

Efecto de la p-clorofenilalanina sobre la reproducción de ratas en distintas condiciones de iluminación

S. González-Barón, J. Jiménez-Vargas, J. Marcó y B. Ribas

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

(Recibido el 26 de enero de 1976)

S. GONZALEZ-BARON, J. JIMENEZ-VARGAS, J. MARCO and B. RIBAS. *Effect of p-chlorophenylalanine on Rat Reproduction Under Different Conditions of Lighting*. Rev. esp. Fisiol., 32, 301-306. 1976.

Reproduction in female rats kept on artificial cycles of light/darkness, continuous lighting and continuous darkness, has been studied. Three weekly doses of p-chlorophenylalanine (p-CPA), 100 mg/kg, were given to half of the rats in each group during the two preconditioning months before copulation. An evaluation has been made of the insemination, fecundation, number of embryos, ovarian cycle and level of 5-HT in the hypothalamus.

The administration of p-CPA had an inhibitory effect on the reproductive behavior, especially pronounced in rats kept under continuous lighting and under continuous darkness. The difference in 5-HT levels were greater among the groups kept on cycles of light/darkness without treatment and with p-CPA ($0.05 > P > 0.01$). The importance of 5-HT in the mechanisms of reproductive behavior is emphasized.

La glándula pineal tiene un papel importante en la influencia de la luz sobre el ritmo reproductivo en diversas especies de vertebrados fotosensibles, según los datos de diversas investigaciones (1, 4, 5, 24, 25). La oscuridad influye sobre la glándula pineal favoreciendo la síntesis de melatonina (5 hidroxí-acetiltriptamina) (1, 32), que, junto a otros derivados indólicos pineales, y a la 5 hidroxítriptamina (5-HT), parecen ejercer un control inhibitorio sobre la secreción de gonadotrofinas hipofisarias en la rata (4, 5, 18). Los cambios del ci-

clo ovárico y de los genitales, por exposición a la luz permanente se han comparado a lo observado después de la pinealectomía. Sin embargo, algunos resultados, como inhibición de ovulación, disminución de peso del ovario, infertilidad (13, 21, 23, 28, 29), disminución de LH (20) y modificación de la conducta reproductora (14), no permiten dar, por el momento, una explicación del todo satisfactoria sobre los cambios neurohormonales que tienen lugar en esa situación, y sugieren nuevas investigaciones. Por otra par-

te, recientes trabajos sobre ovulación y reproducción en la rata (2, 9, 11, 16, 17) plantean nuevas experiencias para estudiar la influencia de la 5-HT en la reproducción. Administrando una sola dosis de p-clorofenilalanina (p-CPA), en distintos momentos del ciclo, se observa una inhibición en la receptividad de la rata hembra (10), en contraposición con lo observado por otros autores en ratas machos y hembras (22, 26, 27, 30). Estos resultados sugerían estudiar la reproducción de ratas hembras en distintas condiciones de iluminación, y la influencia de la p-CPA [fármaco conocido por su efecto selectivo en la inhibición de la 5-HT (19)], en dosis más bajas y repetidas. Estas investigaciones constituyen el objeto del presente trabajo.

Material y métodos

Las experiencias se realizan en ratas hembras Wistar, mantenidas entre 20 y 25° C, con comida y agua *ad libitum*, desde los 30 días de edad.

Se disponen tres grupos en distintas condiciones de iluminación artificial: a) Uno de 20 ratas con 14 horas de luz y 10 de oscuridad. b) Otro de 10 ratas, en iluminación continua. c) Un tercero de 10 ratas en oscuridad continua.

En cada grupo, a la mitad de animales, se les administra p-CPA (100 mg/kg), i.p., tres dosis por semana durante dos meses. Al cabo de este tiempo, todos los animales, siguiendo en las condiciones de iluminación señaladas, se ponen en jaula individual con una rata macho durante cuatro días consecutivos, tiempo medio de duración del ciclo ovárico en este tipo de ratas. Pasados 12 ó 16 días se sacrifican por decapitación, se hace recuento de embriones, y se extrae encéfalo por determinación de 5-HT. Las ratas sometidas a tratamiento se sacrifican 16 ó 20 días después de la última dosis de p-CPA.

Desde la edad de dos meses hasta que son sacrificadas se realiza control diario

del ciclo ovárico mediante frotis vaginales a la misma hora. Los frotis vaginales de los días que las ratas hembras se ponen en condiciones de copulación, permite saber si hubo inseminación por la observación de espermatozoides, lo que constituye un dato decisivo para valorar la conducta reproductora.

Los machos de peso medio 300 g se utilizan después de comprobada su capacidad de fecundación en distintas condiciones de iluminación.

Para la determinación de 5-HT se extrae el encéfalo en tiempo inferior a cuatro minutos y se disecan distintas regiones. En todos los animales se valoró el contenido de 5-HT en hipotálamo. El análisis se hace por el método de CURZON y GREEN (3), basado en la fluorescencia que presentan los complejos de 5-HT con 0-ftaldehído. Las lecturas se realizan con longitudes de onda de 360 mμ de activación y 470 mμ de emisión.

Resultados

En la tabla I se exponen resumidamente los resultados.

Las ratas mantenidas a ciclos artificiales de luz/oscuridad y tratadas con p-CPA, presentan ciclo regular. Se observan espermatozoides en 8, y 7 quedan fecundadas, con un número medio de embriones normal ($8,28 \pm 0,95$). En las que no quedan preñadas se observa mayor frecuencia en aparecer fases de diestro en los días siguientes a la puesta en condiciones de copulación.

Las mantenidas en iluminación continua presentan fase de estro mantenida con alguna otra fase intercalada cada 6 ó 7 días. Se observa inseminación y fecundación en todas las ratas, con un número medio de embriones de $8,80 \pm 0,83$ que difiere poco del control.

Las ratas mantenidas en iluminación continua y tratadas con p-CPA, presentan ciclos en los que fases de estro en número de cuatro a seis consecutivas, se

Tabla I. Efecto de la p-clorofenilalanina (100 mg/kg) sobre la reproducción de ratas en distintas condiciones de iluminación.
Entre paréntesis número de animales por grupo.

Condiciones experimentales	Ciclo ovárico antes de poner en condiciones de copulación	N.º ratas inseminadas	N.º ratas preñadas	N.º embriones por rata preñada	Ciclo ovárico después de poner en condiciones de copulación	5-HT (hipotálamo) $\mu\text{g/g}$
Luz/oscuridad (10)	Normal	10	10	$10 \pm 1,70$	—	$2,14 \pm 1,01$
Luz/oscuridad + p-CPA (10)	Normal	8	7	$8,28 \pm 0,95$	Mayor frecuencia de diestro	$1,31 \pm 0,64^*$
Iluminación continua (5)	Gran predominio de estro	5	5	$8,80 \pm 0,83$	—	$2,29 \pm 0,27$
Iluminación continua + p-CPA (5)	Fases de estro seguidas, alternando con diestros	0	—	—	Diestro seguido más de 12 días en 4 ratas	$1,76 \pm 0,32$
Oscuridad continua (5)	Normal	5	5	$6,40 \pm 2,88^*$	—	$2,28 \pm 0,75$
Oscuridad continua + p-CPA (5)	Gran predominio de diestro	1	1	6	Diestro mantenido de 6 a 8 días	$2,16 \pm 0,68$

* $0,05 > P > 0,01$ en relación al primer grupo.

alternan con fases de diestro mantenidas de tres a cinco días. En ningún frotis vaginal se observan espermatozoides y ninguna rata queda fecundada. En los frotis vaginales de los días que siguieron a la puesta en condiciones de fecundación, se observan fases de diestro mantenido durante más de 12 días en la casi totalidad de ratas.

En oscuridad continua, los ciclos que presentan son regulares. Se produce inseminación y fecundación en todas, con una cifra media de embriones de $6,40 \pm 2,88$ inferior a la del grupo control ($0,05 > P > 0,01$).

En oscuridad continua y tratadas con p-CPA, en cuatro de las cinco ratas, el ciclo se caracteriza por la aparición de fases de diestro de cuatro a siete días consecutivos, alternando con fases de estro durante dos o tres días. En una sola se produce inseminación y fecundación

con seis embriones. Los frotis siguientes a la puesta en condiciones de fecundación se caracterizan por un predominio de fases de diestro que se mantiene de cuatro a ocho días consecutivos.

Los valores de 5-HT obtenidos son inferiores en los grupos sometidos a tratamiento en relación con los que, en las mismas condiciones de iluminación, no se tratan. Sólo tiene valor estadístico significativo entre los que estuvieron en ciclos artificiales de luz/oscuridad ($0,05 > P > 0,01$).

Los valores más altos, aunque con poca diferencia, se han obtenido en los mantenidos en iluminación continua sin tratamiento. En los mantenidos en oscuridad, los valores de 5-HT, apenas difieren entre los dos grupos. Datos obtenidos en estas experiencias y no recogidos en este trabajo, indican que los valores de 5-HT también son más altos, en corteza cere-

bral, en las ratas mantenidas en iluminación continua.

Discusión

Se observa un predominio de fases de estro en las ratas en iluminación continua, que se interpreta debido al bloqueo parcial en la síntesis de melatonina (20, 23, 32). El número de ratas preñadas no contradice con los resultados que señalan un aumento de la receptividad sexual en la rata hembra, en esas condiciones de iluminación (14). El tratamiento con p-CPA, en otro grupo, también en iluminación continua, pone de manifiesto una inhibición en la receptividad sexual y fases de diestro mantenidas durante más de 12 días, de modo similar a lo que ocurre en otras condiciones de iluminación con una sola dosis (10). Es de suponer que se favorece la luteinización del ovario por la existencia de mecanismos reflejos extra-vaginales (31).

Observación análoga proporciona el grupo de ratas en oscuridad continua y tratadas con p-CPA. Destacándose de los resultados el efecto inhibitor de p-CPA sobre los mecanismos de la conducta reproductora en distintas condiciones de iluminación.

En condiciones de ciclos de luz/oscuridad y con la dosis utilizada de 100 mg/kg, no se aprecia esa inhibición, que tan evidente fue también con una sola dosis de 300 mg/kg (10). Podría ser que la dosis de 100 mg/kg (aunque repetida), afecte menos la secreción de gonadotrofinas ya que los ciclos ováricos presentan cierta regularidad.

Los valores de 5-HT, determinados pasados 16 ó 20 días después de la última dosis de p-CPA, no manifiestan cambios muy marcados. El que los valores más altos de 5-HT en los animales en iluminación continua parecen estar de acuerdo con los ritmos de 5-HT observados en distintos momentos del día (15).

Aunque faltan datos para una explica-

ción más satisfactoria del papel de la 5-HT sobre la conducta reproductora, resultados anteriores (10) y los señalados en el presente trabajo, ponen de manifiesto un efecto de la p-CPA sobre la conducta reproductora que discrepa de otras (6, 22, 26, 27, 30) en los que se utilizaron patrones distintos.

Resumen

Se estudia la reproducción en ratas hembras mantenidas en ciclos artificiales de luz/oscuridad, en iluminación continua y en oscuridad continua. En cada grupo, a la mitad de ratas se les administra p-clorofenilalanina (p-CPA) — 100 mg/kg —, 3 dosis por semana, durante dos meses previos a la puesta en condiciones de copulación. Se valora la inseminación, fecundación, número de embriones, ciclo ovárico y nivel de 5-HT en hipotálamo. La administración de p-CPA tiene efecto inhibitor de la conducta reproductora, especialmente marcado en ratas mantenidas en iluminación continua y oscuridad continua. Las diferencias en los valores de 5-HT son más manifiestas entre los grupos mantenidos en ciclos de luz/oscuridad, sin tratamiento y tratados con p-CPA. Se destaca la importancia de la 5-HT cerebral en los mecanismos de la conducta reproductora.

Bibliografía

1. AXELROD, J.: *Am. Zool.*, 10, 259-267, 1970.
2. CARRASCOSA, M. A., CROFTON J. y TEJERA, V.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, 14, 7-14, 1970.
3. CURZON, G. y GREEN, AR. R.: *Brit. J. Pharmacol.*, 39, 653-655, 1970.
4. FRASCHINI, F., COLLU, R. y MARTINI, L.: En «The Pineal Gland» (GE. W. Wolstenholme y J. Knight, eds.). Churchill Livingstone, Edinburgh, 1971, pp. 259-273.
5. FRASCHINI, F. y MARTINI, L.: En «The hypothalamus» (L. Martini, M. Motta y F. Fraschini, eds.). Academic Press, New York, 1970, pp. 529-549.
6. GESSA, G. L., TAGLIAMONTE, A., TAGLIAMONTE, P. y BRODIE, B. B.: *Nature*, 227, 616-617, 1970.

7. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **29**, 189-196, 1973.
8. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **29**, 279-288, 1973.
9. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y LÓPEZ-GARCÍA, G.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **15**, 251-260, 1971.
10. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y MARCÓ, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 63-68, 1975.
11. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J., MARCÓ, J. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, **32**, 29-32, 1976.
12. GONZÁLEZ-BARÓN, S., VELAYOS, J. L., MARCÓ, J. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 53-62, 1975.
13. HOFFMAN, J. C.: *Biol. Reprod.*, **1**, 185-188, 1969.
14. HARDY, D. F.: *Physiol. Behav.*, **5**, 421-426, 1970.
15. HÉRY, F., ROVER, R. y GLOWINSKI, J.: *Brain. Res.*, **43**, 445-465, 1972.
16. JIMÉNEZ-VARGAS, J., GONZÁLEZ-BARÓN, S. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **17**, 1-7, 1973.
17. JIMÉNEZ-VARGAS, J., TEJERA, V. y GONZÁLEZ-BARÓN, S.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **14**, 123-127, 1970.
18. KAMBERI, I. A., MICAL, R. S. y PORTER, J. C.: *Endocrinology*, **88**, 1288-1293, 1971.
19. KOE, B. K. y WEISMANN, A.: *J. Pharmacol. Esp. Ther.*, **154**, 499-516, 1966.
20. LAWTON, I. W. y SCHWARTZ, N. B.: *Endocrinology*, **77**, 1140-1142, 1965.
21. MEYER, R. K. y MCCORMACK, C. E.: *Endocrinology*, **38**, 187-194, 1967.
22. MEYERSON, B. J. y LEWANDER, T.: *Life Sci.*, **9**, 661-671, 1970.
23. NEGRO-VILLAR, A., DICKERMAN, E. y MEITES, J.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **127**, 751-754, 1968.
24. REITER, R. J. En «Physiologic role of the pineal gland. The Action of Hormone» (P. P. Foa, ed.). Springfield, Thomas, 1971, pp. 283-314.
25. REITER, R. J.: *Ann. Rev. Physiol.*, **35**, 305-314, 1973.
26. SHEARD, M. H.: *Brain Res.*, **15**, 524-528, 1969.
27. SHILLITO, E.: *Brit. J. Pharmacol.*, **35**, 305-315, 1970.
28. SINGH, K. B.: *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **103**, 1078-1079, 1969.
29. SINGH, K. B.: *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **104**, 1004-1007, 1969.
30. TAGLIAMONTE, A., TAGLIAMONTE, P., GESSA, G. L. y BRODIE, B. B.: *Science*, **166**, 1433-1435, 1969.
31. TELEISNIK, S., CALIGARIS, L. y ASTRADA, J. J.: *Endocrinology*, **79**, 49-54, 1966.
32. WURTMAN, R. J., AXELROD, J. y PHILLIPS, L. S.: *Science*, **142**, 1071-1073, 1963.

