

COMPORTAMIENTO ULTRAESTRUCTURAL DE LA INERVACION DE LAS CELULAS INTERSTICIALES DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DEL OVARIO DEL EMBRION DE POLLO CULTIVADO CON 17- β -ESTRADIOL.

Rodolfo E. Avila (1) ., María E. Samar (1) , Ricardo Ferraris(2) , Lucia Bonomi (3) .

Facultad de Ciencias Médicas, U. N. C.

Resumen

En trabajos previos hemos demostrado la relación entre las fibras y terminaciones nerviosas y las células intersticiales (células productoras de estrógenos) en el ovario derecho atrófico y la médula del ovario izquierdo funcionando, *in ovo*. Además la producción local de neurotrofinas por la células esteroidogénicas está probablemente comprometida en el control de la innervación ovárica. El objetivo del presente estudio fue analizar ultraestructuralmente la innervación durante la diferenciación del ovario del embrión de pollo cultivado con 17- β - estradiol. Explantos de ovarios derechos e izquierdos de 7 a 19 días de desarrollo *in ovo* fueron cultivados separadamente por cuatro días en MEM (controles) o en presencia de 17- β - estradiol (problemas) . En los controles, con microscopía electrónica, el examen de la innervación de los explantos de los ovarios de embrión de pollo reveló que las células intersticiales están bien innervadas. Fibras y terminaciones nerviosas fueron observadas en íntimo contacto con las células productoras de esteroides, una estructura similar a la encontrada en la innervación de aquellos ovarios de quince días del desarrollo *in ovo*. Los cultivos problemas de 7 días cultivados por cuatro días mostraron fibras y terminaciones nerviosas a diferencias del control. Estos resultados *in vitro* sugieren que la innervación de los ovarios es controlada por mecanismos indirectos por vía del sistema hipotálamo-hipofisario y de la producción de factores locales. Más experimentos son necesarios para confirmar estos resultados.

Palabras claves: Ultraestructura – Células Intersticiales- Innervación – Ovario –Embrión-Pollo- *In vitro* -estradiol.

Abstract

In a previous work we demonstrated the relationship between nerve fibers and nerve endings and interstitial cells (estrogen-producing cells) from the atrophic right ovary and the medulla in the left functioning ovary during embryogenesis in the chick, *in ovo*. Besides, the local production of neurotrophins by steroidogenic cells is probably involved in the control of ovarian innervation. The objective of the present study was to analyze ultrastructurally the innervation during the differentiation of chick ovary cultured with 17- β -estradiol. Explants of right and left ovaries from seven to nineteen days *in ovo* development were cultured separately for 4 days in MEM (controls) or in the presence of 17- β -estradiol (problems). In controls the electron microscopic examination of the innervation explants from chick embryo ovaries revealed that the interstitial cells are well innervated. Nerve fibres and nerve endings were observed in close contact with steroid-producing cells, a similar pattern of innervation that those of the fifteen days ovaries *in ovo* development. Problems cultured from seven days showed nerve fibres and nerve endings at difference to controls. These results *in vitro* suggest that innervation of the ovaries is controlled by indirect mechanism via the hypothalamic-pituitary system and local production factors. More experiments are necessary to confirm this results.

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

(1)Ila. Cátedra de Biología Celular, Histología y Embriología,,(2) Ila. Cátedra de Patología y (3) Departamento de Neurociencias y Comportamiento Humano.

Correspondencia dirigida al autor - E-mail: ravila@cmefcm.uncor.edu

Introducción

En el control del funcionamiento del ovario participan importantes factores (6,7,13): 1- externos: las hormonas a través del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (hypothalamic-pituitary-gonadal axis) 2- internos : la innervación que regula la actividad hormonal y ovulación del ovario, fundamentalmente adrenérgica. (12,13,14,16,17,18) Receptores de catecolaminas existen en los vasos sanguíneos y las estructuras endocrinas del ovario. Se conoce que la esteroidogénesis es controlada no solamente por las gonadotropinas pituitarias sino también por la acción de nervios de los ovarios. (10,19)

Por otro lado se sugiere la participación de los nervios adrenérgicos sobre el desarrollo folicular de ovarios. (17,19)

Se conoce también que las neurotrofinas, entre ellas los factores de crecimiento nervioso (NGFR), factor neurotrófico derivado del cerebro (brain-derived neurotrophic factor BDNF), neurotrofina -4 (NT-4) neurotrofina 3 (NT-3) y neurotrofinas 4/5 (NT-4/5) no sólo promueven la supervivencia neuronal y su diferenciación sino que actuarían sobre células no neuronales como son las endocrinas de ovario. (20) Además las neurotrofinas se encuentran presente durante el desarrollo de ovario siendo producidas por células esteroidogénicas. (15)

Nosotros en trabajos previos demostramos que las células epiteliales y germinales del ovario derecho (atrófico) y las de la médula del ovario izquierdo (funcionante) sufren regresión. (3,4,22,23) Sin embargo, las células intersticiales (CI) productoras de hormonas esteroideas se preservan. Normalmente las CI se encontraron en la región central de los ovarios de embriones de 7 días de desarrollo in ovo. (1) Ultraestructuralmente las mismas se reconocen por sus típicos organoides: SER, aparato de Golgi, mitocondrias con crestas tubulares y abundantes vacuolas lipídicas.

Cuando cultivamos explantos de ovarios en presencia de LH y HCG observamos que las mismas exacerbaban sus organoides involucrados en la producción de hormonas esteroideas. (2)

Además describimos fibras y terminaciones nerviosas cercanas a las mismas recién

a partir de los 15 días del desarrollo in ovo. Por otra parte 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 aparecían de acuerdo al patrón in ovo. Por ello nos propusimos estudiar el efecto del 17 β -estradiol in vitro y observar el momento de aparición de las fibras y terminaciones nerviosas.

Así pues, dado los escasos datos bibliográficos sobre el efecto de las hormonas esteroideas sobre las fibras y terminaciones nerviosas durante el desarrollo embrionario nos propusimos estudiar la conducta ultraestructural de la innervación de las células intersticiales cultivados con 17 β -estradiol durante la diferenciación de ovarios de embrión de pollo.

Material y Métodos

Explantos de ovarios izquierdo y derecho de 14 embriones de pollo de 7 a 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, 100 U/ml de penicilina y 5 μ g/ml de estreptomycin y 1% de L-glutamina, medio básico. 2- Medio básico con el agregado de 17- β -estradiol (1 mg/ml), (**problemas**). Cada ovario fue seccionado en trozos de 2 a 3 mm de diámetro, lo que permitió realizar aproximadamente 30 cultivos de cada ovario. Posteriormente se procesaron para su estudio ultraestructural. (24)

Los explantos de ovarios controles y problemas se fijaron, 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 Cl₂ de Ca al 0,05%, durante 2 horas a temperatura ambiente.

Luego de esta primera fijación, el material lavado en buffer cacodilato, se postfijó 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 resinas epóxicas (Araldita)

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 por 130 segundos.

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 (guesos) de 1 mm de espesor, del mismo material los que fueron coloreadas con Azul de toluidina al 1 % en solución acuosa de bórax al 1% sobre platina calentada a 70°C y observados 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

Los ovarios fueron extraídos de cuatro grupos experimentales : 1- ovarios de embriones de 7 días de desarrollo in ovo, 2- ovarios de embriones de 11 días de desarrollo in ovo, 3- ovarios de embriones de 15 días de desarrollo in ovo y 4- ovarios de embriones de 19 días de desarrollo in ovo

Controles: En ambos ovarios las células intersticiales agrupadas o aisladas y la aparición de fibras y terminaciones nerviosas fueron observadas en los explantos de ovarios de 11 días cultivados durante cuatro días y de manera similar a las descritas en la edad de 15 días del desarrollo in ovo. Las células intersticiales agrupadas se observaron en los explantos de 11 días de desarrollo cultivados durante cuatro días. (Fig 1, 2)

Los axones poseían numerosos microfilamentos y se encontraban rodeados por células de Schwann.

Los explantos de los estadios de 15 y 19 días no mostraron modificaciones en comparación a los encontrados en los estudios in ovo.

Problemas : Se observaron tanto en la gónada derecha y en la médula del ovario izquierdo fibras y terminaciones nerviosas en íntimo contacto con las células intersticiales productoras de esteroides, que aparecieron en

los ovarios de 7 días de desarrollo cultivados durante 4 días. El presente estadio corresponde al de los 11 días del desarrollo in ovo. Escasas células de Schwann fueron encontradas rodeando a los axones en estos explantos.

Las terminaciones nerviosas contenían mitocondrias, microtúbulos y pequeñas y medianas vesículas, algunas con un contenido electrodensito. (Fig 3)

Las células intersticiales agrupadas se observaron en los explantos de 11 días de desarrollo cultivados durante cuatro días. Los axones poseían numerosos microfilamentos y se encontraban rodeados por células de Schwann.

Los explantos de los estadios de 15 y 19 días no mostraron modificaciones en comparación a los encontrados en los estudios controles.

Discusión

Las gónadas de embriones producen y secretan hormonas esteroideas que inducen la diferenciación sexual secundaria en diferentes especies.

En los ovarios de embriones de pollo se demostró in ovo e in vitro la producción de estrógenos, testosterona y progesterona por las células intersticiales. (1)

Los estrógenos podrían ser responsables de la evolución del ovario izquierdo funcional. Gasc (11) demostró la presencia de receptores estrogénicos en el epitelio germinativo del ovario izquierdo y no en el derecho.

El ovario derecho del embrión de pollo no evoluciona y por el contrario se atrofia.

De esta manera el ovario izquierdo al poseer receptores estrogénicos en el epitelio germinativo evolucionaría en tanto el derecho involuciona.

Sin embargo las células intersticiales productoras de esteroides y las fibras y terminaciones nerviosas se preservan en ambos ovarios. (5)

Se conoce que las células intersticiales producen hormonas esteroideas (estrógenos, progesterona) en las gónadas de embriones de

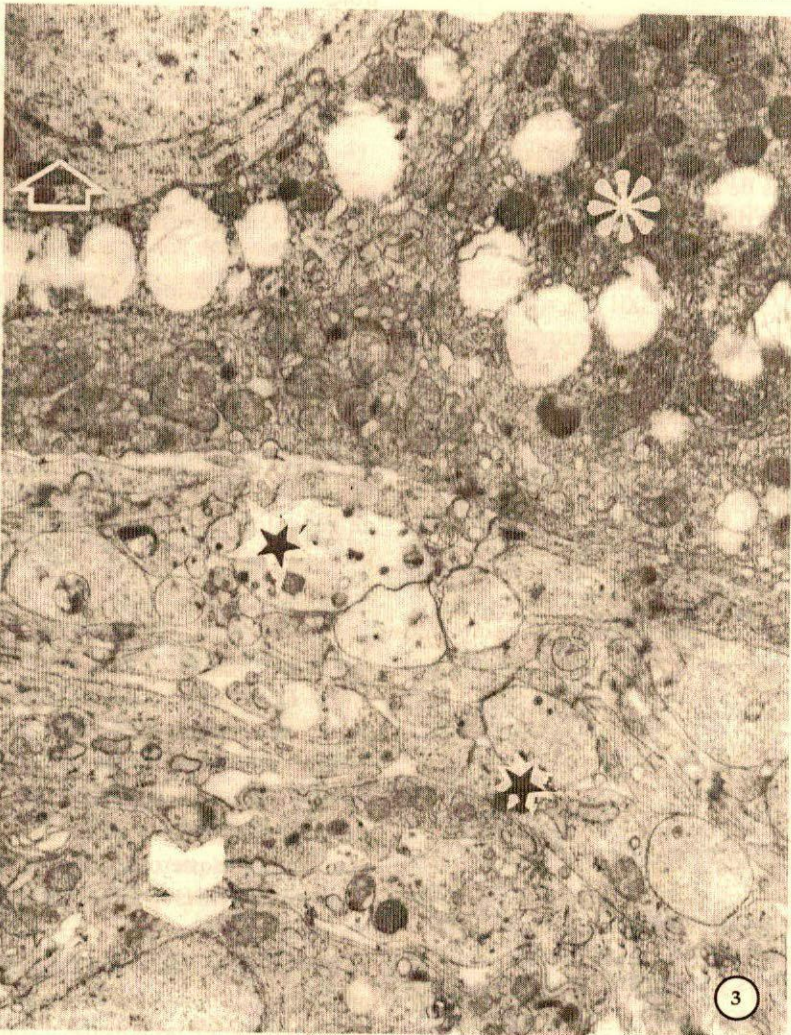
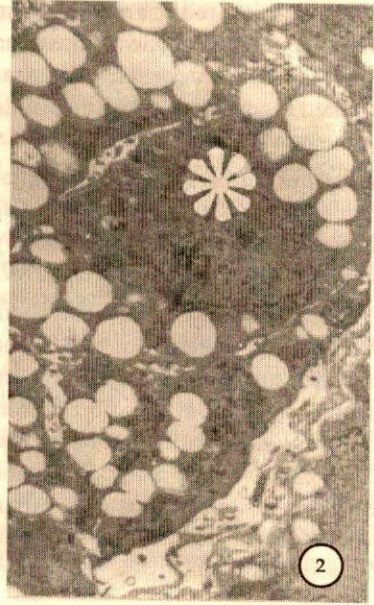
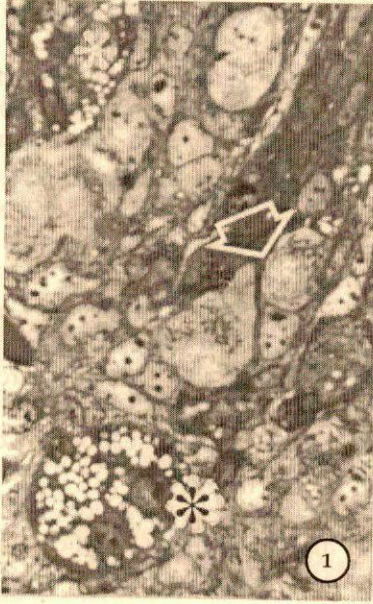


Figura 1 :Médula del ovario izquierdo de embrión de pollo de 7 días de desarrollo cultivado durante cuatro días sin hormona (**Control**). Corte grueso .Ovocitos (cabeza de flecha) Células intersticiales (asterisco). Azul de Toluidina .450 X.

Figura 2 :Médula de ovario izquierdo de embrión de pollo de 7 días de desarrollo cultivado durante cuatro días sin hormona (**Control**). Microscopía electrónica. Células intersticiales (asterisco). 6.000 X.

Figura3: Ovarios derecho de 7 días de desarrollo cultivado durante cuatro días con *con* 17- β -estradiol (**Problema**). Microscopía electrónica. Ovocito (cabeza de flecha) . Citoplasma de una célula intersticial (asterisco). Fibras y terminación nerviosas (estrellas). Núcleo de una célula de Schwann (flecha blanca). 20.000 X.

distintas especies. (21) Su aparición en la estructura de los ovarios de embriones de pollo se establece a partir de los 15 días. Posteriormente a dicha edad se observa que las mismas se encuentran asociadas a fibras y terminaciones nerviosas de tipo adrenérgicas.(1,5)

En el presente trabajo nosotros encontramos terminaciones nerviosas en los explantos de ovarios de siete días cultivados durante cuatro días. De esta manera detectamos en un estadio anterior a los 15 días encontradas *in ovo*.

En las terminaciones observamos dos tipos de vesículas con y sin contenido electrodenso. Dahal (8) describió en gallinas adultas dos tipos de terminaciones y fibras nerviosas. Unas que poseían vesículas con un contenido electrodenso identificando a las terminaciones de tipo adrenérgicas y otras que no poseían en su interior ninguna materia adjudicándole funciones colinérgicas.

Nosotros consideramos que las terminaciones nerviosas participarían en la diferenciación de las células esteroideas productoras de estrógenos ya que la aparición de las mismas es coincidente con la presencia de las terminaciones y fibras nerviosas. (26)

No obstante, los resultados sobre la relación de la simpactectomía y el nivel de producción de estrógenos por el ovario es contradictorio. (9,10) Además Shinohara y col.. (25) comprobaron que la administración de dietilbestrol, un potente estrógeno sintético, disminuye el número de receptores estrogénicos en neuronas de ganglios cefálicos de ratas que inervan el ovario.

Pocos experimentos en embriones fueron realizados analizando el efecto de los estrógenos sobre las fibras y terminaciones nerviosas y su relación con las células productoras de esteroides. (14)

De acuerdo a nuestros resultados preliminares los estrógenos actuarían induciendo la aparición de fibras y terminaciones nerviosas durante el desarrollo embrionario.

Sin embargo su acción sería a través de la producción de factores neurotróficos producidos por las células intersticiales que poseían exacerbados sus organoides.

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 las hormonas a través del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal y por factores locales. Más experimentos son necesarios para confirmar estos resultados.

Bibliografía

- 1- 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.
- 2- 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.

- 3- 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.
- 4- 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.
- 5- 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.
- 6- Avila R.E., Ferraris R., Samar M.E., Ortiz S., Frede S. El envejecimiento celular en un modelo de embriología experimental: 17-b-estradiol y apoptosis en el ovario del embrión de pollo in vitro. *Revista Médica de Córdoba* 87:21-24, 1999.
- 7- Avila R.E., Ferraris R., Samar M.E. Acido retinoico y tumorigénesis en un modelo de embriología experimental: Aspectos morfohistoquímicos del estroma en el ovario del embrión de pollo in vitro. *Rev. Med. Córdoba* 88: 18-24, 2000.
- 8- 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.
- 9- Forneris M, Oliveros L, Aguado L Effect of secretion of splenocytes after superior ovarian nerve section on the ovarian steroidogenesis. *Neuroimmunomodulation* 6(4):293-9, 1999.
- 10- Galvez A, Paredes A, Fiedler JL, Venegas M, Lara HE. Effects of adrenalectomy on the stress-induced changes in ovarian sympathetic tone in the rat. *Medicina (B Aires)*;61(1):35-40, 2001.
- 11- Gasc JM: Estrogen target cells in gonads of the chicken embryo during sexual differentiation. *J Embryol Exp Morphol* 55:: 331-342, 1980.
- 12- Gerendai I, Toth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I, Halasz B. CNS structures presumably of ovarian. involved in vaga function control: *J Auton Nerv Syst* 80 (1-2): 40- 5, 2000.
- 13- Gioia L. Control of ovarian innervation *Zygote*4(4):295-8, 1996.
- 14- Kalczyk J. Effect of estradiol and progesterone on noradrenaline content in nerves of the oviduct, uterus and vagina in ovariectomized pigs. *Folia Histochem Cytobiol*;32(2):119-26, 1994.
- 15- Mattioli M, Barboni B, Gioia L, Lucidi P. Nerve growth factor production in sheep follicles antral. *Domest Anim Endocrinol* 17(4):361-71, 1999.
- 16- Majewski M, Heym C The origin of ovarian neuropeptide Y (NPY)-immunoreactive nerve fibres from the inferior mesenteric ganglion in the pig. *Cell Tissue Res* 266(3):591-6., 1991.
- 17- Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 138(8):3320-9, 1997.
- 18- Mayerhofer A, Frungieri MB, Bulling A, Fritz S. Sources and function of neuronal signalling molecules in the gonads. *Medicina (B Aires)* 59(5 Pt 2):542-5, 1999.
- 19- Moran C, Morales L, Quiroz U, Dominguez R. Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth. *J Endocrinol* 166(1):205-11, 2000.
- 20- 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.
- 21- Oliveros L, Forneris M, Aguado L. Secretion from neuropeptide-treated splenocytes modifies ovarian steroidogenesis. *Medicina (BAires)* 61(1):35-40, 2001.
- 22- 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.
- 23- 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.
- 24- Samar ME, Avila RE, Esteban Ruiz F. Técnicas histológicas: fundamentos y aplicaciones. Ed-SeisC Córdoba, Pág. 45-65, 2000.
- 25- Shinohara Y, Matsumoto A, Hayashi S, Mori T: Prenatal exposure to diethylstilbestrol decreases the number of estrogen receptor alpha-containing neurons innervating the ovary in rat celiac ganglion. *101(3):779-83, Neuroscience* 2000
- 26- 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.