

## Efecto de la p-clorofenilalanina sobre la LH, FSH, prolactina y ovulación en rata

J. Marcó \*, O. Rosero \*\*, I. Villa \*\*, A. Esquifino \*\*\* y J. Larralde

Departamento de Investigaciones Fisiológicas  
C.S.I.C. Pamplona

(Recibido el 15 de enero de 1982)

J. MARCO, O. ROSERO, I. VILLA, A. ESQUIFINO and J. LARRALDE. *Effect of p-Chlorophenylalanine on LH, FSH, Prolactin and Ovulation in Rats*. Rev. esp. Fisiol., 38, 285-290. 1982.

The effect of p-chlorophenylalanine (PCPA: 300 mg/kg) on the rate of ovulation and plasma LH, FSH and prolactin secretion has been studied in rats at preovulatory periods (18th hour of diestrus) and post-ovulatory periods (9th hour of metaestrus).

In both experimental groups, results showed that administration of PCPA caused an increase in both prolactin concentration and number of mature ovarian follicles ( $p < 0.001$ ). No changes were observed in FSH levels. LH concentration, however, decreased ( $p < 0.001$ ) and ovulation became totally inhibited. Rats treated at the 9th hour of metaestrus exhibited a marked luteinization as well as an increased number of corpus luteum in the ovaric tissue ( $p < 0.001$ ), whereas those treated at the 18th hour of diestrus underwent no luteinization and merely showed a greater number of mature ovarian follicles ( $p < 0.001$ ).

PCPA, therefore, seems not to have a double effect on ovulation, LH, FSH, and prolactin secretion regardless of the pre or post-ovulatory periods. Changes observed in the ovaric tissue might be due to an increase in plasma prolactin concentration which appears earlier in the preovulatory than in the post-ovulatory treated animals. This difference may explain the double effect that has been attributed to the ovaric cycle and reproductive behavior.

En numerosos trabajos se ha señalado que la serotonina (5-HT) cerebral inter-

viene a través de la regulación de la secreción de gonadotrofinas hipofisarias en la ovulación y en la conducta reproductora (3, 10, 16, 18, 20, 23, 26-28, 30). Algunos señalan un efecto inhibitor de la 5-HT (2, 3, 16-19, 26, 28, 29), mientras que otros indican que tiene un efecto estimulador (11, 13, 23, 27, 30, 31). Ante estos resultados opuestos de la 5-HT en la secreción de gonadotrofinas hipofisarias, en la ovulación y en la conducta re-

\* Dirección actual: Departamento de Fisiología Animal. Facultad de Biología. Universidad de Santiago de Compostela.

\*\* Departamento de Pediatría. Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. Pamplona.

\*\*\* Cátedra de Endocrinología Experimental. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.

productora, se ha sugerido que la acción de la 5-HT puede ser diferente según el momento del ciclo ovárico en que ejerza su influencia (13, 16, 17).

Para estudiar el papel fisiológico de la 5-HT, en muchos casos se utiliza la p-clorofenilalanina (PCPA), que es un potente inhibidor de la triptófano 5-hidroxilasa — enzima que limita la velocidad de síntesis de la 5-HT —, con lo que se produce una intensa depleción de la 5-HT cerebral (15). En trabajos anteriores, habíamos observado que al inhibir la 5-HT mediante la PCPA se producía, al tratar en períodos alejados a la ovulación (hora 9 de metaestro), una inhibición total de la reproducción y una disminución de la conducta reproductora, con alargamiento de la fase no receptiva de diestro, que se mantenía entre 3 a 5 días (7-9). Cuando el tratamiento era en períodos más próximos a la ovulación, la reproducción no se inhibía totalmente y aumentaba progresivamente a medida que se administraba la PCPA en períodos más cercanos a la ovulación, hasta alcanzar valores semejantes al control. En el ciclo ovárico se produjo un alargamiento de la fase receptiva de estro, que se mantenía entre 2 y 4 días. Sin embargo, en el estudio de la ovulación se observó inhibición total al tratar con PCPA en períodos cercanos a la rotura folicular (21, 22).

En este trabajo se estudia en ratas intactas, el efecto sobre la secreción de gonadotrofinas hipofisarias, prolactina y ovulación, de la PCPA administrada en períodos cercanos y alejados de la ovulación, con el fin de comprobar si existe un doble efecto de 5-HT que pueda explicar los resultados contradictorios hasta ahora observados. Para ello se administra la PCPA en períodos alejados de la ovulación — a la hora 9 de metaestro — y en períodos próximos a la rotura folicular — a la hora 18 de diestro —, que da lugar a una importante depleción de la 5-HT cerebral en la mañana de proestro. Se valoran los efectos producidos en los

niveles plasmáticos de hormona luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH) y prolactina, en la ovulación, en el desarrollo folicular y en la aparición de cuerpos lúteos en el ovario.

### Material y métodos

Se utilizan ratas Wistar hembras de peso aproximado 200 g. Se mantienen en condiciones de iluminación artificial de 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Temperatura ambiente controlada entre 20 y 25° C. Comida y agua *ad libitum*. Se realiza control del ciclo ovárico mediante frotis vaginales diarios a la misma hora, utilizándose sólo las ratas que presentan ciclo regular por lo menos 12 días antes de los experimentos.

La PCPA se disuelve en agua destilada con un 1 % de Tween 80 y se administra en una sola dosis de 300 mg/kg por vía intraperitoneal (30 mg/ml) en un día y hora concreto del ciclo.

*Radioinmunoensayo de hormonas.* Con las ratas ligeramente anestesiadas con éter, se extraen muestras de sangre por vía intracardiaca en un tercio de cada grupo, respectivamente, a las horas 18, 19 y 20 de la tarde del proestro. Se determina en plasma LH, FSH y prolactina por radioinmunoensayo de doble anticuerpo (25) con kits suministrados por el NIAMD,\* marcados por el método de la cloramina T con I<sup>125</sup> y purificados en columna de Sephadex G-75. Los valores se expresan en ng/ml de plasma, respectivamente, de los preparados de referencia: NIAMD rat LH-RP1, NIAMD rat FSH-RP1 y NIAMD rat prolactin-RP2.

*Estudio de la ovulación.* Las ratas se sacrifican por decapitación a la hora 16 de estro, se disecan trompas y ovarios. Se

\* National Institute of Arthritis and Metabolic Diseases (U.S.A.).

realizan cortes seriados de 5 a 10  $\mu$  de espesor, que se tiñen con hematoxilina-eosina. Este método permite una gran seguridad en el recuento de óvulos en las trompas y el estudio histológico de los ovarios, con recuento de folículos maduros mayores de 500  $\mu$  y de cuerpos lúteos (4-6, 14).

La distribución de experimentos es la siguiente: a) Dos grupos control de 19 y 11 ratas, en los que se determina respectivamente los niveles hormonales y el número de óvulos, de folículos maduros y de cuerpos lúteos. b) Dos grupos de 12 ratas tratadas con PCPA a la hora 9 de metaestro, en los que se determina respectivamente los niveles hormonales y el número de óvulos, de folículos maduros y de cuerpos lúteos. c) Dos grupos de 18 y 10 ratas tratadas con PCPA a la hora 18 de diestro, en los que se determina respectivamente los niveles hormonales y el número de óvulos, de folículos maduros y de cuerpos lúteos.

Los resultados se expresan con la media y la desviación de la media, y el estudio estadístico se realiza mediante el test de Student.

### Resultados

Los valores medios de LH en el grupo control presentan una gran variabilidad,

debido a que corresponden al pico ovulatorio de LH de la tarde de proestro. Los grupos tratados con PCPA, presentan una fuerte disminución de los niveles de LH, que se mantienen bajos en la tarde de proestro, siendo la disminución mayor en el grupo tratado a la hora 9 de metaestro (tabla I).

Los valores medios de FSH no disminuyen significativamente en los grupos tratados con PCPA, mientras que los valores de prolactina presentan un fuerte aumento que es mayor en el grupo tratado a la hora 18 de diestro.

Se observan óvulos en las trompas de todas las ratas del grupo control (fig. 1), mientras que en los grupos tratados con PCPA, en ningún caso se encuentran óvulos en las trompas y los ovarios presentan un mayor número de folículos maduros respecto al control (tabla II). En el grupo tratado a la hora 18 de diestro, en los ovarios se observan pocos cuerpos lúteos, escasa luteinización difusa y un elevado número de folículos maduros, que es mayor que en el grupo tratado a la hora 9 de metaestro ( $p < 0,05$ ) que presenta abundante luteinización difusa y un mayor número de cuerpos lúteos en el ovario (fig. 2). En el grupo control se observa el mayor número de cuerpos lúteos ( $p < 0,001$ ) debido a que se ha producido la rotura folicular.

Tabla 1. Efecto de la p-clorofenilalanina (300 mg/kg) administrada a las horas 9 de metaestro y 18 de diestro sobre la LH, FSH y prolactina.

Las muestras de plasma se obtienen entre las horas 18 y 20 de proestro. n = número de ratas del grupo. \*  $p < 0,001$  respecto al control.

Condiciones	LH (ng/ml)	FSH (ng/ml)	Prolactina (ng/ml)
Control	560,00 $\pm$ 111,11 (n = 19)	288,10 $\pm$ 37,52 (n = 16)	84,15 $\pm$ 10,14 (n = 19)
PCPA 9 h metaestro	6,46 $\pm$ 1,12 * (n = 12)	221,67 $\pm$ 9,20 (n = 12)	174,67 $\pm$ 12,18 * (n = 12)
PCPA 18 h diestro	51,18 $\pm$ 9,92 * (n = 18)	228,67 $\pm$ 14,67 (n = 15)	208,67 $\pm$ 31,99 * (n = 18)

Tabla II. Efecto de la *p*-clorofenilalanina (300 mg/kg) administrada a las horas 9 de metaestro y 18 de diestro sobre la ovulación en ratas sacrificadas a la hora 16 de diestro.

Condiciones experimentales	N.º de ratas que ovulan	N.º de óvulos por rata	N.º de folículos maduros	N.º de cuerpos lúteos
Control	11/11	10,00 ± 0,83	4,82 ± 0,46	12,45 ± 0,58
PCPA 9 h metaestro	0/12	—	8,08 ± 0,36 *	5,42 ± 0,43 *
PCPA 18 h diestro	0/10	—	15,10 ± 0,57 *	1,30 ± 0,15 *

\*  $p < 0,001$  respecto al primer grupo.

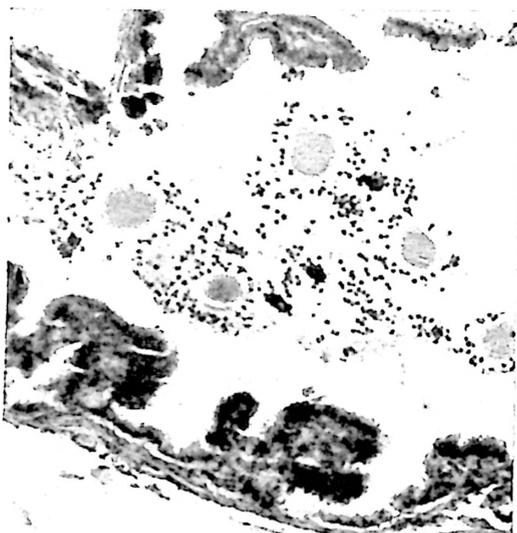


Fig. 1. Sección de trompa de rata control sacrificada a la hora 16 de diestro. Se aprecian 5 óvulos rodeados de cúmulo ovi-gero (X150).



Fig. 2. Sección de ovario y trompa de rata tratada con PCPA (300 mg/kg) a la hora 9 de metaestro y sacrificada a la hora 16 de diestro. Se aprecian dos cuerpos lúteos, abundante luteinización difusa en el tejido ovárico y ausencia de óvulos en la trompa (X40).

### Discusión

En ratas intactas, la PCPA produce una fuerte disminución de la secreción de LH, aumenta la secreción de prolactina e inhibe totalmente la ovulación, tanto al tratar en períodos alejados como cercanos a la ovulación, mientras que la secreción de FSH no varía significativamente. Estos resultados están de acuerdo con los descritos en ratas hembras castradas con implantación subcutánea de estradiol (13) o en ratas inmaduras tratadas con PMS (31)

y dependen de la disminución de los niveles cerebrales de 5-HT, producida por la PCPA (15). Aunque la PCPA también afecta secundariamente a los niveles de noradrenalina, el efecto es de menor grado y se ha demostrado que no hay correlación significativa entre la disminución de noradrenalina y el descenso de LH producido por la PCPA (13). El tratamiento a la hora 18 de diestro se puede

considerar período cercano a la ovulación, ya que la PCPA tiene un período de latencia mayor a 9 horas para producir cambios en el ciclo ovárico (21) y no produce disminución importante de los niveles de 5-HT cerebral hasta la mañana de proestro (15).

Ante estos resultados, se puede afirmar que no existe un doble efecto de la PCPA en la secreción de prolactina y gonadotrofinas hipofisarias y en la ovulación. Las diferencias observadas en el número de folículos maduros, número de cuerpos lúteos y en la luteinización del tejido ovárico, pueden deberse a que los niveles elevados de prolactina se producen en el grupo tratado a la hora 9 de metaestro desde períodos alejados a la ovulación, lo que permite la luteinización del tejido ovárico y de parte de los folículos, que se transforman en cuerpos lúteos. Sin embargo, en el grupo tratado a la hora 18 de diestro, que presenta numerosos folículos maduros, la elevación de los niveles de prolactina se produce poco antes de la ovulación y no se observan, como consecuencia, cuerpos lúteos ni luteinización. Este distinto efecto sobre el desarrollo folicular puede explicar la doble acción de la PCPA sobre la receptividad y conducta reproductora (7, 21). El alargamiento de la fase de estro y el aumento de la conducta reproductora observada al tratar en períodos cercanos a la ovulación, puede deberse a que los folículos maduros no sufren rotura folicular y mantienen la secreción de estrógenos, de lo que depende la conducta reproductora (1). El alargamiento de la fase de diestro y la disminución de la conducta reproductora observada al tratar en períodos alejados a la ovulación, puede deberse al aumento de la secreción de progesterona producida por los abundantes cuerpos lúteos.

La disminución de la secreción de gonadotrofinas descrita por algunos al tratar con 5-HT, parece ser que se debe a un efecto periférico de la 5-HT a nivel de los ovarios a dosis no fisiológicas, que pro-

duce vasoconstricción y disminución de la secreción de hormonas ováricas responsables de la estimulación de LH (30). Se ha observado también que en el hipotálamo y en otras áreas cerebrales de ratas hembras en proestro, hay una masiva liberación de 5-HT justo antes del pico ovulatorio de LH (12, 24), interpretándose que la 5-HT facilita la liberación de los factores hipotalámicos responsables del pico ovulatorio de LH. La PCPA, al disminuir los depósitos cerebrales de 5-HT, impediría su masiva liberación en la tarde de proestro y por lo tanto el pico ovulatorio de LH, la ovulación y podría producir la elevación de los niveles de prolactina al inhibir la liberación del factor inhibidor de la prolactina.

#### *Agradecimientos*

Al NIAMD (Rat Pituitary Hormone Program) por la donación de los kits de LH, FSH y Prolactina de rata empleados en el radioinmunoensayo.

#### **Resumen**

Se estudia en ratas, el efecto de la p-clorofenilalanina (PCPA: 300 mg/kg) administrada en períodos preovulatorios (hora 18 diestro) y post-ovulatorios (hora 9 de metaestro) sobre los niveles plasmáticos de LH, FSH y prolactina, el número de óvulos en la trompa y el número de folículos maduros y de cuerpos lúteos en el ovario.

En los dos grupos tratados se observa un aumento de los niveles plasmáticos de prolactina y del número de folículos maduros en el ovario, mientras que disminuyen los niveles de LH y la ovulación es inhibida totalmente. Los niveles de FSH no varían significativamente. En el grupo tratado a la hora 9 de metaestro, se observa un aumento del número de cuerpos lúteos y una abundante luteinización en el tejido ovárico. Sin embargo, en el grupo tratado a la hora 18 de diestro, no se observa luteinización en el tejido ovárico y sólo se aprecia un mayor número de folículos maduros.

Se concluye que no existe un doble efecto de la PCPA sobre la ovulación y secreción de

LH, FSH y prolactina al tratar en períodos preovulatorios o post-ovulatorios. Sólo se observan diferencias en el tejido ovárico, que pueden depender del incremento de la concentración plasmática de prolactina, que en las ratas tratadas en períodos preovulatorios se produce antes que en el grupo tratado en períodos post-ovulatorios. Esta diferencia puede explicar el doble efecto que se ha descrito en el ciclo ovárico y en la conducta reproductora.

### Bibliografía

1. BRENNER, R. M. y WEST, N. B.: *Ann. Rev. Physiol.*, **37**, 273-302, 1975.
2. CRAMER, O. M. y BARRACLOUGH, C. A.: *Endocrinology*, **103**, 694-703, 1978.
3. EVERITT, B. J., FUXE, K. y HÖKFELT, T.: *Eur. J. Pharmacol.*, **29**, 187-191, 1974.
4. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **29**, 189-196, 1973.
5. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **29**, 279-288, 1973.
6. GONZÁLEZ-BARÓN, S., VELAYOS, J. L., MARCÓ, J. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 53-62, 1975.
7. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y MARCÓ, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 63-68, 1975.
8. GONZÁLEZ-BARÓN, S., MARCÓ, J. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. Univ. Navarra*, **19**, 1-16, 1975.
9. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J., MARCÓ, J. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **32**, 29-32, 1976.
10. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J., MARCÓ, J. y RIBAS, B.: *Rev. esp. Fisiol.*, **32**, 301-306, 1976.
11. GORZULKA, B. B. y WHALEN, R. E.: *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **3**, 511-513, 1975.
12. HÉRY, F., ROVER, E. y GLOWINSKI, J.: *Brain Res.*, **43**, 445-465, 1972.
13. HÉRY, M., LAPLANTE, E. y KORDON, C.: *Endocrinology*, **99**, 496-503, 1976.
14. JIMÉNEZ-VARGAS, J., GONZÁLEZ-BARÓN, S. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **17**, 1-8, 1973.
15. KOE, B. K. y WEISSMAN, A.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **154**, 499-516, 1966.
16. KORDON, C., JAVOY, F., VASSENT, G. y GLOWINSKI, J.: *Eur. J. Pharmacol.*, **4**, 169-174, 1968.
17. KORDON, C. y GLOWINSKI, J.: *Neuropharmacology*, **11**, 153-162, 1972.
18. LABHSETWAR, A. P.: *J. Endocrinol.*, **54**, 269-275, 1972.
19. LIPPMANN, W.: *Nature*, **218**, 173-174, 1968.
20. MARCÓ, J., TOSAR, A., GONZÁLEZ-BARÓN, S. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **34**, 81-86, 1978.
21. MARCÓ, J. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **35**, 63-74, 1979.
22. MARCÓ, J. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **35**, 75-84, 1979.
23. MARKÓ, M. y FÜCKIGER, E.: *Neuroendocrinology*, **30**, 228-231, 1980.
24. MEYER, D. C. y QUAY, W. B.: *Endocrinology*, **98**, 1160-1165, 1976.
25. NISWENDER, G. D., CHEN, C. L., MIDGLEY Jr., A. R., MEITES, J. y ELLIS, S.: *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y.)*, **130**, 793-797, 1969.
26. O'STEEN, W. K.: *Endocrinology*, **77**, 937-939, 1965.
27. PARKER, V. D., SOLIMAN, K. F. A. and WALKER, C. A.: *Experientia*, **35**, 692-694, 1979.
28. SCHNEIDER, H. P. G. y McCANN, S. M.: *Endocrinology*, **86**, 1127-1133, 1970.
29. VAN DE POLL, N. E. H., VAN DIS, H. y BERMOND, B.: *Eur. J. Pharmacol.*, **41**, 225-229, 1977.
30. WILSON, C. A., HORTH, C. E., MCNEILLY, A. y McDONALD, P. G.: *J. Endocr.*, **64**, 337-347, 1975.
31. WILSON, C. A., ANDREWS, M. y MADLEY, J. C.: *Psychoneuroendocrinology*, **2**, 267-274, 1977.