

Efecto de la inyección intraventricular cerebral de 6-hidroxidopamina y 5-6-dihidroxitriptamina sobre la secreción fásica de hormona luteinizante *

P. Montilla, M. Muñoz y J. L. Palacios

Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina
Córdoba (España)

(Recibido el 19 de junio de 1978)

P. MONTILLA, M. C. MUÑOZ and J. L. PALACIOS. *Effect of Intracerebroventricular Injection of 6-Hydroxydopamine and 5,6-Dihydroxytryptamine on the Phasic Secretion of Luteinizing Hormone*. Rev. esp. Fisiol., 35, 163-168. 1979.

In ovariectomized rats carrying an estradiol silyastic implant the effect of the intraventricular administration of the serotonin neurotoxin 5,6-dihydroxytryptamine and of the norepinephrine neurotoxin 6-hydroxydopamine on the circadian secretion of the luteinizing hormone (LH) was studied. The decrease of 5-HT after injection of 5,6-dihydroxytryptamine reduced the a.m. and p.m. values and suppressed the phasic rhythm of LH. The diminution of noradrenaline after administration of 6-hydroxydopamine increased the a.m. and did not alter the p.m. values, resulting in a partial abolition of the rhythm.

En los últimos años, estudios histofisiológicos y farmacológicos, han establecido la relación existente entre los neurotransmisores del cerebro y las hormonas hipotalámicas que regulan la secreción de hormonas adenohipofisarias (6, 11, 18).

Centrado este aspecto al papel de noradrenalina (NA) y serotonina (5HT) ce-

rebrales en la dinámica de secreción de hormonas gonadotropas, las aportaciones han sido numerosas en el curso de la última década (11, 12, 18).

El incremento de la síntesis cerebral de NA, bien por la administración de drogas o por precursores metabólicos, ocasiona un aumento del efecto *feed-back* positivo de los esteroides gonadales en la descarga preovulatoria de gonadotropinas (15). Al contrario, el bloqueo de la síntesis suprime tal descarga en el modelo de animal ovariectomizado y tratado con estrógenos y progesterona (9).

* Trabajo realizado bajo la dirección del Dr. C. KORDON en la Unité de Neurobiologie de l'I.N.S.E.R. París. 75014, 2 ter, rue d'Alesia. Francia y en este Departamento. Becado por European Training Programme.

La serotonina cerebral también se halla involucrada en este tipo de secreción. La inyección de 5HT en ventrículos cerebrales o de compuestos que incrementen su biosíntesis en el sistema nervioso central provocan como efecto más llamativo la anulación de la descarga ovulatoria de LH, tanto en la rata adulta como en la impúber pretratada con gonadotrofinas (13, 17).

Junto a estos efectos, se ha evidenciado que tanto los sistemas catecolaminérgicos como serotoninérgicos del cerebro actúan de forma positiva en el mantenimiento de la secreción circadiana de FSH y LH (7, 8). Sin embargo, existen controversias al respecto, especialmente con los cambios de 5HT, ya que los resultados varían según las condiciones experimentales, edad del animal y momento en que el inhibidor o estimulador de la síntesis sea administrado (10, 12).

En el presente trabajo se investiga la acción de las drogas neurotóxicas, 6-hidroxidopamina (6-OH-DA) y 5-6-dihidroxitriptamina (5-6-DHT), que, respectivamente, destruyen de modo selectivo las terminaciones nor-adrenérgicas y serotoninérgicas del cerebro (1, 2), sobre la liberación circadiana de LH en el modelo experimental de rata castrada y portadora de un implante siláctico de estradiol (E-2), que permite un nivel permanente de estrógenos circulante durante un período prolongado. En estas condiciones, después de tres o cuatro días de la implantación, se establece un ritmo cíclico de FSH y LH que perdura hasta cerca de los 40 días (3, 14).

Material y métodos

Se han utilizado ratas Wistar hembras de 200 g de peso y con ciclos estrales normales de 4 a 5 días de duración. En el transcurso del experimento, todos los grupos fueron sometidos a condiciones idénticas de iluminación (14 h luz/10 h

oscuridad), temperatura (23°), alimentación integral y agua *ad libitum*.

Bajo ligera anestesia con éter se procedió a la ovariectomía bilateral y a la inyección intraventricular de 5-6-DHT y 6-OH-DA, que se hizo bilateralmente por control estereotáxico, utilizando como vehículo una solución salina de ácido ascórbico (1 mg/ml de ácido ascórbico en solución salina al 0,9 %) con el fin de evitar la autooxidación de las drogas. La dosis administrada fue de 50 µg por rata en un volumen de 10 µl, en el caso de 5-6-DHT, y de 150 µg por animal en el de 6-OH-DA, en el mismo volumen. El grupo control sólo recibió el vehículo salino.

Pasados catorce días de la ovariectomía se implantó en el dorso un pequeño tubo siláctico que contiene 17-B-estradiol cristalino; al cuarto día de la implantación por punción yugular, se extrajeron muestras sanguíneas a las 9 de la mañana y 6 de la tarde a todos los animales durante cuatro días consecutivos. Finalizados éstos se procedió a la decapitación y extracción del cerebro con el fin de estudiar los cambios de NA y 5HT.

La LH plasmática fue estimada, en doble muestra, por radioinmunoanálisis con doble anticuerpo (16), siendo expresada en ng/ml de NIAMDD rata LH-PR 1. Los cerebros fueron homogeneizados en una mezcla etanol-agua con EDTA al 2 % y ácido ascórbico (0,1 %). Después de la cromatografía en amberlita CG-50, alícuotas se recogieron para valorar NA y 5HT de acuerdo con técnicas fluorimétricas descritas para NA (5) y 5HT (4).

Las drogas en forma de base fueron suministradas por Sigma.

Resultados

Efecto de 5-6-DHT. En el animal castrado con implante de E-2 que sólo recibió el vehículo salino se observa un ritmo circadiano de LH (tabla I y fig. 1),

Tabla I. Efecto de la inyección intraventricular cerebral de 50 μ g de 5-6-dihidroxitriptamina (5-6-DHT) y 150 de 6-hidroxidopamina (6-OH-DA) sobre los niveles cíclicos de LH plasmática.

Media \pm error estándar. Entre paréntesis, número de animales. a.m.: antes de mediodía. p.m.: después de mediodía. Valores de P: a.m. VS p.m. de cada día. N.S.: no significativo. El valor de «p», calculado según el valor *t* del tests de Student.

Grupo	E2 días	LH plasma (ng/ml)		p
		9 a.m.	6 p.m.	
Control salino	4	318,1 \pm 39,9 (8)	866,2 \pm 94,5 (8)	< 0,001
	5	238,5 \pm 35,4 (7)	925,3 \pm 88,6 (8)	< 0,001
	6	355,7 \pm 51,5 (8)	1.053,1 \pm 96,3 (7)	< 0,001
	7	451,6 \pm 44,8 (8)	942,0 \pm 87,5 (8)	< 0,001
Inyección 5-6-DHT	4	175,2 \pm 26,4 (9)	128,2 \pm 19,5 (9)	N.S.
	5	211,8 \pm 30,1 (10)	222,3 \pm 28,7 (10)	N.S.
	6	267,5 \pm 22,4 (10)	301,7 \pm 34,3 (10)	N.S.
	7	228,6 \pm 37,7 (10)	196,8 \pm 23,1 (10)	N.S.
Inyección 6-OH-DA	4	360,5 \pm 41,6 (8)	970 \pm 101,4 (8)	< 0,001
	5	560,0 \pm 62,2 (8)	793,2 \pm 65,4 (8)	< 0,01
	6	616,3 \pm 57,7 (8)	758,4 \pm 73,5 (8)	N.S.
	7	585,1 \pm 64,8 (8)	826,3 \pm 77,6 (8)	N.S.

con amplias variaciones entre los valores de la mañana y la tarde ($p < 0,001$) y que se mantuvieron durante los cuatro días consecutivos en que fueron medidos los niveles de LH plasmática.

La administración intraventricular de 50 μ g de sulfato de creatinina de 5-6-DHT determina un doble efecto: caída de los valores de LH a.m. y p.m. y abolición absoluta del ritmo. Los descensos fueron evidentes, del 33,3 % para los valores de la mañana y del 81,2 % para los de la tarde, ambos considerados globalmente.

Efecto de 6-OH-DA. La dosis de 150 μ g de BrH de 6-OH-DA, por la vía indicada, no produjo caída de LH plasmática en los valores de la mañana. Al contrario, acontece una elevación de 36 % con respecto al grupo salino. Los valores de la tarde descendieron, aunque de modo poco significativo.

El ritmo de LH se afecta, aunque no como con la inyección de 5-6-DHT. Du-

rante dos días se conserva y no es tan manifiesto en los otros dos, pero diferencias de valores entre a.m. y p.m., aunque si bien para estos últimos días el trata-

Tabla II. Efecto de 5-6-dihidroxitriptamina y 6-hidroxidopamina sobre el contenido cerebral de noradrenalina y serotonina.

Media \pm error estándar. Número de animales entre paréntesis.

Grupo	Contenido cerebral NA	(ng/g de tejido) 5-HT
Salino	345,1 \pm 44,3 (8)	610,3 \pm 39,6 (7)
5-6-DHT (50 μ g)	296,5 \pm 31,7 (9) ^a	131,4 \pm 22,3 (8) ^{b'}
6-OH-DA (150 μ g)	86,4 \pm 17,3 (8) ^b	463,5 \pm 51,6 (8) ^c

a: Valor de p versus grupo control NS: no significativo. Referido a NA.

b: Valor de p < 0,001 versus grupo control. Referido a NA.

b': Valor de p < 0,001 versus grupo control. Referido a 5-HT.

c: Valor de p < 0,05 versus grupo control. Referido a 5-HT.

miento estadístico proporciona valores de *p* no significativos.

Efecto de 5-6-DHT y 6-OH-DA sobre el contenido cerebral de NA 5HT. Después de 18 días de la inyección intraventricular 5-6-DHT produjo una notable caída de la serotonina cerebral (78,5 %). Efecto similar ocasionó 6-OH-DA en relación con la concentración cerebral de NA (75 %). El contenido de 5HT fue afectado también por esta droga, que provocó una caída de casi el 25 %.

Discusión

Los resultados obtenidos indican que la degeneración de las terminaciones noradrenérgicas y serotoninérgicas, consecutivas a la administración de ambas drogas, altera la secreción basal y circadiana de LH, siendo este efecto más relevante para 5-6-DHT que para 6-OH-DA.

La acción bloqueadora de 5-6-DHT sobre la cuantía y el ritmo fásico de secreción de LH apoya el criterio mantenido por ciertos autores de que los sistemas serotoninérgicos cerebrales actúan, en conjunto, de manera permisiva facilitando la liberación cíclica de gonadotropinas con la condición de que existe un nivel mantenido de esteroides en la circulación (7, 8).

Estos resultados, especialmente la detención de los niveles de LH a valores bajos y mantenidos en el curso del día, presentan una gran similitud con los obtenidos por la administración intraperitoneal de p-clorofenilalanina (PCPA), potente inhibidor de la síntesis cerebral de serotonina. La inyección de esta droga determina entre las 24-48 horas de su administración un descenso del 50 %, que perdura en tanto permanezca su acción, aunque tal efecto es yugulado en un lapso de tiempo breve con la inyección intraventricular de 5-hidroxitriptófano (5-HTP) precursor de la síntesis cerebral de serotonina (7, 8).

La afectación de los sistemas de serotonina por 5-6-DHT, dada la abolición tan absoluta que determina sobre la liberación fásica de LH, sugiere que se trate de un efecto muy específico de 5-HT y al que han de contribuir todas las neuronas serotoninérgicas del cerebro. Esta afirmación tiene su base en el hecho de que cuando la abolición del sistema indicado es parcelaria la alteración del ritmo pulsátil de LH no es absoluta. La destrucción de las neuronas de serotonina de los núcleos central y ventral del rafe ocasionan un descenso de 5-HT hipotalámica junto a una menor elevación de los valores vespertinos de FSH y LH, pero sin abolición del ritmo (2, 10). Esto indica que la acción moduladora de la amina no sólo procede de las vías ascendentes de origen mesencefálico, sino que otros núcleos nerviosos de esta naturaleza contribuyen en la misma función, pues cuando se afecta de una forma global y continuada, como es el caso de la administración i.v. de 5-6-DHT, o de forma transitoria con PCPA, la alteración de la secreción de LH es más notable, ya que en estas circunstancias, además de ser bloqueado el ritmo, los niveles de LH quedan mantenidos en valores bajos y fijos. Se ha comprobado además que en el animal sometido a los efectos del PCPA, la administración de 5-HTP anula estos efectos en lo que a los cambios de LH se refiere, pero sólo cuando éste es inyectado por las vías intraventricular o parenteral, pero no cuando es implantado en áreas discretas del hipotálamo u otra zona del cerebro (8).

La inyección de 6-OH-DA produce cambios en la secreción fásica de LH, aunque sus efectos no son tan llamativos como en el de la droga antes comentada. El ritmo no es anulado absolutamente, aunque las oscilaciones entre los valores de la mañana y de la tarde disminuyen de amplitud. Estos resultados no son superponibles a los referidos por otros investigadores que niegan la participación

de los sistemas nor-adrenérgicos del cerebro en los cambios circadianos de FSH y LH, al menos en el modelo experimental utilizado en la presente investigación, donde los niveles de esteroide circulante, por implante silástico, son mantenidos sin fluctuaciones apreciables (10), pudiera aducirse en favor de los referidos autores que la droga afecta también a las terminaciones neuronales de 5-HT y que a la dosis empleada, en este experimento se produce una caída de alrededor del 25 % del contenido de serotonina cerebral, de tal forma que las oscilaciones de amplitud disminuida entre los valores de la mañana y la tarde pudieran ser más imputables al ligero descenso de 5-HT que a la gran depleción de nor-adrenalina cerebral. Sin embargo, la influencia de esta discreta caída de 5-HT ha de ser mínima, pues los niveles de LH se mantienen con pequeñas variaciones en cotas elevadas, cosa que no acontece si el contenido de 5-HT desciende por encima del 75 %. Examinando los resultados se observa que tanto el descenso de 5-HT como de NA alteran el ritmo cíclico de secreción de LH, pero mientras que la falta de serotonina determina una fijación de los niveles de LH a valor bajo, la disminución de nor-adrenalina realiza este mismo pinzamiento, pero con cotas de LH más altas. Parece ello indicar que si la serotonina es importante para determinar la cuantía de secreción y la elevación de LH vespertina, la nor-adrenalina lo haría en el sentido de disminuir la cantidad de secreción y la de facilitar el descenso matutino de LH. Si los valores p.m. después de la administración de 6-OH-DA no ascendieron en gran proporción, posiblemente se deba a la discreta caída de 5-HT por la citada droga. De no haberse producido este efecto, los valores de LH hubieran ascendido.

Concluyendo, el animal castrado con niveles mantenidos de estradiol circulante, tanto los niveles cerebrales de 5-HT como de NA son importantes en la regu-

lación de la secreción pulsátil de LH. Este trabajo pone una vez más en evidencia la importancia de los sistemas aminérgicos del sistema nervioso central en la regulación de hormonas gonadotropas y la importancia de NA y 5-HT para informar al hipotálamo y modular su actividad basal.

Resumen

En ratas ovariectomizadas portadoras de un implante silástico con estradiol se estudia el efecto que sobre la secreción circadiana de LH ejerce la administración intraventricular de 5-6 dihidroxitriptamina y 6-hidroxi-dopamina que destruyen, respectivamente, las terminaciones de neuronas de 5HT y de noradrenalina cerebrales. El descenso de 5HT por efecto de 5-6 dihidroxitriptamina bajó los valores a.m. y p.m. y produjo abolición absoluta del ritmo fásico de LH. La disminución de noradrenalina 6-hidroxi-dopamina elevó los valores a.m., pero no por p.m., lo que se traduce en una anulación parcial del ritmo.

Bibliografía

1. BAUMGARTEN, H. G., BJORKLUND, A., LOCHENMAYER, L. NOBIN, A. y STENOVI, U.: *Acta Physiol. Scand.*, supl., 373, 3-15, 1971.
2. BREESE, G. R. y TAYLOR, T. D.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 174, 413-420, 1970.
3. CHAZAL, G., FAUDON, M., GOGAN, F., HERY, M. y LAPLANTE, E.: *J. Physiol.*, 68, 18b, 1974.
4. CURZON, G. y CREEN, J.: *J. Pharmacol.*, 39, 653-664, 1970.
5. VON EULER, U. S. y LISHAJKO, F.: *Acta Physiol. Scand.* 51, 348-356, 1961.
6. FUXE, K. y HOKFELT, H.: En «Neurosecretion» (Stutinsky, S., ed.), Springer Verlag. Berlín, 1967, pp. 207.
7. HERY, M., LAPLANTE, E. y KORDON, C.: *J. Endocr.*, 67, 463-464, 1975.
8. HERY, M., LAPLANTE, E. y KORDON, C.: *Endocrinology*, 99, 496-503, 1976.
9. KALRA, P. S. y MCCANN, S. M.: *Prog. Brain Res.*, 39, 185-191, 1973.
10. KORDON, C., EPELBAUM, J., ENJALBERT, A. y MCKELVY: En «Subcellular Mechanisms in Reproductive Neuroendocrinology» (Naftolin, F., Ryan, K. J. y Davies, J., ed.),

- Elservier Scientific Publishing Co. Amsterdam, 1976, pp. 167-184.
11. KORDON, C. y GLOWINSKY, J.: *Neuropharmacology*, **11**, 153-162, 1972.
 12. KORDON, C., HERY, M. y ENJALBERT, A.: En «Hypothalamus and endocrine functions» (F. Labrie, J. Meites y G. Pelletier, ed.), Plenum Publ. Corp., Nueva York, 1976, pp. 51-61.
 13. KORDON, C., JAVOY, F., VASSENT, G. y GLOWINSKY, J.: *Europ. J. Pharmacol.*, **4**, 169-174, 1968.
 14. LEGAN, S. J., COON, G. A. y KARSCH, F. J.: *Endocrinology*, **90**, 50-57, 1975.
 15. MCCANN, S. M. y MOSS, R. L.: *Life Sci.*, **16**, 833-841, 1976.
 16. NISWENDER, G. D. y MIDGLEY, Jr. S. E., MONROE, S. E. y RICHERT, L. E.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **128**, 807-811, 1968.
 17. SCHNEIDER, H. P. y MCCANN, S. M.: *Endocrinology*, **86**, 1127-1132, 1970.
 18. WURMAN, R. J.: *Rec. Prog. Brit.*, **9**, 172-193, 1971.