

Factores reflejos que modifican el efecto de la p-clorofenilalanina sobre la ovulación y reproducción en la rata

J. Marcó, A. Tosar, S. González-Barón * y J. Jiménez-Vargas

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

(Recibido el 2 de junio de 1977)

J. MARCO, A. TOSAR, S. GONZALEZ-BARON and J. JIMENEZ-VARGAS. *Reflex Factors that Modify the Effect of p-Chlorophenylalanine on Ovulation and Reproduction in Rats*. Rev. esp. Fisiol., 34, 81-86. 1978.

The appearance of reflex ovulation in rats under the influence of the copulation, has been studied. Evaluation of insemination, fecundation, number of embryos, ovarian cycle and ovulation in several groups of rats treated with doses of p-CPA (300 mg/Kg, i.p.), have been made.

The application of p-CPA 48 hours before the estrus phase, inhibits the ovulation. This increases significantly through copulation. Reproduction is totally inhibited by p-CPA in animals under copulation conditions during 24 hours of the estrus phase. The inhibition is disappears if placed under copulation conditions during a full cycle. Inseminated rats had a 33 % decrease in number of embryos with respect to the control group.

The application of p-CPA 24 hours before the estrus phase does not produce any inhibition effect. The decrease observed in the number of embryos is non-significant. When p-CPA is applied, instead, 48 hours before the estrus phase, there is total inhibition of the reproductive conduct.

En muchas especies de mamíferos la ovulación es un proceso desencadenado por la cópula, como en el caso de la coneja y de la gata, conociéndose el proceso como ovulación refleja. En la rata y en otras especies la ovulación es espon-

tánea, produciéndose periódicamente como consecuencia de un ritmo intrínseco del sistema neuroendocrino.

Hay datos experimentales de más de 40 especies de mamíferos, de las cuales sólo en 6 la ovulación es espontánea (19), lo que indica que en la mayoría de las especies la ovulación depende de la cópula. Además, las dos formas de ovulación no se pueden diferenciar como dos tipos

* Dirección actual: Departamento de Bioquímica y Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.

independientes, ya que en hembras de ovulación cíclica se han observado ovulaciones fuera del ritmo normal provocadas por estímulos nerviosos sobreañadidos (1, 17), por cópula (3, 25), por la excitación vaginal artificial (4) o por estimulación de estructuras centrales (6, 7). La cópula neutraliza el efecto inhibitorio de la ovulación de algunos fármacos (8, 11, 19, 27). En la determinación de diversas hormonas se ha encontrado que la copulación aumenta los niveles en suero de progesterona (2), prolactina (5), LH (28, 31) y que el aumento es proporcional a la intensidad de la conducta sexual (28). La copulación incrementa el número de óvulos implantados (16, 30, 31). Se pone de manifiesto la importancia, en los animales de ovulación espontánea, de los reflejos dependientes de descargas sensoriales aferentes en relación con la esfera genital o de fenómenos emocionales más amplios que influyen en el mecanismo de control biológico de la ovulación, facilitándola.

Se estudia la modificación de la ovulación y reproducción en ratas tratadas previamente con p-clorofenilalanina (p-CPA). Este fármaco se viene utilizando por su inhibición selectiva en la síntesis de la 5-hidroxitriptamina (5-HT), produciendo una intensa depleción de la serotonina cerebral, sin afectar a las catecolaminas (21, 22). La 5-HT de neuronas centrales tiene un papel destacado en la regulación de la secreción de gonadotrofinas hipofisarias (20, 24, 29, 32) y en la conducta reproductora (9, 26). En resultados obtenidos en nuestro laboratorio (12-14) se observaba que la administración de p-CPA (300 mg/kg, i.p.) en las distintas fases del ciclo ovárico, inhibía totalmente la ovulación y la reproducción en ratas que permanecían en condiciones de copulación durante 16 y 24 horas. En este trabajo tratamos de observar la posible existencia de mecanismos reflejos que supriman la inhibición de la ovulación y la reproducción producida por la p-CPA, al

permanecer los animales en condiciones de copulación durante un ciclo completo, en vez de 24 horas.

Material y métodos

Se utilizan ratas Wistar hembras de peso aproximado a 200 g y machos de peso medio 300 g, cuya capacidad de fecundación se ha comprobado. Se mantienen en condiciones de iluminación artificial de 14 horas de luz y 10 de oscuridad, temperatura ambiente (20 a 25° C) y comida y agua *ad libitum*. Se realiza control del ciclo ovárico mediante frotis vaginales diarios a la misma hora, utilizándose sólo las que presentan ciclo regular por lo menos desde 12 días antes de las experiencias. Los frotis vaginales se continúan hasta el momento de sacrificar los animales. La p-CPA se administra a las ratas hembras a la hora 9 del metaestro (300 mg/kg, i.p.).

Estudio de la reproducción. Cada rata hembra se pone con un macho en jaula individual en una fase concreta del ciclo durante 4 días (un ciclo completo). El frotis vaginal de los días en que están en condiciones de copulación tiene especial interés, ya que la presencia de espermatozoides es la comprobación de haberse producido inseminación y sirve como valoración de la conducta reproductora. Las ratas hembras se sacrifican 15 días después de ponerlas con los machos y se hace recuento de embriones.

Estudio de la ovulación. Se controla el ciclo ovárico durante 15 días, valorando especialmente los frotis de los 4 días posteriores al estro teórico. En un grupo reducido de 6 ratas, se disecan trompas y ovarios, realizándose cortes seriados de 10 μ de espesor para ulterior estudio histológico de ovarios y recuento de óvulos en las trompas.

La distribución de experiencias es la siguiente:

Grupo A. Desde la hora 9 del proestro durante cuatro días, 10 ratas control y 12 tratadas con p-CPA, a la hora 9 del metaestro, 48 horas antes de ponerlas en condiciones de copulación.

Grupo B. Veinte ratas tratadas con p-CPA a la hora 9 del metaestro, de las cuales 6 se sacrifican en la fase de estro teórico para estudio histológico de ovarios y recuento de óvulos y en 14 se controla el ciclo ovárico.

Grupo C. Desde la hora 9 del estro, durante 24 horas, 12 ratas control y dos grupos de 12 ratas tratadas con p-CPA 24 y 48 horas, respectivamente, antes de ponerlas en condiciones de copulación.

Las ratas tratadas con p-CPA presentan inseminación, quedando preñadas 8 de los 12 animales, con un número medio de embriones de $8,87 \pm 1,48$ (tabla I).

Grupo B. En el grupo reducido de 6 ratas tratadas con p-CPA y sacrificadas en la fase de «estro teórico» se comprueba la ausencia de óvulos en los cortes seriados de trompa y la sustitución de la fase de estro por una fase leucocitaria. Los cortes de ovario presentan abundante luteinización (fig. 1). En 14 ratas se

Tabla 1. Efecto de la p-clorofenilalanina (300 mg/kg) administrada 48 h antes de la fase de estro en ratas mantenidas un ciclo completo en condiciones de copulación.

Condiciones experimentales	Núm. de ratas	Inseminación	Ratas preñadas	Embriones por rata
Control	10	10	10	$10 \pm 1,70$
p-CPA	12	12	8	$8,87 \pm 1,48$

Resultados

Grupo A. Todas las ratas control quedan preñadas y el número medio de embriones es $10 \pm 1,70$. Todas las ratas tra-



Fig. 1. Sección de ovario y trompas de rata tratada con p-CPA y sacrificada en la fase de «estro teórico». Se observa ausencia de óvulos en las trompas y abundante luteinización en el ovario ($\times 75$).

valoran especialmente los frotis de los 4 días posteriores al estro teórico, tomándose como signo de ovulación la aparición de fases de estro. De las 14, sólo 3 presentan fase de estro en esos 4 días y, por lo tanto, ovulación, mientras que en 11 sólo aparecen fases de diestro, con lo que no hubo ovulación.

Comparando estos resultados con los obtenidos bajo el mismo tratamiento y en condiciones de copulación (tabla I), se observa que el número de ratas que ovulan es mayor en condiciones de copulación, siendo significativo el aumento de la ovulación ($0,05 > p > 0,02$).

Grupo C. Todas las ratas control mantenidas en condiciones de copulación 24 horas en la fase de estro quedan preñadas, con un número medio de embriones de $9,50 \pm 2,09$. Todas las tratadas con p-CPA 24 horas antes de ponerlas en condiciones de copulación quedan preñadas, con un número medio de embri-

Tabla II. Efecto de la p-clorofenilalanina (300 mg/kg) administrada 24 y 48 horas antes de la hora 9 del estro. Copulación durante 24 h. Grupos de 12 ratas.

Condiciones experimentales	Ratas preñadas	Inseminación	Embriones por rata
Control	12	12	$9,50 \pm 2,09$
p-CPA 24 h	12	12	$7,83 \pm 3,04$
p-CPA 48 h	0	—	—

nes inferior ($7,83 \pm 3,04$). Ninguna de las tratadas con p-CPA 48 horas antes de colocarlas en condiciones de copulación quedan preñadas, no observándose espermatozoides en el frotis del día siguiente (tabla II).

Discusión

Los animales tratados con p-CPA y que permanecen en condiciones de copulación durante un ciclo completo (4 días), presentan una disminución no sig-

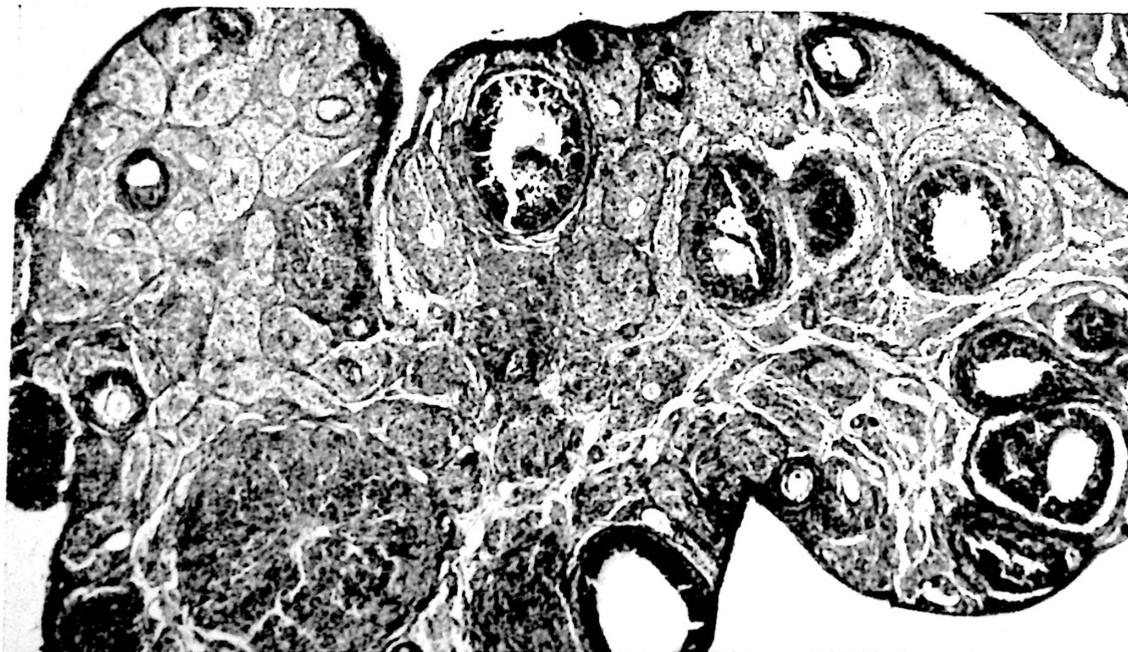


Fig. 2. Sección de ovario de rata tratada con p-CPA y sacrificada en la fase de «estro teórico».

Se aprecia luteinización difusa con cuerpos lúteos destacados ($\times 50$).

nificativa respecto al grupo control del número de ratas preñadas y número de embriones por rata. No se manifiesta la inhibición total en la ovulación y en la conducta reproductora observada en trabajos anteriores (13-17), cuando con el mismo tratamiento se mantienen las ratas hembras en condiciones de copulación 16 ó 24 horas.

En los animales tratados con p-CPA que no permanecen en condiciones de copulación se observa una marcada luteinización en los ovarios (fig. 2) y un efecto inhibitorio en la ovulación, ya que sólo ovulan 3 en los 4 días posteriores a la fase de estro teórico. En los animales que con el mismo tratamiento permanecen en condiciones de copulación durante 4 días, se produce un aumento significativo en la ovulación. Se pone de manifiesto que la permanencia en condiciones de copulación durante un ciclo completo, parece neutralizar la inhibición de la ovulación y de la reproducción dependiente de la disminución de los niveles de 5-HT cerebral por la administración de la p-CPA. Probablemente mecanismos reflejos vaginales en relación con la cópula, dan lugar a ovulaciones reflejas al producir cambios en la secreción hormonal hipofisaria. La interferencia de ovulaciones reflejas en el ciclo espontáneo de la rata, aun teniendo los animales en las condiciones más adecuadas para la regularidad de los ciclos, ha sido observado repetidamente en numerosos trabajos (3, 4, 8, 10, 11, 17, 18, 33). La depleción de los depósitos de 5-HT cerebrales producida por la p-CPA (300 mg/kg) al inhibir la síntesis de la serotonina, se realiza de forma progresiva, alcanzando su grado máximo a las 48 horas (22, 27, 30). El efecto inhibitorio en la conducta reproductora no se manifiesta cuando se administra la p-CPA 24 horas antes de la fase de estro, ya que todos los animales quedan preñados y sus frotis vaginales son normales, produciéndose únicamente una disminución del número de embri-

nes por rata con respecto al grupo control. Cuando se administra la p-CPA 48 horas antes del estro teórico se produce el efecto inhibitorio, ya que ninguna rata queda preñada, no se observan espermatozoides en el frotis vaginal del día siguiente de estar en condiciones de copulación y hay sustitución del frotis de estro por el característico de la fase de diestro, que se prolonga de 4 a 8 días consecutivos en un número importante de ratas. La administración de la p-CPA 24 horas antes de la fase de estro no produce una suficiente disminución de los niveles de 5-HT en el cerebro para producir una inhibición en la conducta reproductora por la modificación de la secreción de gonadotrofinas hipofisarias.

Resumen

Se estudia la influencia de la copulación en la aparición de ovulaciones reflejas en la rata. Se valora la inseminación, fecundación, el número de embriones, el ciclo ovárico y la ovulación en diversos grupos de ratas tratadas con p-CPA (300 mg/kg i.p.).

La p-CPA administrada 48 horas antes de la fase de estro produce inhibición de la ovulación. Por la copulación la ovulación aumenta significativamente. La reproducción en animales que permanecen en condiciones de copulación durante 24 horas en la fase de estro es inhibida totalmente por la p-CPA. Se suprime la inhibición si se ponen en condiciones de copulación durante un ciclo completo. En todas las ratas se produce inseminación y respecto al grupo control hay una disminución del 33 % en el número de embriones por rata.

El efecto inhibitorio de la p-CPA no se produce cuando se administra con 24 horas de antelación a la fase de estro, observándose sólo una disminución no significativa del número de embriones por rata respecto al grupo control. Cuando se administra la p-CPA 48 horas antes de la fase de estro, la inhibición de la conducta reproductora es total.

Bibliografía

1. ADLER, N. T.: *Anatomical Record*, **160**, 305, 1968.

2. ADLER, N. T., RESKO, J. A. y GOY, R. W.: *Physiol. Behav.*, 5, 1003-1007, 1970.
3. ARON, C., ROOS, J. y ASCH, G.: *Neuroendocrinology*, 3, 47-54, 1968.
4. BALL, J.: *Am. J. Physiol.*, 107, 698, 1934.
5. DAVIDSON, J. M., SMITH, E. R. y BOWERS, C. Y.: *Endocrinology*, 93, 1185-1192, 1973.
6. EVERETT, J. W.: *Anat. Rec.*, 112, 327, 1952.
7. EVERETT, J. W. y QUINN, D. L.: *Endocrinology*, 78, 141-150, 1966.
8. EVERETT, J. W.: *Endocrinology*, 80, 145-154, 1967.
9. GESSA, G. L., TAGLIAMONTE, A., TAGLIAMONTE, P. y BRODIE, B. B.: *Nature*, 227, 616, 1970.
10. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, 29, 189-196, 1973.
11. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, 29, 279-288, 1973.
12. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J. y MARCÓ, J.: *Rev. esp. Fisiol.*, 31, 63-68, 1975.
13. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J., MARCÓ, J. y HERNÁNDEZ, F.: *Rev. esp. Fisiol.*, 32, 29-32, 1976.
14. GONZÁLEZ-BARÓN, S., JIMÉNEZ-VARGAS, J., MARCÓ, J. y RIBAS, B.: *Rev. esp. Fisiol.*, 32, 301-306, 1976.
15. GONZÁLEZ-BARÓN, S., MARCÓ, J. y JIMÉNEZ-VARGAS, J.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, 19, 25-40, 1975.
16. HARDY, D. F.: *Behaviour*, 41, 288-297, 1972.
17. HARRINGTON, F. E., EGGERT, R. G., WILBUR, R. D. y LINKERHEIMER, W. H.: *Endocrinol.*, 79, 1130-34, 1966.
18. JIMÉNEZ-VARGAS, J., TEJERA, V. y GONZÁLEZ-BARÓN, S.: *Rev. Med. Univ. Navarra*, 14, 123-127, 1970.
19. JÖCHE, W.: «Handbuch der experimentellen Pharmakologie». Tomo 22/2. Die Gestagene (K. Junkmann, ed.). Springer-Verlag, Berlin, 1969, págs. 606-607.
20. KAMBERI, I. A., MICAL, R. S. y PORTER, J. C.: *Endocrinology*, 88, 1288, 1971.
21. KIEFFER, J. D. y HARPER, M. J. K.: *Nature*, 231, 125, 1971.
22. KOE, B. K. y WEISSMAN, A.: *J. Pharmacol. exp. Ther.*, 154, 499-516, 1966.
23. KOELLA, W. P., FELDSTEIN, A. y CZIEMAN, J. S.: *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, 25, 481-483, 1968.
24. KORDON, C. y GLOWINSKI, J.: *Neuropharmacology*, 11, 153, 1972.
25. KREY, L. C. y EVERETT, J. W.: *Endocrinology*, 93, 377-384, 1973.
26. MEYERSON, B. J. y LEWANDER, T.: *Life Sci.*, 9, 1, 661, 1970.
27. MILLER, F. P., COX, R. H., SNODGRASS, W. R. S. y MAICKEL, R. P.: *Biochem. Pharmacol.*, 19, 435-442, 1970.
28. MOSS, R. L. y COOPER, K. J.: *Endocrinology*, 92, 1748-1753, 1973.
29. REITER, R. J.: *Endocrinol. Exp.*, 6, 3, 1972.
30. RODGERS, C. H. y SCHWART, N. B.: *Endocrinology*, 90, 461-465, 1972.
31. RODGERS, C. H. y SCHWART, N. B.: *Endocrinology*, 92, 1475-1479, 1973.
32. SCHNEIDER, H. P. G. y MCCANN, S. M.: *Endocrinology*, 86, 1127, 1970.
33. YING, S. Y. y MEYER, R. K.: *Fertil. Steril.*, 20, 772-779, 1969.