

## O óxido nítrico na função ovariana

MARIA INÊS LENZ SOUZA<sup>1\*</sup>; MARILICE CHARÃO TEODORO<sup>2</sup>; MARCELO ALEXANDRINO LEANDRO GRESSLER<sup>3</sup>; MÔNICA CRISTINA TOFFOLI-KADRI<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Professora Doutora – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UFMS – Campo Grande/MS. E-mail: [maria.souza@ufms.br](mailto:maria.souza@ufms.br). \*Autor para correspondência

<sup>2</sup>Graduanda em Medicina – Faculdade de Medicina – UFMS – Campo Grande/MS

<sup>3</sup>Médico Veterinário, Autônomo, Campo Grande/MS

<sup>4</sup>Professora Doutora – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – UFMS – Campo Grande/MS

### RESUMO

Revisam-se a síntese e as funções do óxido nítrico, bem como seus locais de produção no ovário, relacionando-o especialmente à função lútea. As interações celulares dentro do corpo lúteo (CL) parecem ser fisiologicamente relevantes aos processos luteotróficos e luteolíticos nessa glândula, e o óxido nítrico parece atuar por meio de múltiplos mecanismos para exercer seus efeitos completos sobre a função do CL. A produção e o papel do óxido nítrico no CL são dependentes da dose, do estágio do ciclo estral e da espécie, sendo dualísticos, ou seja, envolvendo ações luteotróficas e luteolíticas.

**Palavras-chave:** fêmeas, folículo ovariano, corpo lúteo, fisiologia.

### ABSTRACT

#### Nitric oxide in ovarian function

This study reviews the synthesis and the functions of nitric oxide, as well as its production sites in the ovary, relating it especially to luteal function. Cellular interactions in the corpus luteum (CL) seem to be physiologically relevant for luteotrophic and luteolytic processes in this gland, and nitric oxide appears to act through multiple mechanisms to exert their full effects on the function of the CL. The production and the role of nitric oxide in the CL depend on the dose, the estrous cycle stage and the species, being dualistic, that is, involving luteotrophic and luteolytic actions.

**Keywords:** females, ovarian follicle, corpus luteum, physiology.

### INTRODUÇÃO

A função ovariana, incluindo o desenvolvimento folicular e oocitário, a produção de estradiol ( $E_2$ ) e a capacidade do corpo lúteo (CL) para produzir progesterona ( $P_4$ ), é altamente dependente da tensão de oxigênio ( $O_2$ ), a qual é controlada pelo fluxo sanguíneo e metabolismo celular (SKARZYNSKI et al., 2008; ACOSTA et al., 2009; TAKASAKI et al., 2009; SHIRASUNA, 2010). Os processos fisiológicos de crescimento e formação do CL podem ser regulados por diferentes fatores, ainda não completamente esclarecidos (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004; SKARZYNSKI et al., 2008) e continuamente estudados.

O ciclo estral é uma dinâmica endócrina contínua, iniciado pela ovulação, que leva à formação de um CL e secreção de  $P_4$ , prevalecendo a secreção tônica de gonadotrofinas durante a fase lútea do ciclo. A regressão do CL inicia a fase folicular, dominada pelo estradiol ( $E_2$ ) e modificações endócrinas que levam ao pico pré-ovulatório na secreção fásica de gonadotrofinas,

resultando em outra ovulação (SOUZA et al., 2008). Embora o hormônio luteinizante (LH), secretado pela hipófise anterior, tenha sido considerado o principal hormônio responsável pela ovulação e formação luteal por décadas, alguns fatores e mediadores ovarianos, como o óxido nítrico (NO), podem ter papéis autócrinos e parácrinos no crescimento do CL (BASINI et al., 1998; KORZEKWA et al., 2004; FAES et al., 2007; LEE et al., 2010; FERREIRA-DIAS et al., 2011; PANCARCI et al., 2012). Os estrógenos regulam, diretamente, a foliculogênese ovariana, a formação do CL, a expressão dos receptores para gonadotrofinas nas células da granulosa, a apoptose das células da granulosa e a produção de esteróides pelas células da teca, da granulosa e luteais (SOUZA et al., 2008), e podem estar ligadas às ações do NO. Eventos apoptóticos e modificações nas concentrações de  $E_2$ ,  $P_4$  e NO podem estar relacionados à qualidade folicular (FAES et al., 2007; PANCARCI et al., 2011; PANCARCI et al., 2012).

O NO é um potente mensageiro químico vasodilatador que aumenta o fluxo sanguíneo ovariano (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004; PIRES et al., 2009; PANCARCI et al., 2011), e constitui-se numa das menores e mais simples moléculas biossintetizadas. É um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (DUSSE et al., 2003). Quando em solução, o NO tem uma meia vida menor que 10 segundos, devido à sua rápida oxidação a nitritos e nitratos. O NO liga-se à hemoglobina e outras proteínas que contêm o núcleo heme, levando ao término de sua atividade biológica (FLORA FILHO & ZILBENSTEIN, 2000; HATTORI & TABATA, 2006).

Um microambiente com baixa tensão de  $O_2$  pode ser inadequado para sustentar um metabolismo aeróbico, enquanto um ambiente rico em  $O_2$  pode incrementar as espécies reativas de  $O_2$  (ROS), de forma nociva para as células (NISHIMURA et al., 2008; BARBOSA et al., 2010; GOTTLIEB et al., 2010), sob controle da enzima superóxido dismutase (SOD), um importante antioxidante nas células expostas ao  $O_2$  (LEE et al., 2010; GUR et al., 2011). Segundo LEE et al. (2010), as células endoteliais luteais produzem ROS (peróxido de hidrogênio -  $H_2O_2$ , ânion superóxido -  $O_2^-$ , radicais hidroxílicos - OH), e NO, que inibem a produção de  $P_4$  e induzem apoptose nestas células. Em humanos, o efeito pró-apoptótico do NO no CL podem ser mediados por decréscimo na expressão *Bcl-2*, bem como pela regulação diferencial de outros fatores, tais como *Bax* ou outros compostos gerados no CL durante sua vida média (VEGA et al., 2000). O estresse oxidativo ocorre como consequência da excessiva produção de ROS e sistemas de defesa oxidativa enfraquecidos (SUGINO, 2006), o que leva à inibição da função lútea (TAKASAKI et al., 2009). A prostaglandina  $F_2\alpha$  ( $PGF_2\alpha$ ) interage, localmente, com as ROS durante a luteólise estrutural e funcional (KORZEKWA et al., 2006). Após várias horas de exposição ao NO, a enzima citocromo oxidase ainda pode ser irreversivelmente inibida, devido à conversão do NO em ROS (peroxinitrito, um forte oxidante), o qual inibe vários sítios respiratórios celulares (FAES et al., 2007; BARBOSA et al., 2010). Este conhecimento permite levantar a hipótese de que a quantidade de NO e ROS produzidas pelas estruturas do ovário (fóliculo e CL) possa ser determinante na possível resposta às manipulações exógenas do ciclo estral com uso de  $PGF_2\alpha$ .

### Síntese e secreção de óxido nítrico

Até os anos de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais (DUSSE et al., 2003). O interesse pelas suas funções biológicas foi consequência das demonstrações do seu envolvimento em diversos processos fisiológicos no homem e nos animais, inclusive nas funções reprodutivas, especialmente ligado aos processos de luteogênese e luteólise. Inicialmente, pesquisas concluíram que a ação de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, era inteiramente dependente da presença do endotélio intacto e envolvia liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular, o qual chamaram de *endothelial-derived relaxing factor* – EDRF (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Poucos anos mais tarde descobriu-se ser o NO o responsável pela atividade biológica do EDRF (IGNARRO et al., 1987; PALMER et al., 1987).

O NO é um mensageiro químico formado pela conversão da L-arginina à L-citrulina e NO, na presença de NADPH e O<sub>2</sub> (FLORA FILHO & ZILBENSTEIN, 2000; KORZEKWA et al., 2004; PIRES et al., 2009), pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Três isoformas de NOS são descritas (FLORA FILHO & ZILBENSTEIN, 2000; KWON et al., 2004; PIRES et al., 2009), sendo uma NOS induzida (iNOS ou NOS II) e duas NOS constitutivas (cNOS), uma endotelial (eNOS ou NOS III) e uma neuronal (nNOS ou NOS I; VANNI et al., 2007; DIAS et al., 2011). As NOS constitutivas (cNOS) são dependentes de íons cálcio e calmodulina e envolvidas na sinalização celular, e a NOS induzível (iNOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (KWON et al., 2004; HATTORI & TABATA, 2006; FERREIRA-DIAS et al., 2011). No CL bovino foram detectadas a eNOS e a iNOS (KORZEKWA et al., 2006) e nos folículos é produzido pelas células da granulosa (BASINI et al., 1998), estando presente no fluido folicular.

Em adição às suas propriedades vasodilatadoras, o NO é importante molécula sinalizadora com vários papéis fisiológicos no sistema reprodutivo (VEGA et al., 2000; KEATOR et al., 2008; ACOSTA et al., 2009; SHIRASUNA, 2010; FERREIRA-DIAS et al., 2011) que vem sendo estudado em animais, por seu envolvimento com funções lúteas através de ações sobre vascularização das estruturas ovarianas e interferência na função da PGF<sub>2</sub>α (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004; HATTORI & TABATA, 2006; KORZEKWA et al., 2006; FAES et al., 2007; SHIRASUNA et al., 2007; MOREIRA et al., 2008; ACOSTA et al., 2009) e no desenvolvimento folicular (PANCARCI et al., 2011; PANCARCI et al., 2012). O NO atravessa o espaço do endotélio para o músculo liso vascular e estimula diretamente a enzima guanilato ciclase solúvel e a consequente formação de cGMP (monofosfato cíclico de guanosina) intracelular, resultando no relaxamento das células da musculatura lisa vascular (HATTORI & TABATA, 2006). O mecanismo de relaxamento envolve diminuição da entrada de cálcio para a célula, inibição da liberação deste íon do retículo endoplasmático e aumento de seu sequestro para esta organela intracelular (DUSSE et al., 2003). Um aumento no fluxo de NO para a musculatura lisa vascular provoca maior relaxamento celular e vasodilatação (HATTORI & TABATA, 2006; KEATOR et al., 2008). Esta se mantém enquanto estiver ocorrendo difusão do NO para a musculatura lisa vascular. As células musculares lisas também produzem NO, o qual pode regular a atividade das mesmas por um mecanismo dependente do cGMP (HATTORI & TABATA, 2006). A interação do NO com a guanilato ciclase solúvel provoca muitos efeitos fisiológicos e fisiopatológicos (VANNI et al., 2007).

A síntese de NO é regulada, no ovário, através da mediação de citocinas, fatores angiogênicos e de estradiol (HATTORI & TABATA, 2006; FAES et al., 2007; SANDER et al., 2008; SHIRASUNA, 2010; FERREIRA-DIAS et al., 2011; PANCARCI et al., 2012). O NO pode participar na regressão luteal funcional por inibir a esteroidogênese e engrandecer síntese de PGF<sub>2</sub>α durante a fase luteal final, a qual atuará na luteólise por um incremento nas ROS, que inibem a produção de P<sub>4</sub>, associadas às citocinas (HATTORI & TABATA, 2006; SUGINO, 2006). Em éguas, ao longo da fase luteal, eNOS e iNOS são encontradas no citoplasma de células luteais grandes (*large cells*) e em células endoteliais sanguíneas (FERREIRA-DIAS et al., 2011). Uma combinação entre NO derivado de células imunes, luteais e do endotélio vascular pode ter um importante papel para regular a cascata luteolítica (SHIRASUNA et al., 2008b; SHIRASUNA, 2010).

No CL bovino, o NO é produzido por três tipos de células: esteroidogênicas, endoteliais e imunes (KORZEKWA et al., 2006), enquanto eNOS e iNOS estão presentes em folículos de todas as categorias e em outros compartimentos do ovário (células da granulosa, da teca, superfície endotelial, CL e estroma) e no citoplasma de oócitos imaturos e maturados *in vitro* (PIRES et al., 2009). As células endoteliais são reconhecidas como uma das principais fontes de NO (SHIRASUNA et al., 2008b; LEE et al., 2010; SHIRASUNA, 2010), principalmente nas arteríolas e capilares luteais (SKARZYNSKI et al., 2008; MIYAMOTO & SHIRASUNA, 2009). O NO estimula a formação de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e a angiogênese

do CL em formação (BERISHA & SCHAMS, 2005; SKARZYNSKI et al., 2008), e pode ser um importante agente regulatório para esteroidogênese e angiogênese folicular em bovinos (PANCARCI et al., 2011).

### **Funções gerais do óxido nítrico**

As funções do NO até hoje descobertas são complexas e antagônicas. Um aspecto dessa molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração ou depuração tecidual (FLORA FILHO & ZILBENSTEIN, 2000). Tendo-se o conhecimento da existência das três isoformas da enzima (eNOS, nNOS, iNOS), de como estão distribuídas e suas maneiras de ativação, não é difícil imaginar que uma diversidade de funções fisiológicas seja desempenhada pelo NO gerado a partir da ação catalisadora das mesmas (KWON et al., 2004).

O NO é mediador de vários fenômenos, como relaxamento vascular dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso peniano humano, regulação da pressão sanguínea basal, depressão sináptica em longo prazo, potencialização da transmissão sináptica em longo prazo, entre outros (BASINI et al., 1998; DUSSE et al., 2003; BARBOSA et al., 2010; DIAS et al., 2011; PANCARCI et al., 2012). A atividade do NO foi relatada em endotélio, cerebelo, nervos não adrenérgicos não colinérgicos (NANC) presentes nos tratos gastrointestinal, respiratório e genitourinário, macrófagos, neutrófilos, rins, células epiteliais pulmonares, mucosa gastrintestinal e miocárdio (KWON et al., 2004; FINKELBERG et al., 2006; ISLAM et al., 2009). Em ratas expostas a dieta restrita, o NO e a ciclooxigenase-2 participam no metabolismo da glicose, o qual pode ser regulado por prostaglandinas (FINKELBERG et al., 2006). O NO é um importante modulador no suprimento sanguíneo local para órgãos e tecidos, através do controle do tônus vascular (ACOSTA et al., 2009; TAKASAKI et al., 2009; SHIRASUNA, 2010).

O O<sub>2</sub> é importante para suportar as reações que mantêm as células vivas e funcionais; no entanto, seus metabólitos, as ROS podem modificar as funções celulares ou comprometer a viabilidade das células, promovendo um estresse oxidativo quando em altas concentrações, acompanhadas de enfraquecimento no sistema de defesa antioxidante, como metaloenzimas redutoras de substâncias oxidantes (SUGINO, 2006; BASINI et al., 2008; BARBOSA et al., 2010; GOTTLIEB et al., 2010; GUR et al., 2011). Por outro lado, estas ROS podem regular a função celular por controlar produção ou ativação de substâncias que tenham atividades biológicas, e que são produzidas por várias células, como macrófagos e neutrófilos do CL (SUGINO, 2006; GUR ET AL., 2011). A carência de um aumento na pressão de O<sub>2</sub> na circulação sistêmica sugere um papel local das ROS nas modificações agudas vasculares, hormonais e metabólicas que ocorrem no CL como observado no tratamento com PGF<sub>2</sub>α em vacas (ACOSTA et al., 2009).

### **Funções do óxido nítrico no ovário**

Folículos menores produzem mais NO em relação aos maiores, indicando que a atividade NOS varia durante o desenvolvimento folicular (BASINI et al., 1998). Pancarci et al. (2011) relatam que maiores folículos subordinados têm concentrações de NO mais elevadas e taxas E<sub>2</sub>:P<sub>4</sub> menores em relação aos folículos dominantes, que apresentam baixas concentrações de NO e elevadas taxas E<sub>2</sub>:P<sub>4</sub>.

A presença de isoformas NOS no ovário, verificada por Pires et al. (2009), sugere que oócitos de todos os tamanhos foliculares podem contribuir com a produção de NO intrafolicular, e que a NOS pode estar envolvida nos processos relacionados ao desenvolvimento do oócito e do folículo. Modificações súbitas na concentração de NO podem ser um dos mecanismos envolvidos na atresia de folículos subordinados (FAES et al., 2007). O NO também está envolvido nas alterações da luteólise estrutural e funcional que ocorrem no CL bovino ao longo do ciclo estral (SKARZYNSKI et al., 2008; SHIRASUNA, 2010).

As iNOS e eNOS são expressadas no ovário durante o desenvolvimento folicular e luteinização, e o NO pode participar na foliculogênese, atresia, esteroidogênese, biossíntese de prostaglandinas, ovulação, luteólise e maturação de oócitos (HATTORI & TABATA, 2006; SHIRASUNA, 2010). No CL, as enzimas eNOS e iNOS são encontradas em células luteais e endoteliais, com expressão aumentada desde o começo ao final da fase luteal e, então, redução na fase de regressão lútea (SHIRASUNA, 2010). Já Skarzynski et al. (2003), detectaram iNOS e eNOS nas células esteroidogênicas e vasos sanguíneos do CL bovino, ao longo de todo o ciclo estral, desde a fase luteal inicial até a final. Em folículos ovarianos e CLs ovinos, Grazul-Bilska et al. (2006) detectaram eNOS nos vasos sanguíneos das camadas teca interna e externa de folículos ovarianos saudáveis, enquanto estava reduzida ou ausente em folículos atresícos iniciais ou de desenvolvimento avançado. Durante o período pós-ovulatório imediato, estes autores identificaram eNOS nas células derivadas da teca, que pareciam estar invadindo a camada granulosa, e nos vasos sanguíneos do CL durante o ciclo estral. Já Skarzynski et al. (2003), detectaram iNOS e eNOS nas células esteroidogênicas e vasos sanguíneos do CL bovino, ao longo de todo o ciclo estral, desde a fase luteal inicial até a final. Tanto a nNOS como a eNOS estão presentes na glândula mamária de camundongos durante o ciclo reprodutivo, sendo sobre-regulados durante a prenhez, indicando correlação positiva entre NO com crescimento e desenvolvimento normais desta glândula (ISLAM et al., 2009). O fluido folicular reflete os processos metabólicos e hormonais que ocorrem no microambiente ovariano, ao longo da maturação do oócito, pré-ovulação (BASINI et al., 2008; PANCARCI et al., 2012). Enzimas eNOS e iNOS estão presentes em oócitos bovinos ao longo da foliculogênese, até o final da maturação (PIRES et al., 2009).

A produção e o papel do NO no CL é dependente do estágio do ciclo estral e da espécie (SHIRASUNA, 2010). Conforme o estágio do ciclo estral e do CL, as interações celulares (contato célula a célula), a composição celular ou o tipo de cultura de células utilizada, o NO pode ter efeitos luteolíticos ou luteotróficos (SKARZYNSKI et al., 2008). Keator et al. (2008) sugerem que baixas concentrações de NO podem estimular função luteal, seja por induzir a gênese de novas mitocôndrias ou por engrandecer transporte citocrômico de elétrons e, por isso, aumentar a produção de  $P_4$  pelas mitocôndrias existentes. Avaliando o conteúdo de nitrato ( $NO_3^-$ ), um método indireto de estimar concentração de NO, Faes et al. (2007) não encontraram variações nos níveis desta substância em folículos de diferentes estágios de desenvolvimento, exceto naqueles folículos médios atresícos, sugerindo um possível papel da mesma na atresia de folículos subordinados, igualmente a Grazul-Bilska et al. (2006). Em CLs iniciais, o NO pode agir muito mais como luteotrófico do que como luteolítico (SHIRASUNA et al., 2010a). O NO tem sido encontrado como o mais potente inibidor da secreção de  $P_4$ , *in vitro* e *in vivo* (SKARZYNSKI et al., 2003; KORZEKWA et al., 2004; KORZEKWA et al., 2006; SKARZYNSKI et al., 2008).

As concentrações de nitrito no meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de cabras funcionaram como indicadores da viabilidade das células da granulosa dos mesmos (BRUNO et al., 2008). Pancarci et al. (2012) postulam que a relação  $E_2:P_4$  associada às concentrações de NO e à presença de fluido sanguíneo folicular, possam ser usadas para determinar o *status* funcional de folículos em bovinos. No útero de vacas, a produção de nitrito está correlacionada com ocorrência de alterações como endometrite, fibrose periglandular e distrofia angiomasiosa (MOREIRA et al., 2008). Utilizando modelos de camundongos *knockout-Nos-3*, Pallares et al. (2008) verificaram que deficiências em NO e eNOS afetam características reprodutivas e de desenvolvimento nestes animais, tais como ovulação, fertilização, implantação e desenvolvimento embrionário.

Conforme Hattori & Tabata (2006), Bruno et al. (2008) e Acosta et al. (2009), o NO é um importante fator nos processos fisiológicos normais do período periovulatório, provavelmente por estimular síntese de  $PGE_2$  e  $PGF_2\alpha$  foliculares, via ciclo-oxigenase (COX), para engrandecer o processo de ruptura folicular. Embora o NO suporte o desenvolvimento do CL e sua

manutenção durante a fase luteal inicial, ele é o mediador dos sinais luteolíticos ao final da fase luteal (KORZEKWA et al., 2004; 2006). No trato genital de éguas, o NO parece estar envolvido no crescimento folicular e na ovulação, bem como na secreção de PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2</sub>α endometrial (FERREIRA-DIAS et al., 2011).

Sabe-se que a administração de PGF<sub>2</sub>α reduz a secreção de P<sub>4</sub> e encurta o ciclo estral de muitas fêmeas, por uma ação indireta, via substâncias produzidas localmente no CL por células esteroidogênicas e não esteroidogênicas (KORZEKWA et al., 2004; SHIRASUNA, 2010). O NO tem papéis cruciais no mecanismo local de regressão do CL e parece ser regulado, em seus mecanismos locais de controle sobre a luteólise, pela SOD (LEE et al., 2010). O aumento agudo no fluxo sanguíneo luteal, induzido pela PGF<sub>2</sub>α, pode ser um dos mais precoces sinais fisiológicos para a cascata luteolítica, e deve-se à ação do NO luteal, por uma maior expressão da eNOS na periferia do CL nesse período (SHIRASUNA et al., 2010a). Em células endoteliais luteais bovinas, a estimulação do sistema gerador de NO e da atividade NOS, via PGF, pode resultar em produção local de NO aumentada seguida por luteólise (LEE et al., 2009; SHIRASUNA et al., 2010a). Em bovinos, para Korzekwa et al. (2006), o NO é um fator luteolítico, que tem um papel crucial na regulação do ciclo estral, na luteólise estrutural, por induzir apoptose nas células luteais, via estímulo das proteínas pró-apoptóticas Fas, bax e caspases e mobilização de cálcio intracelular. O NO reage diretamente com proteínas heme (oxi-hemoproteínas), formando ROS, as quais atuam em biomoléculas salvo (via nitrosilação, nitritização e oxidação), modificando a função ovariana (HATTORI & TABATA, 2006; FAES et al., 2007), inibindo a esteroidogênese, através desse estresse oxidativo (SUGINO, 2006; BARBOSA et al., 2010). Lee et al. (2009) sugerem que a interação de células endoteliais com células luteais engrandeça a capacidade destas últimas para produzir eNOS em resposta à prostaglandina. Em outro experimento, Lee et al. (2010) sugeriram que um aumento local na produção de NO, induzido pela PGF dentro do CL bovino, afete a função desta glândula, e que a elevação aguda da SOD represente uma resposta das células endoteliais luteais para proteger a si mesmas contra o estresse oxidativo, induzido pelo tratamento com PGF<sub>2</sub>α no começo da luteólise funcional.

As atividades de enzimas antioxidantes estudadas por Sander et al. (2008) no CL de camundongos, mostraram-se aumentadas para superóxido dismutase (SOD) e diminuídas para catalase durante perda de função luteal na luteólise, o que leva ao acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Além disso, no mesmo estudo, a capacidade ovariana para remover radicais hidroxila estava diminuída no estágio regressivo do CL, o que permitiu a reação destes radicais com ácidos graxos polinsaturados e a peroxidação lipídica. O NO ativa enzimas contendo porção heme, tais como cicloxigenase (COX-1 e COX-2) e lipoxigenase, bem como inibe, indiretamente, enzimas microssomais citocromo P<sub>450</sub>, o que reduz a síntese de E<sub>2</sub> (KORZEKWA et al., 2004). Uma relação entre produção de prostaglandinas e a via biossintética do NO foi encontrada no ovário, regulando a ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2), a enzima limitante para biossintese de prostaglandinas, via união à metade heme (KORZEKWA et al., 2004; HATTORI & TABATA, 2006; SANDER et al., 2008; ACOSTA et al., 2009). A expressão de COX-1 é especificamente sobre-regulada no endotélio da artéria uterina de ovelhas, durante os estados de alto fluxo sanguíneo, tais como fase folicular e, em particular, na prenhez (HABERMEHL et al., 2000). A gestação de um feto não afeta o balanço entre oxidantes e antioxidantes na ovelha, mas gestação com dois ou mais fetos induz estresse oxidativo, por aumentar os níveis de peroxidação lipídica e diminuir o nível de glutathiona sérica e a atividade glutathiona-peroxidase (GUR et al., 2011).

O NO pode estimular a atividade da COX, resultando em aumento na síntese de prostaglandinas, a partir do ácido araquidônico, em diferentes tecidos (BIRD; ZHANG; MAGNESS, 2003; HATTORI & TABATA, 2006; SANDER et al., 2008), inclusive no CL, reduzindo assim as concentrações de P<sub>4</sub> plasmática, parecendo servir como mediador da ação da PGF<sub>2</sub>α na regressão funcional do CL bovino (ACOSTA; MIYSMOTO, 2004; KORZEKWA et al., 2006; SHIRASUNA et al., 2008b; ACOSTA et al., 2009). A PGF<sub>2</sub>α e o NO manifestam uma

curva de *feedback* positiva nas células endoteliais luteais bovinas, interagindo-as com células não endoteliais para iniciar luteólise estrutural e funcional (LEE et al., 2010; SHIRASUNA, 2010). Cerca de duas horas após administração de  $\text{PGF}_2\alpha$  em vacas, para promover a luteólise, ocorre relaxamento de musculatura lisa vascular (provocada pelo NO e pela  $\text{PGE}_2$  produzida das células luteais por estímulo do NO), o que pode ser crucial para o aumento transitório no suprimento sanguíneo e na permeabilidade vascular, possibilitando a infiltração de células imunes no tecido luteal, as quais são requeridas para ocorrência da luteólise estrutural (ACOSTA et al., 2009). Isso ocorre, segundo Miyamoto et al. (2005) e Acosta et al. (2009), porque o CL produz uma considerável quantidade de NO em resposta à  $\text{PGF}_2\alpha$ , levando ao aumento agudo no fluxo sanguíneo observado no CL bovino nesta fase do ciclo estral. É possível que os pulsos luteolíticos de  $\text{PGF}_2\alpha$  estimulem atividade eNOS por induzirem o  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e, simultaneamente, um aumento no fluxo sanguíneo e no estresse provocado pelo atrito do sangue na parede vascular na periferia do CL, o que atua como um potente estimulador para a produção de NO e vasodilatação (SHIRASUNA et al., 2010a).

A luteólise, com aumento de  $\text{PGF}_2\alpha$  ovariana, relaciona-se com a geração incrementada de ROS, levando às reações como a peroxidação lipídica, reagindo com ácidos graxos polinsaturados, perda de receptores de gonadotrofinas e formação reduzida de cAMP, além de incremento na produção de  $\text{PGF}_2\alpha$ , via COX-2 aumentada, diminuindo a habilidade esteroidogênica e levando à perda da função luteal (SANDER et al., 2008). As concentrações de SOD, em células endoteliais bovinas cultivadas por Lee et al. (2010), foram diferentemente reguladas pelo NO, dependendo do tempo de exposição. Houve uma elevação aguda na SOD nas primeiras duas horas, como um mecanismo protetor das células ao estresse oxidativo durante a luteólise funcional, seguido de uma redução, em 24 horas, para facilitar um acúmulo de ROS intraluteal durante a luteólise estrutural. As ROS têm sido implicadas em danos causados ao DNA, peroxidação lipídica (a qual afeta, principalmente, estrutura e função da membrana) e danos às proteínas (SUGINO, 2006; BARBOSA et al., 2010).

A queda nas concentrações de  $\text{P}_4$ , seguindo luteólise induzida com  $\text{PGF}_2\alpha$  é precedida por um aumento nas concentrações de NO e na pressão parcial de  $\text{O}_2$  na circulação ovariana, na artéria aorta abdominal e na veia jugular de vacas, demonstrando envolvimento destas substâncias com os eventos iniciais da regressão luteal (ACOSTA et al., 2009).

O incremento agudo na  $\text{PGF}_2\alpha$  após a administração de  $\text{PGF}_2\alpha$  exógena estimula a expressão de eNOS no CL maturo, com um pico abrupto no fluxo sanguíneo luteal, o qual pode ser mediado por uma ação local do NO sobre os vasos do CL (SHIRASUNA et al., 2008a). As células luteais são expostas às altas tensões de  $\text{O}_2$  nas duas primeiras horas da luteólise, e uma condição hipóxica ocorre nos estágios finais deste processo, como resultado de um significativo decréscimo no fluxo sanguíneo luteal, cerca de oito horas após a injeção de  $\text{PGF}_2\alpha$  em vacas (ACOSTA et al., 2009). Isso acompanha os resultados de Lee et al. (2010) com relação aos níveis de SOD e ROS intraluteais. A sensibilidade das células do CL bovino ao NO aumenta drasticamente do início ao final da fase luteal (KORZEKWA et al., 2006).

O contato célula a célula e a comunicação entre células luteais e não luteais são essenciais para desenvolvimento, manutenção e regressão do CL bovino, e é possível que o NO, produzido localmente no CL, atue como a fração parácrina para causar vasodilatação local e aumentar o fluxo sanguíneo que influencia, indiretamente, a esteroidogênese (ACOSTA et al., 2009; SHIRASUNA, 2010). Desta forma, as interações celulares dentro do CL parecem ser fisiologicamente relevantes aos processos luteotróficos e luteolíticos nesta glândula, e o NO parece atuar através de múltiplos mecanismos para exercer seus efeitos completos sobre a função do CL (KORZEKWA et al., 2004). As interações célula a célula entre células endoteliais, musculares lisas e da granulosa completamente luteinizadas, em cultura de células, alteram as características das células endoteliais para produção do NO em resposta à  $\text{PGF}_2\alpha$  (SHIRASUNA et al., 2008b).

A endotelina-1 (ET-1), um peptídeo vasoconstritor secretado pelas células endoteliais, é um mediador local da luteólise funcional (via  $\text{PGF}_2\alpha$ ) em vacas, modulado pela secreção de ocitocina intraluteal, pois o CL refratário à  $\text{PGF}_2\alpha$  também o é para a ET-1 (SHIRASUNA et al., 2006; SHIRASUNA et al., 2007; SKARZYNSKI et al., 2008). A  $\text{PGF}_2\alpha$  endógena ou exógena aumenta a expressão de RNAm e a secreção de ET-1 pelas células endoteliais da microcirculação que rodeia o CL (ACOSTA & MIYAMOTO, 2004; MIYAMOTO et al., 2005). As ações de substâncias vasoconstritoras, como a  $\text{PGF}_2\alpha$  e a ET-1, ou uma mudança abrupta no fluxo sanguíneo podem levar, rapidamente, a uma reação de estresse, resultando em uma liberação compensatória de NO e relaxação dos vasos sanguíneos (ACOSTA et al., 2009). O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) estimula as células endoteliais a produzirem ET-1, a qual desencadeia o processo de regressão luteal estrutural, promovendo migração de leucócitos e estimulando os macrófagos a liberarem citocinas (TNF- $\alpha$  e interferon  $\gamma$ ; SKARZYNSKI et al., 2008).

O CL de éguas estudadas por Ferreira-Dias et al. (2011) demonstrou a presença de um sistema gerador de NO, sugerindo um papel para esta molécula na regulação da função luteal, onde a eNOS tem ação relevante na angiogênese luteal durante os estágios iniciais e um efeito oposto durante a luteólise. Os autores citam, ainda, que a interação do NO e  $\text{PGE}_2$  no CL equino podem participar nos mecanismos luteoprotetores requeridos para formação do CL e manutenção do ciclo estral, pois são potentes vasodilatadores (KEATOR et al., 2008; ACOSTA et al., 2009).

Em resumo, a produção do NO e seu papel no CL são dependentes da dose, estágio do ciclo estral e espécies, sendo dualísticos, tendo ações luteotróficas e luteolíticas (KORZEKWA et al., 2007; KEATOR et al., 2008; SKARZYNSKI et al., 2008). O NO também é o mediador da ação do TNF- $\alpha$  no ovário, e as duas substâncias podem atuar como fatores luteotróficos, para manter a prenhez inicial (FERREIRA-DIAS et al., 2011). Em ovinos, Keator et al. (2008) afirmam que o NO pode estimular ou inibir a função luteal, dependendo da concentração desta substância que alcança o CL. O NO, a ET-1, reagentes vasoativos e citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , interferon  $\gamma$ , Fas ligante) estão envolvidos na regressão do CL bovino, como componentes de uma cascata luteolítica autócrina/parácrina induzida pela  $\text{PGF}_2\alpha$  (SKARZYNSKI; FERREIRA-DIAS; OKUDA, 2008). A  $\text{PGF}_2\alpha$ , a angiotensina II e o NO iniciam, cooperativamente, a luteólise funcional (SHIRASUNA et al., 2010b).

## CONCLUSÕES

Os processos fisiológicos ovarianos são dependentes de fatores hormonais e humorais, endócrinos, parácrinos e autócrinos. Dentre estes, o NO desempenha importantes papéis no crescimento e maturação folicular, bem como nos processos de luteogênese e luteólise, associado ao controle do fluxo sanguíneo e à ação da  $\text{PGF}_2\alpha$ , e às citocinas. No entanto, ainda existem lacunas de informações que geram a necessidade de novas pesquisas sobre as ações destas substâncias na função ovariana, especialmente relacionadas à utilização de tratamentos hormonais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, T.J.; MIYAMOTO, A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. **Animal Reproduction Science**, New York, v.82-83, p.127-140, 2004.
- ACOSTA, T.J. et al. Acute changes in circulating concentrations of progesterone and nitric oxide and partial pressure of oxygen during prostaglandin  $\text{F}_{2\alpha}$ -induced luteolysis in cattle. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v.55, n.2, p.149-155, 2009.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

- BASINI, G. et al. Reactive oxygen species and anti-oxidant defenses in swine follicular fluids. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v.20, n.2, p.269-274, 2008.
- BASINI, G. et al. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v.10, n.6, p.471-478, 1998.
- BERISHA, B.; SCHAMS, D. Ovarian function in ruminants. **Domestic Animal Reproduction**, v.29, n.2, p.305-317, 2005.
- BIRD, I.M. et al. Possible mechanisms underlying pregnancy-induced changes in uterine artery endothelial function. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Washington, v.284, n.2, p.245-258, 2003.
- BRUNO, J.B. et al. Característica histológica, ultra-estrutural e produção de nitrito de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* na ausência ou presença de soro. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.60, n.6, p.1329-1337, 2008.
- DIAS, R.G. et al. Óxido nítrico e sistema cardiovascular: ativação celular, reatividade vascular e variante genética. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v.96, n.1, p.68-75, 2011.
- DUSSE, L.M.S. et al. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.39, n.4, p.343-350, 2003.
- FAES, R.F. et al. Relationship among nitric oxide, progesterone and estradiol-17 $\beta$  concentrations in follicular fluid during follicular development in cattle. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v.4, n.1-2, p.31-37, 2007.
- FERREIRA-DIAS, G. et al. Nitric oxide stimulates progesterone and prostaglandin E<sub>2</sub> secretion as well as angiogenic activity in the equine corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v.40, n.1, p.1-9, 2011.
- FILKENBERG, A.B. et al. Glucose metabolism in isolated uteri of immature rats. Influence of prostaglandins and nitric oxide. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.46, n.1, p.1-8, 2006.
- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido Nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v.46, n.3, p.265-271, 2000.
- FURCHGOTT, R.F.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, n.5789, p.373-376, 1980.
- GOTTLIEB, M.G.V. et al. Estresse oxidativo como fator de risco cardiometabólico. **Scientia Medica (Porto Alegre)**, Porto Alegre, v.20, n.3, p.243-249, 2010.
- GRAZUL-BILSKA, A.T. et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ovine ovary throughout the estrous cycle. **Reproduction**, Cambridge, v.132, n.4, p.579-587, 2006.
- GUR, S. et al. Effect of pregnancy and foetal number on diameter of corpus luteum, maternal progesterone concentration and oxidant/antioxidant balance in ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, Auburn, v.46, n.2, p.289-295, 2011.
- HABERMEHL, D.A. et al. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. IV. Cyclooxygenase isoform expression during the ovarian cycle and pregnancy in sheep. **Biology of Reproduction**, Wisconsin, v.62, n.3, p.781-788, 2000.
- HATTORI, M.; TABATA, S. Nitric oxide and ovarian function. **Animal Science Journal**, Tokyo, v.77, n.3, p.275-284, 2006.

- IGNARRO, L.J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and veins is nitric oxide. **Proceedings of National Academy Science USA**, Washington, v.84, n.24, p.9265-9269, 1987.
- ISLAM, M.S. et al. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase (NOS) in mouse mammary gland during reproductive cycle. **Journal of Veterinary Medicine Science**, Tokyo, v.71, n.7, p.945-949, 2009.
- KEATOR, C.S. et al. Luteotrophic and luteolytic effects of nitric oxide in sheep are dose-dependent *in vivo*. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v.35, n.1, p.74-80, 2008.
- KORZEKWA, A.J. et al. Nitric oxide induces apoptosis in bovine luteal cells. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v.52, n.3, p.353-361, 2006.
- KORZEKWA, A.J. et al. Effects of prostaglandin F<sub>2α</sub> and nitric oxide on the secretory function of bovine luteal cells. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v.50, n.4, p.411-417, 2004.
- KWON, H. et al. Developmental changes in nitric oxide synthesis in the ovine placenta. **Biology of Reproduction**, Wisconsin, v.70, n.3, p.679-686, 2004.
- LEE, S.H. et al. Prostaglandin F<sub>2α</sub> regulates the nitric oxide generating system in bovine luteal endothelial cells. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v.55, n.4, p.418-424, 2009.
- LEE, S.H. et al. Role of nitric oxide in the regulation of superoxide dismutase and prostaglandin F<sub>2α</sub> production in bovine luteal endothelial cells. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v.56, n.4, p.451-459, 2010.
- MIYAMOTO, A.; SHIRASUNA, K. Luteolysis in the cow: a novel concept of vasoactive molecules. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v.6, n.1, p.47-59, 2009.
- MIYAMOTO, A. et al. Blood flow: a key regulatory component of corpus luteum function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v.29, n.2, p.329-339, 2005.
- MOREIRA, L. et al. Concentração de nitrito endometrial e a ocorrência de patologias uterinas em vacas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Sciences**, São Paulo, v.45, n.3, p.206-210, 2008.
- NISHIMURA, R. et al. Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, Wisconsin, v.78, n.3, p.529-536, 2008.
- PALLARES, P. et al. Disruption of the endothelial nitric oxide synthase gene affects ovulation, fertilization and early embryo survival in a knockout mouse model. **Reproduction**, Cambridge, v.136, n.5, p.573-579, 2008.
- PALMER, R.M.J. et al. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v.327, n.6123, p.524-526, 1987.
- PANCARCI, S.M. et al. Nitric oxide concentrations, estradiol-17β progesterone ratio in follicular fluid, and COC quality with respect to perifollicular blood flow in cows. **Animal Reproduction Science**, New York, v.130, n.1-2, p.9-15, 2012.
- PANCARCI, S.M. et al. Changes in follicular blood flow and nitric oxide levels in follicular fluid during follicular deviation in cows. **Animal Reproduction Science**, New York, v.123, n.3-4, p.149-156, 2011.
- PIRES, P.R.L. et al. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.116, n.3-4, p.233-243, 2009.

- SANDER, V.A. et al. Regulation of functional and regressing stages of corpus luteum development in mice. Role of reactive oxygen species. **Reproduction, Fertility and Development**, Collingwood, v.20, n.7, p.760-769, 2008.
- SHIRASUNA, K. Nitric oxide and luteal blood flow in the luteolytic cascade in the cow. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v.56, n.1, p.9-14, 2010.
- SHIRASUNA, K. et al. A cooperative action of endothelin-1 with prostaglandin F<sub>2</sub>α on luteal function in the cow. **Domestic Animal Endocrinology**, Auburn, v.31, n.2, p.186-196, 2006.
- SHIRASUNA, K. et al. Positive association, in local release, of luteal oxytocin with endothelin 1 and prostaglandin F<sub>2α</sub> during spontaneous luteolysis in the cow: a possible intermediary role for luteolytic cascade within the corpus luteum. **Biology of Reproduction**, Wisconsin, v.76, n.6, p.965-970, 2007.
- SHIRASUNA, K. et al. Prostaglandin F<sub>2α</sub> increases endothelial nitric oxide synthase in the periphery of the bovine corpus luteum: the possible regulation of blood flow at an early stage of luteolysis. **Reproduction**, Cambridge, v.135, n.4, p.527-539, 2008a.
- SHIRASUNA, K. et al. Prostaglandin F<sub>2α</sub> stimulates endothelial nitric oxide synthase depending on the existence of bovine granulosa cells: analysis by co-culture system of endothelial cells, smooth muscle cells and granulosa cells. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.43, n.5, p.592-598, 2008b.
- SHIRASUNA, K. et al. Distribution of arteriovenous vessels, capillaries and eNOS expression in the bovine corpus luteum during the estrus cycle: a possible implication of different sensitivity by luteal phase to PGF<sub>2α</sub> in the increase of luteal blood flow. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v.56, n.1, p.124-130, 2010a.
- SHIRASUNA, K. et al. Prostaglandin F<sub>2α</sub> differentially affects mRNA expression relating to angiogenesis, vasoactivation and prostaglandins in the early and mid corpus luteum in the cow. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v.56, n.4, p.428-436, 2010b.
- SKARZYNSKI, D.J. et al. Administrations of a nitric oxide synthase inhibitor counteracts PGF<sub>2α</sub>-induced luteolysis in cattle. **Biology of Reproduction**, Wisconsin, v.68, n.6, p.1907-1913, 2003.
- SKARZYNSKI, D.J. et al. Regulation of luteal function and corpus luteum regression in cows: hormonal control, immune mechanisms and intercellular communication. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v.43, suppl.s2, p.57-65, 2008.
- SOUZA, M.I.L. et al. Secreção de esteróides ovarianos em ovelhas mestiças de raças exploradas para corte, no Estado de São Paulo. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v.9, n.4, p.1107-1113, 2008.
- SUGINO, N. Roles of the reactive oxygen species in the corpus luteum. **Animal Science Journal**, Tokyo, v.77, n.6, p.556-565, 2006.
- TAKASAKI, A. et al. Luteal blood flow and luteal function. **Journal of Ovarian Research**, v.2. doi:10.1186/1757-2215-2-1, 2009.
- VANNI, D.S. et al. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v.43, n.3, p.181-189, 2007.
- VEGA, M. et al. Nitric oxide induces apoptosis in the human corpus luteum *in vitro*. **Molecular Human Reproduction**, Oxford, v.6, n.8, p.681-687, 2000.