

ROL DEL OXIDO NITRICO EN LA SINTESIS DE PROSTAGLANDINA F_{2α} Y PROGESTERONA DURANTE LA LUTEOLISIS EN LA RATA

ALEJANDRA ESTEVEZ, ALICIA B. MOTTA, MARTHA FERNANDEZ de GIMENO

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO-CONICET) Buenos Aires, Argentina

Resumen En el cuerpo lúteo (CL), la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) es un agente luteolítico. El óxido nítrico (NO) es una molécula mensajera capaz de regular diversos procesos patofisiológicos, algunos de ellos relacionados con el tracto reproductivo femenino. El objetivo del presente estudio fue investigar el rol del NO ovárico en la producción de PGF_{2α} y progesterona (Pg) durante la regresión del CL en la rata. Se utilizó para ello el modelo de la rata pseudopreñada, obteniéndose un cuerpo lúteo funcional por 9 ± 1 días. Fueron inyectados en bursa ovárica dos inhibidores competitivos de la óxido nítrico sintasa (NOs), N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA, 1 mg/kg); N^W-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg) así como también un generador de NO como el nitroprusiato sódico (SNP, 0.05 mg/kg). Los resultados obtenidos indican que el NO, producido en el ovario durante la fase final del desarrollo del CL (días 8 y 9), actuaría aumentando la producción de PGF_{2α} ovárica y disminuyendo la progesterona sérica desencadenando la regresión luteal. Se ha propuesto un mecanismo de feedback positivo entre la PGF_{2α} y el NO hacia la fase final del desarrollo del CL, para asegurar la luteólisis. Esto fue evaluado mediante la medición de la actividad de la NOs, luego de haber inyectado una dosis luteolítica de PGF_{2α} (3 µg/kg) a ratas en estadio medio (día 5) y tardío (día 9) del desarrollo luteal. Los resultados confirmaron nuestra hipótesis; no se observó un efecto en el estadio medio del desarrollo del CL, pero en la fase final se encontró un aumento en la actividad de la enzima NOs en aquellos animales que habían recibido la dosis mencionada de PGF_{2α}.

Abstract *Role of nitric oxide in the synthesis of prostaglandin F_{2α} and progesterone during luteolysis in the rat.* In the corpus luteum (CL) prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) is a luteolytic agent. Nitric oxide (NO) is a messenger molecule capable of modulating diverse pathophysiological processes. Many of these functions are related with the female reproductive tract. The aim of the present study was to investigate the role of ovarian NO in PGF_{2α} production and in progesterone synthesis during CL regression in the rat. By means of the intrabursa (i.b.) ovarian sac treatment of two competitive NO inhibitors, N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA; 1 mg/kg); N^W-Nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 3 mg/kg) and sodium nitroprusside (SNP, 0.05 mg/kg) as a NO generator we found that NO, produced by the ovarian tissue during the last days (days 8 and 9) of CL development, acted by increasing PGF_{2α} production in the ovary and diminishing seric progesterone levels leading to CL involution. We also postulated a positive feedback mechanism between PGF_{2α} and NO, to ensure luteal regression. Thus, we injected intraperitoneally (i.p.) a luteolytic dose (3 µg/kg) of a synthetic PGF_{2α} during the mid and late phase of CL development. The ovarian activity was evaluated. The results confirmed our hypothesis; we did not see any effect in mid-stage of CL development, while at a late stage enhancement of ovarian NOs activity was observed in PGF_{2α}-injected animals.

Key words: corpus luteum, luteolysis, nitric oxide, prostaglandins, rat.

El ovario es un órgano endocrino complejo que sufre profundos cambios estructurales y funcionales a lo largo del ciclo reproductivo.

El óxido nítrico (NO) ha surgido como un importante mensajero intercelular e intracelular controlando numerosos procesos fisiológicos¹. A partir de L-arginina se obtiene NO por la acción de la óxido nítrico sintasa (NOs), encontrándose múltiples isoformas de esta enzima. Algunos efectos del NO se ejercen vía la activación de una

guanilato ciclasa soluble y la consecuente producción de GMPc². Sin embargo, se ha encontrado también una directa activación sobre enzimas conteniendo grupos hemo como la cicloxigenasa 1 y 2. Recientemente, el ARN mensajero de la NOs fue encontrado en el ovario de rata y se postuló su intervención en la ovulación y la atresia como agente antiesteroideogénico.

En un estudio previo sobre el mecanismo de regresión del cuerpo lúteo (CL), hemos reportado que la ocitocina aumentaba la producción de la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) ovárica en la fase final del desarrollo del CL en ratas pseudopreñadas (psp)³. Esta acción fue mediada por un aumento en la actividad de la NOs⁴. Hemos encontrado también que el NO endógeno aumentaba la síntesis de PGF_{2α} sólo durante la fase tardía del desarro-

llo luteal en ratas psp⁵. Sobre la base de las observaciones anteriores es que decidimos examinar la intervención del sistema NO/NOs en la esteroidogénesis lútea y la producción de PGF_{2α} ovárica en ratas durante la regresión del CL.

Se trabajó con el modelo de la rata pseudopreñada, en el cual ratas inmaduras de la cepa Wistar fueron inyectadas con 15 UI/rata de gonadotropina de yegua preñada (PMSG, Sigma) para inducir la formación de un CL que permaneció funcional por 9 ± 1 días. Se consideró como día cero de psp, 48 horas post inyección. Se midieron los niveles de progesterona sérica y PGF_{2α} ovárica durante el desarrollo del CL, pudiéndose definir tres fases del desarrollo, a saber, temprana (días 1 y 2), media (día 5) y tardía (días 8 y 9). En el día 2 la concentración de progesterona era mayor que en el día 1, pero fue aún más alta en el día 5. Desde allí, los niveles hormonales disminuyeron hasta el día 9. En el día 10 no mostró diferencias significativas con el primer día del desarrollo ($p < 0.05$).

Por otro lado, la PGF_{2α} liberada al medio de incubación por ovarios durante la psp, aumentaba significativamente con el desarrollo luteal, llegando a un máximo en el día 9 de psp ($p < 0.05$).

Para estudiar el efecto del NO sobre la producción de progesterona y PGF_{2α}, ratas en la fase final del desarrollo del CL (días 8 y 9) fueron inyectadas por separado, intrabursa, con dos inhibidores competitivos de la NOs como son N^ω-monometil-L-arginina (L-NMMA; 1 mg/kg) y N^ω-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg). Estas eran las mínimas dosis capaces de producir un efecto máximo en la inhibición de la enzima y en la producción de PG. También se trabajó con un generador de NO como el nitroprusiato sódico (SNP, 0.05 mg/kg). Las ratas fueron sacrificadas a las cuatro horas del tratamiento, y se midieron los parámetros antes mencionados. Los resultados se observan en la Fig. 1. Tanto en el día 8 como en el día 9, la producción de PGF_{2α} disminuyó significativamente respecto a los controles, luego del tratamiento con cada inhibidor. Este efecto fue revertido, tanto en el día 8 como en el 9, con la aplicación de un generador de NO observándose un aumento significativo en la producción de PGF_{2α} (Fig. 1, A) $p < 0.05$. Por el contrario, los niveles de progesterona sérica, luego de la aplicación de los inhibidores, aumentó significativamente. Para confirmar que el efecto era debido al NO, se trató con el generador SNP encontrándose valores significativamente menores que el control (Fig. 1, B) $p < 0.05$.

Con el objetivo de evaluar la existencia de un mecanismo de feedback positivo entre la PGF_{2α} y el NO, específico de la fase final del desarrollo del CL, ratas en fase media (día 5) y tardía (día 9) del desarrollo del CL, fueron inyectadas con una dosis luteolítica de PGF_{2α} (3 μg/kg) y a las dos horas se midió la actividad de la enzima

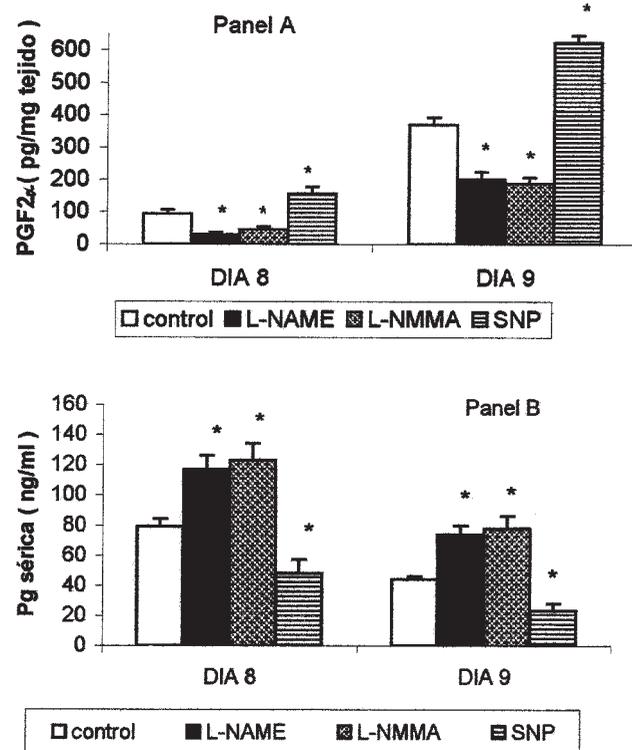


Fig. 1.— Acción de los inhibidores de la NOs y un generador de NO sobre los niveles de prostaglandina y progesterona sérica. Producción de PGF_{2α} ovárica (panel A) y Progesterona sérica (panel B) luego de la inyección intrabursa de dos inhibidores de la NOs y un generador de NO. Ratas en días 8 y 9 de pseudopreñez fueron inyectadas i.b. con L-NAME (3 mg/kg), L-NMMA (1 mg/kg) o SNP (0.05 mg/kg) y sacrificadas a las 4 horas. Se midió PGF_{2α} ovárica y progesterona en suero mediante radioinmunoensayo usando antisuero de conejo de Sigma Chemical Co (St. Louis). Cada columna representa la media \pm ES de diez observaciones de diferentes animales ($n = 10$) Test ANOVA, valores de P (* $P < 0.05$) referidos al correspondiente control de cada tratamiento.

NOs. Como se observa en la Fig. 2, durante la fase media del desarrollo el tratamiento con PGF_{2α} no tuvo efecto sobre la actividad de la enzima. Sin embargo, en la fase final del desarrollo luteal (día 9) el tejido ovárico proveniente de animales inyectados con PGF_{2α} mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) en la actividad de la NOs.

Se ha reconocido que el sistema NO/NOs está presente en el ovario de rata modulando muchos procesos patofisiológicos⁶. Actualmente hay evidencias del efecto del NO sobre el proceso ovulatorio y la regulación de la función del CL^{7,8}. Las prostaglandinas, producto del metabolismo del ácido araquidónico, también se consideran moléculas claves que actúan como mensajeras en procesos como la inflamación, mitogénesis, vasoconstricción/dilatación y ovulación.

Una acción importante de las prostaglandinas en el sistema reproductivo de mamíferos, es la participación

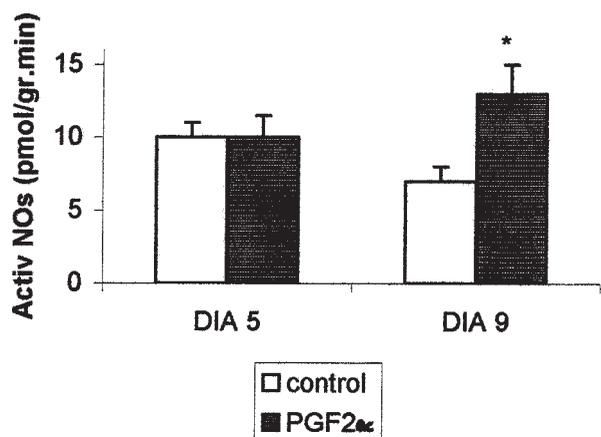


Fig. 2.— Efecto de una dosis luteolítica de prostaglandina F_{2α} sobre la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa. Actividad de la enzima óxido nítrico sintasa luego de la inyección intrabursa de una dosis luteolítica de PGF_{2α} a ratas en días 5 y 9 de pseudopreñez. Se inyectó una dosis luteolítica de PGF_{2α}, 3 µg/kg, luego se extrajo el tejido ovárico y se determinó actividad de la NOs a través de la formación de L-[14 C] citrulina a partir de L-[14 C] arginina, como se describió previamente. Los valores representan la media de diez observaciones ± ES con * P 0.05 (Test ANOVA, n = 10).

en la regresión del CL, donde PGF_{2α} es considerada un agente luteolítico en muchas especies⁹. Sin embargo el mecanismo exacto en el que PGF_{2α} está involucrado no se conoce.

En el presente estudio se investigó el rol del NO durante la regresión luteal y la posible correlación con la producción de prostaglandinas y progesterona. Los animales psp fueron inyectados *in vivo* con dos inhibidores competitivos de la NOs en la fase final del desarrollo del CL. La producción de PGF_{2α} disminuyó mientras que la progesterona sérica aumentó aplicando un generador de NO se obtuvieron los efectos inversos. Esto demuestra que el sistema NO/NOs del ovario es responsable de estas acciones.

Como la inyección de PGF_{2α} reduce los niveles de progesterona, disminuyendo los niveles de proteína y ARN mensajero de la enzima 3 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa¹⁰, se puede asumir que los niveles séricos de progesterona aumentan al disminuir los niveles de PGF_{2α} por acción de los inhibidores (L-NAME y L-NMMA).

Este trabajo demuestra la existencia de un mecanismo de feedback positivo, entre la PGF_{2α} y el NO sólo durante la regresión del CL. Esto contribuye con la regresión celular, asegurando la continuidad del proceso manteniendo altos niveles de PGF_{2α}.

El hecho de no haber observado esta retroalimentación positiva durante la fase media (día 5) del CL podría

deberse a que el CL se encontraría en un período refractario.

También consideramos que la exposición del CL a PGF_{2α} resultaría en un influjo de células del sistema inmune que ejercen también un rol en el proceso luteolítico a través de la liberación de citocinas y sus propiedades fagocitarias¹¹. Cabe señalar que los macrófagos representan una fuente importante de NO y podrían ser responsables del aumento de la síntesis de PGF_{2α} vía la activación de la ciclooxigenasa.

En conclusión, presentamos evidencias que sugieren que el sistema NO/NOs participa en el mecanismo de regresión luteal, aumentando la síntesis de PGF_{2α} e inhibiendo la esteroidogénesis lútea.

Agradecimientos: Los autores agradecen al Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, PIP 4076, PEI 0045/97) y al Programa de Capacitación e Investigación en Reproducción Humana (PLACIRH, Re-entry Grant PRE-020/98) por la colaboración financiera y a María Inés Casella y Ramona Morales por su colaboración técnica.

Bibliografía

1. Moncada SR, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-12.
2. Rettori V, Gimeno MAF, Lyson K, Mc Cann SM. Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 11543-6.
3. Motta AB, Franchi A, Faletti A, Gimeno MAF. Effect of an oxytocin receptor antagonist on ovarian and uterine synthesis and release of prostaglandin F_{2α} in pseudopregnant rats. *Prost Lekot and Essential Fatty Acid* 1996; 52: 95-100.
4. Motta AB, Franchi A, Gimeno MAF. Role of nitric oxide on uterine and ovarian prostaglandin synthesis during luteolysis in the rat. *Prost Lekot and Essential Fatty Acids* 1997; 56: 265-9.
5. Motta AB, Gimeno MAF. Nitric oxide participates in the corpus luteum regression in ovaries isolated from pseudopregnant rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1997; 75: 1335-9.
6. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FEBS J* 1992; 6: 3051-64.
7. Bonello N, Mc Kie K, Jasper M, et al. Inhibition of nitric oxide: effects on IL-1β-enhanced ovulation rate, steroid hormones and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat. *Biol Reprod* 1996; 54: 436-45.
8. Zackrisson U, Mikuni M, Wallin A, et al. Cell Specific localization of nitric oxide synthases (NOs) in the rat ovary during follicular development, ovulation and luteal formation. *Human Reprod* 1996; 12: 2667-73.
9. Rothchild I. The regulation of the mammalian corpus luteum. *Rec Progr Horm Res* 1981; 37: 183-298.
10. Mc Lean MP, Billheimer JT, Warde KJ, Irby RB. Prostaglandin 2α mediates ovarian sterol carrier protein-2 expression during luteolysis. *Endocrinology* 1995; 136: 4963-72.
11. Wang IJ, Pascoe V, Petrucco OM, et al. Distribution of leukocyte subpopulation in the human corpus luteum. *Human Reprod* 1992; 7: 197-202.