

Supresión por copulación del efecto inhibitor de la p-clorofenilalanina sobre la ovulación en la rata

J. Marcó y J. Jiménez-Vargas

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

(Recibido el 31 de mayo de 1978)

J. MARCO and J. JIMENEZ-VARGAS. *Supression by Copulation of the Inhibitory Effect of p-Chlorophenylalanine on Rat Ovulation*. Rev. esp. Fisiol., 35, 75-84. 1979.

The effect of copulating on reflex ovulation was studied in rat. The effect of PCPA (300 mg/kg, i.p.) on ovulation and reproduction was compared by evaluating number of oocytes in tubes, histologic features of ovaries, vaginal cycle, insemination, fertilization and number of embryos per rat.

PCPA, administered on 9th and 16th h of the estrus phase, totally inhibits ovulation, stimulates reproductive behaviour and prolongs the estrogenic phase. When the animals are kept in copulatory conditions for 16 or 46 hours, the inhibition induced in ovulation disappears to the extent that 60 % of the rats become pregnant though the number of embryos is under that of the control group.

The farther the treatment with PCPA within the same cycle in the ovulatory period, the greater the inhibitory effect on ovulation is and the lesser the neutralizing effect produced by reflexes related to copulation. Administration of PCPA at the 16 hour of the diestrus causes a greater increase in the average number of embryos as compared to administration at the 9 hour.

In periods longer than 48 hours before ovulation, the inhibition brought about by PCPA is not suppressed by copulatory conditions kept for 16 or 24 hours and is only neutralized if they are kept during a complete cycle. Those treated with PCPA in the diestrus phase and maintained in copulatory conditions for 46 hours, present a higher average of embryos than those maintained in similar conditions for 16 hours.

En las ratas y otras especies de mamíferos la ovulación es espontánea produciéndose cíclicamente como consecuencia de un ritmo intrínseco del sistema neuroendocrino. En otras especies como la coneja y la gata la ovulación es refleja, desencadenándose por la cópula. Sin em-

bargo, las dos formas de ovulación no son dos tipos independientes, ya que en hembras de ovulación espontánea se han observado ovulaciones reflejas por estímulos nerviosos sobreañadidos (1, 19), por la cópula (3, 29), por excitación vaginal artificial (6), o por estímulo de es-

estructuras centrales (7, 8). La cópula neutraliza el efecto inhibitor de la ovulación de algunos fármacos (9, 12, 23, 31, 36) y aumenta las concentraciones plasmáticas de hormonas como la progesterona (2), la prolactina (6) y la LH (37-39), siendo el aumento proporcional a la intensidad de la conducta sexual (37). La copulación incrementa el número de óvulos implantados (18, 38).

En trabajos anteriores se puso de manifiesto que, al poner ratas en condiciones de copulación durante 48 horas desde la hora 8 de diestro, se producían ovulaciones reflejas que suprimían el efecto inhibitor sobre la ovulación de la reserpina administrada en la hora 8 de diestro (11, 12). También se observó que el efecto inhibitor sobre la ovulación y reproducción de la p-clorofenilalanina (PCPA) administrada en períodos alejados del momento de la ovulación (48 horas antes), era suprimido cuando los animales se mantienen en condiciones de copulación durante un ciclo completo (31). Se pone de manifiesto en los animales de ovulación espontánea la importancia 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.

La 5-HT de neuronas centrales tiene un papel destacado en la regulación de la secreción de gonadotrofinas hipofisarias (16, 20, 24, 28, 35, 43) y en la conducta reproductora (10, 14, 17, 34, 36, 40, 41). Su disminución por la PCPA en períodos alejados de la rotura folicular produce alargamiento de la fase de diestro de 3 a 7 días consecutivos e inhibición de la conducta reproductora (14, 15, 17). En períodos cercanos a la ovulación, da lugar a aumento en la conducta reproductora (36, 41) con alargamiento de la fase de estro de 2 a 4 días consecutivos (32). En todos los casos la disminución intracerebral de 5-HT inhibe la descarga de

LH e impide la ovulación (15, 16, 32).

En este trabajo tratamos de observar la posible existencia de ovulaciones reflejas que supriman la inhibición de la ovulación producida por la PCPA al permanecer los animales en condiciones de copulación desde la hora 16 de proestro, durante 16 y 46 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 ha sido comprobada. Se mantienen en condiciones de iluminación y temperatura ambiente (20 a 25° C), con 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 PCPA se disuelve en agua destilada con 1 % de Tween 80. Se administra a las ratas hembras en una sola dosis de 300 mg/kg por vía i.p. (30 mg/ml) en distintas horas y fases del ciclo ovárico.

El estudio de la ovulación se realiza por recuento de óvulos en cortes seriados de trompas y ovarios, según la técnica descrita en anteriores trabajos (11, 22, 32). Se realiza también un estudio histológico de ovarios. En el estudio de la reproducción, cada rata hembra se coloca con un macho en jaula individual en una fase concreta del ciclo durante 16 o 46 horas según los experimentos.

La distribución de los experimentos es la siguiente:

Grupo A. Sacrificadas a la hora 18 de estro para el estudio de la ovulación, 11 ratas control, 12 tratadas con PCPA a la hora 9 de diestro y 10 tratadas con PCPA a la hora 16 de diestro.

Grupo B. Mantenidas en condiciones de copulación durante 16 horas, desde

la hora 16 de proestro, 12 ratas control, 10 tratadas con PCPA a la hora 9 de diestro y 11 tratadas con PCPA a la hora 16 de diestro.

Grupo C. Mantenidas en condiciones de copulación durante 46 horas, desde la hora 16 de proestro, 10 ratas control, 11 tratadas con PCPA a la hora 9 de diestro y 10 tratadas con PCPA a la hora 16 de diestro.

Resultados

Grupo A. En todas las ratas control sacrificadas en la hora 18 de estro se produce ovulación con un número medio de óvulos en la trompa de $10,00 \pm 3,09$ (figura 1). El número medio de folículos maduros en el ovario es de $4,81 \pm 1,49$, siendo significativamente menor al resto de los grupos. En ninguna de las trata-

das con PCPA en las horas 9 y 16 de diestro se observan óvulos en la trompa. Los ovarios (fig. 2) presentan abundantes folículos maduros sin romper con el oocito en el interior (tabla I).

Grupo B. De las 12 ratas control que permanecen 16 horas en condiciones de copulación se observan espermatozoides en 10 y quedan preñadas 8, con un número medio de embriones de 11,37. De las 10 tratadas con PCPA a la hora 9 de diestro, 7 presentan inseminación y 6 quedan preñadas con un número medio de embriones de 8,00, que es significativamente menor respecto al grupo control. En las que copulan, la fase de estro se mantiene de 2 a 3 días consecutivos, mientras que en las que copulan y no quedan fecundadas, la fase de diestro se alarga durante 5 días consecutivos (tabla II). En todas las tratadas con PCPA

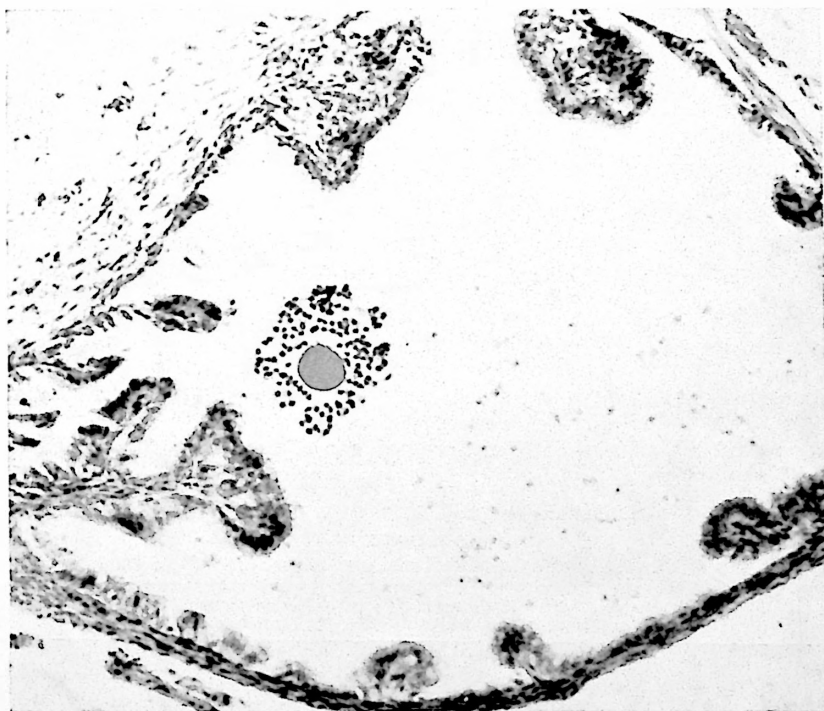


Fig. 1. Sección de trompa en la que se observa un óvulo rodeado del cúmulo ovigero ($\times 150$).

en la hora 16 de diestro se observan espermatozoides en el frotis vaginal, quedando preñadas 7 de las 11 ratas (63,63 %), con un número medio de embriones de 9,14, que es lieramente inferior al grupo control. Las no preñadas mantienen la fase de estro de 2 a 5 días consecutivos, mientras que las preñadas no alargan la fase de estro (tabla II).

Grupo C. Todas las ratas control que permanecen 46 horas en condiciones de copulación desde la hora 16 de proestro, quedan preñadas con un número medio de embriones de 10,80. De las 11 tratadas con PCPA a la hora 9 de diestro, en 8 se observan espermatozoides en el frotis vaginal y 6 quedan preñadas con un número medio de embriones de 9,00. Respecto



Fig. 2. Sección de ovario de rata tratada con PCPA a la hora 9 de diestro y sacrificada a la hora 18 de estro.

Se observan 2 folículos maduros sin romper, con el oocito en el interior ($\times 40$).

Tabla I. Efecto de la *p*-clorofenilalanina (300 mg/kg) administrada en las horas 9 y 16 de diestro.

Sobre la ovulación en ratas sacrificadas a la hora 18 de estro.

Condiciones experimentales	N.º de ratas	N.º de ratas que ovulan	N.º de óvulos por rata	N.º de folículos maduros
Control	11	11	10,00 $\pm$ 3,09	4,81 $\pm$ 1,49 *
PCPA, hora 9	12	0	—	15,00 $\pm$ 1,81
PCPA, hora 16	10	0	—	15,10 $\pm$ 1,78

* $p < 0,001$ respecto al resto de los grupos.

al grupo control la disminución del número de preñadas es significativo. En las ratas que no copulan la fase de estro se alarga de 2 a 4 días consecutivos, mientras que en las que copulan y no quedan preñadas, mantienen primero la fase de estro 2 días y a continuación la de diestro 4 días (tabla II). Todas las tratadas con PCPA en la hora 16 de diestro presentan inseminación y 6 de las 10 ratas quedan preñadas con un número medio de embriones de 10,16. Respecto al grupo control la disminución del número de preñadas es significativo. El ciclo de las que copulan y no quedan preñadas presenta alargamiento de la fase de estro de 2 a 3 días consecutivos (tabla II).

Discusión

La disminución de los niveles de 5-HT cerebral, producida por la PCPA administrada en la hora 9 y 16 de diestro o en periodos más alejados, 48 horas antes de la rotura folicular (14, 15), inhibe totalmente la ovulación (fig. 3). Se ha observado que antes del pico de LH en el proestro de las ratas hembras se produce un aumento brusco de la liberación de 5-HT (20, 37), interpretándose que la descarga de 5-HT facilita la liberación de los factores hipotalámicos que controlan la secreción de LH por la hipófisis. La PCPA, al disminuir los depósitos de 5-HT (26), impide ese aumento brusco

Tabla II. Efecto de la *p*-clorofenilalanina (300 mg/kg) administrada en las horas 9 y 16 de diestro sobre la copulación.

Las ratas fueron colocadas en condiciones de copulación desde la hora 16 de proestro durante 16 y 46 horas.

Condiciones experimentales	Horas en condiciones de copulación	N.º de ratas	N.º de ratas que copulan	N.º de ratas preñadas	N.º de embriones por rata	Ciclo de ratas que copulan	Ciclo de ratas que no copulan
Control	16	12	10 (83,33 %)	8 (66,66 %)	11,37 ± 1,82	Diestro de 3 a 5 días consecutivos	Normal
PCPA Hora 9	16	10	7 (70 %)	6 (60 %)	8,00 ± 1,72 *	Diestro 5 días consecutivos	Estro de 2 a 3 días consecutivos
PCPA Hora 16	16	11	11 (100 %)	7 (63,63 %)	9,14 ± 1,36	Estro de 2 a 5 días consecutivos	—
Control	46	10	10 (100 %)	10 (100 %)	10,80 ± 1,87	—	—
PCPA Hora 9	46	11	8 (72,72 %)	6 ** (54,54 %)	9,00 ± 2,00	Estro 2 días y diestro 4 días	Estro de 2 a 4 días consecutivos
PCPA Hora 16	46	10	10 (100 %)	6 ** (60 %)	10,16 ± 2,65	Estro de 2 a 3 días consecutivos	—

* 0,05 > p > 0,02 respecto al primer grupo.

** 0,05 > p > 0,02 respecto al cuarto grupo, control.

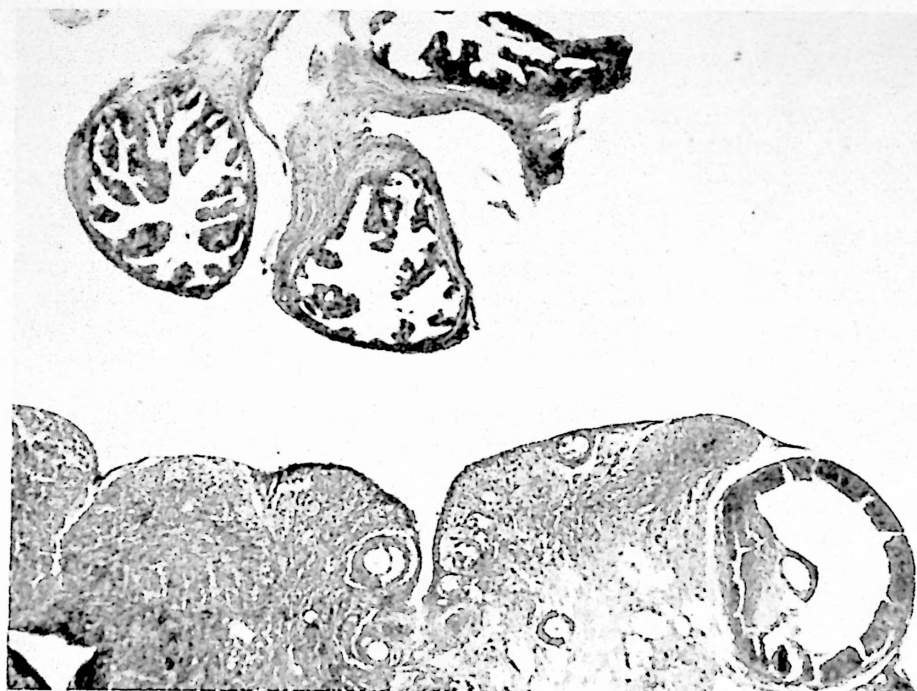


Fig. 3. Sección de trompa y ovario de rata tratada con PCPA a la hora 16 de diestro y sacrificada a la hora 18 de estro.

Se aprecia ausencia de óvulos en la trompa y en el ovario un folículo maduro sin romper, con el oocito en el interior ($\times 40$).

antes de la rotura folicular y por tanto la descarga de LH y la ovulación. Otros autores han señalado un control inhibidor de la 5-HT sobre la descarga de LH (24, 27, 28, 30), que es antagonizado por la progesterona (5, 24, 40, 42, 43). Se cree que es una acción periférica de la 5-HT en dosis no fisiológicas que, a través de la disminución de la secreción de progesterona por vasoconstricción a nivel de los ovarios, impide la descarga de LH y la ovulación (25, 42, 43).

El estudio comparativo del efecto de la PCPA administrada en la hora 9 y 16 de diestro sobre la ovulación y la reproducción (tabla III), pone de manifiesto que la inhibición de la ovulación por la PCPA no se produce cuando los animales permanecen en condiciones de copu-

lación durante 16 o 46 horas. Parece ser que existen mecanismos reflejos en relación con la cópula, que neutralizan la inhibición de la ovulación dependiente de la disminución de los niveles de 5-HT cerebral por la PCPA.

Al permanecer 16 horas en condiciones de copulación desde la hora 16 de proestro, 6 de las 10 ratas tratadas con PCPA en la hora 9 de diestro quedan preñadas (60 %). De los 11 animales tratados en la hora 16 de diestro, 7 quedan preñados (63,63 %) con un número medio de embriones menor respecto al grupo control. Por lo tanto, se ha producido ovulación, aunque, respecto al control, el número de óvulos y ratas que ovulan es menor.

En las tratadas en la hora 9 de diestro

Tabla III. *Estudio comparativo de la ovulación y la fecundación en ratas tratadas con p-clorofenilalanina (300 mg/kg) en las horas 9 y 16 de diestro. Fecundación desde la hora 16 de proestro durante 16 y 46 horas.*

Condiciones experimentales	Ovulación		Fecundación 16 horas		Fecundación 46 horas	
	N.º de ratas que ovulan	N.º de óvulos por rata	N.º de ratas preñadas	N.º de embriones por rata	N.º de ratas preñadas	N.º de embriones por rata
Control	11/11	10,00 ± 3,09	8/12 (66,66 %)	11,37 ± 1,82	10/10 (100 %)	10,80 ± 1,87
PCPA Hora 9	0/12	—	6/10 (60 %)	8,00 ± 1,72 *	6 */11 (54,54 %)	9,00 ± 2,00
PCPA Hora 16	0/10	—	7/11 (63,63 %)	9,14 ± 1,36	6 */10 (60 %)	10,16 ± 2,65

* 0,05 > p > 0,02 respecto al primer grupo.

tro, el número medio de embriones es significativamente menor respecto al control. Sin embargo, al tratar a la hora 16 de diestro, el número de ratas preñadas y número medio de embriones es mayor respecto al grupo tratado a la hora 9 de diestro y menor respecto al control. En trabajos anteriores se había observado que en las mismas condiciones de copulación, administrada la PCPA a la hora 9 de metaestro (48 antes de la ovulación), se producía inhibición total de la reproducción (14, 15). Sólo cuando los animales permanecían en condiciones de copulación durante un ciclo completo se suprimía la inhibición en la reproducción (31). Se pone de manifiesto que dentro de un mismo ciclo, cuanto más alejado del momento de la ovulación es el tratamiento con PCPA, mayor es el efecto inhibitorio en la ovulación y menor su neutralización por mecanismos reflejos relacionados con la cópula.

En los animales que permanecen en condiciones de copulación durante 46 horas (tabla III), el número medio de embriones al tratar con PCPA se aproxima al control, especialmente cuando el tratamiento es en la hora 16 de diestro. Parece deducirse que cuanto mayor es el efecto reflejo de la cópula, mayor es la capacidad de suprimir la acción inhibi-

dora de la PCPA sobre la ovulación, aunque no afecta al número de ratas preñadas, que se mantiene significativamente menor al grupo control. Probablemente, mecanismos reflejos relacionados 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, 9, 11, 12, 19, 21).

Resumen

Se estudia la influencia de la copulación en la aparición de ovulaciones reflejas en la rata. Se compara el efecto de la PCPA (300 mg/kg, i.p.) sobre la ovulación y la reproducción, valorándose el número de óvulos en la trompa, aspecto histológico de los ovarios, ciclo vaginal, inseminación, fecundación y número de embriones por rata.

La PCPA administrada en las horas 9 y 16 de diestro, inhibe totalmente la ovulación y estimula la conducta reproductora con alargamiento de la fase de estrus. La inhibición de la ovulación es suprimida cuando los animales permanecen en condiciones de copulación durante 16 ó 46 horas de forma que el 60 % de las ratas quedan preñadas con un número medio de embriones que es inferior al control.

Cuanto más alejado del momento de la ovulación dentro de un mismo ciclo es el tratamiento con PCPA, mayor es el efecto inhibidor en la ovulación y menor su neutralización por mecanismos reflejos relacionados con la cópula. Al administrar PCPA en la hora 16 de diestro, el número medio de embriones es mayor que al tratar en la hora 9 de diestro. En períodos más alejados, 48 horas antes de la rotura folicular, la inhibición de la ovulación por la PCPA no es suprimida al permanecer en condiciones de copulación 16 ó 24 horas y sólo se neutraliza al permanecer un ciclo completo. En las tratadas con PCPA en diestro y que permanecen en condiciones de copulación durante 46 horas, el número medio de embriones es mayor respecto a las que en las mismas condiciones permanecen 16 horas en condiciones de copulación.

Bibliografía

- ADLER, N. T.: *J. Comp. Physiol. Psychol.*, **69**, 613-622, 1969.
- ADLER, N. T., J. A. RESKO y R. W. GOY: *Physiol. Behav.*, **5**, 1003-1007, 1970.
- ARON, C., J. ROOS y G. ASCH.: *Neuroendocrinology*, **3**, 47-54, 1968.
- BALL, J.: *Am. J. Physiol.*, **107**, 698, 1934.
- BARRACLOUGH, C. A., R. COLLU, R. MASA y L. MARTINI: *Endocrinology*, **88**, 1437-1447, 1971.
- DAVIDSON, J. M., E. R. SMITH y C. Y. BOWERS: *Endocrinology*, **93**, 1185-1192, 1973.
- EVERETT, J. W.: *Anat. Rec.*, **112**, 327, 1952.
- EVERETT, J. W. y D. L. QUINN: *Endocrinology*, **78**, 141-150, 1966.
- EVERETT, J. W.: *Endocrinology*, **80**, 145-154, 1967.
- GONZÁLEZ-BARÓN, S., J. JIMÉNEZ-VARGAS y G. LÓPEZ-GARCÍA: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **15**, 251-260, 1971.
- GONZÁLEZ-BARÓN, S., J. JIMÉNEZ-VARGAS y F. HERNÁNDEZ: *Rev. esp. Fisiol.*, **29**, 189-196, 1973.
- GONZÁLEZ-BARÓN, S., J. JIMÉNEZ-VARGAS y F. HERNÁNDEZ: *Rev. esp. Fisiol.*, **29**, 279-288, 1973.
- GONZÁLEZ-BARÓN, S., J. L. VELAYOS, J. MARCÓ y J. JIMÉNEZ-VARGAS: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 53-62, 1975.
- GONZÁLEZ-BARÓN, S., J. JIMÉNEZ-VARGAS y J. MARCÓ: *Rev. esp. Fisiol.*, **31**, 63-68, 1975.
- GONZÁLEZ-BARÓN, S., J. MARCÓ y J. JIMÉNEZ-VARGAS: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **19**, 1-16, 1975.
- GONZÁLEZ-BARÓN, S., J. JIMÉNEZ-VARGAS, J. MARCÓ y F. HERNÁNDEZ: *Rev. esp. Fisiol.*, **32**, 29-32, 1976.
- GONZÁLEZ-BARÓN, S., J. JIMÉNEZ-VARGAS, J. MARCÓ y B. RIBAS: *Rev. esp. Fisiol.*, **32**, 301-306, 1976.
- HARDY, D. F.: *Behaviour*, **41**, 288-297, 1972.
- HARRINGTON, F. E., R. G. EGGERT, R. D. WILBUR y W. H. LINKERHEIMER: *Endocrinology*, **79**, 1130-1134, 1966.
- HÉRY, F., E. ROVER y J. GLOWINSKI: *Brain Res.*, **43**, 445-465, 1972.
- JIMÉNEZ-VARGAS, J., V. TEJERA y S. GONZÁLEZ-BARÓN: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **14**, 123-127, 1970.
- JIMÉNEZ-VARGAS, J., S. GONZÁLEZ-BARÓN y F. HERNÁNDEZ: *Rev. Med. Univ. Navarra*, **17**, 1-8, 1973.
- JOCHE, W.: En «Die Gestagene» (K. Junkmann, ed.), Vol. 22/2. Springer-Verlag, Berlín, 1969, pág. 606.
- KAMBERI, I. A., R. S. MICAL y J. C. PORTER: *Endocrinology*, **88**, 1288-1293, 1971.
- KOBAYASHI, F., K. HARA y T. MIYAKE: *Endocrinologia Japonica*, **16**, 251-260, 1969.
- KOE, B. K. y A. WEISSMANN: *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **154**, 499-516, 1966.
- KORDON, C.: *Neuroendocrinology*, **4**, 129-138, 1969.
- KORDON, C. y J. GLOWINSKI: *Neuropharmacology*, **11**, 153-162, 1972.
- KREY, J. C., L. TYREY y J. W. EVERETT: *Endocrinology*, **93**, 385-390, 1973.
- LABHSETWAR, A. P.: *J. Endocr.*, **54**, 269-275, 1972.
- MARCÓ, J., A. TOSAR, S. GONZÁLEZ-BARÓN y J. JIMÉNEZ-VARGAS: *Rev. esp. Fisiol.*, **34**, 81-86, 1978.
- MARCÓ, J. y J. JIMÉNEZ-VARGAS: *Rev. esp. Fisiol.*, **35**, 63-74, 1979.
- MARSDEN, C. A. y G. CURZON: *Neuropharmacology*, **15**, 165-171, 1976.
- MARSDEN, C. A. y G. CURZON: *Neuropharmacology*, **16**, 489-494, 1977.
- MEYER, D. C. y W. B. QUAY: *Endocrinology*, **98**, 1160-1165, 1976.
- MILLER, F. P., R. H. COX, W. R. S. SNODGRASS y R. P. MAICKEL: *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 435-442, 1970.

37. MOSS, R. L. y K. J. COOPER: *Endocrinology*, **92**, 1748-1753, 1973.
38. RODGERS, C. H. y N. B. SCHWARTZ: *Endocrinology*, **92**, 1475-1479, 1973.
39. SPIES, H. G. y G. D. NISWENDER: *Endocrinology*, **88**, 937-943, 1971.
40. TAGLIAMONTE, A., P. TAGLIAMONTE, G. L. GESSA y B. B. BRODIE: *Science*, **166**, 1433-1435, 1969.
41. VAN DE POLL, N. E., H. VAN DIS y B. BERMOND: *Eur. J. Pharmacol.*, **41**, 225-229, 1977.
42. WILSON, C. A. y P. G. McDONALD: *J. Endocr.*, **60**, 253-260, 1974.
43. WILSON, A., C. E. HORTH, A. MCNEILLY y P. G. McDONALD: *J. Endocr.*, **64**, 337-347, 1975.

