

Efectos del Manganeso sobre el eje hipotálamo-hipófiso reproductivo

Juan Pablo Prestifilippo y Valeria Rettori

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos
(CEFyBO-CONICET-UBA)

Manganeso y sus funciones fisiológicas

El Manganeso (Mn) es un oligoelemento que está involucrado en el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos, siendo cofactor de varias enzimas⁽¹⁻²⁾ entre las que se encuentran: la superóxido dismutasa mitocondrial (Mn-SOD) que es una de las principales enzimas antioxidantes⁽³⁾; la glutamina sintasa que metaboliza el ácido glutámico a glutamina⁽⁴⁾; y la fosfoenol piruvato carboxiquinasa que es una enzima clave en el metabolismo de los hidratos de carbono⁽⁵⁾. El déficit de Mn en la dieta puede producir anomalías congénitas, problemas en la reproducción, desórdenes de movimiento y alteraciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos⁽⁶⁾. El departamento de nutrición y alimentación del Instituto de Medicina de la Organización Mundial de la Salud⁽⁷⁾ determina que la ingesta diaria recomendada de Mn es de 2.3 mg/día para los hombres y de 1.8 mg/día para las mujeres, y también establece los niveles tolerables de ingesta en 11 mg/día para los adultos⁽⁷⁻⁸⁾. Si bien el Mn es un nutriente esencial para el organismo⁽⁶⁾, la exposición a altas concentraciones de este metal puede ocasionar alteraciones, especialmente en el Sistema Nervioso Central (SNC), ya que se concentra en diferentes núcleos cerebrales, generando un daño irreversible⁽⁹⁾. Además puede generar disfunciones reproductivas, acompañado de daño testicular⁽¹⁰⁻¹²⁾. En humanos se ha demostrado que la exposición a niveles elevados de Mn puede producir disminución de la libido e impotencia⁽¹³⁻¹⁴⁾ y hasta una baja en la tasa de nacimiento, evidenciando el efecto del Mn sobre la fertilidad⁽¹⁵⁾. Trabajos publicados recientemente relacionan al Mn con la alteración del eje reproductivo⁽¹⁶⁻¹⁹⁾, indicando que también ejerce un efecto a nivel hipotalámico, donde estimula la liberación de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) con el consecuente aumento de la secreción adenohipofisaria de la hormona luteinizante (LH).

Control de la liberación de Hormona liberadora de hormona luteinizante

El hipotálamo representa la zona de integración entre el SNC y el sistema endócrino. El control del eje hipotálamo-hipofiso-reproductivo se expresa a través de la estimulación pulsátil de la LHRH sintetizada en neuronas hipotalámicas. El control de la liberación de la

LHRH esta dado, al menos en parte, por la producción y difusión de óxido nítrico (NO) por las neuronas adyacentes a las neuronas productoras de LHRH. La producción de NO en el hipotálamo, esta generado principalmente por la isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa (NOSn) y su activación depende de diferentes neurotransmisores. Uno de estos es la noradrenalina que actúa sobre receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos en neuronas productoras de NO provocando el aumento de calcio (Ca) intraneuronal. Este catión se une con la calmodulina para activar la NOSn⁽²⁰⁾, con el consecuente aumento de NO que difunde hacia las neuronas de LHRH donde estimula la liberación del deca péptido⁽²¹⁾. Otro neurotransmisor que controla la producción de NO es la dopamina⁽²²⁾ y, aunque es considerado un neurotransmisor inhibitorio en otras regiones del cerebro, éste estimula la liberación hipotalámica de LHRH⁽²³⁾.

El NO en las neuronas de LHRH activa la ciclooxigenasa (COX) con el consecuente incremento en la síntesis de prostanoïdes. La prostaglandina E2 (PGE2) sintetizada por la COX, que activa la adenilato ciclasa (AC) y aumenta la producción de adenosina mono fosfato ciclica (AMPC) provocando la exocitosis de los gránulos de LHRH, ya sea por la activación de la proteína quinasa A (PKA)⁽²⁴⁻²⁵⁾ o directamente aumentando la conductancia de canales iónicos y provocando la despolarización de las membranas neuronales⁽²⁶⁾. Asimismo, algunos autores demostraron que el guanosina mono fosfato ciclico (GMPc), cuya producción es estimulada por la unión del NO al grupo hemo de la enzima guanilato ciclasa (GC), tendría también una función importante en la liberación de LHRH, promoviendo la apertura de canales de Ca a través de la proteína quinasa G (PKG). La entrada de este catión al espacio intracelular provoca la despolarización neuronal y exocitosis de los gránulos de LHRH⁽²⁷⁾. En el presente trabajo de actualización se analizan algunos mecanismos desencadenados por el Mn en forma aguda sobre el eje hipotalamo-hipofiso reproductivo.

Efectos del Manganeso sobre la liberación de LHRH

Para estudiar el papel del Mn sobre el eje hipotálamo-hipofiso-reproductivo, comenzamos evaluando el efecto de la administración de Mn (50µg/5µl) *in vivo* por vía intra-cerebro-ventricular a ratas macho adultas. Los resultados obtenidos muestran que la administración

de una única dosis de Mn incrementó significativamente los niveles plasmáticos de LH a partir de los 60 min con respecto al grupo control que recibió solución fisiológica estéril. Estos niveles se mantuvieron incrementados hasta el tiempo de finalización del estudio (120 min) (Figura 1A). Para confirmar este resultado, evaluamos el efecto de diferentes concentraciones de Mn *in vitro* sobre la liberación de LHRH desde el hipotálamo medio basal (HMB) obtenido de ratas macho adultas. Los resultados indicaron que la concentración de 500µM de Mn fue la única de las estudiadas que tuvo efecto estimulador significativo sobre la liberación hipotálamica de LHRH desde el HMB (Figura 1B).

Efecto del Manganeso sobre diferentes mediadores implicados en la secreción de LHRH

Las vías que conducen a la liberación de LHRH, involucran tanto a las quinasas dependientes de AMPc como a las dependientes de GMPc. Para ello determi-

namos el efecto *in vitro* de dos concentraciones de Mn (50 y 500 µM) sobre la producción de AMPc y GMPc. Los resultados mostraron que el Mn, no produce modificaciones en el contenido hipotalámico de AMPc con ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 2A). Sin embargo, el contenido hipotalámico de GMPc se vio incrementado significativamente por la presencia de Mn en una concentración 500 µM (Figura 2B).

El NO participa en las interacciones neuroendocrinas y es capaz de producir un aumento de la liberación de LHRH, ya que activa a la GC incrementando los niveles hipotalámicos de GMPc. Es por esto que determinamos la actividad total de la NOS en HMBs incubados con diferentes concentraciones de Mn (50 y 500 µM). Los resultados mostraron que sólo la concentración de 500 µM incrementó significativamente la actividad hipotalámica de la NOS total (Figura 3A) siendo ésta la misma concentración que incrementó el contenido hipotalámico de GMPc (Figura 2B). Además, para

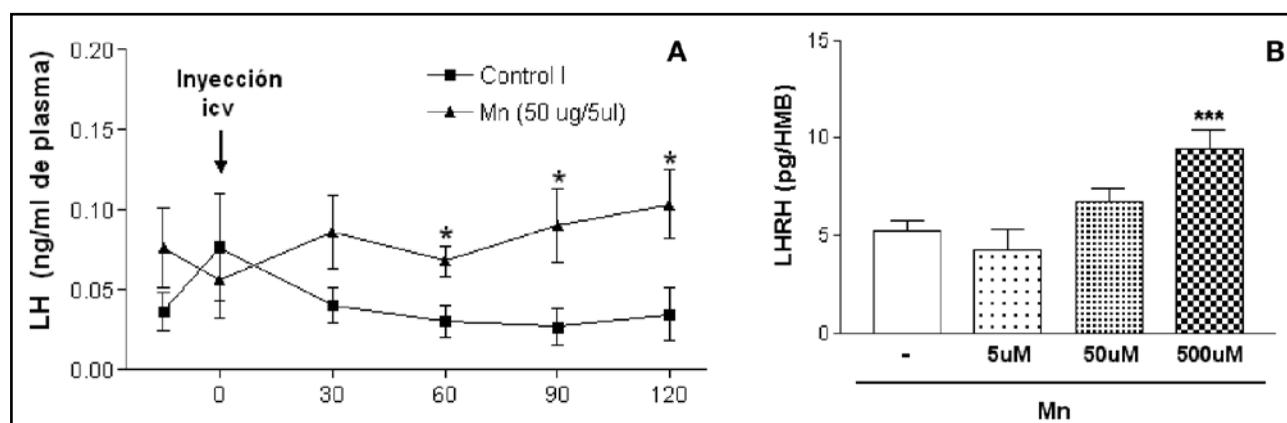


Figura 1. (A) Efecto del Mn, administrado por vía icv, sobre los niveles plasmáticos de LH en función del tiempo. Cada punto de la curva corresponde a la media ± ESM de 8-10 ratas por grupo. Los datos fueron analizados por test "t" de Student para cada tiempo evaluado, *p<0.05 vs. control a 60, 90 y 120 min. **(B) Efecto de concentraciones crecientes de Mn, sobre la liberación de LHRH *in vitro* desde HMB.** Las barras representan la media ± ESM de 6-8 HMB por grupo. Los datos fueron analizados por ANOVA seguido por el test de Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples; ***p<0.001 vs. control.

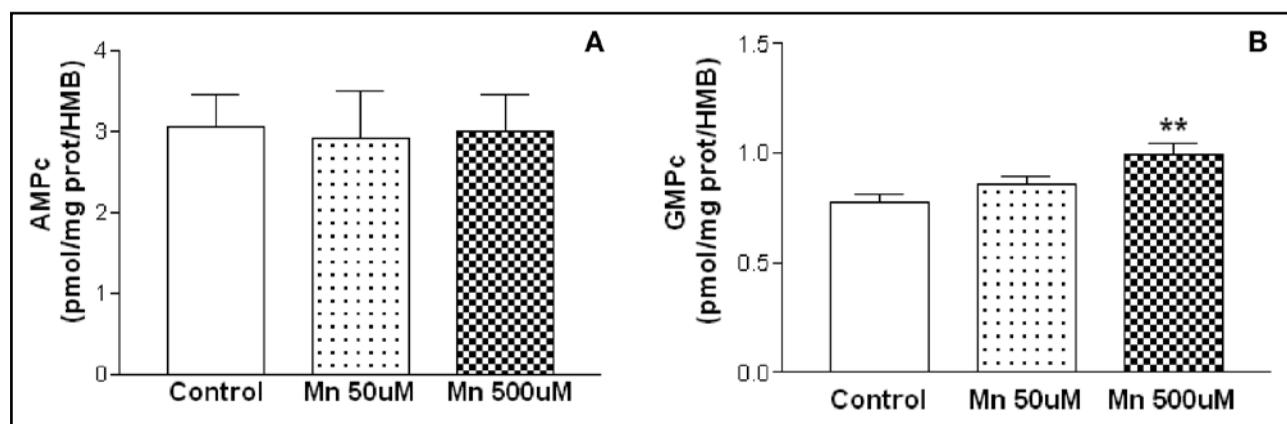


Figura 2. (A) El Mn no modificó el contenido hipotalámico de AMPc (B) pero estimula la producción de GMPc. Las barras representan la media ± ESM de 6-8 HMB por grupo. Los datos fueron analizados por ANOVA seguido por el test de Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples, **p<0.01 vs. control.

evaluar el efecto del Mn sobre la COX, se determinó la producción de los diferentes prostanoideos sintetizados por ésta, utilizando una técnica de radioconversión a partir de su sustrato, el ácido araquidónico, marcado con ^{14}C , demostrando que la concentración de 500 μM disminuyó significativamente la producción de los prostanoideos 6-keto-F1- α , la PGE2 y el tromboxano (TXB), mientras que la concentración de 50 μM sólo disminuyó significativamente la de PGE2 (Figura 3B)

Estudio de los mecanismos implicados en la liberación de LHRH estimulada por Manganeso en el HMB

El Mn en una concentración de 500 μM , produce un incremento de la liberación de LHRH desde el HMB y, además, estimula la producción de NO, el cual participa como mediador en la liberación de LHRH. Para demostrar la participación del NO liberado se examinó el efecto de la hemoglobina (HB), un secuestrador de NO extracelular, y de N ω -Nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), un inhibidor específico de la NOS, sobre la liberación de LHRH estimulada por Mn. Los resultados

indican que tanto la HB como el L-NAME bloquearon el efecto estimulador del Mn sobre la liberación de LHRH (Figura 4 A y B), confirmando que el aumento de la actividad enzimática de la NOS forma parte de la cascada de eventos involucrados en la liberación de LHRH por Mn.

El GMPc es uno de los mediadores intracelulares que participa en los complejos mecanismos de la liberación de LHRH que se encuentra incrementado por la presencia de Mn (figura 2B). Este nucleótido se produce por la GC, y la presencia de azul de metileno (AM), un inhibidor no selectivo de la GC, bloqueó totalmente el incremento en la liberación hipotalámica de LHRH producido por el Mn, demostrando la importancia del GMPc en este proceso (Figura 5 A). Uno de los caminos por los cuales el GMPc media sus efectos, es a través de la activación de la PKG. El KT5823, inhibidor de la PKG, nos permitió evidenciar la participación de esta quinasa en la liberación de LHRH estimulada por Mn (Figura 5 B). Estas evidencias demuestran la participación del NO y del GMPc, en el mecanismo de liberación hipotalámica de LHRH estimulada por Mn.

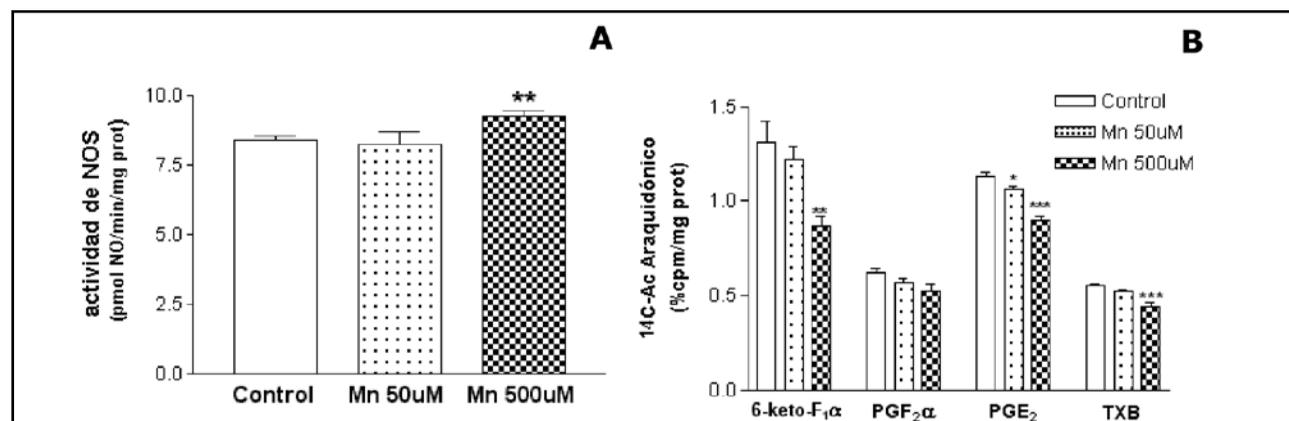


Figura 3. (A) El Mn estimula la actividad total de la NOS en el HMB e (B) inhibe la producción hipotalámica de diferentes prostanoideos, generados por la COX. Las barras representan la media \pm ESM de 6-8 por HMB grupo. Los datos fueron analizados por ANOVA seguido por el test de Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples para cada grupo. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control.

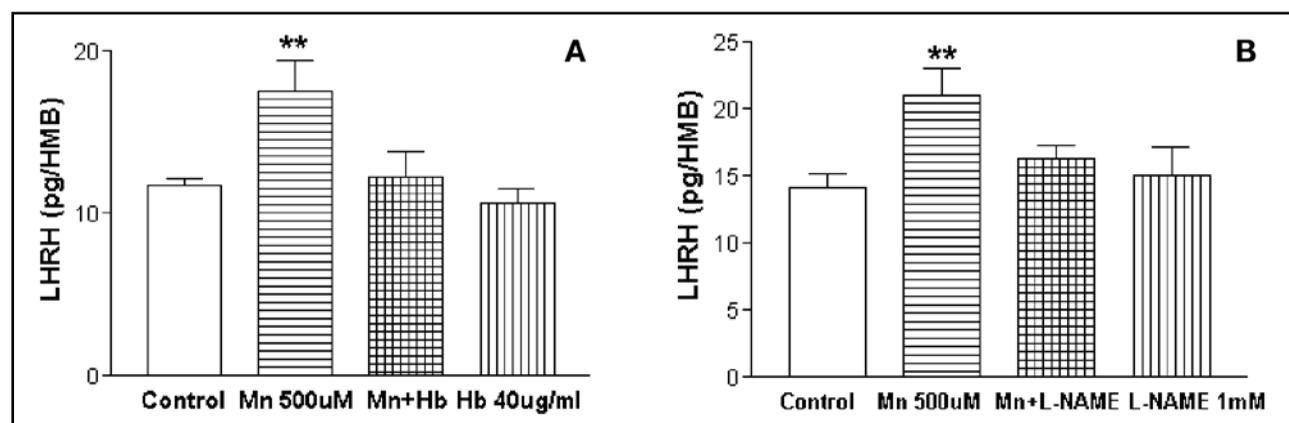


Figura 4. (A) La Hb impide el efecto estimulador del Mn sobre la liberación de LHRH. (B) El NO participa en el efecto estimulador del Mn sobre la liberación de LHRH. Las barras representan la media \pm ESM de 6-8 HMB por grupo. Los datos fueron analizados por ANOVA seguido por el test de Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples; ** $p < 0.01$ vs. control.

El desarrollo industrial, al igual que los cambios alimenticios y los imponderables naturales, hacen que la exposición a este metal se halla incrementado en las últimas décadas. Como se citó anteriormente, el Mn es un nutriente esencial para el normal desarrollo y crecimiento del organismo; es por esto que la Organización Mundial de la Salud ha establecido valores de ingesta diaria recomendada y máximos tolerables (7). Sin embargo, estos últimos puede ser fácilmente sobrepasados. La exposición a concentraciones elevadas de Mn produce diferentes alteraciones en el organismo, siendo la expresión más grave de la intoxicación, la aparición de un síndrome similar Enfermedad de Parkinson conocido como managanismo, provocado por la alteración del sistema dopaminérgico en los ganglios de la base (8-9). Además, el Mn produce efectos deletéreos sobre la reproducción, demostrado no sólo en modelos animales sino también en humanos (28-29,14-15). Como es sabido, el control neuroendocrino de la función reproductiva se expresa a través de la secreción de gonadotropinas desde la adenohipofisis, en respuesta a la estimulación de la LHRH (30). Esta neurohormona, al igual que el NO, juegan un papel esencial en la cascada de eventos que coordinan la fisiología y el comportamiento reproductivo (20-21,31). Recientemente se ha demostrado que el Mn puede contribuir con los eventos hipotalámicos relacionados con la reproducción en ambos sexos (16-19). La exposición a niveles moderadamente altos de Mn causa un incremento en los niveles séricos de hormonas relacionadas con la reproducción como lo son LH y FSH, produciendo un temprano inicio de la pubertad en animales jóvenes (16-17). De esta manera se demuestra la importancia de los niveles de Mn y de su acumulación en el hipotálamo en la vida temprana. Además, como se demuestra en este trabajo, el Mn también tiene la capacidad de afectar la liberación de LHRH en animales adultos facilitando la secreción de LH en forma aguda, hormona encargada de controlar la producción de testosterona en las células de Leydig. Asimismo, la

exposición a altas concentraciones de Mn en forma crónica causa efectos tóxicos en la reproducción en machos adultos por disminución en el número de espermatozoides y de su movilidad, lo que resulta en la disminución de la fertilidad (28-29). En el presente trabajo se demuestra que el Mn afecta diferentes mediadores que controlan la liberación de LHRH en el hipotálamo, incrementando la misma a través de la vía NO-GMPc-PKG y aumentando, en consecuencia, los niveles plasmáticos de LH (Figura 6), afectando así el eje hipotálamo-hipofisario relacionado con la reproducción.

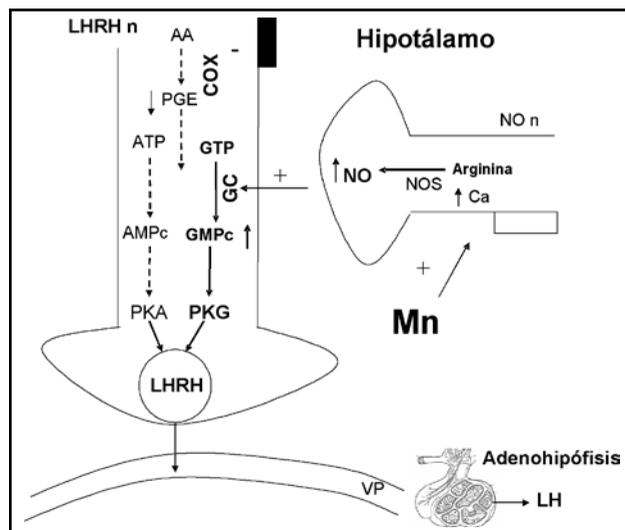


Figura 6. Esquema que resume los mecanismos involucrados en la estimulación de la liberación hipotalámica de LHRH desencadenados por el Manganeseo. Las flechas discontinuas indican efectos inhibitorios y las continuas efectos estimulatorios. Mn, Manganeseo; LHRH, hormona liberadora de hormona luteinizante; LH, hormona luteinizante; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintasa; Ca, calcio; AA, ácido araquidónico; COX, ciclooxigenasa; PGE2, prostaglandina E2; AC, adenilato ciclasa; AMPc, adenosina mono fosfato ciclica; PKA, proteína quinasa A; GMPc, guanosina mono fosfato ciclico; GC, guanilato ciclasa; PKG, proteína quinasa G; LHRH n, neurona LHRH; NO n, neurona NO; VP, vasos porta.

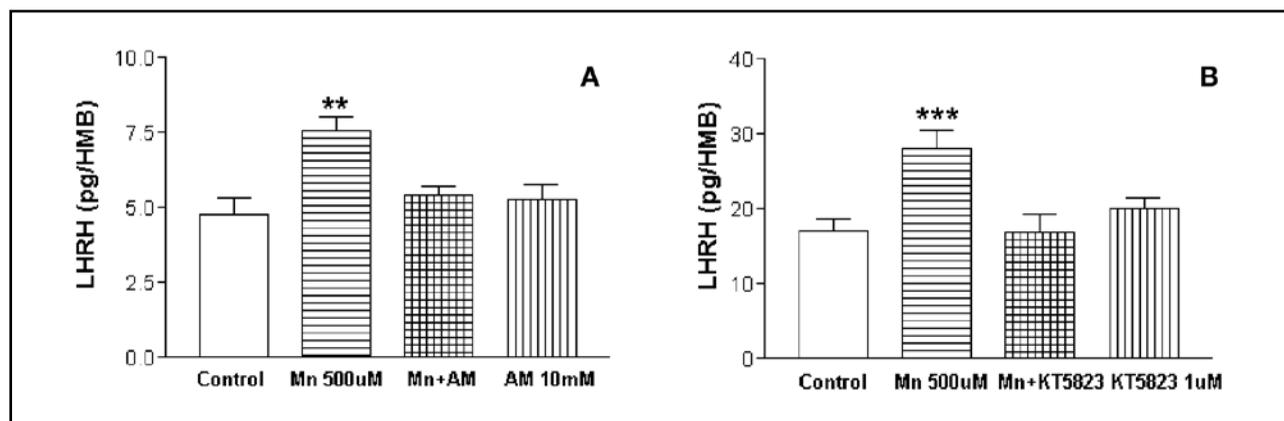


Figura 5. (A) El GMPc y (B) la PKG participan en el efecto estimulador del Mn sobre la liberación de LHRH. Las barras representan la media \pm ESM de 6-8 HMB por grupo. Los datos fueron analizados por ANOVA seguido por el test de Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control.

Bibliografía

1. Keen CL. Manganese. In: E. Frieden (Ed.), *Essential Ultratrace Elements*, Plenum Press, New York, 1984
2. Wedler FC. Biological significance of manganese in mammalian systems. In: G.P. Ellis, D.K. Luscombe (Eds.), *Progress in Medicinal Chemistry*, Vol. 30, Elsevier, Amsterdam, 1993, pp. 89–133
3. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 1973;248:4793-6
4. Norenberg MD. Distribution of glutamine synthetase in the rat central nervous system. *J Histochem Cytochem.* 1979;27:756-62
5. Bentle LA, Lardy HA. Interaction of anions and divalent metal ions with phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem* 1976;251:2916-21
6. Underwood EJ. Trace elements in human and animal nutrition. New York, Academic Press, 1977,13-55
7. IOM. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. A report of the Panel on Micronutrients, Subcommittees on Upper Reference levels of Nutrients and of Interpretation and Use of Dietary Reference Intakes, and the Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes. Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Washington, DC: National Academy Press (prepublication version, downloaded on 01/25/2001 from the Internet at: [http://www.nap.edu/openbook\(8\)](http://www.nap.edu/openbook(8))) Greger JL. Nutrition versus toxicology of manganese in humans: evaluation of potential biomarkers. *Neurotoxicology* 1999;20:205-12
9. Cotzias GC, Horiuchi K, Fuenzalida S, Mena I. Chronic manganese poisoning. Clearance of tissue manganese concentrations with persistence of the neurological picture. *Neurology* 1968;18:376-82
10. Seth PK, Nagar N, Husain R. Effects of manganese on rat testes. *Environ Physiol Biochem* 1973;3:263–7
11. Singh J, Husain R, Tandon SK, Seth PK, Chandra SV. Biochemical and histopathological alterations in early manganese toxicity in rats. *Environ Physiol Biochem* 1974;4:16–23
12. Katira V, Bawa P. Histopathological changes induced by manganese in the rat testes. *Uttar Pradesh J Zool* 1993;13(1):60–2
13. Chandra SV, Ara R, Nagar N, Seth PK. Sterility in experimental manganese toxicity. *Acta Biol Med Geriatr* 1973;30:857–62
14. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile manganese. Boca Raton, FL: CRC Press; 1997, p. 25–6
15. Lauwerys R, Roels H, Genet P, Toussaint G, Bouckaert A, De Cooman S. Fertility of male workers exposed to mercury vapor or to manganese dust, a questionnaire study. *Am J Ind Med* 1985;7:171–6
16. Lee B, Pine M, Johnson L, Rettori V, Hiney JK, Dees WL. Manganese acts centrally to activate reproductive hormone secretion and pubertal development in male rats. *Reprod Toxicol* 2006;22:580-5
17. Pine M, Lee B, Dearth R, Hiney JK, Dees WL. Manganese acts centrally to stimulate luteinizing hormone secretion: a potential influence on female pubertal development. *Toxicol Sci* 2005;85:880-5
18. Prestifilippo JP, Fernandez-Solari J, Mohn C, De Laurentiis A, McCann SM, Les Dees W, Rettori V. Effect of Manganese on Luteinizing Hormone Releasing Hormone (LHRH) Secretion in Adult Male Rats. *Toxicol Sci* 2007;97:75-80
19. Lee B, Hiney JK, Pine MD, Srivastava VK, Dees WL. Manganese stimulates luteinizing hormone releasing hormone secretion in prepubertal female rats: hypothalamic site and mechanism of action. *J Physiol* 2007;578:765-72
20. Rettori V, Gimeno M, Lyson K, McCann SM. Nitric oxide mediates norepinephrine-induced prostaglandin E2 release from the hypothalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:11543-6
21. Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM. Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:10130-4
22. Melis MR, Succu S, Argiolas A. Dopamine agonists increase nitric oxide production in the paraventricular nucleus of the hypothalamus: correlation with penile erection and yawning. *Eur J Neurosci* 1996;8:2056-63
23. Rotsztein WH, Charli JL, Pattou E, Kordon C. Stimulation by dopamine of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) release from the mediobasal hypothalamus in male rats. *Endocrinology* 1977;101:1475-83
24. Ojeda SR, Negro-Vilar A, McCann SM. Release of prostaglandin Es by hypothalamic tissue: evidence for their involvement in catecholamine-induced luteinizing hormone-releasing hormone release. *Endocrinology* 1979;104:617-24
25. Canteros G, Rettori V, Genaro A, Suburo A, Gimeno M, McCann SM. Nitric oxide synthase content of hypothalamic explants: increase by norepinephrine and inactivated by NO and cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:4246-50
26. Vitalis EA, Costantin JL, Tsai PS, Sakakibara H, Paruthiyil S, Iiri T, Martini JF, Taga M, Choi AL, Charles AC, Weiner RI. Role of the cAMP signaling

- pathway in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion in GT1 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:1861-6
27. Karanth S, Yu WH, Mastronardi CA, McCann SM. Inhibition of stimulated ascorbic acid and luteinizing hormone-releasing hormone release by nitric oxide synthase or guanyl cyclase inhibitors. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004;229:650-6
28. Elbetieha A, Bataineh H, Darmani H, Al-Hamood MH. Effects of long-term exposure to manganese chloride on fertility of male and female mice. *Toxicol Lett* 2001;119:193-201
29. Ponnappakkam TP, Bailey KS, Graves KA, Iszard MB. Assessment of male reproductive system in the CD-1 mice following oral manganese exposure. *Reprod Toxicol* 2003;17:547-51
30. Lee PA. In: *Pediatric Endocrinology* (Lifshitz F, Ed.), Disorders of puberty. New York: Marcel Dekker, Inc. 1996, pp. 175-95
31. Mani SK, Allen JM, Rettori V, McCann SM, O'Malley BW, Clark JH. Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Jul 5;91(14):6468-72