
EVALUACION MORFOLOGICA DE LAS UNIONES INTERCELULARES EN EL OVARIO DEL EMBRION DE POLLO: ACCION DE HORMONAS ESTEROIDEAS Y GONADOTROFICAS IN VITRO.

Rodolfo E. Avila, María Elena Samar, Sofía Parisi de Fabro

Ila Cátedra de Histología y Genética.

Facultad de Ciencias Médicas. UNC.

Córdoba (5000). Argentina.*

RESUMEN

Se determinaron las variaciones de las uniones intercelulares de las células germinales y epiteliales en el epitelio ovárico producidas por hormonas gonadotróficas y esteroideas sobre los ovarios del embrión de pollo a los 7 días de desarrollo. Se cultivaron explantos de ovarios derecho e izquierdo Sin (controles) y con adición de hormonas (experimental) durante 4 días. Los cultivos fueron procesados para su estudio ultraestructural (MET). En ambos ovarios controles los complejos de unión eran similares a los identificados *in ovo*. En el ovario izquierdo se observó aumento y mayor desarrollo de las uniones adherens y desmosomas; en el ovario derecho los mismos disminuyeron por acción de 17 β -estradiol. La respuesta del ovario izquierdo a la progesterona y testosterona fue similar a la obtenida con estrógeno. En la gónada derecha no se observaron cambios. En ambos ovarios se produjo una disminución de las uniones intercelulares por acción de FSH. Los cambios producidos por LH y hCG fueron semejantes a los encontrados en el ovario izquierdo por efecto del estrógeno, consistentes en un incremento de los complejos de unión, principalmente los de tipo adherens. Estos análisis indican que las hormonas esteroideas y gonadotróficas actúan modificando las uniones intercelulares y

participarían en los procesos de crecimiento y atrofia que ocurren en los ovarios del embrión de pollo.

Palabras clave: Ovario - embrión de pollo-complejos de unión-gonadotrofinas-esteroides-cultivos.

INTRODUCCION

En estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio demostramos la participación de las hormonas sexuales esteroideas y gonadotróficas en el desarrollo estructural y citoquímico del ovario izquierdo funcional y del ovario derecho atrófico del embrión de pollo "in vitro"(1-4). En ovarios de embriones de pollo en cultivo con el agregado de 17- β -estradiol, propionato de testosterona, progesterona, Hormona Folículo Estimulante (FSH), Hormona Luteinizante (LH) o Gonadotrofina Coriónica (hCG), se demostró mediante el análisis citoquímico y ultraestructural que las diferenciaciones de membranas y mucosustancias tenían un mayor desarrollo inducido por las hormonas sexuales, en el ovario izquierdo que es el que madura, en relación con el derecho, que involuciona. FSH actúa de la misma manera en los dos ovarios, produciendo regresión celular, mientras que LH y hCG incrementaron las diferenciaciones

* Subsidiado por CONICOR

de membrana y mucosustancias, en ambos ovarios. Estos resultados indican que las superficies celulares serían moduladas por la acción de estas hormonas durante la diferenciación ovárica.

Por otro lado, diferentes autores consideran de importancia el compromiso de los contactos intercelulares en la permeabilidad celular, la cual puede estar bajo la influencia de estímulos hormonales (7, 11, 12, 15, 16, 19). También, en numerosos modelos experimentales utilizando cultivos de diferentes tejidos o células, se destacó la importancia del rol de las comunicaciones intercelulares en el control del crecimiento, migración, diferenciación y función celular (14, 17).

Las uniones ocludens o estrechas son de importancia en la permeabilidad selectiva que regula los movimientos paracelulares de moléculas en los epitelios. Esta permeabilidad puede ser alterada por diferentes condiciones fisiológicas, patológicas y experimentales: entre ellas, por hormonas, hipertonicidad, variaciones de pH, concentración de calcio, proteasas, factor de necrosis tumoral y factores que alteran el citoesqueleto (12).

Basándonos en estos resultados nos propusimos evaluar morfológicamente las variaciones de las uniones intercelulares de las células germinales y epiteliales en el epitelio ovárico del pollo producidas "in vitro" por hormonas gonadotróficas y esteroideas en relación a la diferenciación del ovario izquierdo y la regresión del derecho en el embrión de pollo. Determinamos las variaciones de las uniones intercelulares de las células germinales y epiteliales en el epitelio ovárico producidas "in vitro".

MATERIAL Y METODOS

Explantos de ovarios izquierdos y derechos de embriones Cobb' s White Rock de 7 días fueron cultivados por separado durante 4 días en medio MEM con 10% de suero fetal bovino, 100 U/ml de penicilina y 5 mg/ml de estreptomycin y 1% de L- glutamina. Los explantos fueron incubados 4 días a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂.

Los siguientes experimentos fueron llevados a cabo: a) control sin hormonas; b) más 17 β -estradiol (1 μ g/ml); c) más propionato de testosterona (1 μ g/ml); d) más progesterona (1 μ g/ml); e) más FSH (10 mg/ml); f) más LH (10 mg/ml); g) más hCG (100 UI/ml) (4).

Los cultivos se procesaron para su estudio ultraestructural. Se fijaron en una solución de Karnovsky por 2 hs y se post-fijaron por una h en una solución al 1% de tetróxido de osmio. Las gónadas se incluyeron en Araldita. Los cortes finos se colorearon con acetato de uranilo, contrastándose con citrato de plomo, y fueron examinados con un microscopio electrónico Siemems E 101.

RESULTADOS

En ambos ovarios controles los complejos de unión de los diferentes tipos celulares eran similares a los identificados in ovo. Así pues eran escasos los complejos de unión y las superficies celulares regulares (Fig. 1A). En el ovario izquierdo se observó un aumento y mayor desarrollo de las uniones adherens y desmosomas en tanto que en el ovario derecho los mismos disminuían por acción de 17 β -estradiol (Fig. 1B).

La respuesta del ovario izquierdo a la progesterona y la testosterona fue similar a la obtenida con estrógeno. En la gónada derecha no se observaron cambios.

Se comprobó que en ambos ovarios se producía una disminución de las uniones intercelulares por acción de FSH (Figura 2A). Los cambios producidos por LH y hCG fueron semejantes a los encontrados en el ovario izquierdo por efecto del estrógeno. Con esas dos hormonas se observó el incremento de los complejos de unión, principalmente los de tipo adherens. (Fig. 2B).

DISCUSION

Estos hallazgos nos indican que las hormonas esteroideas y gonadotróficas actúan modificando las uniones intercelulares y participarían en los procesos de crecimiento y atrofia que ocurren en los ovarios del embrión de

pollo. En este sentido, coinciden con los datos de Espey y col. (6), quienes determinaron un considerable aumento de nexus y complejos de unión en las células granulosas ováricas de otras especies por acción de estrógenos.

Además, Merk y col. (9) comprobaron que se produce un incremento de los nexus en respuesta a los estrógenos en las células granulosas del folículo ovárico de la rata.

Es interesante destacar los estudios de Letourneau y col. (7), quienes establecieron que los estrógenos actúan sobre los complejos de unión y nexus en células tumorales y no lo hacen en las normales. Esto corrobora la importancia de estas estructuras en la diferenciación gonadal y la influencia que ejercen sobre ellas las hormonas gonadotróficas y esteroideas. De acuerdo a nuestros resultados, es posible sugerir que existe un compromiso de las uniones intercelulares en los procesos de tumorigénesis, ya que las células embrionarias poseen algunas semejanzas con las tumorales.

Stein y col. (17), comprobaron una disminución de las uniones nexus en el mecanismo comprometido en la separación de las células durante la progresión del cáncer de ovario de rata *in vitro*. Algunos carcinomas provenientes de líneas celulares epiteliales, mantienen las uniones ocludens o estrechas en cultivos; sin embargo, otras no. Cozen y col (5) describieron la permanencia de las uniones estrechas en líneas de células epiteliales humanas transformadas "in vitro".

Son de importancia los estudios acerca de los efectos del ácido retinoico y antiestrógenos, ya que estos productos se aplican en la terapéutica antitumoral (10). Sin embargo, los resultados experimentales con tamoxifeno y los análogos de la vitamina A, son contradictorios y sus mecanismos de acción están bajo revisión (8, 13, 18, 20-23).

Creemos que este aporte sobre el comportamiento de las especializaciones de membranas de células de ovario del pollo durante su embriogénesis es de importancia, ya que aparentemente, estas estarían comprometidas cuando actúan diferentes agentes teratogénicos, como así también los promotores tumorales a nivel celular.

ABSTRACT

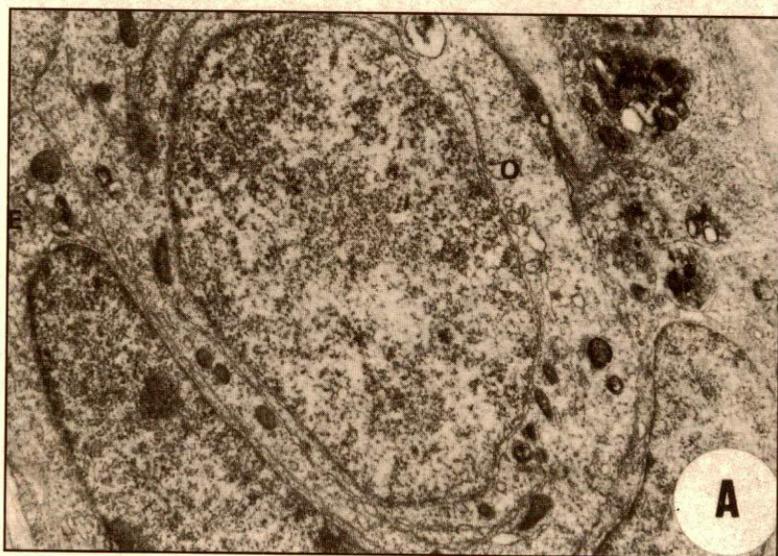
Variations of the intercellular junctions of the germ and epithelial cells of the ovarian epithelium produced by gonadotropic and steroid hormones were determined on ovaries of the chick embryo at 7 days of development. Explants of right and left ovaries were cultured without (control) or with hormones addition (experimental) for 4 days. Cultures were processed for their ultrastructural study. In both control ovaries the union complexes were similar to those identified *in ovo*. Under the action of 17 β -estradiol, an increase and a greater development of adherens junctions was observed in the left ovary; in the right ovary, adherens junctions diminished by action of 17 β -estradiol. The response of the left ovary to progesterone and testosterone was similar to that seen with the estrogen. No changes were observed in the right gonad. A diminution of intercellular junctions was produced in both ovaries under the action of FSH. The changes produced by LH and hCG were similar to those found in the left ovary with the estrogen, consisting of an increase of the union complexes, mainly of the adherens type. These results indicate that steroid and gonadotropic hormones act by modifying intercellular junctions and would participate in the processes of growth and atrophy that occur in the ovaries of the chick embryo.

Key words: Ovary - Chick embryo - intercellular junctions - gonadotropins - steroids - cultures.

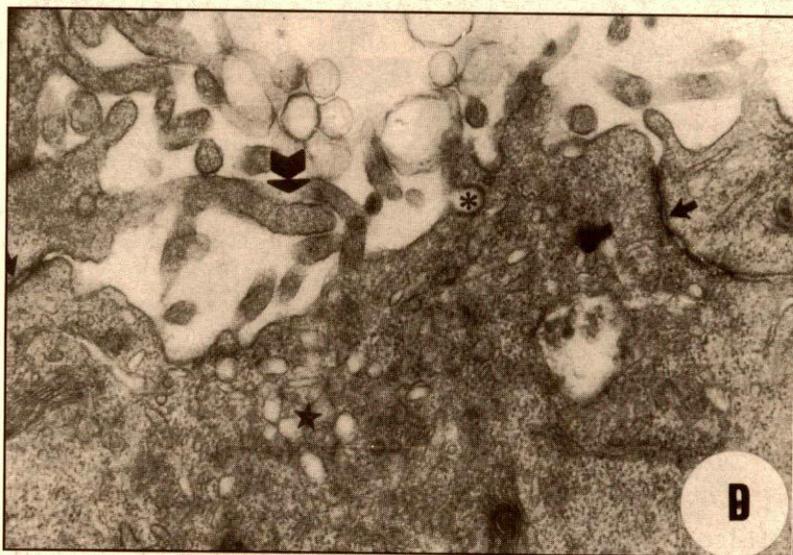
REFERENCIAS

1. Avila RE, Samar ME, Fabro SP de: Explant organ culture of chick embryo ovaries: response to gonadotrophic hormones. *In Vitro* 23:34A, 1987.
2. Avila RE, Fabro SP de: Hormone-Induced differentiation of ovaries from chick embryo in tissue culture. *Comun Biol* 8:121-133, 1989.
3. Avila RE, Samar ME, Fabro SP de: In vitro effects of gonadotrophic and steroid hormones on the interstitial cells of the chick embryo ovaries. *Rev Fac Cienc Méd Córdoba* 48 (1-2):13-17, 1990.
4. Avila R E, Samar M E, Fabro S P de: Structural variation 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. Cozens A L, Yezzi M J, Yamaya M, Steiger D, Wagner J A et al: A transformed human epithelial cell line that retains tight junctions post crisis. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A:735-744, 1992.
6. Espey LL, Stutts RH: Exchange of cytoplasm between cells of membrane granulosa in rabbit ovarian follicles. *Biol Reprod* 6:168-175, 1972.
7. Letourneau R J, Li J J, Rsen S, Vilee C A: Junctional specialization in estrogen-induced renal adenocarcinomas of the golden hamster. *Cancer Res* 35:6-10, 1975.
8. Labarriere N, Piau JP, Zennadi R, Blanchardie P, Denis M, Lustenberger P: Retinoic acid modulation of $\alpha(1-2)$ fucosyltransferase activity and sensivity of tumor cells to lak-mediated cytotoxicity. *In Vitro Cell Dev Biol* 29A:140-144, 1993.
9. Merk F B, Botticelli C R, Albright J T: An intercellular response to estrogen by granulosa cells in the rat ovary: An electron microscopy study. *Endocrinology* 90:992-1007, 1972.
10. Mignotte H, Sasco A J, Lasset C, Saez S, Rivoire M: Adjuvant therapy of breast cancer with tamoxifen and endometrial carcinoma. *Bull Cancer Paris* 79(10):969-77, 1992.
11. Mitchell P A: The ontogeny of nexuses (gap junctions) in the ovary of the fetal mouse. *Anat Rec* 214:283-288, 1986.
12. Mortell K, Marmoistein A, Cramer E: Fetal bovine serum and other sera used in tissue culture increase epithelial permeability. *In Vitro Cell Dev Biol* 29A(3):235-238, 1993.
13. Rivedal E, Sanner T: Regulation of gap junction communication in Syrian hamster embryo cells by retinoic acid and 12-O-tetradecanoyl 1-phorbol-13-acetate. *Carcinogenesis* 17:199-203, 1992.
14. Saunders K, D' Amore P: An in vitro model for cell-cell interaction. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A:521-528, 1992.
15. Schult R M: Roles of cell-to cell communication in development. *Biol Reprod* 32:27-42, 1985.
16. Sheridan J D: Cell coupling and cell communication during embryogenesis. *Cell Surface Rev* 1:409-447, 1976.
17. Stein L S, Welsh T H, Wilson V G, Burghardt R C: Cell-to-cell communication competence in simian virus 40-transfected rat ovarian cells is reduced following tumor selection. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A:436-44, 1992.
18. Touchette N: Tamoxifen resistance in breast cancer. *J NIH Res* 4:72, 1992.
19. Weinstein R, Merk F, Alroy J: The structure and function of intercellular junctions in cancer. *Adv Cancer Res* 23:23, 1976.
20. Weniger P, Samsel J, Zeis A: Le tamoxifene contrecarre l' action feminisante des androgenes sur l' embryon de poulet. *C R Acad Sc Paris* 293:451-452, 1981.
21. Weniger P, Chouraqui J, Zeis A: Secretion d' oestrogenes par l' ovarie d' embryon de poulet traité par le tamoxifene. *C R Acad Sc Paris* 294:1025-1027, 1982.
22. Weniger P, Samsel J, Chouraqui J, Zeis A: Action du tamoxifene sur la feminisation du testicule embryonnaire de poulet. *Ann Endocrinol (Paris)* 44:139-142, 1983.
23. Williams J, Hogan B: Cell differentiation. *Curr Op Cell Biol* 3:925-927, 1991.

Figura 1. Ovario izquierdo de embrión de pollo de 7 días de desarrollo cultivado durante 4 días:

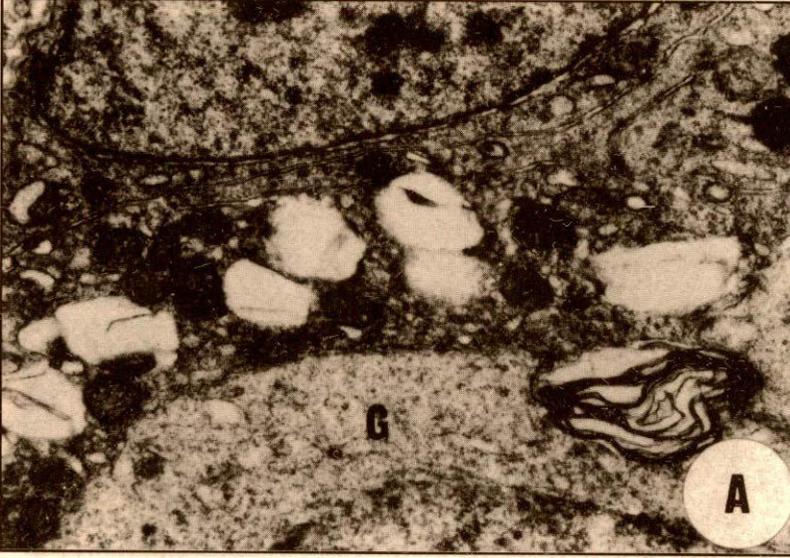


A: En un medio sin Hormonas (control). Ovocito rodeado por células epiteliales (E) con superficie regular. 32.000 X.

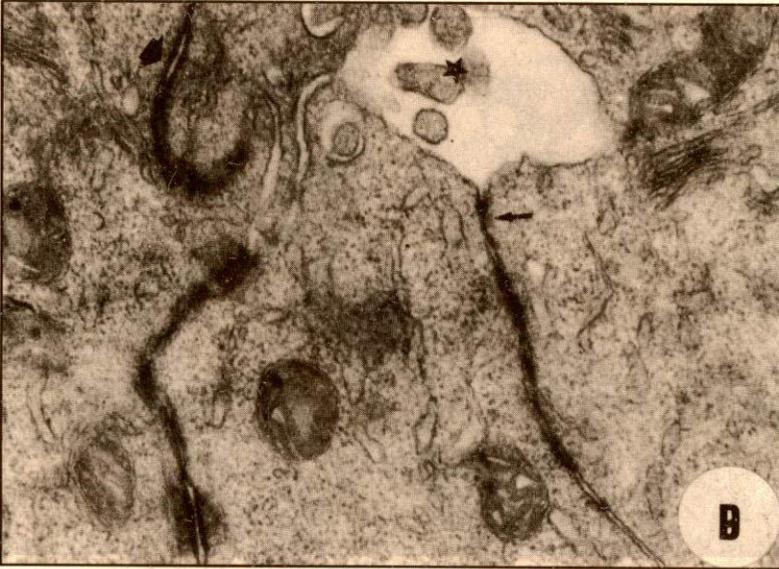


B: En un medio con 17- β -estradiol. Célula epitelial con numerosas microvellosidades (Flecha gruesa). Fosetas cubiertas. (Asterisco) Vesículas cubiertas. (Estrella) Uniones Intercelulares (Flechas finas). 80.000 X.

Figura 2: Ovario izquierdo de embrión de pollo de 7 días de desarrollo cultivado durante 4 días:



A: En un medio con FSH. Células germinales (G) y epiteliales (E) en involución. 21.000 X.



B: En un medio con hCG. Células epiteliales. Uniones intercelulares tipo ocludens (Flecha fina) y adherens (Flecha gruesa). Microvellosidades (Estrella). 80.000 X.