

Efecto de la 6-hidroxidopamina intracerebral sobre la ovulación en la rata

S. González-Barón, J. L. Velayos, J. Marcó y J. Jiménez-Vargas

Departamento de Investigaciones Fisiológicas
Sección de Fisiología Aplicada. C.S.I.C.
Universidad de Navarra
Pamplona (España)

(Recibido el 23 de diciembre de 1974)

S. GONZALEZ-BARON, J. L. VELAYOS, J. MARCO and J. JIMENEZ-VARGAS. *Effect of 6-Hydroxydopamine Intracerebrally Injected on Reproduction in Rats*. Rev. esp. Fisiol., 31, 53-62. 1975.

The effect of 6-hydroxydopamine (6-OH-DA) — 250 μ g — intracerebrally injected on rat ovulation has been studied. Administration of 6-OH-DA in the nucleus *accumbens septi* and its neighbourhood, inhibited follicle rupture, causing ovarian cycles with leucocitary phases in nearly all cases. The ovaries present a deep luteinization. Administration of 6-OH-DA in the stria-hypothalamic tract gives rise to a estrogenic cycle and to a normal number of oocytes in the tubes. The study of the fibrillar degeneration leads us to assumption of a probable adrenergic connections of the nucleus *accumbens septi* with the lateral hypothalamic area, preoptic area and olfactory tubercle. The influence of the nucleus *accumbens septi* on the mechanisms of follicle rupture is stressed.

En numerosos trabajos se viene señalando la relación entre sistema catecolaminérgico hipotalámico y secreción de gonadotrofinas y prolactina (3, 5, 6, 10-13, 18-20, 22, 23, 25-27, 32-34). Aunque se conoce la existencia de fibras noradrenérgicas y dopaminérgicas en hipotálamo y otras estructuras diencefálicas (4, 9, 10), se dispone de escasos conocimientos (30, 31) sobre conexiones de núcleos del septum con zonas de hipotálamo y no se dispone de datos suficientes sobre la posible influencia de estos núcleos en el conjunto de mecanismos neurohormonales que determinan la rotura folicular.

Desde hace unos años se viene utilizan-

do la 6-hidroxidopamina (6-OH-DA) para estudiar funciones adrenérgicas. Su efecto específico de degeneración de terminaciones nerviosas adrenérgicas en sistema nervioso periférico y central (2, 8, 17, 24, 35, 37-44) ha permitido un mejor conocimiento de determinadas funciones dependientes de este tipo de transmisores.

En el sistema nervioso central, a dosis altas, se ha podido observar rápida degeneración de fibras noradrenérgicas y dopaminérgicas sin afectar las terminaciones nerviosas que contienen serotonina (41, 42). Cuando se administra en rata por vía intraventricular, se observa a las pocas horas disminución en los niveles de nor-

adrenalina y dopamina (40), disminución en la actividad de tirosinahidroxilasa y en la captación de noradrenalina (2, 17).

En el presente trabajo se administra 6-OH-DA en distintas zonas diencefálicas preferentemente en núcleos del septum, a fin de aportar nuevos datos sobre posible influencia de esas estructuras en la regulación del ciclo ovárico, y poder señalar posibles conexiones adrenérgicas de esos núcleos.

Material y métodos

Se utilizan ratas Wistar hembras, de peso medio 220 g. Treinta días antes de las experiencias los animales se mantienen en condiciones de iluminación controlada, 14 horas de luz y 10 de oscuridad. Comida y agua *ad libitum*. Temperatura ambiente 25° C. Se lleva control del ciclo ovárico mediante frotis vaginales realizados todos los días a la misma hora. Sólo se utilizan aquellas ratas que presentan ciclos regulares en los 16 días precedentes a la experiencia. Bajo anestesia con éter sulfúrico se fija la cabeza en aparato de estereotaxia y se inyecta 250 µg de 6-OH-DA (cloruro) disuelto en 25 µl de suero fisiológico, conteniendo 0,001 % de bisulfito sódico. En ratas control se inyecta 25 µl de suero fisiológico. La administración se hace en tejido cerebral, mediante microjeringa con tornillo micro-

métrico. Como referencia se utiliza el Atlas estereotáxico de ALBE-FESSARD *et al.* (1), y como complemento el Atlas estereotáxico de KÖNIG y KLIPPEL (21).

En la mayoría de ratas la inyección se hace en el lugar correspondiente a las coordenadas del núcleo *accumbens septi* (X: -2; Y: +4; Z: +9 ó +9,5). En una rata se administró 6-OH-DA en núcleo caudado-putamen para tener como referencia degeneraciones en otras zonas. En otra rata se inyecta en haz estriohipotalámico.

A los 6 u 8 días de la inyección intracerebral se sacrifican, perfundiéndolas con suero fisiológico y formol 10 %. Se diseccionan trompas y ovarios. Se hacen cortes de 10 µ para estudio histológico de ovarios y recuento de ovocitos en trompas. En algunas ratas de cada grupo se extrae el encéfalo que se fija en formol al 10 %, y se realizan cortes por congelación en secciones de 50 y 25 µ. Los cortes de 50 µ se tiñen por el método de Nissl. Los de 25 µ impregnados por el método de VELAYOS y LIZARRAGA (46) con tiempos de permanganto potásico al 0,025 % entre 4 y 11 minutos, y de 7 minutos para la mezcla de hidroquinona-ácido oxálico. Este método pone de manifiesto con gran precisión las degeneraciones terminales y es útil en períodos de fijación habituales, y cuando el material se mantiene en formol durante tiempo prolongado.

Tabla 1. Efecto de la 6-hidroxidopamina (6-OH-DA) intracerebral sobre la ovulación en la rata.

Condiciones experimentales	Número ratas	Fase, día de sacrificar	Número óvulos por rata	Número ratas ciclo normal	N.º ratas con predominio fase leucocitaria (M y D)	N.º ratas del grupo anterior con retraso aparición estró más de 3 días
Suero	6	E: 4 M: 2	9 ± 2,58	4	1	1
6-OH-DA (250 µg)	12	P: 1 E: 3 (*) D: 1 M: 7	7,6 ± 0,41	2	9	6

(*) En una rata se inyecta la sustancia en caudado-putamen y en otra en haz estriohipotalámico.

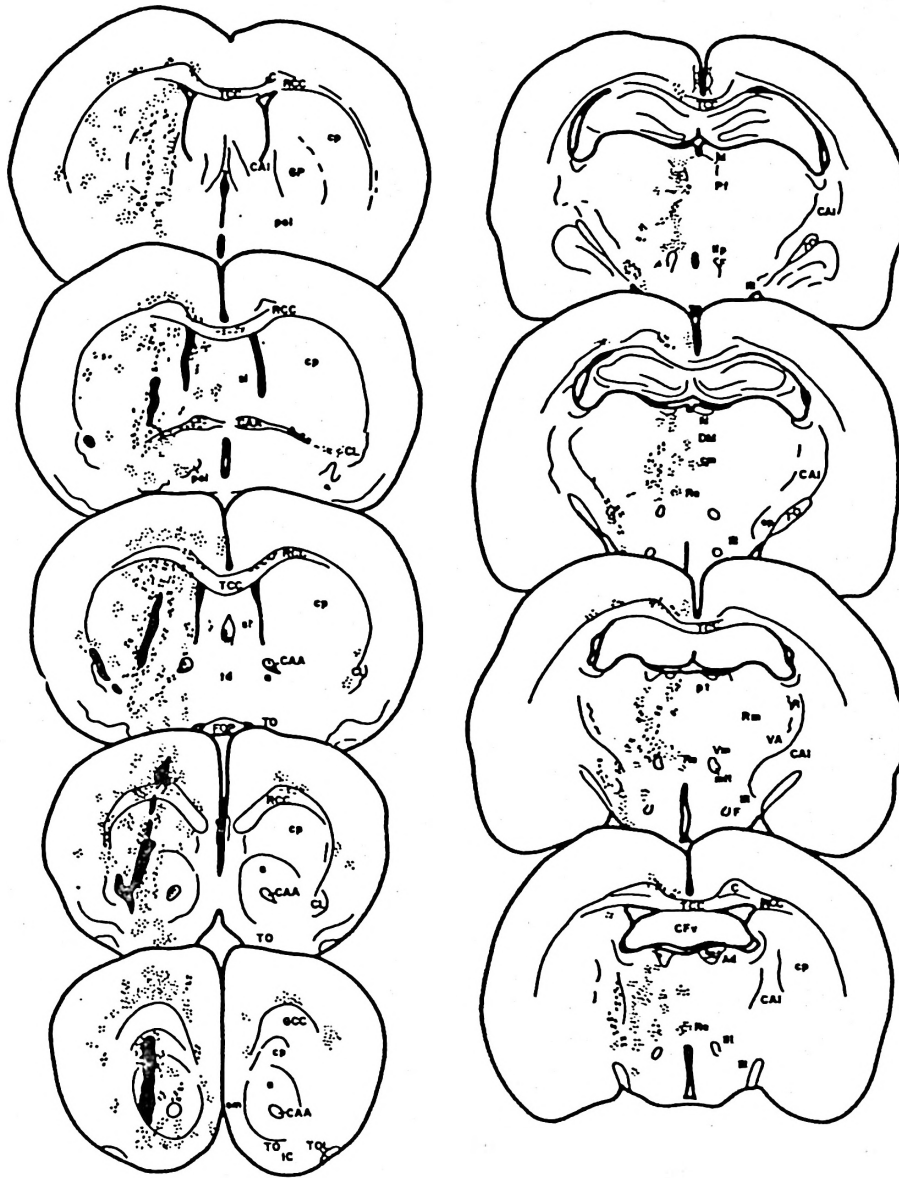


Fig. 1. Representación en cortes frontales de las zonas que presentan degeneración consecutiva a la administración de 6-OH-DA en núcleo accumbens septi.

Abreviaturas: a: núcleo accumbens septi; Ad, Am, Av: núcleos anterodorsal, anteromedial y anteroventral del tálamo; CA: comisura anterior; CAA: porción anterior de la comisura blanca anterior; cp: caudado-putamen; HI: área hipotalámica lateral; hl: núcleo abenular lateral; pol: área preóptica lateral; poma: área preóptica magnocelular; sm: núcleo septal medial; st: núcleo intersticial de la estria terminal; To: tubérculo olfatorio; ts: núcleo triangular del septo.

En todos los casos los cortes son dibujados en amplificación de ($\times 10$), y sobre los dibujos es anotada la degeneración anterógrada observada, según los métodos habituales.

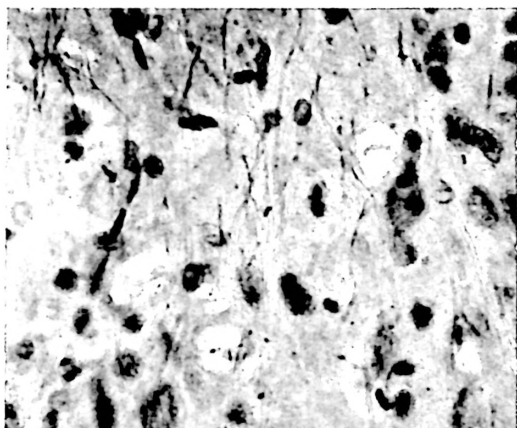


Fig. 2. Degeneración en área hipotalámica lateral del mismo lado de la lesión, correspondiente a la rata de la figura 1 ($\times 1152$).

Resultados

En la tabla I se resumen los resultados expuestos en relación con las variaciones en la función ovárica, divididos en dos grupos: 1) Control, al que se administró suero intracerebral y sacrificados a los 8 días, y 2) Tratados con 6-OH-DA intracerebral y sacrificados a los 6 u 8 días.

En la mayoría de los animales tratados con suero se aprecia ciclo ovárico normal, con un número medio normal de óvulos en trompas (9 ± 2.58).

En los animales tratados con 6-OH-DA, en la mayoría, en núcleo *accumbens septi*, se aprecia, en un bajo número de ratas, ciclos ováricos normales, destacando la alta incidencia de fases leucocitarias predominantes en el frotis vaginal. En la mitad de este grupo la fase de estro se retrasa más de 3 días, lo que señala una inhibición manifiesta en el mecanismo de la rotura folicular. El estudio histológico de trompas y ovarios pone de manifiesto

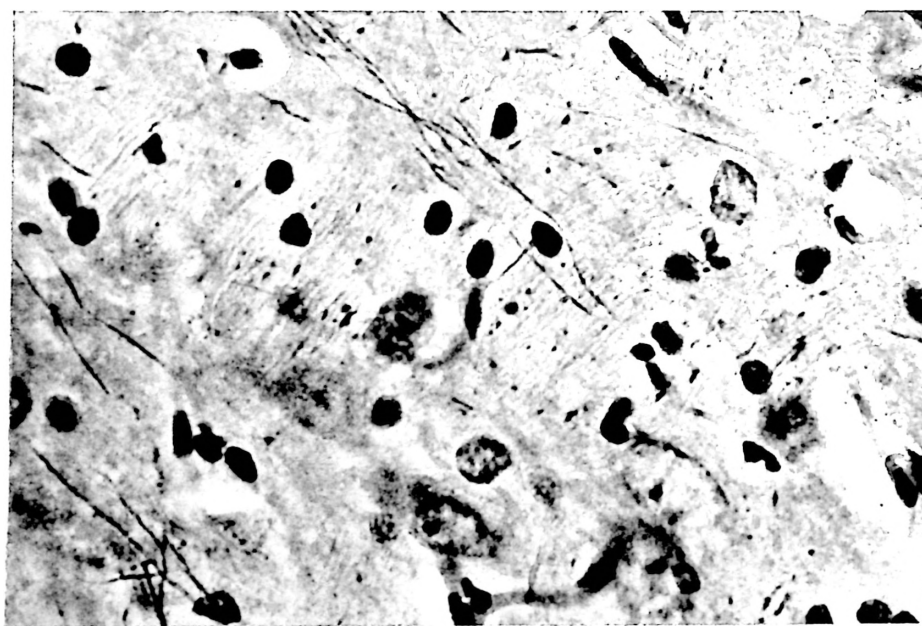


Fig. 3. Degeneración en núcleo anteromedial del tálamo homolateral a la lesión, correspondiente a la rata de la figura 1 ($\times 1152$).

una marcada luteinización difusa con cuerpos lúteos destacados, y en la mayoría no se visualizaron óvulos en las trompas (fig. 1).

En dos, uno control y otro tratado, se observan fases de estró permanente. Sólo un animal del grupo control presenta un ciclo con predominio de fases leucocitarias.

Discusión

En anteriores trabajos se ha venido estudiando en este laboratorio el papel de las monoaminas en las funciones de ovu-

lación y reproducción (3, 11-14, 18, 19) mediante utilización de fármacos que modifican los niveles de catecolaminas y serotonininas en sistema nervioso central. La administración intracerebral de la 6-OH-DA utilizada en el presente trabajo ha permitido además un estudio simultáneo de posibles conexiones del núcleo accumbens del septum, que no estaban descritas de forma precisa.

La lesión fundamental en la mayoría de ratas se localiza en el núcleo *accumbens septi*, lugar en el que se administra la 6-OH-DA o suero. En una rata se localiza en caudado-putamen y sirve de referencia.

En las ratas control inyectadas con suero en núcleo *accumbens septi* se observan escasas degeneraciones terminales en área hipotalámica lateral y núcleos anteriores del tálamo.

En las ratas inyectadas con 6-OH-DA en núcleo *accumbens septi* se observa degeneración terminal en el propio núcleo. En lado homolateral, en estructuras del tubérculo olfatorio, caudado-putamen, corteza — áreas F y F' —, en comisura blanca anterior y en cuerpo calloso. En áreas preóptica lateral y magnocelular. Más caudalmente en área preóptica y área hipotalámica lateral (figs. 1 y 2).

En zonas más caudales se ven más degeneraciones terminales en área hipotalámica y núcleo reuniens, así como en núcleos anteromedial (fig. 3), anterodorsal, central medial, dorsal medial, complejo centromediano-parafascicular del tálamo y en núcleo habenular lateral. En lado contralateral la cuantía de fibras y terminales degeneradas es mucho menor que en el lado homolateral.

En una rata en la que no se lesiona el núcleo *accumbens septi*, la 6-OH-DA fue administrada en caudado-putamen; no se observan degeneraciones en área hipotalámica lateral.

Es muy probable que haya conexiones específicas adrenérgicas del núcleo *accumbens septi* con área hipotalámica lateral.



Fig. 4. Sección de ovario de rata tratada con 6-OH-DA y en la que se produjo inhibición de la rotura folicular ($\times 25$). Corresponde a la rata de la figura 1. Se puede apreciar luteinización.



Fig. 5. Representación en cortes frontales de las zonas que presentan degeneraciones consecutivas a la administración de 6-OH-DA. El fármaco se aplicó en haz estrio-hipotalámico lateral. Se manifiesta un ciclo estrogénico permanente. Abreviaturas como en la figura 1.

El estudio de las funciones ováricas en ratas en las que la 6-OH-DA se administró en núcleo *accumbens septi* pone de manifiesto — en 9 de 12 — la existencia de ciclos con predominio casi total de fases de tipo leucocitario e inhibición de la ovulación, apreciándose luteinización en los ovarios (fig. 4). La inhibición de la ovulación puede depender de la supresión de conexiones adrenérgicas existentes normalmente entre núcleo *accumbens septi* y área hipotalámica lateral, áreas preópticas o tubérculo olfatorio. Se ha señalado (15, 16, 36) que la ovulación en ratas se mantiene siempre que el hipotálamo quede conectado con área preóptica. Los resultados obtenidos en el presente trabajo no contradicen esos datos. Sin embargo, parece destacar el papel del núcleo *accumbens* — tal vez de otros núcleos septales — en el control de la ovulación.

Por otra parte, la existencia de luteinización del tejido ovárico, en esas ratas, puede interpretarse debido a una mayor secreción de prolactina, por degeneración

de las zonas señaladas, lo que está de acuerdo con otros resultados (7, 26) que ponen de manifiesto la existencia de un mecanismo adrenérgico fisiológico, inhibidor de la secreción de prolactina.

En la única rata tratada con 6-OH-DA que presenta un ciclo estrogénico mantenido, la sustancia fue administrada en el haz estriohipotalámico en el que se observa clara lesión (fig. 5). Se destaca en la misma rata abundante degeneración terminal en áreas preópticas magnocelular y lateral (fig. 6), en el núcleo intersticial de la estria terminal. En núcleos septal lateral y triangular del septum. Más caudalmente, en núcleo parataenialis antero-medial y dorsalmedial del tálamo. Se observa también lesión del fascículo prosencefálico medial. Presenta 6 días consecutivos de fase de estro. El aspecto morfológico del ovario es normal y se contaron ocho óvulos en las trompas (fig. 7). Aunque no resulta fácil llegar a una explicación definitiva de lo ocurrido en esta rata, se puede interpretar con otros (26) que la

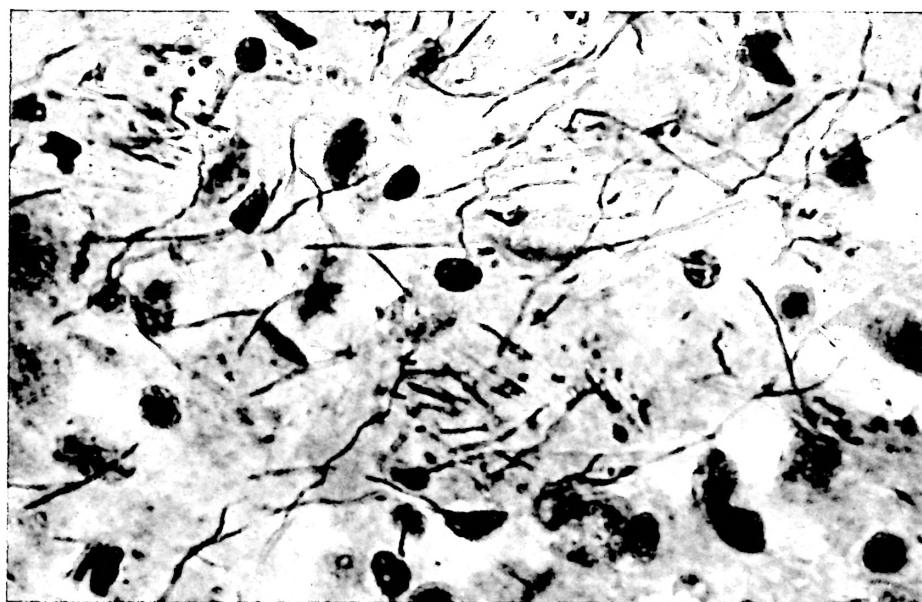


Fig. 6. Degeneración en área preóptica lateral, del mismo lado de la lesión, correspondiente a la rata de la figura 2 ($\times 1152$)



Fig. 7. Sección de trompa. Se puede apreciar un óvulo rodeado de cúmulo ovigero, correspondiente a la rata de la figura 5 ($\times 100$).

lesión y degeneración abundante en el haz estriohipotalámico haya suprimido un control negativo ejercido normalmente desde el núcleo amigdalino sobre la secreción de gonadotrofinas.

Las degeneraciones observadas en área hipotalámica lateral ya habían sido observadas por lesión del núcleo amigdalino (45), pero no se había concretado qué núcleos del septum establecen conexiones con área hipotalámica lateral (30, 31). De igual modo puede considerarse como característico del núcleo *accumbens septi* conexiones con núcleos anteriores del tálamo en la rata. En el gato ya habían sido descritos (28, 29). Las conexiones observadas de ese núcleo del septum con tubérculo olfatorio no habían sido precisadas (28, 30) en trabajos anteriores.

En las ratas tratadas con 6-OH-DA en

núcleo *accumbens septi* se observó disminución de peso, que no se manifiesta en las tratadas con suero. Aunque no es propósito de este trabajo estudiar mecanismos adrenérgicos en el control del hambre y la sed, y, por tanto, no se dispone de suficientes datos para una interpretación completa, esos resultados están de acuerdo con los descritos por otros autores (8, 48).

Resumen

Se estudia en ratas el efecto de la 6-hidroxidopamina —6-OH-DA—, inyectando 250 μ g intracerebralmente, sobre la ovulación. Se precisan nuevas conexiones de estructuras diencefálicas. La inyección de 6-OH-DA en núcleo *accumbens septi* bloquea la rotura folicular, apreciándose ciclos ováricos con fases leucocitarias en casi la totalidad de animales. Los ovarios presentan una marcada luteinización. La administración de la sustancia en el haz estriohipotalámico da lugar a ciclo de tipo estrogénico con número normal de ovocitos en trompas. Del estudio de degeneración de fibras se deduce la probable existencia de conexiones adrenérgicas del núcleo *accumbens septi* con área hipotalámica lateral, área preóptica y tubérculo olfatorio. Se destaca la influencia del núcleo *accumbens septi* en los mecanismos que determinan la rotura folicular.

Bibliografía

1. ALBE-FESSARD, D., STUTINSKI, F. y LIBOUBAN, S.: Atlas Stéréotaxique du diencephale du rat blanc. Edit. du Centre National de la Recherche Scientifique. París, 1966.
2. BELL, L. J., IVERSEN, L. L. y URETSKY, N. J.: *Br. J. Pharmacol.*, 40, 790, 1970.
3. CARRASCOSA, M. A., CROFTON, J. y TEJERA, V.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, 14, 7, 1970.
4. DAHLSTROM, A. y FUXE, K.: *Acta Physiol. Scand.*, 64, Sup. 247, 1965.
5. DAVIDSON, J. M.: En «Frontiers in Neuroendocrinology» (W. F. Ganong y L. Martini, ed.), Oxford University Press, Nueva York, 1969, pág. 307.
6. DONOSO, A. O., BISHOP, W., FAWCETT, C. P., KRULICH, L. y MCCANN, S. M.: *Endocrinology*, 89, 774, 1971.

7. EVERETT, J. W. y NICHOLS, D. C.: *Anat. Record.*, 160, 346, 1968.
8. FIBIGER, H. C., PHILLIPS, A. G. y CLOUSTON, R. A.: *Amer. J. Physiol.*, 225, 1282, 1973.
9. FUXE, K.: *Acta Physiol. Scand.*, 64, Sup. 247, 37, 1965.
10. FUXE, K. y HOKFELT, T.: En «The Hypothalamus» (L. Martini, M. Motta y F. Fraschini, ed.). Academic, New York, 1970, págs. 123-138.
11. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y LÓPEZ-GARCÍA, G.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, 15, 251, 1971.
12. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, 29, 189, 1973.
13. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, 29, 279, 1973.
14. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y MARCÓ, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, 31, 63, 1975.
15. HALASZ, B. y GORSKI, R. A.: *Endocrinology*, 80, 608, 1976.
16. HALASZ, B.: En «Frontiers in Neuroendocrinology» (W. G. Ganong y L. Martini, edit.), Oxford University Press, Nueva York, 1969, pág. 307.
17. IVERSEN, L. L. y URETSKY, N. J.: *J. Neurochem.*, 17, 269, 1970.
18. JIMÉNEZ-VARGAS, J., TEJERA, V. y GONZÁLEZ-BARÓN, S.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, 14, 123, 1970.
19. JIMÉNEZ-VARGAS, J., GONZÁLEZ-BARÓN, S. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, 17, 1, 1973.
20. KAMBERI, I. A., MICAL, R. S. y PORTER, J. C.: *Endocrinology*, 87, 1, 1970.
21. KONING, J. F. R. y KLIPPEL, R. A.: The rat brain. A Stereotaxic Atlas of the forebrain and Lower Parts of the Brain Stern. Williams and Wilkins Co. Baltimore, 1963.
22. KORDON, C., JAVOY, F., VASSENT, G. y GLOWINSKI, J.: *Europ. J. Pharmacol.*, 4, 169, 1968.
23. KORDON, C. y GLOWINSKI, J.: *Neuropharmacology*, 11, 153, 1972.
24. LAVERTY, R. y TAYLOR, K. M.: *Br. J. Pharmacol.*, 40, 836, 1970.
25. MCCANN, S. M.: *Fed. Proc.*, 29, 1888, 1970.
26. MCLEOD, R. M., FONTHAM, E. H. y LEHMEYER, J. E.: *Neuroendocrinology*, 6, 283, 1970.
27. MOTTA, M., FRASCHINI, F. y MARTINI, L.: En «Frontiers in Neuroendocrinology» (W. F. Ganong y L. Martini, eds.), Oxford University Press, Nueva York, 1969, página 211.
28. POWELL, E. W.: *Exp. Neurol.*, 14, 328, 1966.
29. POWELL, E. W. y RORIE, D. K.: *Amer. J. Anat.*, 120, 605, 1967.
30. RAISMAN, G.: *Brain*, 89, 317, 1966.
31. RAISMAN, G.: *Brain Res.*, 14, 25, 1969.
32. RODGES, C. B.: *Endocrinology*, 88, 433, 1971.
33. SCHNEIDER, H. P. G. y MCCANN, S. M.: En «Aspects of Neuroendocrinology» (W. Bargmann and B. Scharrez, eds.). Springer Berlín, 1970, pág. 177.
34. SCHNEIDER, H. P. G. y MCCANN, S. M.: *Endocrinology*, 86, 1127, 1970.
35. SIMONDS, M. A. y URETSKY, M. J.: *Br. J. Pharmacol.*, 40, 360, 1970.
36. TALEISNIK, S., VELASCO, M. E. y ASTRADA, J. J.: *J. Endocrinol.*, 46, 1, 1970.
37. TAYLOR, K. M. y LAVERTY, R.: *Eur. J. Pharmacol.*, 17, 16, 1972.
38. THOENEN, H. y TRANZER, J. P.: *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 261, 271, 1968.
39. TRANZER, J. P., SNIPES, R. L., THOENEN, H. y RICHARDS, J. G.: *Prog. Brain Res.*, 31, 33, 1969.
40. UNGERSTEDT, U.: *Eur. J. Pharmacol.*, 5, 107, 1968.
41. UNGERSTEDT, U.: *Acta Physiol. Scand.*, 367, 69, 1971.
42. UNGERSTEDT, U.: *Acta Physiol. Scand.*, 367, 95, 1971.
43. URETSKY, N. J. e IVERSEN, L. L.: *Nature*, 221, 557, 1969.
44. URETSKY, N. J. e IVERSEN, L. L.: *Neurochem.*, 17, 269, 1970.
45. VALVERDE, F.: *Prog. Brain Res.*, 3, 20, 1963.
46. VELAYOS, J. L. y LIZARRAGA, M. F.: *Experientia*, 29, 135, 1973.
47. VELAYOS, J. L. y ULLÁN, J.: *An. Anat.*, 23, 461, 1974.
48. ZIGMOND, M. J. y STRICKER, E. M.: *Science*, 182, 717, 1973.