Rev. Med. Univ. Navarra, XV; 251, 1971

UNIVERSIDAD DE NAVARRA. FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA

Cambios en el ciclo ovárico por anfetamina y reserpina

S. González-Barón, J. Jiménez-Vargas y G. López García

RESUMEN

Se estudia la influencia de la anfetamina, la reserpina y la interacción de ambos fármacos sobre el ciclo ovárico de ratas adultas.

La anfetamina (1 mg/Kg) en dosis repetidas a lo largo de dos ciclos, aumenta la duración del estro ($P = 0,05$) en relación con la duración de dicha fase antes del tratamiento.

En las mismas condiciones, la reserpina 0,5 mg/Kg aumenta la duración del diestro ($0,01 > P > 0,001$), y acorta el proestro ($0,01 > P > 0,001$).

En las ratas tratadas con reserpina, aumenta la duración del diesro cuando se comparan con grupo control ($P < 0,001$), con el grupo bajo tratamiento con anfetamina ($P < 0,001$), y con el grupo de animales en los que se administró reserpina 24 horas antes de anfetamina ($P < 0,001$).

En las ratas tratadas con reserpina se acorta la duración de la fase de estro en comparación con el grupo tratado con anfetamina ($0,05 > P > 0,01$) y en relación con los animales tratados con reserpina 24 horas antes de anfetamina ($0,01 > P > 0,001$).

En otra serie de experiencias la reserpina (2 mg/Kg) en dosis repetidas, disminuye el número de folículos maduros en relación con animales sin tratamiento ($P < 0,001$).

Se interpretan los resultados y se destaca el papel de las catecolaminas en la ovulación.

Datos obtenidos en este Laboratorio sobre acción de anfetamina y reserpina en la ovulación y reproducción en la rata sugieren un aumento del número de folículos maduros bajo acción de la anfetamina. Resultado análogo encontramos al valorar el número de fetos bajo tratamiento con el mismo fármaco. Por el contrario, la administración de reserpina disminuye tanto el número de folículos maduros como el número de fetos, administrada a dosis repetidas [5, 18].

Partiendo de estos resultados, hemos llevado a cabo una serie de experiencias orientadas a precisar las modificaciones en las fases del ciclo bajo tratamiento farmacológico con anfetamina y reserpina. Tratamos de estudiar los efectos de cada fármaco y la interacción de los dos, administrando reserpina 24 horas antes de anfetamina. Pensamos que con esto podríamos aportar nuevos datos al papel funcional de las catecolaminas en cada fase del ciclo, así como al mecanismo de acción de la anfetamina y la reserpina.

Junto a datos sobre la estructura de localizaciones diencefálicas, estrechamente ligadas al control de la ovulación [19, 52] se han aislado estos últimos años, factores químicos hipotalámicos reguladores de la secreción adenohipofisaria [2, 6, 7, 8, 14, 15, 26, 35, 41]. Hay datos para pensar que las catecolaminas de determinados núcleos hipotalámicos juegan un papel decisivo en la secreción de los "factores hipotalámicos" ("hormonas hipofisiotróficas" [28, 32, 33]). La importancia de la dopamina como transmisor en neuronas de la eminencia media y núcleo arcuato responsable de la secreción del factor liberador de hormona luteinizante (LRF), ha sido puesto de relieve por McCann y col. [27, 28, 42], si bien otros investigadores [12] no llegan a la misma conclusión.

Otros trabajos también sugieren que el contenido de catecolaminas del hipotálamo guarda relación con el control hormonal del ciclo de la rata. Como más demostrativos citaremos los siguientes: los efectos producidos por hormonas ováricas (estrógeno y progesterona) disminuye el nivel de noradrenalina, y aumenta la dopamina en el hipotálamo de rata [9]. La demostración de que el vaciamiento de monoaminas del hipotálamo puede impedir la ovulación [25]. El efecto ovulatorio provocado en la rata inmadura se relaciona con la descarga de noradrenalina a nivel del hipotálamo [20]. Se ha observado también un cambio significativo en la concentración de catecolaminas en la región tuberal con un incremento desde diestro a estro, lo que sugiere una relación funcional entre los diversos estados de actividad de estas neuronas y el nivel de gonadotrofinas [12, 22, 23, 24, 29].

Todos estos datos se completan con otras recientes aportaciones sobre el control ejercido sobre el ovario desde la hipófisis, hipotálamo y estructuras del sistema nervioso central [10, 11, 13, 16, 21, 30, 34, 37, 38, 40, 43, 44, 51], habiéndose precisado el mecanismo de la rotura folicular [39] y su control neurohumoral.

La acción central de la anfetamina ha sido objeto de numerosos trabajos en los últimos años [1, 3, 4, 17, 36]. Su mecanismo de acción se interpreta en parte como dependiente del nivel de catecolaminas.

En este sentido se ha observado que algunos de sus efectos quedan bloqueados cuando se administra previamente α-metil-p-tirosina, inhibidor de la síntesis de noradrenalina a nivel de la tirosina hidroxilasa enzima que interviene en el paso de l-tirosina a l-dopa.

Sin embargo en experiencias realizadas sobre actividad locomotora asociando anfetamina y reserpina, parecen encontrarse algunos efectos que no corresponden con un mecanismo de acción dependiente de catecolaminas [45]. En cuanto a los efectos sobre la ovulación, encontramos pocos datos en la bibliografía. Los resultados obtenidos en nuestro Laboratorio [5, 18], sugieren que el mecanismo de acción está en relación con las catecolaminas, al menos en varias de las experiencias. Sus efectos sobre la conducta reproductora [31, 50], parecen ser también dependientes del nivel de algunas catecolaminas centrales sobre todo de serotonina.

La reserpina, otro de los fármacos que estudiamos, tiene efectos centrales y periféricos, bien conocidos [46, 47, 48, 49]. Su mecanismo de acción realizado por vaciamiento de las vesículas adrenérgicas, im-

pidiendo simultáneamente la recaptación del transmisor, ha sido señalado como responsable de sus efectos sobre la ovulación [32].

En relación con la conducta reproductora la reserpina tiene una acción favorecedora, mecanismo que parece deberse a la disminución de los depósitos centrales de noradrenalina, y especialmente de serotonina. Nuestros resultados anteriores en ese sentido no permiten deducir conclusiones, ya que los datos obtenidos sobre número de fetos y ratas preñadas, tanto si se administraba reserpina sola, o seguida de anfetamina, resultan de difícil interpretación, por la participación de factores neurohormonales muy diversos junto a posibles ovulaciones reflejas, que aún tratándose de animales con ciclo espontáneo hay que tener en cuenta [50, 53].

El planteamiento de nuestro trabajo ha sido orientado en primer lugar a comprobar las variaciones experimentadas en las fases de estro y proestro de ratas no sometidas a tratamiento farmacológico. La valoración del número de folículos maduros en esas fases, nos pareció dato básico para posteriores experiencias.

En una segunda serie de ensayos hemos estudiado las modificaciones de cada fase bajo administración farmacológica de anfetamina, reserpina, y reserpina 24 horas antes de anfetamina. Hacemos una serie de experiencias con reserpina sola para completar el estudio de dicho fármaco.

Material y métodos

Hemos utilizado ratas Wister de 4 meses y 200 g de peso medio. Los animales han sido mantenidos en condiciones de iluminación controlada con luz artificial desde las 6 de la mañana hasta las 8 de la tarde. Contamos las horas de cada día artificial a partir de la hora cero: punto medio que corresponde a la una de la madrugada.

En todos los animales realizamos control diario del ciclo mediante frotis vaginales llevados a cabo a la misma hora. En la especie que utilizamos, la duración media del ciclo es de 4 días. En el estudio citológico del frotis vaginal se distinguen claramente 4 fases: metaestro, diestro, proestro, estro.

La duración de cada una de estas fases es discutible por la diversidad de apreciación según los autores. Puede considerarse que la ovulación tiene lugar en la tarde del proestro.

Para el estudio de la ovulación sacrificamos a los animales en una fase determinada del ciclo y estudiamos los ovarios haciendo recuento de folículos totales y folículos maduros. Hemos tenido muy en cuenta el grado de hemorragia y hemos determinado las dimensiones de cada ovario mediante lupa apropiada y papel milimetrado.

Los fármacos empleados han sido anfetamina (sulfato de β-fenilisopropilamina) en suero fisiológico a la dosis de 1 mg/Kg y reserpina (Serpasol) en suero fisiológico a la dosis de 0,5 mg/Kg. Ambos fármacos se inyectan subcutáneamente. En las experiencias en las que se administraban los dos fármacos la reserpina se inyecta 24 horas antes de la anfetamina. En un grupo de experiencias la reserpina se administró a la dosis de 2 mg/Kg.

Se han realizado en todos los casos los estudios estadísticos: pruebas de la varianza y prueba de t (Student).

Resultados

I. En un grupo de 15 ratas, sin tratamiento, hemos estudiado el número de folículos maduros en las fases del ciclo de mayor interés en cuanto al mo-

mento de la ovulación: proestro y estro. Se realizó el control del ciclo mediante frotis vaginales. Los animales fueron sacrificados el día correspondiente a la fase en estudio. Los datos obtenidos son los siguientes:

Número de folículos maduros en proestro: 29 ± 8.

Número de folículos maduros en estro: $15{,}5 \pm 9$.

Por análisis de la varianza entre ambos grupos obtenemos un valor estadísticamente significativo $0{,}01 > P > 0{,}001$, lo que indica que en la fase de proestro el número de folículos maduros es superior al encontrado en el estro. Estos resultados, junto al estudio morfológico de los folículos en cada una de las fases citadas, nos llevan a la conclusión de que en el estro, la disminución del número de folículos se debe a la rotura que algunos experimentaron con la salida del óvulo a las trompas.

II. En una segunda serie de experiencias hemos estudiado **las variaciones de las células vaginales en cada una de las fases,** bajo la administración de anfetamina y reserpina. El estudio lo realizamos sobre cuatro lotes de diez ratas cada uno: control, tratadas con anfetamina (1 mg/Kg), tratadas con reserpina (0,5 mg/Kg), y tratadas con reserpina 24 horas antes de anfetamina. Los fármacos se administraron durante 8 días seguidos (2 ciclos). Realizamos control diario del ciclo mediante frotis vaginales, y estudiamos las variaciones en el tipo de células encontradas en los días anteriores al tratamiento y durante la administración farmacológica. En la tabla adjunta exponemos la duración media en días de cada una de las fases en los cuatro grupos estudiados:

CAMBIOS EN LA DURACION DEL CICLO OVARICO DE LA RATA POR ANFETAMINA Y RESERPINA

(Duración de cada fase del ciclo expresada en días)

Fases	Control	Anfetamina	Reserpina	Reserpina más Anfetamina
Diestro	1,05 ± 0,28	1,25 ± 0,42	2,10 ± 0,45	1,20 ± 0,32
Proestro	1 ± 0,33	0,75 ± 0,35	0,45 ± 0,36	0,70 ± 0,32
Estro	1,05 ± 0,14	1,40 ± 0,65	0,80 ± 0,32	1,30 ± 0,32
Metaestro	0,85 ± 0,26	0,60 ± 0,06	0,65 ± 0,33	0,80 ± 0,25
Nº ratas	10	10	10	10

En primer lugar hacemos una valoración de la acción farmacológica en los mismos animales, observando la *duración de cada fase en relación con la encontrada antes del tratamiento.* Destacamos el aumento de la duración del estro bajo la administración de *anfetamina* con un valor $P = 0,05$ (prueba de t Student).

En el grupo de animales *tratados con reserpina* observamos una reducción del estro; un aumento del diestro bajo la acción farmacológica ($0,01 > P > 0,001$); y una reducción del proestro ($0,01 > P > 0,001$).

Un segundo aspecto del estudio ha sido la *comparación entre las variaciones observadas en los cuatro grupos.*

El grupo control lo constituyen 10 ratas sin tratamiento en las que se estudió el ciclo durante 16 días (4 ciclos). Mediante análisis de varianza encontramos los siguientes resultados:

La *anfetamina* hizo aumentar la duración del estro en relación al grupo de control, y con cifras significativas estadísticamente si se compara al grupo de animales tratados con reserpina ($F=6,14$; $0,05 > P > 0,01$).

En el grupo de *animales tratados con reserpina* destacamos lo siguiente:

Aumento de la duración del diestro en cifras altamente significativas ($P < 0,001$) en relación con el grupo control ($F = 37,93$) en relación al grupo tratado con anfetamina ($F = 25,8$), y en relación al grupo en que se administró reserpina 24 horas antes de anfetamina ($F = 25,31$).

En el grupo de animales sometidos a la administración de *reserpina 24 horas antes de anfetamina,* observamos un aumento en la duración del estro en relación con el grupo control, y un aumento con cifras significativas ($F = 10,41$; $0,01 > P > 0,001$) en relación al grupo tratado con reserpina (figs. 1 y 2).

III. Los resultados expuestos nos llevaron a completar experiencias anteriores sobre **acción de la reserpina en la ovulación, valorando el número de folículos maduros.** En esta experiencia utilizamos dos lotes de 11 ratas de características ya señaladas, uno nos sirvió de control, y al otro se administró 5 dosis, en días alternos, de reserpina (2 mg/Kg). Elegimos esta dosis superior a las empleadas en experiencias anteriores a fin de disponer de nuevos datos. Las ratas sometidas a tratamiento fueron sacrificadas en la fase de proestro. Los ovarios son estudiados, teniendo en cuenta número de folículos maduros, tamaño y carácter hemorrágico.

Las cifras medias de número de folículos maduros fueron las siguientes:

Grupo control: $25,90 \pm 6,07$.

Tratadas con reserpina: $11,81 \pm 3,28$.

El estudio estadístico mediante análisis de la varianza nos puso de evidencia la disminución altamente significativa ($F = 20,28$; $P < 0,001$) del número de folículos después de administrar reserpina en relación al grupo control.

Discusión

Nuestros primeros resultados indican una mayor existencia de folículos maduros en el proestro que en el estro. Este dato, punto de partida para ulteriores experiencias, es indicativo de que en ese momento del proestro, aún no ha tenido lugar la elevada secreción de LH que se presenta antes de la rotura folicular. De ahí que un día después, en fase de estro, el número de folículos sea inferior al haber experimentado la rotura, y por tanto la ovulación.

Las variaciones obtenidas en la duración de fases determinadas del ciclo bajo tratamiento farmacológico, sugieren en al-

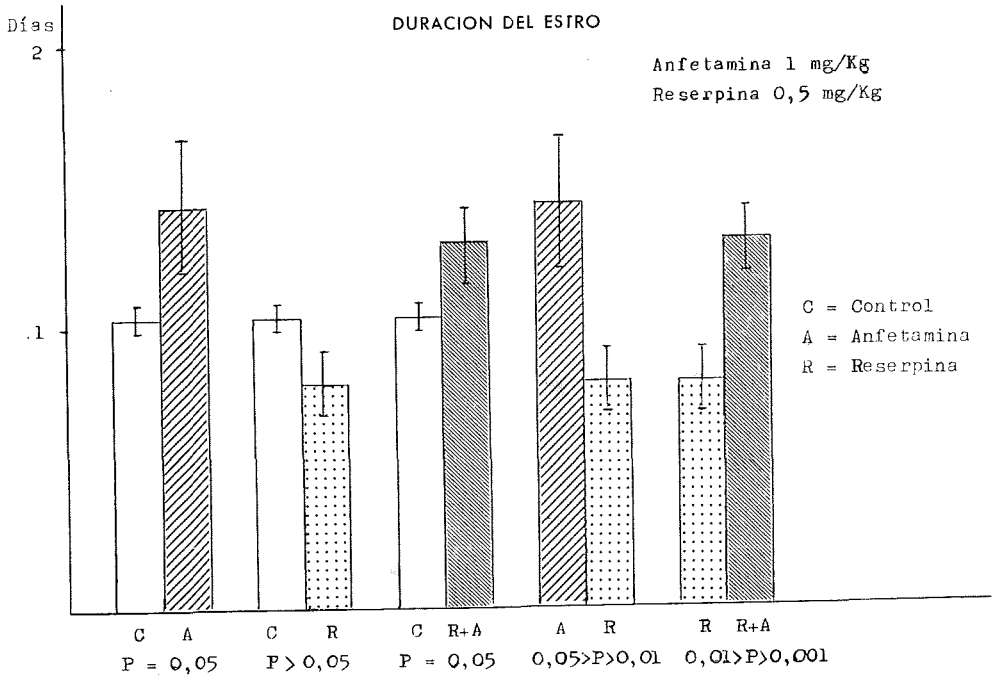

Figura 1

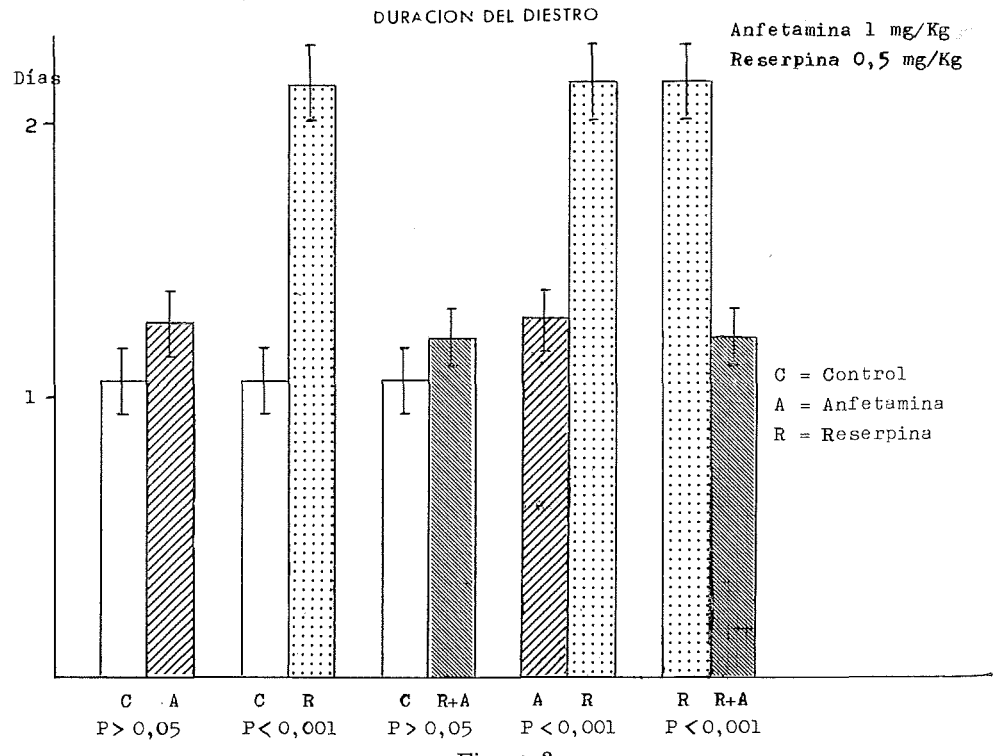

Figura 2

gunas de las experiencias la participación de mecanismos adrenérgicos hipotalámicos. Bajo la administración de anfetamina, aumenta la duración del estro y se acorta el proestro. Interpretamos que ha habido un adelanto en la secreción elevada de estrógenos que ha determinado un ciclo vaginal que tiende a manifestar células de tipo queratinizadas. Apoyados en otros datos experimentales [1, 4, 28, 32] pensamos que una posible explicación es el aumento en la liberación de neurotransmisor hipotalámico (dopamina) que a través de factores de liberación aumenta los niveles de FSH y LH, y, en consecuencia esté alargada la fase estrogénica. Pero el hecho de que los resultados obtenidos administrando reserpina 24 horas antes de anfetamina sean análogos, plantea dificultad de interpretar el mecanismo de acción de la anfetamina como dependiente de las catecolaminas hipotalámicas.

El aumento considerable del diestro, la disminución de la fase de estro, y la disminución en el número de folículos maduros, en los animales tratados con reserpina, indica una acción inhibidora de la ovulación, ya observada por otros autores [32], especialmente cuando se administraba en el día de proestro antes del período crítico de descarga de LH. El mecanismo de acción se puede interpretar como una disminución de los depósitos de catecolaminas y posterior inactivación por la MAO. Que este efecto, en nuestro caso —dosis repetidas— sería por acción sobre el hipotálamo lo deducimos por lo encontrado en la bibliografía en donde con 5 mg/Kg se demostró no tener efecto después del período crítico de liberación de LH [32].

Nuestros resultados sugieren el importante papel de las catecolaminas en la ovulación en la rata.

Summary

Changes in the ovary cycle under anphetamine and reserpine treatment

Influence of amphetamine, reserpine and mutual interaction exerted by both drugs on the estrous cycle of adult rats is studied.

Repeated doses of amphetamine (1 mg/Kg) administered along two cycles, prolonged the estrous phase ($P = 0.05$), if compared with the situation in the same animals before treatment. Reserpine (0.5 mg/Kg), under the same conditions, increased the diestrous time ($0.01 > P > 0.001$) and shorted the proestrous phase ($0.01 > P > 0.001$).

Rats treated with reserpine prolonged the diestrous ($P < 0.001$), if compared with a control group, a group treated with reserpine 24 hours before a treatment with amphetamine ($P < 0.001$) and a group treated with amphetamine ($P < 0.001$).

Rats treated with reserpine showed a shorter estrous phase, if compared with a group of rats treated with amphetamine ($0.05 > P > 0.01$) and a group treated with reserpine 24 hours before amphetamine ($0.01 > P > 0.001$).

Other experiments were done in a group of rats to which repeated doses of reserpine (2 mg/Kg) were administered. This group follicles, if compared with a control group of rats ($P < 0.001$).

The results are interpreted paying special attention to the action of the cathecholamines on the ovulation.

BIBLIOGRAFÍA

1. ANDÉN, N., A. CARLSSON y J. HÄGGENDAL. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 9: 119, 1969.
2. ARIMURA, A. y A. V. SCHALLY. *Endocrinology*, 87: 653, 1970.
3. CARLSSON, A., B. FALCK y N. A. HILLARP. *Acta Physiol. Scand.* (suppl. 56), 196: 1, 1962.
4. CARLSSON, A. y M. LINDQVIST. *Eur. J. Pharmacol.*, 2: 187, 1968.
5. CARRASCOSA, M.ª A., J. CROFTON y V. TEJERA. *Rev. Med. Univ. Navarra*, 14: 7, 1970.
6. CORBIN, A. y J. C. STORY. *Endocrinology*, 80: 1006, 1967.
7. CORBIN, A., E. L. DANIELS y J. E. MILMORE. *Endocrinology*, 86: 735, 1970.
8. DAVIDSON, J. M. En *Frontiers in Neuroendocrinology*. Editado por W. F. Ganong, y L. Martini. Página 343. Oxford University Press, New York, 1969.
9. DONOSO y CUKIER. *Nature*, 218: 969, 1968.
10. EVERETT, J. W. y D. C. NICHOLS. *Anat. Record.*, 160: 346, 1968.
11. FINCK, G. y G. W. HARRIS. *J. Physiol.*, 208: 221, 1970.
12. FUXE, K., T. HÖKFELT y O. NILSSON. *Life Sci.*, 6: 2057, 1967.
13. GROSSBERG, C. y N. B. SCHWARTZ. *Fed. Proc.*, 27: 371, 1968.
14. GUILLEMIN, R. *Ann. Rev. Physiol.*, 29: 313, 1967.
15. GUILLEMIN, R., R. BURGUS, E. SAKIZ y D. M. WARD. *C. R. Acad. Sci.*, 262: 2278, 1968.
16. HARRIS, G. W. y F. NAFTOLIN. *Brit. Med. Bull.*, 26: 3, 1970.
17. JIMÉNEZ VARGAS, J., S. GONZÁLEZ BARÓN y M. ASIRÓN. *Rev. Med. Univ. Navarra*, 13: 123, 1969.
18. JIMÉNEZ VARGAS, J., V. TEJERA y S. GONZÁLEZ BARÓN. *Rev. Med. Univ. Navarra*, 14: 123, 1970.
19. KOBAYASHI, H. y T. MATSII. En *Frontiers in Neuroendocrinology*. Editado por W. F. Ganong y L. Martini. Página 3. Oxford University Press. New York, 1969.
20. KORDON, C. *Neuroendocrinology*, 4: 129, 1969.
21. LADISCH, W. y P. BAUMANN. *Neuroendocrinology*, 7: 16, 1971.
22. LICHTENSTEIGER, W. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 165: 204, 1969.
23. LICHTENSTEIGER, W. y col. *Brain Res.*, 16: 199, 1969.
24. LIPPMAN, W. y col. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 156: 258, 1967.
25. MAANEN, J. H. van y P. G. SMELIK. *Neuroendocrinology*, 3: 177, 1968.
26. MCCANN, S. M., A. P. S. DHARIWAL y J. C. PORTER. *Ann. Rev. Physiol.*, 30: 589, 1967.
27. MCCANN, S. M. y J. C. PORTER. *Physiol. Rev.*, 49: 240, 1969.
28. MCCANN, S. M. *Fed. Proc.*, 29: 1888, 1970.
29. MCCLINTOCK, J. A. y N. B. SCHWARTZ. *Endocrinology*, 83: 433, 1968.
30. MCDONALD, D. M. y col. *Endocrinology*, 85: 236, 1969.
31. MEYERSON, B. J. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenn.*, 46: 394, 1968.
32. MEYERSON, B. J. y C. H. SAWYER. *Endocrinology*, 83: 170, 1968.
33. MEYERSON, B. J. y T. LEWANDER. *Life Sci.*, 9: 661, 1970.
34. MONROE, S. E., R. W. REBAR y A. R. JR. MIDLEY. *Fed. Proc.*, 27: 371, 1968.
35. MOTTA, M., F. FRASCHIVI y L. MARTINI. En *Frontiers in Neuroendocrinology*. Editado por W. F. Ganong y L. Martini. Página 211. Oxford University Press. New York, 1969.
36. PFEIFER, A. K., L. GYÖRGY y M. FODOR. *Acta Med. Acad. Sci. Hung.*, 25: 439, 1968.
37. REES, G. P. VAN. *Acta Physiol. Pharmacol.*, 15: 136, 1969.
38. RODIER, W. I. *Physiol. Behav.*, 4: 801, 1969.
39. RONDELL, P. *Fed. Proc.*, 29: 1875, 1970.
40. SAWYER, CH. S. *Fed. Proc.*, 29: 1895, 1970.
41. SCHALLY, A. V. y col. *Recent Progr. Hormone Res.*, 24: 497, 1968.
42. SCHNEIDER, H. P. G. y S. M. MCCANN. *Endocrinology*, 87: 330, 1970.
43. SINGH, K. B. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 105: 274, 1969.
44. STOFFER, S. S. y col. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 105: 989, 1969.
45. STOLK, J. M. y R. H. RECH. *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 163: 75, 1968.
46. VALDECASAS, F. G., J. A. SALVÁ y E. CUENCA. *Arzneim. Forsch.* 8: 655, 1958.
47. VALDECASAS, F. G. y J. A. SALVÁ. *Arch. int. Pharmacodyn.*, 140: 581, 1962.
48. VALDECASAS, F. G., E. CUENCA y L. RODRÍGUEZ. *IX Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas.* Páginas 177-179. Pamplona, 1965.
49. VALDECASAS, F. G., J. LAPORTE y F. JANÉ. *X Reunión Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Fisiológicas.* Páginas 121-125. Valencia, 1967.

50. WOLSTENHOLME, G. E. M. y M. O'CONNOR. *Yale J. Biol. Med.*, 40: 178, 1967.

51. YOSHINAGA, K., R. A. HAWKINS y J. F. STOCKER. *Endocrinology*, 85: 103, 1969.

52. ZAMBRANO, D. y E. DE ROBERTIS. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.*, 87: 409, 1968.

53. ZARROW, M. X. y J. H. CLARK. *J. Endocrinol.*, 40: 343, 1968.