

## REGOLAZIONE DELLA FUNZIONE E REGRESSIONE LUTEALE NEL CONIGLIO

Maranesi M1, Zerani M2, Brecchia G1, Boiti C1

1Dip. Scienze Biopatologiche Veterinarie, Sez. Fisiologia, Perugia;

2Scuola di Scienze Mediche Veterinarie, Matelica (MC)

Parole chiave: corpo luteo, coniglio, funzione luteale, luteolisi

### Riassunto

La funzione principale del corpo luteo (CL) è la produzione del progesterone determinante per conseguire e portare a termine la gravidanza. Nel coniglio, i meccanismi che controllano lo sviluppo del CL, la funzione secretoria e la regressione coinvolgono diversi fattori intra- ed extra-ovarici con azione luteotropica e luteolitica tra cui gli estrogeni e la prostaglandina F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>). La loro azione risultante è tuttavia mediata da una complessa serie di interazioni che coinvolgono meccanismi in cui un ruolo non trascurabile è svolto da fattori ad azione autocrina e/o paracrina, emersi nel corso degli anni, quali principali regolatori dell'attività luteale, tra i quali: citochine (es. interleuchine, leptina), peptidi vasoattivi (es. ossido nitrico, endotelina) e fattori legati all'apoptosi (es. membri della famiglia BCL2 e TP53).

Il CL neoformato sembra essere resistente all'azione della PGF<sub>2</sub>. La competenza luteolitica all'azione della PGF<sub>2</sub> aumenta progressivamente con lo sviluppo del CL e viene pienamente acquisita dal 9° giorno di pseudogravidanza. I risultati riassunti in questo lavoro con differenti approcci metodologici, testimoniano che, anche nei CL apparentemente refrattari all'azione della PGF<sub>2</sub>, esiste una intensa attività molecolare determinata da questa luteolisina. I dati ottenuti approfondiscono meccanismi biologici che sono di estremo interesse nel campo della fisiologia ovarica ma che stanno alla base anche della patologia riproduttiva.

### Summary

The main function of corpus luteum (CL) is the production of progesterone which is necessary for achieving and maintaining a successful pregnancy. In rabbits, the mechanisms controlling luteal development and secretory function as well as luteal regression involve different intra- and extra-ovarian factors with luteotrophic and luteolytic actions, including estrogens and prostaglandin F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>). These factors act by complex interactions involving autocrine and/or paracrine mechanisms. Over the past few years, they emerged as important regulators of luteal activity: cytokines (e.g. interleukins, leptin), vasoactive peptide (e.g. endothelin, nitric oxide) and apoptotic factors (e.g. BCL2 family members and TP53). The newly formed CL appear to resist the luteolytic action of PGF<sub>2</sub>. The acquisition of luteal competency to PGF<sub>2</sub> increases progressively with the CL development and, at day 9 of pseudopregnancy, they are fully responsive. The results here summarized show that in CL apparently resistant to the luteolytic action of PGF<sub>2</sub> exists an intense molecular activity induced by this luteolysin. The data obtained with different methodological approaches provide further details on biological mechanisms that are relevant in the field of ovarian physiology, as well as in that of reproductive pathology.

### Introduzione

Il corpo luteo (CL) è una ghiandola endocrina transitoria che secreta progesterone (P<sub>4</sub>), un ormone determinante per il mantenimento della gravidanza. La specie cunicola ha un'ovulazione riflessa, se gli oociti non sono fecondati, come accade per un accoppiamento non fertile o per un'ovulazione indotta farmacologicamente, segue un periodo chiamato pseudogravidanza (PSG), che dura circa 15-18 giorni, caratterizzato dalla presenza del CL. Le concentrazioni plasmatiche di P<sub>4</sub> aumentano con l'avanzare dello sviluppo luteale, sotto l'influsso di diversi ormoni luteotropici tra i quali i principali nel coniglio sono il 17-estradiolo (E<sub>2</sub>) e la prostaglandina (PG) E<sub>2</sub>.

Il processo di regressione luteale in un animale non gravido è un processo decisivo per l'attività ovarica, poiché permette lo sviluppo di nuovi follicoli ovulatori. Durante la luteolisi strutturale, le cellule luteali vanno incontro ad un processo simil immuno-mediato che, tramite varie citochine, esita nell'apoptosi (Tilly 1996), evento che nel coniglio è stato descritto nei suoi caratteri morfologici (Nicosia et al., 1995). La PGF2 è riconosciuta come principale fattore luteolitico in molte specie, tra cui il coniglio, nonostante ciò, ancora non si conoscono esattamente i fattori e i meccanismi che determinano la mancata sensibilità a questa prostaglandina negli stadi precoci della formazione luteale.

Questo lavoro intende chiarire il ruolo di alcuni fattori che regolano la funzione e regressione luteale durante la PSG nel coniglio. A tal riguardo, verranno sintetizzati i risultati più recenti ottenuti dal nostro gruppo di ricerca riguardanti i mediatori e i meccanismi coinvolti nella luteolisi PGF2 -indotta e nel processo di acquisizione della competenza luteolitica.

### **Fattori luteotrofici e regolazione della funzione luteale**

Tra i fattori luteotrofici prodotti localmente, un ruolo importante è rivestito dalla PGE2 (Gobbetti et al., 1999; Boiti et al., 2000; 2001; Zerani et al., 2005; 2007).

Dati recenti, testimoniano che l'ormone adrenocorticotropo (ACTH), influenza positivamente la steroidogenesi luteale in vitro, anche se in vivo determina una luteolisi funzionale parziale, che si rende evidente a 24 ore dalla sua somministrazione (Guelfi et al., 2011). Gli effetti dell'ACTH sono mediati dall'attivazione del recettore per la melanocortina di tipo 2 (MC2R). Indipendentemente dallo stadio luteale, l'ACTH tramite MC2R, aumenta il rilascio di PGE2 e diminuisce quello della PGF2, aumentando il Ca<sup>2+</sup> e utilizzando il pathway AC/cAMP/PKA.

Il flusso ematico ovarico regola la steroidogenesi. La PGF2 determina una riduzione del flusso ematico che anticipa di 8-10 ore quella del P4 (dati non pubblicati).

### **Fattori luteolitici**

L'ossido nitrico (NO), un potente vasodilatatore, nel coniglio ha un'azione antisteroidogenica diretta a livello luteale. Esperimenti condotti in vivo e in vitro, testimoniano un ruolo di NO e delle sue sintasi (NOS) come target principale della PGF2 (Boiti 2000; 2001; 2002; 2003; 2004; Gobbetti et al., 1999). Oltre alla PGF2 e all'NO, altri fattori coinvolti nella luteolisi sono emersi recentemente, tra questi l'endotelina 1 (ET1), alcune citochine (interleuchine e leptina) e il GNRH.

La presenza di recettori per ET1 nella componente vascolare del CL di coniglio e nelle cellule luteali, suggerisce che il sistema dell'ET1 è coinvolto nella regolazione del flusso ematico e della steroidogenesi in questa specie. Inoltre, i geni per ET1 e per i suoi recettori ETAR ed ETBR, sono espressi, seppure a livelli differenti, nei CL in tutto il corso della PSG. Studi effettuati in vitro e in vivo, dimostrano che ET1 legandosi a ETAR e attivando la via della PLC/PKC determina la luteolisi funzionale. Il pathway utilizzato da ET1 in questo processo coinvolge i prostanoidi e il sistema renina-angiotensina (RAS). Infatti, l'azione luteolitica di ET1 viene arrestata non solo dalla somministrazione di un antagonista di ETAR (BQ123), ma anche dal trattamento con un inibitore della cicloossigenasi (COXib) o con un ACE-inibitore (captopril). Al contrario la PGF2 non richiederebbe ET1 o angiotensina II per esercitare la sua azione luteolitica. Di notevole interesse è la presenza di un feedback positivo reciproco tra PGF2 ed ET1. ET1 aumenterebbe anche l'attività enzimatica della NOS, tramite l'attivazione di ETAR mediata dalla PGF2, poiché sia BQ123 che COXib aboliscono questa sovra-regolazione (Boiti et al., 2005; 2007).

Nel corso della luteolisi spontanea, l'espressione genica per MCP1 e IL1 aumenta al 15°giorno di PSG (Boiti et al., 2004), questo dato riflette il maggior afflusso di macrofagi e cellule immunitarie osservate in corrispondenza della regressione luteale (Bagavandoss et al., 1988). Il trascritto dell'IL2, aumenta più precocemente (13°giorno di PSG) rispetto ad altre citochine (Boiti et al., 2004), infatti, la presenza di linfociti T precede quella dei macrofagi nel CL di coniglio (Bagavandoss et al., 1988).

La leptina, prodotto del gene dell'obesità ob, ha un'azione antisteroidogenica diretta a livello luteale e determina un incremento della produzione della PGF2. Questa citochina tramite il suo recettore (ObR), identificato nel citoplasma delle grandi cellule luteali, utilizza il pathway della MAPK, per inibire la produzione

di P4, e quello della JAK per stimolare la sintesi di PGF2 (Zerani et al., 2004). Al contrario di quanto riscontrato nell'ovidutto di coniglio (Zerani et al., 2005), la leptina non ha effetti sull'attività della NOS e della PGE2 luteale (Zerani et al., 2004).

L'azione del sistema GNRH/GNRHR nel CL di coniglio è essenzialmente antisteroidogenica (Zerani et al., 2010). Il meccanismo post-recettoriale utilizzato dal GNRH a livello luteale, prevede l'attivazione della PLC, con formazione di inositolo trifosfato e diacilglicerolo, della PKC, e, quindi, del pathway COX2/PGF2 /NOS (Zerani et al., 2010). Infatti, in vitro un agonista del GNRH (buserelin) aumenta l'attività della COX2, la produzione di PGF2 e l'attività della NOS, nei CL di 9 e 13 giorni, eventi che si manifestano contemporaneamente alla diminuzione del rilascio di P4 (Zerani et al., 2010).

### **Acquisizione della competenza luteolitica all'azione della PGF2**

Il CL di coniglio, non è totalmente refrattario all'azione della PGF2 nello stadio precoce del suo sviluppo, infatti, anche se non si osservano variazioni della steroidogenesi luteale, a livello molecolare si realizzano numerosi eventi (Boiti et al., 2003; 2007; Zerani et al., 2007; Maranesi et al., 2010). Il ruolo rilevante svolto dalla COX2 nella luteolisi indotta da PGF2 è stato ormai accertato. L'immunopositività per questo enzima è stata evidenziata in diversi tipi cellulari, nei CL di 4 e 9 giorni. A seguito della somministrazione della PGF2, i trascritti di COX2 aumentano in entrambe le fasi luteali, con una modulazione positiva maggiore in quelli più maturi con un picco a 3 e 6 ore dall'iniezione della PGF2. L'attività della COX2 incrementa in tutti e due gli stadi luteali ma particolarmente in quello dello stadio intermedio di PSG.

Analisi colturali dimostrano che la produzione basale intraluteale di PGE2 è maggiore nei CL di 4 rispetto a quelli di 9 giorni, mentre si osserva il contrario per la produzione di PGF2. La somministrazione di PGF2, non ha effetto sulla produzione luteale di PGE2 nei CL di 4 giorni, al contrario la diminuisce marcatamente in quelli di 9 giorni. Di notevole interesse è la presenza di un circuito di auto-amplificazione della PGF2, processo più evidenti nei CL intermedi.

L'enzima PGE2-9-K ha un ruolo chiave a livello luteale, grazie alla sua capacità di trasformare la PGE2 in PGF2 quest'enzima ha, inoltre, una capacità catalitica simile alla 20-HSD, convertendo il P4 in un metabolita inattivo (20-OH-P4). Tutto ciò dimostra l'importanza della PGE2-9-K nella regolazione della luteolisi indotta nel coniglio, poiché essa contemporaneamente incrementa la quantità di PGF2 e diminuisce quella di P4.

La sintesi preferenziale a partire da PGH2 di PGE2, rispetto a PGF2, da parte delle rispettive sintasi, suggerisce un ruolo della PGE2 come precursore per la PGF2 regolato dalla PGE2-9 K. I CL degli stadi luteali precoce ed intermedio utilizzerebbero lo stesso pathway intracellulare (PLA2/AA COX2/PGH2 PGE sintasi/PGE2) nel costruire una riserva di PGE2 intracellulare, che tramite l'attivazione/inattivazione di PGE2-9-K porterebbe ad una diversa produzione finale di PGE2 (predominante nello stadio luteale precoce) o di PGF2 (predominante nello stadio luteale intermedio) (Zerani et al., 2007).

Anche l'ET1 è coinvolta nel processo di acquisizione della competenza luteolitica. Seppure la PGF2 determini un aumento dei trascritti di ET1 e dei suoi recettori (ETAR ed ETBR) nei CL delle fasi precoce e intermedia, in vitro l'ET1 diminuisce il rilascio di P4 e aumenta la secrezione di PGF2 e l'attività della NOS attraverso la via della PLC/PKC solo nei CL competenti (Boiti et al., 2005; 2007).

La regolazione positiva del trascritto dell'IL1 determinata dalla PGF2 fornisce prova che questa citochina è coinvolta nel potenziare il pathway luteolitico della PG (Maranesi et al., 2010). Il fattore trascrizionale TP53 causa apoptosi interagendo coi membri della famiglia BCL2 attivando il pro-apoptotico BAX e inibendo BCLXL (Sot et al., 2007). Il ruolo di TP53, BAX e BCLXL nel regolare la cascata luteolitica è ancora controverso, tuttavia i nostri dati testimoniano che entrambi i CL sono suscettibili al processo apoptotico (Boiti et al., 2004; Maranesi et al., 2010).

Nell'ovaio di coniglio, il recettore per gli estrogeni tipo 1 (ESR1) è l'isoforma dominante associata al compartimento citosolico (Monje e Boland, 2001). Nei CL competenti ESR1 subisce una regolazione marcatamente negativa a 6 ore dall'iniezione con PGF2 (Maranesi et al., 2010). Questo dato è di notevole interesse, soprattutto se posto in relazione al declino di P4, che si osserva a 6 ore dopo il trattamento con PGF2 nel tessuto luteale e 8 ore più tardi nel sangue periferico nei CL competenti (Boiti et al., 2004).

In conclusione, l'acquisizione della competenza luteolitica è da riferirsi non solo all'aumento dei recettori per la PGF2 ed alla diminuzione di fattori luteotropici (E2, PGE2, ACTH) ma anche a fattori ad azione prevalentemente antisteroidogenica (GNRH, ET1, leptina) che interagendo con la PGF2 e tramite il sistema

NO/NOS influenzano i processi infiammatori, vascolari, ed apoptotici coinvolti nel processo luteolitico. Quindi, durante la regressione indotta dalla PGF2 nei CL con competenza luteolitica, la concomitante sovraregolazione dell'attività della NOS, della COX2, della PGE2-9-K e dei trascritti genici per ET1, COX2, IL1 e TP53, precede la regolazione negativa dei trascritti di ESR1 e BCLXL. L'effetto luteolitico della PGF2 è quindi la risultante di un'influenza di questa PG su processi distinti che coinvolgono la regolazione di peptidi vasoattivi, vie steroidogeniche, e vie apoptotiche.

## **Bibliografia**

- 1) Bagavandoss P, Kunkel SL, Wiggins RC, Keyes PL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) production and localization of macrophages and T lymphocytes in the rabbit corpus luteum. *Endocrinology*. 1988;122(3):1185-7.
- 2) Boiti C, Canali C, Zerani M, Gobbetti A. Changes in refractoriness of rabbit corpora lutea to a prostaglandin F2 alpha analogue, alfaprostol, during pseudopregnancy. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 1998;56(4):255-64.
- 3) Boiti C, Guelfi G, Brecchia G, Dall'Aglio C, Ceccarelli P, Maranesi M, Mariottini C, Zampini D, Gobbetti A, Zerani M. Role of the endothelin-1 system in the luteolytic process of pseudopregnant rabbits. *Endocrinology* 2005;146(3):1293-300.
- 4) Boiti C, Guelfi G, Zampini D, Brecchia G, Gobbetti A, Zerani M. Regulation of nitric oxide synthase isoforms and role of nitric oxide during prostaglandin F2alpha-induced luteolysis in rabbits. *Reproduction* 2003;125(6):807-16.
- 5) Boiti C, Guelfi G, Zerani M, Zampini D, Brecchia G, Gobbetti A. Expression patterns of cytokines, p53 and nitric oxide synthase isoenzymes in corpora lutea of pseudopregnant rabbits during spontaneous luteolysis. *Reproduction* 2004;127(2):229-38.
- 6) Boiti C, Maranesi M, Dall'aglio C, Pascucci L, Brecchia G, Gobbetti A, Zerani M. Vasoactive peptides in the luteolytic process activated by PGF2alpha in pseudopregnant rabbits at different luteal stages. *Biol Reprod*. 2007 77(1):156-64.
- 7) Boiti C, Zampini D, Guelfi G, Paolucci F, Zerani M, Gobbetti A. Expression patterns of endothelial and inducible nitric oxide synthase isoforms in corpora lutea of pseudopregnant rabbits at different luteal stages. *J Endocrinol*. 2002;173(2):285-96.
- 8) Boiti C, Zampini D, Zerani M, Guelfi G, Gobbetti A. Prostaglandin receptors and role of G proteinactivated pathways on corpora lutea of pseudopregnant rabbit in vitro. *J Endocrinol* 2001;168:141–51.
- 9) Boiti C, Zerani M, Zampini D, Gobbetti A. Nitric oxide synthase activity and progesterone release by isolated corpora lutea of rabbits in the early and mid-luteal phases of pseudopregnancy are

modulated differently by prostaglandin E-2 and prostaglandin F-2alpha via adenylate cyclase and phospholipase C. *J Endocrinol.* 2000;164(2):179-86.

10) Gobbetti A, Boiti C, Canali C, Zerani M. Nitric oxide synthase acutely regulates progesterone production by in vitro cultured rabbit corpora lutea. *J Endocrinol.* 1999;160(2):275-83.

11) Guelfi G, Zerani M, Brecchia G, Parillo F, Dall'aglio C, Maranesi M, Boiti C. Direct actions of ACTH on ovarian function of pseudopregnant rabbits. *Mol Cell Endocrinol.* 2011 Apr 2.

12) Janson PO, Damber JE, Axen C. Luteal blood flow and progesterone secretion in pseudopregnant rabbits *Journal of Reproduction and Fertility* 1981;63:491-97.

13) Monje P, Boland R. Subcellular distribution of native estrogen receptor alpha and beta isoforms in rabbit uterus and ovary. *J Cell Biochem.* 2001;82(3):467-79.

14) Nicosia SV, Diaz J, Nicosia RF, Saunders BO, Muro-Cacho C. Cell proliferation and apoptosis during development and aging of the rabbit corpus luteum. *Ann Clin Lab Sci.* 1995 MarApr;25(2):143-57.

15) Niswender GD, Davis TL, Griffith RJ, Bogan RL, Monser K, Bott RC, Bruemmer JE, Nett TM. Judge, jury and executioner: the auto-regulation of luteal function. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007;64:191-206.

16) Sot B, Freund SM, Fersht AR. Comparative biophysical characterization of p53 with the proapoptotic BAK and the antiapoptotic CL-xL. *J Biol Chem.* 2007;282:29193–29200.

17) Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod.* 1996;1(3):162-72.

18) Zerani M, Boiti C, Dall'Aglio C, Pascucci L, Maranesi M, Brecchia G, Mariottini C, Guelfi G, Zampini D, Gobbetti A. Leptin receptor expression and in vitro leptin actions on prostaglandin release and nitric oxide synthase activity in the rabbit oviduct. *J Endocrinol.* 2005;185(2):319-25.

IX Congresso Nazionale SO.F.I.VET.

Assisi, 16-18 giugno 2011

19

19) Zerani M, Boiti C, Zampini D, Brecchia G, Dall'Aglio C, Ceccarelli P, Gobbetti A. Ob receptor in rabbit ovary and leptin in vitro regulation of corpora lutea. *J Endocrinol.* 2004;183(2):279-88.

20) Zerani M, Dall'Aglio C, Maranesi M, Gobbetti A, Brecchia G, Mercati F, Boiti C. Intraluteal regulation of prostaglandin F2 alpha-induced prostaglandinbiosynthesis in pseudopregnant rabbits. *Reproduction.* 2007;133(5):1005-16.

21) Zerani M, Parillo F, Brecchia G, Guelfi G, Dall'Aglio C, Lilli L, Maranesi M, Gobbetti A, Boiti C. Expression of type I GNRH receptor and in vivo and in vitro GNRH-I effects in corpora lutea of pseudopregnant rabbits. *J Endocrinol.* 2010;207(3):289-300.