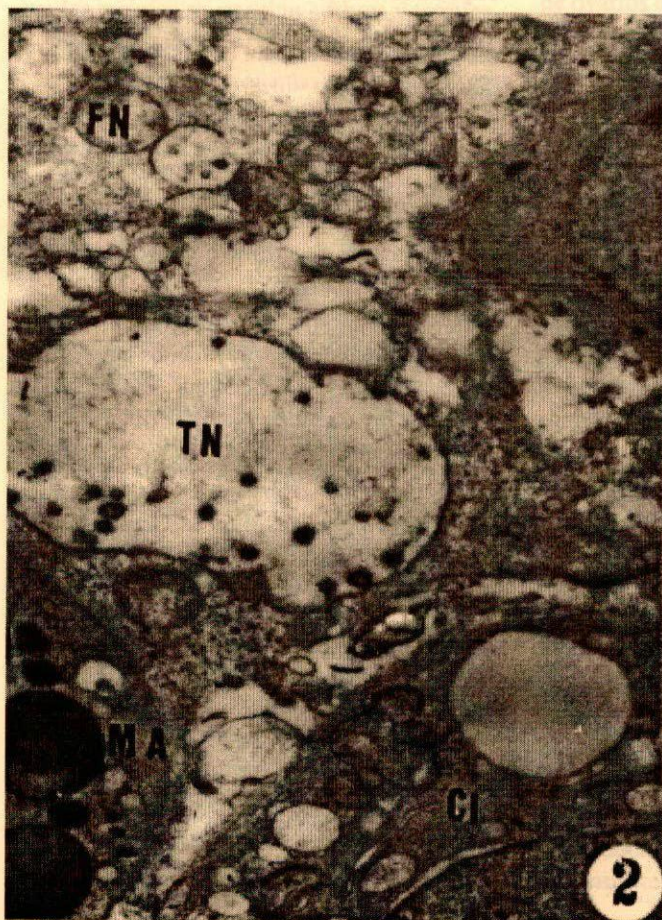


Figura 1 : Ovario izquierdo de embrión de pollo de 7 días de desarrollo cultivado durante cuatro días con LH . Corte semifino. Corteza .Ovocitos (cabeza de flecha) Células intersticiales agupadas (asterisco). Azul de toluidina .450 X.

Figura 2: Ovario derecho de embrión de pollo de 7 días de desarrollo cultivado durante cuatro días con LH. Microscopía electrónica. Citoplasma de una célula intersticial (CI). Fibras (FN) y terminaciones nerviosas (TN). Macrófago (MA). 7.000 X.

en tetróxido de osmio al 1% en buffer cacodilato 0,1 M por 2 horas a temperatura ambiente. A continuación se procedió a la deshidratación del material en concentraciones crecientes de acetona. El material deshidratado fue incluido en araldita (23).

Los cortes se realizaron con un micrótopo Porter Blum MT1. Se contrastaron con acetato de uranilo (solución alcohólica saturada) durante 60 segundos y con citrato de plomo alcalino.

Estos cortes se observaron y fotografiaron en un microscopio Siemens Elmiskop 101 a magnificaciones que oscilaron entre 2.000 y 20.000 aumentos, a una aceleración de 80Kv.

Se realizaron cortes semifinos de 1 mm de espesor del mismo material, los que fueron coloreados con Azul de toluidina al 1 % en solución acuosa de bórax al 1% sobre platina calentada a 70°C y observadas con el microscopio de luz, para obtener una orientación topográfica de las distintas estructuras. Algunos de ellos se fotografiaron en un microscopio Carl Zeiss standard..

Resultados

Controles

Los explantos de ambos ovario de distintas edades presentaron sus características estructurales similares a las "in ovo". El ovario izquierdo poseía una corteza con predominio de ovocitos y células epiteliales y una médula con lagunas y cordones celulares formados por escasos ovocitos, células epiteliales e intersticiales. El ovario derecho carecía de corteza y sólo presentó una estructura similar a la médula del ovario izquierdo. En ambos ovarios las características de las células intersticiales y la aparición de las fibras y terminaciones nerviosas asociadas a las mismas en explantos de 11 días cultivados durante cuatro días eran similares a los 15 días "in ovo".

Las células intersticiales aisladas o agrupadas se localizaban en los cordones del ovario derecho y en la médula del ovario izquierdo. Eran polimorfas con prolongaciones citoplásmicas, núcleo ovalado con cromatina finamente granular y uno o más nucléolos. El citoplasma poseía abundante retículo

endoplásmico liso, aparato de Golgi, mitocondrias con crestas tubulares y abundantes gotas lipídicas.

Las fibras y terminaciones nerviosas se encontraban próximas a los vasos sanguíneos y a las células intersticiales tanto en el ovario derecho como en el izquierdo. Generalmente se encontraba un solo fascículo nervioso en la periferia de un grupo de células intersticiales.

Los axones, que poseían numerosos microfilamentos, se encontraban rodeados por células de Schwann. Las terminaciones nerviosas contenían mitocondrias, microtúbulos y vesículas pequeñas y medianas, algunas con contenido electrodensito.

En los explantos de 11, 15 y 19 días no se observaron modificaciones en la innervación de ambos ovarios presentada "in ovo".

Problemas

Tanto con LH como con hCG, los resultados más destacados se obtuvieron en los explantos de ambos ovarios de 7 días de incubación "in ovo", cultivados durante cuatro días. El presente estadio correspondió a los 11 días de desarrollo «in ovo».

En el ovario izquierdo se observó un mayor desarrollo de la corteza y menor cantidad de lagunas medulares. Las células intersticiales se encontraban agrupadas y poseían un mayor desarrollo de sus organoides y gotas lipídicas. Figura 1.

El ovario derecho presentó un aspecto estructural más compacto y menos lacunar. Las células intersticiales se encontraban agrupadas y con sus organoides más desarrollados.

En el ovario derecho y la médula del ovario izquierdo se observaron las fibras y terminaciones nerviosas. Los fascículos nerviosos que rodeaban a los grupos de células intersticiales poseían numerosos axones con abundantes filamentos. Sin embargo, las terminaciones nerviosas eran escasas y se encontraron asociadas a las células esteroideas. Figura 2.

En los explantos de 11, 15 y 19 días ambos ovarios no mostraron modificaciones en su innervación cuando se compararon con los controles.

Discusión

Normalmente en el embrión de pollo el ovario izquierdo progresa y el derecho se atrofia. De esta manera, el ovario izquierdo funcionando posee una corteza con nidos de células germinales y una médula con cordones de células germinales, epiteliales e intersticiales que rodean a estructuras lacunares. El ovario derecho presenta cordones medulares y lagunas más amplias. La población de células germinales y epiteliales disminuye a medida que aumenta la edad embrionaria. (1-3,12,21,22) Por el contrario, las células intersticiales productoras de esteroides y las fibras y terminaciones nerviosas se preservan en ambos ovarios durante el desarrollo. (7)

Se conoce que las células intersticiales producen hormonas esteroideas (estrógenos, progesterona) en las gónadas de embriones de distintas especies. (20) Su aparición en los ovarios de embriones de pollo se produce a partir de los 15 días. En dicha edad se observa que las mismas se asocian a fibras y terminaciones nerviosas de tipo adrenérgico. (3, 7)

Se considera que las vesículas de las terminaciones nerviosas son sitios de almacenamiento de los neurotransmisores y su agrupación en dichos sitios permitiría la neurotransmisión. También se relaciona el tipo de neurotransmisor contenido con la forma y tamaño de las vesículas.

Dahal E. (10) describió dos tipos de terminaciones y fibras nerviosas en gallinas adultas. Unas que poseían vesículas con un contenido electrodensito identificando a las terminaciones de tipo adrenérgicas y otras que no poseían en su interior ninguna materia adjudicándole funciones colinérgicas.

Yamada y Amanuma (28) mostraron ultraestructuralmente la aparición de fibras y terminaciones nerviosas en el ovario de embrión de pollo a partir de los 12 días «in ovo», cercanas a los vasos sanguíneos, para luego encontrarlas asociadas a las células intersticiales. Según estos autores en el ovario de embrión de pollo predomina la inervación de tipo adrenérgica. También demostraron la aparición de fibras y terminaciones nerviosas en testículos de embriones de pollo feminizados con dietilbestrol no encontrando ninguna

inervación asociada a las células intersticiales de los controles.

Nosotros observamos en las terminaciones nerviosas dos tipos de vesículas, con y sin contenido electrodensito. Consideramos que las fibras y terminaciones nerviosas participan en la diferenciación de las células esteroideas productoras de estrógenos ya que la aparición de estas células es coincidente con la presencia de las terminaciones y fibras nerviosas. (28)

Sin embargo, su acción se produciría a través de la producción de factores neurotróficos producidos por las células intersticiales que presentaban un incremento de sus organoides.

Mattioli y col. (18) demostraron en un modelo in vitro que los folículos de ovarios de oveja cultivados con LH producen relevante cantidad de factor de crecimiento nervioso (NGF) a medida que crecen, relacionando la rápida inervación de las paredes foliculares con dicho factor.

Cuando nosotros cultivamos explantos de ovarios en presencia de LH y hCG observamos que producen en las células intersticiales un incremento de sus organoides involucrados en la producción de hormonas esteroideas. (2) Estos resultados concuerdan con los de Gonzales Del Pliego y col. (14) quienes describieron un aumento de las mitocondrias y retículo endoplásmico liso en las células intersticiales de ovarios izquierdos en el pollo recién nacido después del tratamiento in ovo con hCG. Teng y Teng (24) demostraron in vitro el incremento de la actividad enzimática por parte de las células intersticiales en los ovarios de embrión de pollo cultivados con LH y hCG.

En trabajos previos hemos encontrado terminaciones nerviosas en los explantos de ovarios de siete días cultivados durante cuatro días con 17- β -estradiol. También en ellos detectamos la inervación de las células intersticiales en un estadio anterior a los 15 días «in ovo». (8)

Dado que en el embrión de pollo el eje hipofisogonadal se establece en la tercera y última semana del desarrollo, la síntesis y secreción esteroidea no estaría bajo el control de las hormonas gonadotróficas. Sin embargo, las células intersticiales serían blanco de la hor-

mona luteinizante y compartirían el mismo receptor con la hormona gonadotrofina coriónica humana incrementando su actividad de síntesis esteroidea y de factores neurotróficos.

De acuerdo a nuestros resultados «*in vitro*» sugerimos que la inervación de los ovarios de embrión de pollo está controlada por mecanismos indirectos por medio de las hormonas gonadotróficas a través del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y por factores locales (neurotrofinas) secretados por las células intersticiales y moduladas por LH. Más experimentos son necesarios para confirmar estos resultados.

Bibliografía

- 1- Avila R.E., Samar M.E., Fabro S.P.de. Ultrastructural changes of the left and right ovaries from chick embryo., *Comun Biol.* 6: 63 - 72, 1987.
- 2- Avila R.E., Samar M.E., Fabro S.P. de. Desarrollo *in vitro* de las gónadas femeninas del embrión de pollo. *Rev.Fac.Cienc.Méd. Córdoba XLV: 17 -20,1987.*
- 3- Avila R.E., Samar M.E., Fabro S.P. de. Estudio estructural, ultraestructural y citoquímico de las células intersticiales del ovario del pollo durante el desarrollo embrionario. *Rev.Fac.Cienc.Méd. Córdoba XLVII: 9-12, 1989.*
- 4- Avila R.E., Samar M.E., Fabro S.P. de: *In vitro* effects of gonadotrophic and steroid hormones on the interstitial cells of the chick embryo ovaries. *Rev.Fac.Cienc. Méd. Córdoba XLVIII (1-2), 13-17, 1990.*
- 5- Avila R.E., Samar M.E., Fabro S.P. de. Evolution of germinal epithelium of chick ovary during embryogenesis. *Rev.Fac.Cienc.Méd. Córdoba 49/1: 11 -16, 1991.*
- 6- Avila R.E., Samar M.E., Fabro S.P. de. Structural variations produced *in vitro* by gonadotrophins and steroid hormones on the cell surfaces of the ovarian epithelium of the chick embryo. *Rev.Fac.Cienc.Méd. Córdoba. 49/2:7-12, 1991.*
- 7- Avila R.E., Samar M.E., Fabro S.P.de. Interstitial cells of the ovaries of the chick embryo: ultrastructural aspects of their innervation. *Rev.Fac.Cienc. Méd. Córdoba. 49/2:13-17, 1991.*
- 8- Avila R.E., Samar M.E., Ferraris R., Bonomi L. Comportamiento ultraestructural de la inervación de las células intersticiales durante la diferenciación del ovario del embrión de pollo cultivado con 17- β -estradiol. *Rev.Fac.Cienc.Méd. Córdoba 58 (1):49-51, 2001.*
- 9- Cedard, L., Haffen K., Guichard, A. Influence de l'hormone gonadotrope chorionique sur la production d'oestrogenes a parti d'acetate de Na et Na de dehydroepiandrosterone radiactifs par les gonades embryonnaires de poulet, cultivees *in vitro.* *C R Acad Sci 267:118-120, 1968.*
- 10- Dahl E: Studies on the fine structure of ovarian interstitial tissue. Effects of gonadotrophins on the thecal gland of the domestic fowl. *Z Zellforsch 113: 138-156, 1971.*
- 11- Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, Ojeda SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary: *Endocrinology 142 (5): 2078-86, 2001.*
- 12- Gasc JM: Estrogen target cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation. *J Embryol Exp Morphol 55:: 331-342, 1980.*
- 13- Gioia L. Control of ovarian innervation. *Zygote4(4):295-8, 1996.*
- 14- González Del Pliego, M., González-Morán, G., Pedernera E. Ultrastructure of the ovarian medulla in the newly hatched chick treated with human chorionic gonadotrophin. *Cell Tiss Res 253: 665-670, 1988.*
- 15- González-Moran, G., González Del Pliego, M., Pedernera E. Morphological changes in the ovary of newly hatched chicken treated with human chorionic gonadotrophin during embryonic development. *Gen Comp Endocrinol 59:162-167, 1985.*
- 16- González-Moran, G, Calderon S. Effect of luteinising hormone *in vivo* on ovarian cell subpopulations of newly-hatched chicks. *Brit Poul Science 41: 494-501, 2000.*
- 17- Guichard, A., Haffen K., Cedard, L., Mignot

- TH, Sheib D., Effects of the hCG and LH of season on in vitro steroidogenesis by 18-day chick embryo gonads. *Ann Biol Anim Biochim Biophys* 19: 1317-1325, 1979.
- 18-Mattioli M, Barboni B, Gioia L, Lucidi P. Nerve growth factor production in sheep follicles antral. *Domest Anim Endocrinol* 17(4):361-71, 1999.
- 19-Ojeda SR, Romero C, Tapia V, Dissen GA: Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Mol Cell Endocrinol* 163(1-2):67-71, 2000.
- 20-Oliveros L, Forneris M, Aguado L. Secretion from neuropeptide-treated splenocytes modifies ovarian steroidogenesis. *Medicina (BAires)* 61(1):35-40, 2001.
- 21-Samar M.E., Avila R.E., Fabro S.P. de Cytochemical study of the ovary cells in the chick embryo. *Folia Histochem Cytochem.* 21: 173 - 180, 1983.
- 22-Samar M.E., Avila R.E., Fabro S.P. de. Acid phosphatase activity in the chick ovary during embryonic development. *Bas. Appl. Histochem.* 28:413 -423, 1984.
- 23-Samar ME, Avila RE, Esteban Ruiz F. Técnicas histológicas: fundamentos y aplicaciones. Ed-SeisC Córdoba, pàg. 45-65, 2000.
- 24- Teng, CT, Teng C.S, Studies on sex organ development: The hormonal regulation of steroidogenesis and adenosine 3'5' cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. *Biochem J* 162: 123-134, 1977.
- 25- Teng, CT, Teng C.S, Bousfield GR, Liu, WK, Ward, DN., Differential response of growing and regressing chicken ovaries to gonadotropic hormones. *Gen Comp Endocrinol* 48:325-332, 1982.
- 26-Weniger, JP, Chourauqui, J. Action de LH sur la secretion do estradiol par l'ovaire embryonnaire de poulet en culture in vitro. *Reproduc Nutrit Dev* 28: 1473-1477, 1988.
- 27-Woods, JE, Weeks RL, Ontogenesis of the pituitary-gonadal axis in the chick embryo. *Gen Comp Endocrinol* 45:66-73, 1969.
- 28-Yamada K; Amanuma A: Innervation of ovarian interstitial cells in the chick embryo: an electron microscopy study. *Annot Zool Japon* 55 (2): 70-81, 1982.

...ha representado por la presencia de células de CD8 +.

Palabras Clave: Asma - eosinofilia, linfocitos CD4+, alergia, IgE, Aspirina, absortus alérgica extrínseca, linfocitos CD8+.

Abstract

The asthmatic inflammatory responses present different type of cells involved in this process, such as Lymphocytes and Eosinophils. In experienced hands, the bronchoalveolar lavage (BAL) is a well-tolerated and valuable tool for investigation of basic mechanisms in asthma and other immunological respiratory diseases. The purpose of this work was to study the different cells involved in asthmatic inflammatory responses in allergic and aspirin sensitivity patients and compared with Extrinsic Allergic Alveolitis patients (EAA) by BAL procedure. We studied 27 asthmatic patients. This group was divided by etiological conditions in allergic asthmatic patients (a) (n= 19) (9 male and 10 female) demonstrated