

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

TRABAJO DE TESIS:

"CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL CONTROL
SENSORIAL, HORMONAL Y NEURAL DE LA
FASE LUTEA DE LA RATA"

Enrique Hugo Luque

Director: Prof. Dr. Eduardo M. Zaccardi

AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD

NACIONAL DE LA PLATA

RECTOR:

Dr. GUILLERMO G. GALLO

SECRETARIO GENERAL:

Odont. TOMAS C. FUCINI

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:

Dr. JORGE ALFREDO BOLZAN

SECRETARIO DE SUPERVISION ADMINISTRATIVA:

Cdor. JUAN CARLOS AREVALO

SECRETARIO DE EXTENCION CULTURAL Y DIFUSION:

Prof. ALBERTO G. RANEA

GUARDASELLOS:

Dr. JOSE MARIA MAINETTI

AUTORIDADES DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

DECANO:

Dr. JOSE H. FERNANDEZ DE LIGER

VICE-DECANO:

Dr. JORGE E. LED

SECRETARIO DE ASUNTOS ACADEMICOS:

Dr. FEDERICO CARLOS DEL CASTILLO

SECRETARIO DE SUPERVISION ADMINISTRATIVA:

Sr. OMAR HUGO RAMIREZ

DIRECTORA DE ENSEÑANZA:

Sra. HAYDEE C.R. DE PERETTO

DIRECTORA DE BIBLIOTECA:

Srta. HEBE PEDERNEIRA

DIRECTOR ECONOMICO-FINANCIERO:

Sr. HECTOR S. MOREIRA

NOMINA DEL PERSONAL DOCENTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

PROFESOR TITULAR "DEDICACION EXCLUSIVA"

ANGULO, Eusebia	Investigadora	Titular
CARROZZA, Jesús S.W.	Int. a la Biofísica	Titular
ETCHEVERRIGARAY, M. Elisa	Virología	Reempl.
MARTIN, Alcides A.	Anat.y Fisiología Patológica	Titular
MENENDEZ, Néstor A.	Patología de Aves y Pilíferos	Interino
PRACCA, Lydia C.	Clínica de Peq. Animales	Titular
QUINTEROS, Indalecio R.	Genética y Biometría	Titular
ZACCARDI, Eduardo M.	Fisiología	Titular

PROFESOR TITULAR "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

AGUIRRE, Walter G.	Microbiología Especial	Titular
ALBERDT, Cecilio	Tec. y Sanid. Alimentos	Titular
ANDREATTA, Jorge Nelson	Semiología y Propedéutica	Titular
BERTOLINI, José M.	Anatomía Comparada	Interino
DELPRATO, Ismael Oscar	Anat. Descriptiva y T.	EMERITO
JENSEN Alicia D.	Bioestadística	Interino
LED, Jorge E.	Parasit. y Enf. Parasitarias	Interino
MANZULLO, Alfredo	Inmunología I y II	EMERITO
MAROTTA, Eduardo G.	Zoot. Especial I (O.S.y C.)	Titular
OCHOA, Mario E.	Director-Inst. Sta. Catalina	Interino
OTTINO, Julio F.	Histología y Embriología	Interino
PENNIMPEDE, Enrique F.F.	Inmunología Gral. y Aplicada	Interino
PIOVANO, Nicolás M.	Int. a la Bioquímica	Titular
RODRIGUEZ, Benjamín R.	Zootecnia Esp. II (B. y E.)	Titular

PROFESOR TITULAR "DEDICACION SIMPLE"

AGUIRRE, Walter G.	Microbiología Aplicada	Titular
ARGERI, Nelson J.	Análisis Clínicos I	Interino
ARGERI, Nelson J.	Análisis Clínicos II	Interino
BOCCIA, Francisco O.	Patología Quirúrg.y Podología	Interino
CARROZZA, Jesús S.W.	Física y Química Aplicadas	Reempl.
GIMENO, Emilio Juan	Higiene, Epidemiología y S.P.	Titular
ISEAS, Fortunato B.	Patología Médica	Interino
MARTIN, Alcides A.	Patología General	Titular
MARTINO, Olindo A.L.	Salud Pública	Interino
OSTROWSKI, Jorge E. B.	Patología de la Rep.	Titular
PANZONI, Erico Emir	Economía Agraria	Titular
PEROTTI, Rodolfo M.	Zoot. Esp. III (A. y P.)	EMERITO
SCIAMMARELLA, Alfredo M.	Medicina Operatoria	Interino

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION EXCLUSIVA"

BOCCIA, Francisco O.	Clínica de Peq. Animales	Reempl.
BRANDETTI, Eugenio	Patología de Aves y Pilíf.	Reempl.
IDIART, Julio R.	Anat. y Fisiología Patológica	Interino
LAGRECA, Liliana	Zootecnia Gral. y Agrostología	Interino
MONINA, Marta I.	Clínica de Grand. Animales	Interino

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

CHAMPREDONDE, Hugo N.	Patología General	Interino
DIBBERN, Alberto R.	Zoot. Especial II (B. Y E.)	Interino

DURANTE, Eduardo J.	Servicio Central de Cirugía	Interino
ERRECALDE, Jorge O. (h)	Farmacología F. y Terapéutica	Interino
FELDMAN, Raquel E.	Parasitología Comparada	Interino
FERNANDEZ, Enrique J.	Enfermedades Infecciosas	Interino
GOMEZ, Carlos M.	Inmunología II	Interino
MAGGI, Nilda B.	Servicio Central de Cirugía	Reempl.
MARTINO, Juan J.	Microbiología	Titular
NOIA, Miguel A.	Int. a la Biofísica	Titular
ORTEGA, César F.	Semiología y Propedeútica	Interino
PENNIMPEDE, María T. del A.	Tec. y Sanidad de los Aliment.	Interino
REINOSO, Enso H.	Micología Médica e Industrial	Reempl.
RUAGER, Jorge	Anatomía y Fisiol. Patológica	Interino
REPETTO SANCHEZ, Olindo	Medicina Operatoria	Reempl.

PROFESOR ADJUNTO "DEDICACION SIMPLE"

BACIGALUPO, Néstor R.	Tec. y Sanidad de los Aliment,	Interino
BAIGUN, Roberto	Patología de la Rep. y Obstet.	Reempl.
BRAVO BARDALES, Tomás	Economía Agraria	Reempl.
FERNANDEZ DE LIGER, J. H.	Clínica de Grandes Animales	Titular
FINOCHIETTO, Héctor D.	Patología Médica	Interino
GOMEZ, Carlos M.	Inmunología Gral. y Aplicada	Interino
GRILLO, Virginia E.	Zootecnia Esp, III (A.y P.)	Interino
MAGGI, Nilda B.	Patología Quirúrgica y P.	Interino
MALIANDI, Florestán S. (h)	Higiene, Epid.y S. Pública	Titular
MOISO, Alejandro C.	Mircrobiología	Titular
NOVARINI, Miguel A.	Farmacología F. y Terapéutica	Interino

OLIVA, Graciela A.	Virología	Interino
PRIO LOFEUDO, Graciela E.	Zoot. Especial III (A.y P.)	Interino
RENNER, Juan F.	Clínica de Grand. Animales	Interino
FOJAS, Edmundo R.	Fisiología	Titular
RUTTER, Bruno	Patología de la Rep. y Obst.	Interino
TARSIA, Elba Elena	Int. a la Biofísica	Titular
TESORIERO, Catalina	Microbiología Especial	Interino
VENTURINI, Lucila M.	Parasitología y Enf. Parasit.	Interino
VILLAR, Martha E.	Análisis Clínicos I Parte	Interino
VILLAR, Martha E.	Análisis Clínicos II Parte	Interino
YANNARELLA, Francisco G.	Parasitología y Enf. Parasit.	Interino

JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION EXCLUSIVA"

BASCHAR, Héctor O.	Clínica de Grandes Animales	Interino
FONROUGE, Reinaldo D.	Higiene, Epidem. y S. Pública	Interino
RONSIÑO, Roberto O.	Sección Radioisótopos	Interino
TEJEDOR, Eugenio D.	Genética y Biometría	Interino

JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

ALIVERTI, Héctor M.	Zootecnia Especial II (B. y E.)	Interino
ALLENDE, Miriam G.	Servicio Central de Cirugía	Reempl.
ALLEVATO, Hugo L.	Higiene, Epid. y S. Pública	Interino
AMASINO, Carlos F.	Enfermedades Infecciosas	Interino
AULICINO, Oscar O.	Tec. y Sanid. de los Alimentos	Interino
BABUSCI, Máximo	Fisiología	Interino
BAMBILL, Emilia C.	Zootecnia Especial I (O,S,y C.)	Interino

BARRENA, Javier E.	Anatomía Descriptiva y T.	Interino
BERNAGOZZI, Jorge A.	Inmunología Gral. y Aplicada	Interino
BISCHOFF, Jorge R.	Genética y Biometría	Interino
BUGALLO, Antonio	Farmacología F. y Terapéutica	Interino
BUTLER, Eduardo A.	Patología Quirúrgica y P.	Reempl.
CATALA, Juan C.L.	Anatomía Comparada	Reempl.
CARBONE, Cecilia	Animales de Laboratorio	Interino
CASTUMA, María E.	Intr. a la Bioquímica	Interino
CREDARO, Cristina Noemí	Análisis Clínicos I Parte	Interino
DE ANTONI, Graciela L.	Genética Microbiana	Interino
DEL CASTILLO, Federico C.	Histología y Embriología	Interino
DRAGONETTI, Ana María	Clínica de Pequeños Animales	Interino
FORNER, Jesús J.A.	Tec. y Sanidad de los Alimentos	Interino
FREGOSI, Mario O.	Anatomía Descriptiva y T.	Interino
FRIGOLI, Alicia E.	Int. a la Biofísica	Interino
FRIGOLI, Alicia E.	Int. a la Biofísica	Interino
FUENTES, Leticia S.	Int. a la Biofísica	Interino
GARCIA VALENTI, Horacio N.	Zootecnia Esp. II (B. y E.)	Interino
GIANOTTI, Ricardo S.	Tecnología y S. de los Aliment.	Interino
GIMENO, Eduardo J.	Anat. y Fisiol. Patológica	Interino
GIMENO, Eduardo J.	Patología General	Interino
GOITIA, Oscar F.	Zootecnia Especial II (B. y E.)	Reempl.
GUAJARDO, Margarita H.	Int. a la Bioquímica	Interino
GUGLIELMETTI, Elda M. C.	Int. a la Biofísica	Interino
GUGLIELMETTI, Elda M. C.	Física y Química Aplicadas	Interino
IBARGOYEN, Guillermo S.	Patología General	Interino

LACCHINI, Raúl A.	Zootecnia Gral. y Agrostología	Interino
LINZITTO, Oscar R.	Histología y Embriología	Interino
MARCANTONI, Hugo	Histología y Embriología	Interino
MASSONE, Raúl A.	Clínica de Grandes Animales	Reempl.
MILLAN, Margarita D.	Anatomía Descriptiva y Topogr.	Interino
MONTESINOS RAMOS, Ignacio	Clínica de Grandes Animales	Interino
MURO, Alicia M.	Clínica de Pequeños Animales	Interino
ORELLANA, Jorge	Histología y Embriología	Interino
PELLON, Horacio S.	Tecnología y S. de los Aliment.	Interino
PIACENTINI, Enrique	Tecnología y S. de los Aliment.	Interino
PIAZZA, Delia D.	Microbiología Especial	Interino
POLI, Mario A.	Genética y Biometría	Interino
PONS, Eduardo E.	Clínica de Grandes Animales	Interino
RADMAN, Nilda E.	Parasit. y Enf. Parasitarias	Interino
RAMIREZ, Luis E.	Anatomía Descriptiva y T.	Reempl.
RECALDE, Ricardo J.	Patología Quirúrgica y P.	Reempl.
SALESSI, Enrique	Fisiología	Reempl.
SARA, Raúl C.	Patología de la Rep. y Obst.	Interino
SCAVIA, Ricardo C.	Anatomía Comparada	Interino
TABORCIA, Juan A.	Patología General	Interino
TARABUSO, Ricardo	Semiología y Propedeútica	Interino
TREBUCQ, Rubén A.	Inmunología Gral. y Aplicada	Interino
VENTURINI, María C.	Inmunología Gral. y Aplicada	Interino
VARELA, Juan A.	Microbiología	Reempl.
VOCOS GIMENEZ, Sara T.	Zootecnia Esp. II (B. y E.)	Interino
RIVADAVIA, Carlos A.	Int. a la Bioquímica	Reempl.

JEFES DE TRABAJOS PRACTICOS "DEDICACION SIMPLE"

AVILA, Silvia M.	Microbiología Especial	Interino
BERNAGOZZI, Jorge A.	Inmunología Gral. y Aplicada	Reempl.
CALONGE, Carlos A.	Patología Médica	Interino
CASTAÑEDA, Alberto C.	Clínica de Pequeños Animales	Interino
CESAR, Norberto	Patología Médica	Reempl.
CATALA, Gustavo G.	Patología de la Rep. y Obst.	Reempl.
CORTEZ, Guillermo	Higiene, Epidem. y S. Pública	Reempl.
CUETO, Eduardo R.	Zootecnia Especial II (B. y E.)	Interino
CHIARAVALLI, Juan C.	Zootecnia Gral. y Agrostología	Interino
FERNANDEZ DE LIGER, J.H (h)	Patología Médica	Interino
FORMENTI, Liliana E.	Microbiología Aplicada	Reempl.
GALLO, Guillermo F.	Fisiología	Interino
GARCIA FRONTINI, María V.	Parasitología y Enf. Parasit.	Interino
GIMENEZ, Mabel A.	Zootecnia Especial I (O.S. y C.)	Interino
GRAMIGNA, Tomás E.	Taller de Educación	Interino
HERNANDEZ, Zulma H.	Salud Pública	Interino
LACCHINI, Raúl A.	Zootecnia Especial I (O.S.y C.)	Interino
LOJO, María E.	Genética Microbiana	Interino
MANACORDA, Ana María	Anatomía Descriptiva y T.	Reempl.
MARILUNGO, Aníbal J.	Medicina Operatoria	Interino
MELANI, Gustavo H.	Patología Médica	Interino
MORRIS. Marta Rita	Micología Médica e Ind.	Interino
NICODEMO, María del C.	Zootecnia Especial III P (A.y P.)	Interino
NOSETTO, Edgardo O.	Clínica de Grandes Animales	Interino

UCAMPO, Jesús M. F.	Int. a la Biofísica	Interino
PERFUMO, Juan C.	Anatomía y F. Patológica	Interino
ROMERO, Jorge R.	Parasitología y Enf. Parasit.	Interino
RONCINO, Roberto O.	Fisiología	Interino
SALAS, Laura V.	Semiología y Propedeútica	Interino
SANCHO, José J. I.	Medicina Operatoria	Interino
SIMPSON, María I.	Int. a la Biofísica	Interino
TOBIA, Marta B.	Microbiología Aplicada	Interino
TREBUCQ, Rubén A.	Inmunología I	Interino
TUNES, María del L.	Microbiología	Interino
VALLEJOS, Ethel Victoria	Patología Médica	Interino
VENERE, Rodolfo L.	Zoot. Gral. y Agrostología	Reempl.
WARD, Miguel V.	Farmacología F. y Terapéutica	Reempl.

AYUDANTES DIPLOMADOS "DEDICACION EXCLUSIVA"

AVILA, Silvia M.	Histología y Embriología	Interino
CASTELLANO, María C.	Clínica de Pequeños Animales	Interino
CATALANO, Vicente A.	Histología y Embriología	Interino
CERRUTTI, Augusto S.	Sección Radioisótopos	Interino

AYUDANTES DIPLOMADOS "DEDICACION TIEMPO PARCIAL"

BERISSO, Marcela M.	Enfermedades Infecciosas	Interino
CABRAL, Marta S.	Tec. y Sanidad de los Aliment.	Interino
CAMINO, Ricardo A.	Microbiología Especial	Interino
FLAMINI, Mirta A.	Histología y Embriología	Reempl.
GALOSI, Cecilia M.	Intr. a la Bioquímica	Reempl.

GONZALEZ, Ester T.	Virología	Interino
HUERTA, Alicia N.	Int. a la Bioquímica	Interino
MARENGO, Alejandro G.	Higiene, Epidemiología y S. P.	Interino
MILLAN, Roberto G.	Histología y Embriología	Interino
PETRUCCELLI, Miguel A.	Patología de Aves y Pilíferos	Interino
RAMIREZ, Luis E.	Clínica de Pequeños Animales	Interino
RENARD, Jorge L.	Tecnología y Sanid. de los A.	Interino
RIVADENEIRA, Elizabeth	Clínica de Grandes Animales	Reempl.
RULE, Roberto	Farmacología F. y Terapéutica	Reempl.
TABORCIA, Juan A.	Enfermedades Infecciosas	Interino
URQUIOLA, Horacio M.	Fisiología	Reempl.
ZOHUAR, Edith E.	Clínica de Pequeños Animales	Interino

AYUDANTE DIPLOMADO "DEDICACION SIMPLE"

ALONSO, Juan C.	Genética Microbiana	Interino
ALT, Celia M.	Microbiología Especial	Interino
ALLEVATTO, Susana del C.	Zootecnia Gral. y Agrostología	Reempl.
ANTONINI, Alicia G.	Genética y Biometría	Interino
APREA, Adriana N.	Medicina Operatoria	Interino
ARCHELLI, Susana Mónica	Parasitología Comparada	Interino
BEDOTTI, Daniel O.	Clínica de Grandes Animales	Interino
BUSCAGLIA, Celina	Zootecnia Especial III (A. y P.)	Int,Lic,c,s,
CALVO, Carlos J.	Anatomía y F. Patológica	Interino
CAMINO, Ricardo A.	Animales de Laboratorio	Interino
CATALANO, Vicente A.	Sección Audiovisuales	Interino
CERRUTTI, Augusto S.	Fisiología	Interino

COLOCCIA PAYBA, Lilian G.	Anat. y Fisiol. Patológica	Interino
COURREGES, Marta M.	Patología de Aves y Pilíf.	Interino
CUELLO, Carlos E.	Clínica de Grandes Animales	Reempl.
D'AGOSTINO, Liliana E.	Int. a la Bioquímica	Interino
DELGADO CAFFE, Osvaldo L.	Bioestadística	Interino
DI LEO, Julio A.	Zootecnia Especial I P.	Interino
DOMINELLI, Heraldo A.,	Patología Quirúrgica y P.	Interino
ELSO, Liliana E.	Enfermedades Infecciosas	Interino
FEATHERSTON, Patricia L.	Micología Médica e Ind.	Interino
FERREYRA, Juan C.	Farmacología F. y Terap.	Interino
GONZALEZ, Ester T.	Microbiología Aplicada	Interino
GONZALEZ, Oscar E.	Higiene, Epide. y S. Pública	Reempl.
GUILLEN, Griselda	Análisis Clínicos I Parte	Interino
IRASTORZA, Jorge A.	Patología Médica	Reempl.
IRIGOYEN, Isabel A.	Int. a la Bioquímica	Interino
LASTA, Gregorio	Semiología y Propedeútica	Reempl.
MEZZERA, Ana María	Clínica de Pequeños Animales	Interino
PIAZZA, Delia D.	Microbiología Aplicada	Reempl.
REGGIOSO, Ana María	Int. a la Biofísica	Interino
SANGUINETTI, Héctor R.	Anatomía y F. Patológica	Interino

DIRECCION DE ENSEÑANZA, 12 de abril de 1983.-

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alfredo Castro Vazquez por su guía, su enseñanza y su confianza durante todo el desarrollo del trabajo.

Al Dr. Ricardo P. Deis, Director del Laboratorio de Reproducción y Lactancia del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (LARLAC-CONICET, Mendoza), por brindarme su orientación, su apoyo y los medios necesarios.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de quien obtuve una beca, que me permitió dedicarme al estudio de la fase lútea de la rata.

Al Prof. Dr. Eduardo M. Zaccardi, por haber asumido la responsabilidad de la Dirección de esta tesis.

A la Prof. Norma B. Carreño, por su valiosa colaboración en la realización de las figuras; y al Dr. Jaime Prilusky por enseñarme el uso de la computadora.

A quienes, de modo directo o indirecto, han contribuido a la realización de esta tesis; en especial al Prof. Dr. Sixto Coscarón.

INDICE

	Página
1° PARTE: INTRODUCCION	
1.1.- Consideraciones Generales sobre la Neuroendocrinología de la Reproducción	2
1.2.- Actividad Sexual Cíclica de la Hembra Adulta: Generalidades	11
1.3.- Algunas Consideraciones que Caracterizan el Ciclo Estral de la Rata	21
1.4.- Características Principales del Ciclo Estral en Especies de Interés Zootécnico	32
1.5.- Características de la Fase Lútea o Pseudopreñez de la Rata	44
2° PARTE: DETALLES EXPERIMENTALES	
2.1.- Animales de Experimentación	53
2.2.- Determinación del Ciclo Estral	53
2.3.- Estimulaciones Sensoriales	55
2.3.1.- Estimulación Cervicovaginal	55
2.3.2.- Estimulación de la Región Perineal	56
2.4.- Evaluación de la Respuesta Lútea	57
2.5.- Extracción de Sangre y Determinación de Progesterona	57
2.5.1.- Muestra de Sangre	58
2.5.2.- Radioinmunoensayo de Progesterona	58
2.6.- Sección del Nervio Pudendo	64
2.7.- Administración de Drogas	65
2.8.- Lesiones del Sistema Nervioso Central	66
2.9.- Evaluación de la Actividad Biológica de la Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante	69
2.10.- Análisis Estadístico	70
3° PARTE: CONTROL NEURAL DE LA INDUCCION DE PSEUDOPREÑEZ	
3.- Control Neural de la Inducción de Pseudopreñez: Generalidades	73
3.1.- Resultado de la Sección del Techo del Area Preóptica en Animales con Desnervación de la Región Perineal	76
3.2.- Resultado de la Lesión del Septum	78

3.3.-	Discusión sobre el Efecto de las Lesiones en el Sistema Nervioso	79
4° PARTE: CONTROL HORMONAL DE LA INDUCCION DE PSEUDOPREÑEZ		
4.-	Control Hormonal de la Inducción de Pseudopreñez: Generalidades	83
4.1.-	Efecto de la Progesterona en la Inducción de Pseudopreñez	85
4.1.1.-	Administración de Progesterona en Diferentes Estadios del Ciclo Estral	85
4.1.2.-	Efecto Anestésico de la Progesterona y su Relación con la Inducción de Pseudopreñez	86
4.1.3.-	Facilitación de la Respuesta a la Estimulación Cervicovaginal por una Dosis Baja de Progesterona	87
4.1.4.-	Importancia de la Estimulación Perineal en la Inducción de Pseudopreñez luego de la Administración de Progesterona	88
4.1.5.-	Discusión sobre la Inducción de Pseudopreñez por Progesterona	90
4.2.-	Facilitación de la Inducción de Pseudopreñez por Administración de Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante	91
4.2.1.-	Efecto de la Administración de Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante sobre la Respuesta de Pseudopreñez	93
4.2.2.-	Efecto de la Administración de LH y FSH sobre la Respuesta de Pseudopreñez	95
4.2.3.-	Discusión sobre el Efecto Facilitador de la Inducción de Pseudopreñez por Administración de Hormona Liberadora de Hormona Luteinizante	96
RESUMEN		101
BIBLIOGRAFIA		106

1° PARTE:

INTRODUCCION

1.1.- CONSIDERACIONES GENERALES SOBRE LA NEUROENDOCRINOLOGIA DE LA REPRODUCCION.

Dentro de la fisiología de los animales domésticos, la endocrinología y la fisiología de la reproducción, son las disciplinas que han tenido un mayor desarrollo. Este importante desarrollo está en relación con los principales objetivos de la producción animal, entre los cuales resalta la obtención de animales que crezcan y se reproduzcan lo más rápido y económico que sea posible. Como los procesos del crecimiento y de la reproducción se hallan, en gran parte, bajo control endócrino, la endocrinología se encuentra estrechamente relacionada con el mejoramiento de la producción animal. Pero, luego de una interesante serie de experimentos (que trataremos resumidamente más adelante) se demostró que el sistema endócrino estaba controlado por el sistema nervioso central (SNC). Previa a esto, la glándula hipófisis (s.: glándula pituitaria) era considerada la "directora de la orquesta endócrina" y por tal motivo recibía la mayor atención. Con la introducción del SNC la hipófisis quedó relegada al papel de intermediaria de la información aportada por el SNC.

Una breve descripción histórica de los pasos fundamentales que atravesó la neuroendocrinología de la reproducción hasta nuestros días, servirá para introducirnos al tema. Podemos comenzar definiendo el concepto de secreción interna, establecido

experimentalmente luego de los trabajos de Berthold (24) y Claude Bernard (21), como sustancias biologicamente activas (denominadas hormonas) descargadas en la corriente sanguínea desde los órganos capaces de sintetizarlas. Una vez demostrada la función endócrina de la hipófisis, como así también su importante acción reguladora de otras glándulas endócrinas; surgió un creciente interés por determinar los mecanismos responsables de controlar su actividad.

Algunos trabajos de la literatura indicaban que los principios gonadotróficos hipofisarios eran descargados en la circulación en respuesta a un estímulo nervioso reflejo generado durante el coito en la coneja (84, 85) y la rata (129, 265, 266). Estas evidencias señalaban que la hipófisis anterior estaba bajo el control del sistema nervioso, principalmente, por aferencias nerviosas simpáticas provenientes del ganglio cervical superior (265, 266). En el año 1933, Hinsey & Markee (137) sugirieron que el SNC modificaba la actividad de la adenohipófisis a través de señales hormonales provenientes del lóbulo neural (s. neurohipófisis). Estos investigadores especularon que el estímulo excitatorio desde el hipotálamo activaría la neurohipófisis y que ésta afectaría el lóbulo anterior por una señal hormonal.

Al mismo tiempo surgía el interés por los hallazgos de Popa & Fielding (207, 208) sobre un plexo vascular que unía

la adenohipófisis y el hipotálamo; pero en base a sus resultados estos investigadores concluyeron equivocadamente que la sangre fluía desde la hipófisis hacia el hipotálamo. En 1935, Houssay et al. (142) en una breve descripción de sus observaciones, determinan que el flujo sanguíneo en el sistema porta-hipofisario del sapo era siempre desde el hipotálamo hacia la hipófisis, alcanzando la no siempre reconocida prioridad de este hallazgo. Una serie de trabajos posteriores (105, 106, 275, 277) confirmaban, en otras especies, que la dirección del flujo sanguíneo era similar a la encontrada en el sapo.

Meites & Sonntag (178) comentan que: "la existencia de hormonas en el cerebro de los mamíferos fue sugerida por Friedgood y Brooks (40-45 años atrás), extendiendo las ideas que Ernst y Berta Scharrer desarrollaron en especies no mamíferas a fines de 1920". Posteriores estudios citológicos de los núcleos supraóptico y paraventricular (231) produjeron importantes evidencias en favor de que en el hipotálamo existían neuronas capaces de sintetizar factores humorales. De esta manera, se estableció el principio de la neurosecreción, o sea células del tejido nervioso capaces de elaborar y liberar una sustancia de naturaleza proteica. Con estos antecedentes y los del flujo sanguíneo en el sistema porta-hipofisario, Hinsey (136) publica su hipótesis sobre la descarga de sustancias neurohumorales del hipotálamo hacia la adenohipófisis por medio del sistema portal.

Antes de aparecer la hipótesis de Hinsey (136), Marshall & Verney (171) habían demostrado que la ovulación en la coneja podía ser inducida por estimulación eléctrica a través de la cabeza. También Harris (121) utiliza el mismo procedimiento para inducir la pseudopreñez en la rata, sugiriendo la posibilidad de un control neurohumoral de la adenohipófisis pero a través de una inervación directa de la glándula desde el hipotálamo. Otros experimentos, también confirmaban la participación del sistema nervioso en la actividad reproductiva: a) inducción de pubertad precoz por lesiones del hipotálamo (268) y b) cambios en el funcionamiento del ovario y útero luego de lesionar diferentes zonas del hipotálamo de cobayos (70, 71). Si bien lo expuesto por Hinsey (136) y estos otros antecedentes pueden considerarse una base de la hipótesis neurohumoral, resultados posteriores (105, 124) dieron la base mas sólida para que Harris (122) estableciera -finalmente- la noción del control neurohumoral de la adenohipófisis.

El mecanismo de control de la adenohipófisis se fue aclarando con la demostración de actividad liberadora de hormona adrenocorticotrófica en el hipotálamo (110, 226); y más tarde, por la actividad liberadora de hormona luteinizante (123, 175). Este último hallazgo dió un nuevo impulso para que futuras investigaciones relacionadas con la Fisiología de la Reproducción tuvieran al SNC como uno

de sus objetivos. Así, fue posible determinar por trabajos in vivo e in vitro que el factor liberador de hormona luteinizante (LHRF) estaba localizado en una ancha franja del hipotálamo extendida rostrocaudalmente y que incluye la región supraquiasmática, la eminencia media y el tallo hipofisario (173). Posteriores evidencias surgen de unos clásicos experimentos en los cuales la hipófisis fue trasplantada al hipotálamo de ratas hipofisectomizadas (90, 116). Estos animales mantienen su función gonadotrófica al igual que se observa diferenciación de las células basófilas adenohipofisarias cuando los implantes se ubican en una determinada zona del hipotálamo, denominada área hipofisiotrófica. Este área hipofisiotrófica se extiende desde el quiasma óptico hasta la eminencia media. Otros trabajos de singular importancia fueron los realizados con lesiones y estimulaciones de la región preóptico-supraquiasmática que demostraron la participación de esta zona en el control de la descarga de la hormona luteinizante (LH) responsable de la ovulación (18, 80). Asimismo, Halasz & Gorski (114) mediante el uso de una ingeniosa micro-cuchilla que permite aislar la región tuberal del resto del cerebro, encontraron un bloqueo de la ovulación coexistente con una respuesta normal a la castración (aumento del nivel basal de las gonadotrofinas luego de la ovariectomía). Con los resultados obtenidos por este método y otros (i.e.: lesiones y estimulaciones del SNC, tratamiento neonatal con esteroides que vuelve a la rata hembra estéril), Barraclough (18) presenta la

hipótesis de un doble control hipotalámico responsable de la secreción hipofisaria de las gonadotropinas (LH y hormona foliculoestimulante-FSH): un centro primario ubicado rostralmente (área preóptica-supraquiasmática) que controlaría los cambios cíclicos, y otro en la región tuberal basal (núcleo arcuato-eminencia media) para gobernar el nivel basal.

La aislación y caracterización química de tres hormonas hipotalámicas, hormona liberadora de tirotrófina (TRH) (31), hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH)* (172) y hormona inhibidora de la liberación de hormona de crecimiento (somatostatina) (29); dió un considerable impulso a la neuroendocrinología. Al contar con suficiente cantidad de estos péptidos fue posible, entre otras cosas, producir anticuerpos específicos; permitiendo el desarrollo de técnicas de alta

* Algunos autores prefieren denominarla hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Pero hasta el momento se mantiene la controversia entre los que sostienen que una misma hormona hipotalámica (LHRH o GnRH) sería la responsable de controlar la secreción de las gonadotropinas hipofisarias (LH y FSH), contra los que opinan que la FSH tendría -además- un mecanismo de control propio.

sensibilidad (radioinmunoensayo, inmunohistoquímica) capaces de medir y/o localizar estos péptidos en tejidos y fluidos corporales. Por ejemplo, por medio del radioinmunoensayo fue posible medir la concentración de LHRH en sangre del sistema porta-hipofisario de ratas anestesiadas y correlacionarlo -en el mismo animal- con los niveles de LH en el plasma periférico (88). Muy recientemente, Levine et al. (163) han analizado minuciosamente la correlación entre la descarga de LHRH y la de LH en ovejas no anestesiadas. La inmunohistoquímica fue el método que posibilitó localizar, con mayor precisión, las neuronas productoras de los péptidos hipotalámicos. De esta manera se han descrito las vías involucradas en la síntesis y liberación de LHRH en el cerebro de varias especies de mamíferos: rata, ratón, cobayo, ovino, bovino, equino y mono rhesus (57, 58, 59, 151, 242).

Recientemente ha sido posible describir la estructura primaria del factor liberador de corticotrofina (CRF) (248). Para el factor inhibidor de la liberación de hormona melanocitoestimulante (MIF) se ha propuesto una secuencia de aminoácidos (49, 189), pero aún existen controversias al respecto. Si bien se trabaja activamente para determinar la estructura química del resto de las hormonas hipotalámicas, aún quedan algunas por definir, ellas son: factor liberador de hormona de crecimiento

(GHRF), factor liberador de prolactina (PRF), factor inhibidor de la liberación de prolactina (PIF), y factor liberador de la hormona melanocitoestimulante (MRF).

El estudio de la influencia de los neurotransmisores hipotalámicos en la secreción de hormonas hipofisarias ha alcanzado un notable desarrollo en los últimos 15 años. Con relación a este tema han sido publicados algunos trabajos de revisión (178, 269). Entre los neurotransmisores (sustancias de distinta naturaleza química que, como resultado de su liberación se activa o inhibe una célula post-sináptica) encontrados en el hipotálamo, y que han sido mas estudiados podemos citar: dopamina, noradrenalina y serotonina. También se han aislado del hipotálamo otros neurotransmisores capaces de modificar la liberación de hormonas hipofisarias (174): histamina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), opiodes cerebrales, ácido gama-aminobutírico (GABA), sustancia P, neurotensina, bombesina, acetilcolina. Los neurotransmisores se piensa que actúan sobre los sitios receptores, estimulando o inhibiendo, la actividad de las células responsables de la síntesis de las hormonas hipotalámicas. Ciertos neurotransmisores, reúnen las condiciones como para -también- ser considerados hormonas, a este grupo pertenecería la dopamina. Luego de ser sintetizada por neuronas hipotalámicas hay evidencias de que la dopamina se descarga directamente en el sistema porta-hipofisario y que actúa sobre las células prolactínicas hipofisarias

inhibiendo la descarga de prolactina (PRL).

De acuerdo con lo descripto hasta ahora se comprueba que las neuronas neurosecretoras hipotalámicas son las responsables de controlar el tipo y la cantidad de gonadotrofinas que la glándula pituitaria libera en el sistema circulatorio. Si bien ésto es cierto, en el contexto fisiológico del animal, este sistema hipotálamo-hipofisario recibe una serie de estímulos internos y externos que modifican su actividad. Los estímulos sensoriales provenientes del medio externo son variados (i.e.: luz, olfato, receptores táctiles cutáneos, etc.) y recorren distintas estructuras neurales, para -finalmente- alcanzar el hipotálamo. A este órgano convergen una serie de vías neurales que los integran con estructuras como el telencéfalo y mesencéfalo. La influencia de estas estructuras en el control de la descarga de gonadotrofinas hipofisarias ha sido demostrada (35, 252, 262). Los estímulos internos que recibe el eje hipotálamo-hipofisario son provenientes del nivel plasmático de las hormonas segregadas por las glándulas periféricas. Estas hormonas son las responsables de los mecanismos de retroalimentación (feedback), negativos o positivos, a los cuales el hipotálamo y la glándula pituitaria responden con un incremento o una disminución en la síntesis y descarga de sus hormonas (87, 185).

1.2.- ACTIVIDAD SEXUAL CICLICA DE LA HEMBRA ADULTA: GENERALIDADES.

A partir de la pubertad, las hembras mamíferas mantienen una vida reproductiva regular (ciclos estrales o menstruales), cuyo objeto es la conservación de la especie. Esta sucesión de ciclos estrales o menstruales es interrumpida por la gestación y (durante cierto período) por la lactancia (158). Este esquema se repite hasta la transición gradual a la senilidad, la que se caracteriza por una disminución en el número de folículos en crecimiento y la consecuente modificación de la producción de estrógenos foliculares, los que afectarán al ovocito (induciendo anomalías en el desarrollo embrionario y muerte futura), el útero, el hipotálamo y la hipófisis (34).

Esta manifestación sexual cíclica característica de la hembra adulta, difiere de aquella de los machos que presentan una actividad sexual denominada tónica, debido a que ocurren variaciones mínimas a lo largo de su estación reproductiva. La diferenciación entre la actividad sexual masculina y femenina tiene su base estructural y funcional en diferentes órganos, entre ellos: sistema nervioso, órganos genitales, hígado. Dependiendo de la especie animal, cada una de estas estructuras alcanzan su diferenciación sexual en distintos períodos del desarrollo intrauterino o postnatal. Trabajos recientes en la rata, han descrito una zona del área preóptica-hipotalámica

-denominada núcleo del dimorfismo sexual- cuyas características ultraestructurales difieren entre machos y hembras (103). Este núcleo presenta siempre características femeninas pero, durante un período determinado (denominado período crítico), se vuelve sensible a hormonas esteroideas de la circulación. En el caso de una cría macho los testículos segregan andrógenos en el momento coincidente con el período crítico, transformando al núcleo del dimorfismo sexual de manera tal que adopta características masculinas. Cuando la cría es una hembra el período crítico transcurre sin estimulación esteroidea, ya que la actividad secretoria del ovario comienza recién después del fin del período crítico.

La base funcional de los ciclos estrales o menstruales es el resultado de un rítmico interjuego entre la hipófisis y el ovario. Por lo tanto, la fisiología del ovario y los mecanismos hormonales y neurales que integran la hipófisis con la gónada femenina son los agentes determinantes de esta actividad cíclica. En ausencia de la hipófisis los ovarios se vuelven quiescentes, y en las hembras ovariectomizadas la hipófisis libera un elevado nivel de gonadotrofinas. Solamente cuando la hipófisis y el ovario interactúan mutuamente, a veces estimulando y otras inhibiendo, se pueden observar los ciclos estrales o menstruales.

Resulta bastante difícil poder diseccionar y explicar con

claridad los circuitos neuroendócrinos que integran el eje hipotálamo-hipofisario con el ovario, en la hembra adulta. Para simplificar podemos clasificar estos circuitos en relación al número de estructuras que participan: 1) La hormona puede regular directamente a las células que la producen, por ejemplo una hormona hipotalámica puede modular su propia producción por acción directa sobre el SNC (circuito ultracorto hipotálamo-hipotalámico). 2) La segunda posibilidad es que la hormona hipofisaria actúe directamente sobre el SNC (circuito corto hipofiso-hipotalámico). 3) La hormona hipofisaria regula la glándula periférica cuya secreción actúa directamente sobre el SNC (circuito largo hipotálamo-hipófisis-glándula periférica). 4) La preñez es el ejemplo de un complejo mecanismo de difícil regulación, durante la cual se desarrolla una glándula transitoria como la placenta, que es el cuarto nivel de regulación (circuito cerebro-hipofiso-gonadal-placentario). 5) Finalmente existe otro mecanismo fisiológico de control endócrino sin intervención del hipotálamo, en el cual la secreción de la glándula periférica actuando sobre la hipófisis anterior controla su secreción y la respuesta a la hormona hipotalámica (circuito hipofisario-glándula periférica). Estudios realizados en animales y humanos han demostrado que si bien la LHRH es capaz de estimular la descarga de LH, la intensidad de cada respuesta es dependiente de la concentración de los esteroides ováricos (74).

Las fases que componen el ciclo estral o menstrual pueden ser divididas de acuerdo con: las modificaciones morfofisiológicas correspondientes al ciclo ovárico, o por las alteraciones cíclicas en los órganos sexuales secundarios (i.e.: útero, cervix, vagina, vulva). De acuerdo con las modificaciones morfofisiológicas correspondientes al ciclo ovárico, el ciclo estral de los mamíferos puede dividirse en dos fases características: la fase folicular y la fase luteal.

FASE FOLICULAR. La fase folicular corresponde al período que transcurre desde la formación del folículo antral hasta la ovulación. Durante esta fase la descarga de FSH adenohipofisaria sería la responsable de promover el desarrollo de los folículos antrales y la consecuente producción de estrógenos. Por medio de estudios realizados in vivo e in vitro se ha demostrado que la FSH cumple el papel más importante en la iniciación de la formación del antro folicular. Esta gonadotropina estimula la mitosis de las células de la capa granulosa y la formación del fluido folicular (el que se alojara dentro de la cavidad o antro folicular).

El desarrollo de los folículos primordiales (formados por un ovocito rodeado por una sola capa de células epiteliales planas) hasta el estadio de preantrales, no es estrictamente dependiente de la estimulación gonadotrófica; ya que en hembras hipofisectomizadas la formación de

folículos preantrales continúa a un ritmo casi normal (138). Cuando un folículo primordial inicia su crecimiento culmina en la ovulación o en la degeneración folicular (s.: atresia folicular), este último destino es común para la mayoría de los folículos. Si bién aún resta mucho por conocerse sobre los mecanismos responsables de la atresia folicular (270), parecería que el número de folículos antrales que alcanzan la ovulación estaría relacionado con el nivel de FSH. Estudios en hamsters han permitido observar que una caída del nivel plasmático de FSH coincide con el período de atresia folicular (104).

El período que demanda el total crecimiento folicular hasta la ovulación es un punto de gran importancia dentro de la fisiología ovárica. Los datos disponibles (113) pertenecen a los pequeños roedores, en los cuales se observa una duración de alrededor de 20 días, siendo 4 días para la maduración final luego de la formación del antro folicular. Teniendo en cuenta que la maduración final en ovejas, vacas y cerdas es de alrededor de 17 a 34 días (259), la duración total del desarrollo folicular en los mamíferos de interés zootécnico es mayor que 20 días y, posiblemente, sea cercana a 6 meses.

Conforme los folículos van madurando, producen mayor cantidad de estrógenos; los que estimulan el tracto genital femenino. A medida que van creciendo los folículos, el aumento en el nivel de estrógenos es un factor de gran

importancia para desencadenar el síndrome de receptividad sexual (s.: estro, celo o calor). Esta conducta de receptividad sexual de la hembra depende de un adecuado balance hormonal, ya que la ovariectomía impide su presentación. Los esteroides ováricos serían la señal fisiológica para iniciar la motivación sexual, estimulando determinadas células ubicadas en el SNC.

Durante el estro se produce una sincronización entre la conducta de receptividad sexual de la hembra (que la prepara para recibir la cópula del macho) y el momento de la ovulación. La descarga preovulatoria de las gonadotrofinas ocurre cuando los niveles de progesterona (Pg) son mínimos y los estrógenos han alcanzado su máximo. La capacidad de los estrógenos para liberar las gonadotrofinas en ausencia de Pg, ha sido demostrada por experimentos en hembras castradas (201). Los estrógenos actuarían a dos niveles: hipotálamo e hipófisis. Como resultado de una retroalimentación positiva sobre el hipotálamo, los estrógenos inducen la descarga de LHRH la que llegará a la hipófisis para estimular las células gonadotropas -previamente sensibilizadas por la acción estrogénica- produciéndose la descarga de LH y FSH (aún no se conoce exactamente si esta última hormona cumple algún papel importante en la ovulación). El momento de la ovulación puede tomarse como el acontecimiento que marca el fin de la fase folicular. En algunas especies (vaca y perra) puede detectarse una hemorragia genital próxima al

momento de la ovulación.

La fase folicular incluye el período anterior al estro, denominado proestro. En las hembras poliéstricas éste transcurre entre el final del ciclo anterior y el comienzo del estro.

FASE LUTEA. Después de la ovulación la cavidad folicular se colapsa, la pared folicular se luteiniza y, luego de un corto período, esta estructura vuelve a adquirir un tamaño semejante al preovulatorio. A expensas de la luteinización de las células de la pared folicular (s : células de la granulosa) se organiza el cuerpo lúteo que será el responsable de secretar Pg. En este proceso de luteinización se puede observar, entre otras cosas: hiperplasia y/o hipertrofia de las células granulosas, gotas lipídicas en el citoplasma, incremento del tamaño del citoplasma, desarrollo de una red capilar entre las células (127). Todas las células granulosas de las diferentes especies se luteinizan, pero en algunos animales, un destino similar puede también afectar a las células de la teca interna aunque nunca más que en una pequeña proporción del cuerpo lúteo (184). La participación de la teca interna en la composición del cuerpo lúteo tiene importancia histofisiológica ya que, en relación con la cantidad de estas células, el cuerpo lúteo sintetiza y libera estrógenos y andrógenos.

Durante la ovulación se produce la ruptura de la membrana basal que rodea al folículo, este acontecimiento sería -para algunos autores (55)- el desencadenante del proceso de luteinización. Cuando esta membrana basal se rompe artificialmente (125) y cuando se eliminan las células de la granulosa para ser mantenidas in vitro, o en la cámara anterior del ojo (89) se produce la luteinización. También se ha inducido luteinización de células granulosas en cultivo cuando se le agregó AMP cíclico al medio de incubación (56). El-Fouly et al. (73) encontraron que, por medio de la extracción cuidadosa del ovocito (ovectomía) de folículos antrales, se inducía luteinización. Estos investigadores no encontraron ninguna respuesta luego de la punción de la membrana basal del folículo ni después de la salida del líquido folicular; por lo tanto, postularon que el ovocito cumpliría una función inhibitoria sobre la formación del cuerpo lúteo (esto parece no cumplirse en especies que, como la yegua forman cuerpos lúteos a partir de folículos no ovulados). Los folículos ovectomizados son funcionales durante 5 días solamente. Si se le agrega una dosis de LH dentro del folículo vacío luego de la ovectomía, este cuerpo lúteo se vuelve funcional por el mismo período que dura la pseudopreñez del conejo (52).

El período de vida funcional de los cuerpos lúteos durante el ciclo de un animal no preñado puede dividirse, de acuerdo con los niveles plasmáticos de Pg en: fase de

aumento, fase de mantenimiento y fase de regresión (224). El desarrollo del cuerpo lúteo acompaña a las fases de aumento y mantenimiento, pero la regresión morfológica demora más tiempo que la caída del nivel de Pg. Cada una de estas fases son muy variables entre las diferentes especies animales (por ejemplo: las fases de aumento y mantenimiento pueden durar 5 a 10 días en especies polióestricas, o 10 días a 3 semanas en carnívoros monoéstricos).

El control funcional del cuerpo lúteo dependería, de un balance funcional entre factores luteotróficos y luteolíticos. Estos factores luteotróficos y luteolíticos difieren entre las distintas especies animales y, hasta el momento, quedan muchos aspectos por dilucidar. Los roedores, y más particularmente la rata, han sido objeto del mayor número de investigaciones al respecto. Evans et al. (76) demostraron que el factor hipofisario que mantenía la función lútea en la rata era similar a la PRL. Durante muchos años se pensó que la PRL era la hormona luteotrófica de todas las especies, hasta que una serie de investigaciones demostraron que esta generalización era incorrecta (190). En el año 1970, Ray & Moudgal (213) demuestran que el cuerpo lúteo de la preñez necesita, entre los días 8 y 9, del estímulo de LH para continuar su secreción de Pg. Esta dependencia del cuerpo lúteo de la rata, de la PRL tanto como de la LH, ubica a esta última como otra hormona luteotrófica. Hasta el momento parecería

que la LH es el principal componente del complejo luteotrófico en el mayor número de especies animales (224).

La Pg actuando a nivel uterino provee un medio adecuado para la implantación del embrión y para el mantenimiento de la preñez (10). A su vez, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipofisario inhibe la secreción de las gonadotropinas hipofisarias responsables de la maduración folicular y la ovulación, y -de esta manera- se impide la aparición de nuevos estros.

Si el óvulo producido no es fecundado, el cuerpo lúteo mantiene su actividad funcional sólo durante un limitado período de tiempo. Después ocurre la lisis del cuerpo lúteo como resultado de la acción de agentes luteolíticos. La prostaglandina F2a (PGF 2a) es posiblemente uno de los factores luteolíticos esenciales que causan la muerte del cuerpo lúteo, aunque también existen variaciones entre las especies. En algunas hembras (la oveja es el ejemplo mejor documentado; 102, 141, 177) las prostaglandinas de origen uterino son incuestionablemente el factor más importante en determinar la muerte del cuerpo lúteo (230). En muchas otras especies, el útero tiene una importancia menor (e.g.: conejo, rata) o casi ninguna (e.g.: primates, marsupiales, reproductores monoéstricos) en determinar el período de vida funcional del cuerpo lúteo; a pesar de que estas especies sintetizan prostaglandinas uterinas del mismo modo

que la oveja (1, 258). Luego de la luteólisis, el nivel plasmático de Pg cae abruptamente facilitando la secreción de las hormonas hipofisarias (LH y FSH) al desaparecer la retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipofisario. De esta manera se inicia un nuevo proestro.

Algunos autores dividen la fase lútea en dos períodos: metaestro (intervalo comprendido entre la ovulación y la producción de Pg por el cuerpo lúteo) y diestro (corresponde al período de vida funcional del cuerpo lúteo).

1.3.- ALGUNAS CONSIDERACIONES QUE CARACTERIZAN EL CICLO ESTRAL DE LA RATA.

En la sección anterior hemos comentado que los eventos del ciclo estral son el resultado de un armónico interjuego entre hipotálamo, hipófisis anterior y ovario. Resulta sumamente interesante analizar los varios efectos inhibitorios y estimulatorios que las hormonas ejercen sobre las estructuras arriba citadas, para formar un repetido patrón endócrino con una sólida periodicidad.

A continuación se intentará describir la secuencia de eventos endocrinológicos que ocurren durante el ciclo estral en la especie de laboratorio más estudiada, la rata.

Mucho de lo descripto del ciclo estral de la rata puede ser aplicado a otras especies. Pero también hay algunas diferencias interespecíficas que resultan de gran interés.

Antes de la existencia de los métodos bioquímicos para determinar las concentraciones de hormonas en sangre, los endocrinólogos fueron capaces de observar cambios cíclicos en la actividad ovárica. Para ello se basaron en dos indicadores biológicos que se pueden observar en la rata hembra no copulada: cambios cíclicos en su conducta sexual y modificaciones de la citología vaginal. La conclusión que estas variaciones cíclicas eran el resultado de la descarga de las hormonas ováricas fue confirmado por la ovariectomía que cesó inmediatamente estas fluctuaciones (234). Existen también otros procedimientos para evaluar los cambios durante el ciclo estral, el peso uterino y el examen microscópico del ovario. Estos métodos tienen la desventaja de requerir la intervención quirúrgica del animal.

Las variaciones en la conducta sexual y en la citología vaginal, pueden determinarse en un mismo animal y en reiteradas oportunidades. La técnica para evaluar cambios en la citología vaginal es simple y rápida (250). Este método consiste de un lavaje del lumen vaginal y posterior observación microscópica de la citología vaginal. La mayoría de las ratas de laboratorio no preñadas tienen un ciclo estral que dura entre 4 y 5 días (164). La

citología vaginal en la rata con ciclo estral de 4 días de duración es el siguiente: estro vaginal, células epiteliales cornificadas (duración 36 hs); diestro vaginal, presencia de polimorfonucleares además de otras células epiteliales (duración 48 hs); proestro vaginal, células epiteliales nucleadas y ausencia de polimorfonucleares (duración 12 hs). Las observaciones de la conducta sexual se realizan colocando a la hembra con un macho y evaluando la frecuencia de respuestas de lordosis (una de las respuestas motoras que presenta la hembra cuando es receptiva a la cópula). La inducción de las respuestas motoras de la hembra en celo pueden, también, provocarse por la estimulación de los flancos y región perineal con la mano del experimentador. Por estos métodos, se pudo determinar que la conducta de receptividad sexual de la rata hembra aparece junto con la citología vaginal que corresponde al proestro-principio del estro (cada 4 o 5 días) (281).

Otro importante avance en el entendimiento de la ciclicidad fue provisto por el hallazgo que la ovulación depende de cambios en el período luz y oscuridad. Teniendo en cuenta ésto es que es importante mantener a las ratas bajo un ciclo de luz-oscuridad controlado. Usando un ciclo de 14 hs de luz y 10 hs de oscuridad (con luces prendidas entre las 05.00-19.00 hs), Everett (78) encontró que las ratas ovulaban entre las 01.00-03.00 hs del estro vaginal.

A continuación se intentará describir los principales eventos endócrinos de un ciclo estral de 4 días, en el cual la ovulación ocurre a las 01.00 hs del estro vaginal.

12 HORAS DESPUES DE LA OVULACION (13.00 hs del estro vaginal): El estradiol, Pg, LH y PRL en el plasma sistémico son bajos. Los valores de FSH están descendiendo pero no han alcanzado su valor basal (98). La FSH descargada durante la tarde del proestro y mañana del estro vaginal sería la responsable de estimular el desarrollo de los folículos preantrales que ovularán próximamente (271). Si se impide la estimulación gonadotrófica (e.g.: por medio de hipofisectomía) los folículos no crecen más allá del estadio de preantrales (169).

En el ovario se puede observar la reparación de la pared folicular en los folículos que ovularon, en la cavidad folicular se están desarrollando las células luteales. También se observan folículos terciarios en crecimiento.

36 HORAS DESPUES DE LA OVULACION (13.00 hs del primer día de diestro vaginal): El estradiol, LH, FSH y PRL en sangre son bajos. A pesar de su baja concentración, la LH y la FSH, contribuyen al crecimiento lineal de los folículos y al desarrollo de su teca interna (principal fuente de estrógenos ováricos) (240). Los niveles plasmáticos de Pg son elevados debido a la secreción autónoma de los cuerpos

lúteos recién formados (260).

56 HORAS DESPUES DE LA OVULACION (09.00 hs del segundo día de diestro vaginal): La PRL, LH y FSH en sangre son bajas. La LH (quizás la FSH también) continúa estimulando el crecimiento lineal de los folículos ováricos, y la producción de estrógenos foliculares. La producción de estrógenos foliculares es muy importante pues previene la atresia folicular (120). También sensibiliza al ovario para la acción de las gonadotrofinas induciendo la síntesis de receptores para LH en las células granulosas (216) y favoreciendo la unión de la FSH con su propio receptor en las células granulosas (167). En este momento comienza a aumentar la liberación de estrógenos en la circulación pero sin alcanzar para producir efectos visibles (193).

Los cuerpos lúteos continúan presentes y los niveles basales de LH podrían ejercer efectos líticos sobre éstos haciendo disminuir la producción de Pg (223, 234).

62 HORAS DESPUES DE LA OVULACION (15.00 hs del segundo día de diestro vaginal): Los niveles de estradiol continúan aumentando y, por lo tanto, estimulando el eje hipotálamo-hipofisario. La concentración sérica de gonadotrofinas se mantiene baja. Los niveles de Pg han descendido como consecuencia de la lisis funcional de los cuerpos lúteos. Es importante comentar que estos cuerpos lúteos del ciclo estral pueden ser activados y producir una

pseudopreñez (fase lútea de la rata) si reciben un estímulo luteotrófico antes de la tarde del segundo día del diestro. Si este estímulo luteotrófico llega en la mañana del proestro la activación no es posible (195, 234).

Se observan folículos ováricos que poseen el antro folicular bien desarrollado. Al mismo tiempo, folículos de diferentes tamaños comienzan a mostrar signos de atresia.

80-85 HORAS DESPUES DE LA OVULACION (09.00-14.00 hs del proestro vaginal):. Los niveles sanguíneos de PRL han iniciado su ascenso, los de LH y FSH se mantienen bajos; pero los de estradiol han alcanzado su máximo. Además de sus acciones sobre el folículo ovárico, el estradiol actúa sobre la hipófisis y el diencefalo aumentando el número de receptores estrogénicos (179; 237). En el hipotálamo, el estradiol también produce la descarga de LHRH hacia el sistema porta-hipofisario (228).

En este estadio del ciclo estral se ha descargado suficiente cantidad de estradiol como para desencadenar el mayor incremento del peso uterino y la descarga de LH, FSH y PRL (194). Varios procedimientos experimentales comentados por Neill & Smith (194), han demostrado que el estradiol es el causante de la descarga de las tres hormonas citadas. El bloqueo de la estimulación estrogénica sobre el diencefalo (más particularmente sobre las áreas preóptica, hipotalámica anterior y

supraquiasmática) y/o la hipófisis por el tratamiento con antisueros o antiestrógenos durante el día previo al proestro impide la descarga de LH ovulatoria. Si el tratamiento con antisuero o antiestrógeno se realiza en la mañana del proestro no ocurre el bloqueo, ya que para el medio día del proestro el estradiol ha estimulado suficientemente sus órganos efectores.

Si se realiza ovariectomía en este momento del ciclo, la hembra no presentará la conducta de receptividad sexual subsecuente (209). Esto indicaría que el umbral para la activación de la conducta sexual por estradiol es mayor que para la cornificación vaginal, alcanzar el máximo peso uterino y la descarga de LH, FSH y PRL.

85-89 HORAS DESPUES DE LA OVULACION (14.00-18.00 hs del proestro vaginal): Las áreas preóptica, hipotalámica anterior y supraquiasmática liberarían un pulso de LHRH como resultado de la estimulación estrogénica. La LHRH llega a la adenohipófisis, aumentando la sensibilidad de la glándula a una nueva estimulación por LHRH (4, 46). Esta sensibilización de la adenohipófisis para la LHRH, puede también ocurrir por la acción directa -sobre ésta- del estradiol (5, 239). La llegada de nuevo LHRH a la adenohipófisis previamente sensibilizada, resultará en un incremento de la concentración sanguínea de LH. Blake (26) ha extraído muestras de sangre cada 5 minutos entre las 14.00 y 20.00 hs del proestro y encontró: un leve

incremento de la LH entre las 14.00-14.45 hs, luego un rápido aumento entre las 14.45-16.50 hs. Estos valores máximos permanecieron sin cambios hasta las 18.00 hs y desde aquí iniciaron un lento descenso. Este pico de LH tiene múltiples efectos: a) Tremenda aceleración en el crecimiento y desarrollo (denominado maduración preovulatoria) de los folículos destinados a ovular (234). b) Producir la atresia de los folículos antrales que no ovularan (166). c) Inducción de una importante descarga de Pg en sangre (260). El origen de esta Pg son los cuerpos lúteos de la ovulación previa y que habían dejado de ser funcionales (lisis funcional) en la tarde del segundo día de diestro (por ésto se denominan "cuerpos lúteos viejos").

Por otra parte, la Pg liberada durante este período, también produce importantes efectos: a) Completar el estadio final de la ruptura folicular por una acción directa sobre la pared del folículo (251). b) Facilitar la conducta de receptividad sexual (la que comienza a las 17.00-18.00 hs y finaliza después de la ovulación; 83). Previamente habíamos mencionado que el umbral de los estrógenos para desencadenar la conducta de receptividad sexual era mayor que para liberar LH. Por lo tanto, el estradiol necesita de un estímulo adicional, el de la Pg preovulatoria, para desencadenar la receptividad sexual. Si la descarga de Pg es el resultado del aumento preovulatorio de la LH, podemos deducir que la hembra aceptará la cópula cuando la ovulación sea un fenómeno

inexorable. También se ha postulado que la LHRH hipotalámica descargada por los estrógenos facilita la conducta de receptividad sexual (183, 203). c) Disminución del peso uterino, fundamentalmente, por permitir la salida del líquido intraluminal (86). d) Evitar que se produzcan elevaciones diarias de LH, idénticas a las del proestro, en otros momentos del ciclo estral (194).

Aproximadamente en el mismo tiempo que ocurre la descarga de LH la secreción de PRL llega a su máximo. Al igual que para la LH, los estrógenos son los responsables del aumento de la PRL (193). Una posible acción de esta PRL podría ser la de iniciar la lisis estructural de los "cuerpos lúteos viejos" (278), los que comienzan a ser invadidos por fibrocitos.

Un significativo aumento de la FSH ocurre una pocas horas después de la elevación de la LH, PRL y Pg. Los responsables de iniciar este incremento de la FSH, serían los estrógenos (176) por intermedio de la LHRH, y algunos autores consideran que la Pg también actuaría (37).

92 HORAS DESPUES DE LA OVULACION (21.00 hs del proestro vaginal): Los niveles plasmáticos de LH y PRL han alcanzado valores basales, pero los de FSH se mantienen elevados. Las concentraciones de LHRH en sangre portal son basales. Los valores de estradiol en sangre habían iniciado su descenso a las 14.00 hs del proestro llegando,

ahora, a concentraciones basales. La Pg está descendiendo.

96 HORAS DESPUES DE LA OVULACION (01.00 hs del estro vaginal): Se produce la ovulación. Los valores sanguíneos de LH, PRL, estradiol, Pg y LHRH son bajos. Solamente las concentraciones de FSH se mantienen elevadas. Recientes estudios han demostrado que la FSH se encuentra regulada, además de los esteroides ováricos, por un factor inhibidor proveniente del fluido folicular (denominado inhibina) (170). Esto podría explicar algunas de las diferencias que existen entre los patrones sanguíneos de FSH y LH en la rata.

Como ha sido comentado previamente la rata de laboratorio presenta, generalmente, ciclos estrales que duran 4 ó 5 días. Es importante resaltar que rara vez el ciclo estral de la rata puede ser menor de 4 días (78) ni tampoco durar 4 días y medio. Esto último significa que la rata posee un preciso "reloj biológico de 24 horas" involucrado en el control del ciclo. Uno de los experimentos que demuestran ésto fue realizado por Everett & Sawyer (82), administrando pentobarbital sódico al medio día del proestro (bloqueando la descarga de LH de esa tarde) y postergando la ovulación por 24 horas. También se ha demostrado que la rata ovariectomizada y tratada con estradiol presenta una descarga diaria de LH cada 24 horas (38). De éstos, y otros hallazgos, se concluye que la rata hembra presenta -todos los días del ciclo estral- una señal

neural (descarga de LHRH hipotalámica) para liberar la LH ovulatoria, pero para que esta señal se exprese se deben elevar las concentraciones de estradiol (159). Las Figuras 1.1 y 1.2 resumen los principales eventos del ciclo ovárico, citología vaginal y endocrinología durante el ciclo estral de la rata.

Otra particularidad que caracteriza al ciclo estral de la rata, al igual que otros roedores como el hamster y el raton, es que el cuerpo lúteo del ciclo es activo durante un corto período (generalmente 2 a 3 días). Inmediatamente después de la ovulación las paredes del folículo se colapsan y se inicia la luteinización de las células de la granulosa y de la teca interna. El cuerpo lúteo alcanza su máximo tamaño en el primer día del diestro vaginal y lo mantiene hasta 24 horas después de la próxima ovulación (es importante recordar que este cuerpo lúteo del ciclo estral sufre la luteolisis funcional en el segundo día del diestro vaginal, a pesar de ésto, no modifica su tamaño hasta después del proestro). Esto explica porqué, si realizamos una disección de un ovario de una rata adulta en cualquier estadio de su ciclo estral, se puede observar tres o más generaciones de cuerpos lúteos. La cantidad de Pg que segrega el cuerpo lúteo del ciclo es muy poca (33) no alcanzando a preparar al útero para la implantación del embrión. Esta escasa cantidad de Pg cumple un importante papel regulando la longitud del ciclo estral (78). Cuando la rata hembra es cubierta por un macho vasectomizado se

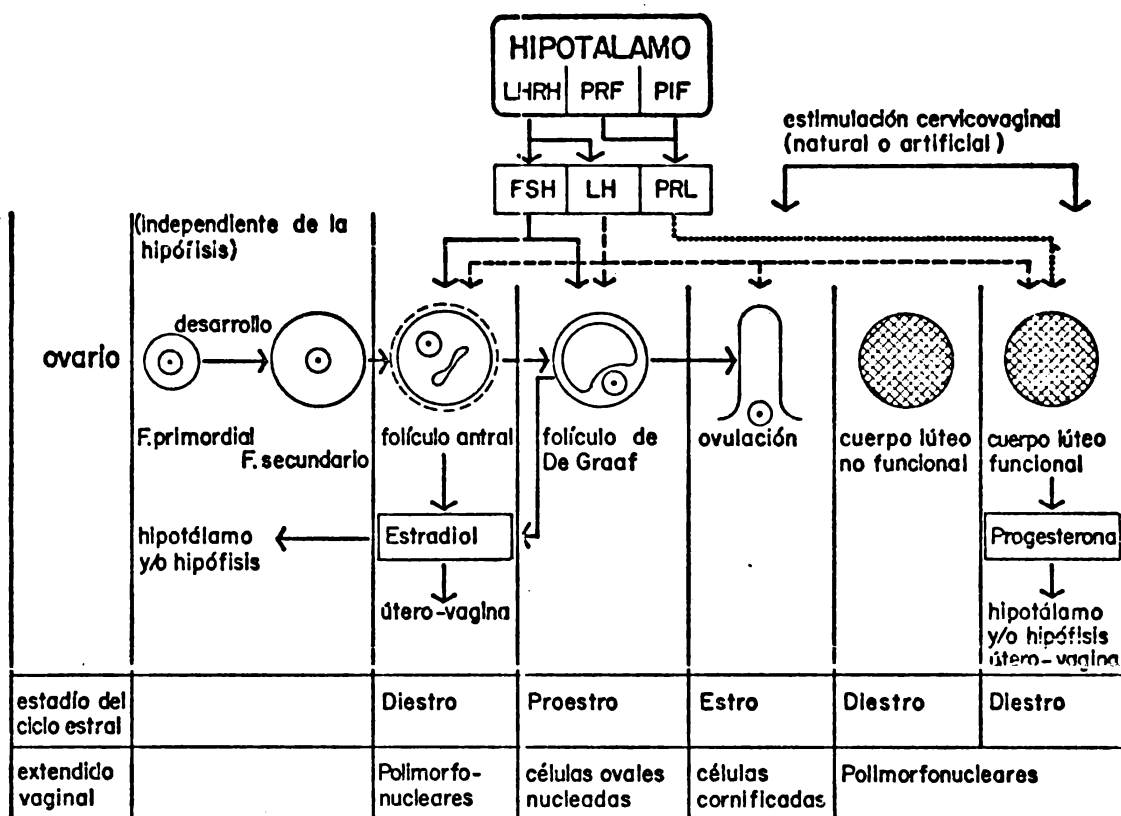


Figura 1.1.- Representación esquemática de los principales eventos ováricos y su relación con las modificaciones de la citología vaginal, durante el ciclo estral de la rata. LHRH, hormona liberadora de hormona luteinizante; PRF, factor liberador de prolactina; PIF, factor inhibidor de la descarga de prolactina; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona folículo estimulante; PRL, prolactina.

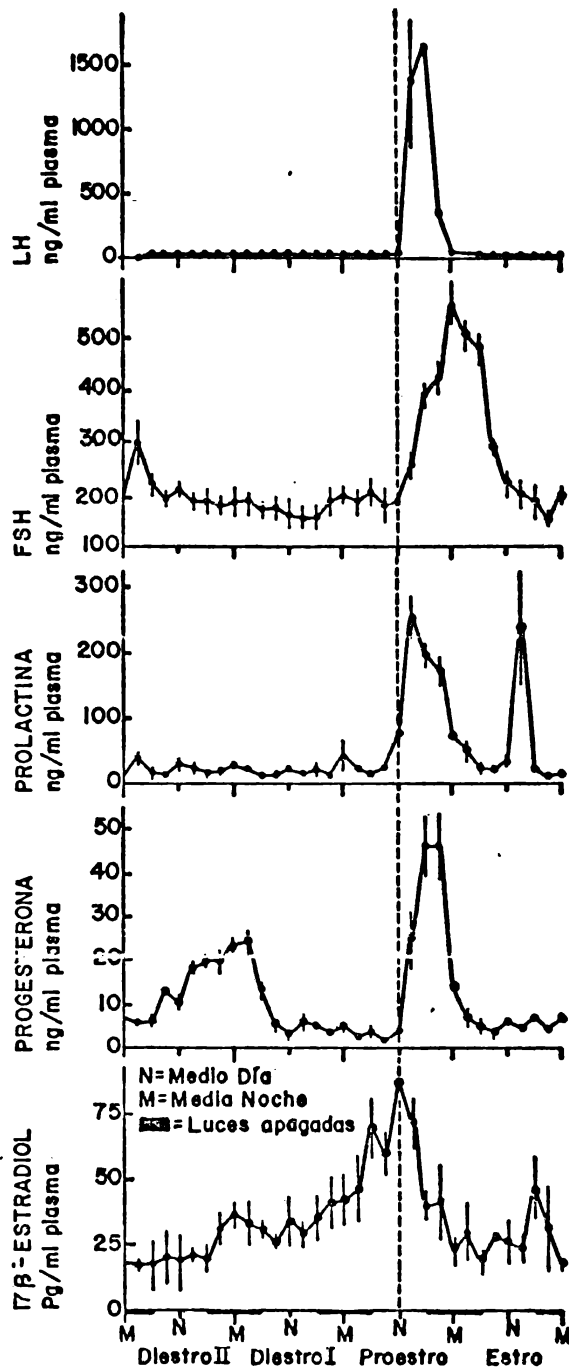


Figura 1.2.- Representación gráfica de la media de las concentraciones plasmáticas (\pm SE) de la hormona luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH), prolactina, progesterona y 17 β -estradiol durante el ciclo estral de 4 días en la rata. Las determinaciones se realizaron cada 3 hs comenzando a las 03.00 hs del diestro II, utilizando 5 animales por grupo. Esta figura pertenece a Butcher, Collins & Fugo (32).

induce la fase lútea o pseudopreñez que dura 12-14 días. Tal como comentaremos en detalle más adelante, esta activación de los cuerpos lúteos del ciclo es consecuencia de la descarga inducida, de factores luteotróficos hipofisarios, luego de la estimulación cervico-vaginal que produce el pene del macho.

1.4.- CARACTERISTICAS PRINCIPALES DEL CICLO ESTRAL EN ESPECIES DE INTERES ZOOTECNICO.

Comparativamente con los estudios llevados a cabo en roedores de laboratorio (e.g.: rata, ratón, hamster), las especies de interés zootécnico (e.g.: bovino, ovino, caprino, porcino, equino) han sido menos usadas como animal de experimentación. Es por ello que, aún quedan muchas incognitas para ser aclaradas en los mecanismos fisiológicos que integran el proceso reproductivo en estas especies. No obstante debemos reconocer que, la neuroendocrinología de la reproducción en la oveja, es la mejor conocida entre las hembras de interés zootécnico. Por este motivo en algunas oportunidades nos referiremos al ciclo estral de la oveja con mayores detalles.

La duración del ciclo estral y de cada uno de sus estadios, como así también el momento de la ovulación, dependen de la especie. Por el contrario, las variaciones entre las hembras de una misma especie son

-comparativamente- menores. La Table 1.3 muestra la longitud del ciclo estral y momento de la ovulación en especies de interés zootécnico.

La sucesión de los ciclos estrales está influenciada por factores ambientales. El factor más importante es el fotoperíodo (215) aunque también resultan condicionantes la temperatura ambiente y la alimentación. Estos estímulos son los responsables de determinar el ciclo sexual estacional. Tomando como base las variaciones estacionales sobre la sucesión de los estros, las hembras de las distintas especies han sido clasificadas como poliéstricas contínuas o estacionales. Las hembras poliéstricas estacionales, que presentan su estación sexual limitada a cierta época del año, pueden ser divididas -a su vez- en dos grupos: a) las que ciclan cuando el período de luz diaria aumenta (hamster, equino) y b) por el contrario, cuando el fotoperíodo disminuye (ovino, caprino). La vaca y la cerda son consideradas poliéstricas contínuas ya que presentan ciclos estrales durante todo el año, sin períodos de anestro estacional (como los presentados por la oveja, cabra o yegua). Sin embargo, se ha observado que ciertos aspectos de la reproducción de la vaca (e.g.: edad a la pubertad, tamaño ovárico, secreción de LH o PRL) estarían influenciados por la estación (232). También la temperatura modifica la fertilidad en la vaca, en los países templados y cálidos la fertilidad es mayor durante la primavera que en el clima caluroso del verano (255).

Tabla 1.3.- Duración del ciclo estral, estro y ovulación en animales de interés zootécnico.

(Tomado de Levasseur & Thibaut, 1962),

	Duración del ciclo estral	Duración del estro	Momento de la ovulación
Oveja	16 - 17 días	24 - 36 horas	24-30 hs. desde el comienzo del estro
Cabra	21 días	32 - 40 horas	30-36 hs. desde el comienzo del estro
Cerda	19 - 20 días	48 - 72 horas	35-45 hs. desde el comienzo del estro
Vaca	21 - 22 días	18 - 19 horas	10-11 hs. luego de finalizado el estro
Yegua	19 - 25 días	4 - 8 días	1- 2 días antes de finalizar el estro

Seguidamente comentaremos algunos aspectos neuroendócrinos de la fase folicular y luteal del ciclo estral en especies de interés zootécnico.

FASE FOLICULAR. De acuerdo con lo comentado previamente (sección 1.2) la fase folicular del ciclo estral corresponde al período entre la formación del folículo antral y su ovulación.

El tiempo que transcurre desde la regresión del cuerpo lúteo hasta la ovulación es bastante corto en la oveja y cabra (2 a 3 días) como también en la vaca, cerda y yegua (3 a 6 días). Este corto período de la fase folicular no reflejaría la verdadera y precisa duración del crecimiento folicular. Sin embargo, la presencia de folículos antrales a lo largo de la fase lútea sugiere que la real duración de la fase folicular es más larga que 2 a 6 días. Esto también estaría avalado por las estimaciones de Turnbull et al., (259) sobre la duración del crecimiento de los folículos antrales; quienes encontraron que desde la formación del antro folicular hasta la ovulación transcurren de 17 a 34 días (equivalente a la duración de uno o dos ciclos estrales). Estas y otras evidencias experimentales han llevado a que Thibault (256) desarrolle una hipótesis en la que postula que la verdadera fase folicular, en los mamíferos de interés zootécnico, podría superponerse parcialmente con la fase lútea. El estímulo

inicial para la formación del antro folicular, al igual que en los roedores, lo realizarían la FSH y los estrógenos; pero para la maduración preovulatoria final también es necesaria la LH además de la FSH (257).

En la oveja y la cerda se ha podido determinar un segundo incremento de FSH unas 20 a 30 hs posteriores a la descarga preovulatoria de LH y FSH (199, 214). Este aumento postovulatorio de FSH sería el responsable de formar una población de folículos antrales que incluye los futuros candidatos para ovular. Cuando se estudiaron las relaciones hormonales y el desarrollo folicular en dos razas de ovejas con alto y bajo porcentaje de ovulaciones, se encontró que la raza con mayor número de ovulaciones tenía una descarga postovulatoria de FSH significativamente más elevada, ya que -17 días más tarde- se observaba en los ovarios un mayor número de folículos antrales (36). En la yegua se ha demostrado la presencia de dos incrementos de FSH, uno al final del estro-principio del diestro, y el segundo durante el diestro unos 10 a 13 días antes de la próxima ovulación (75). Cuando el efecto de ambas descargas de FSH fue inhibido por la administración de un antisuero generado contra un extracto crudo de pituitarias equinas, el desarrollo folicular fue suprimido (205, 206). En la Figura 1.4 podemos observar una representación esquemática del ciclo folicular del cobayo, que podría semejarse al de las especies de interés zootécnico. El cobayo posee una fase lútea de 12 días que sería

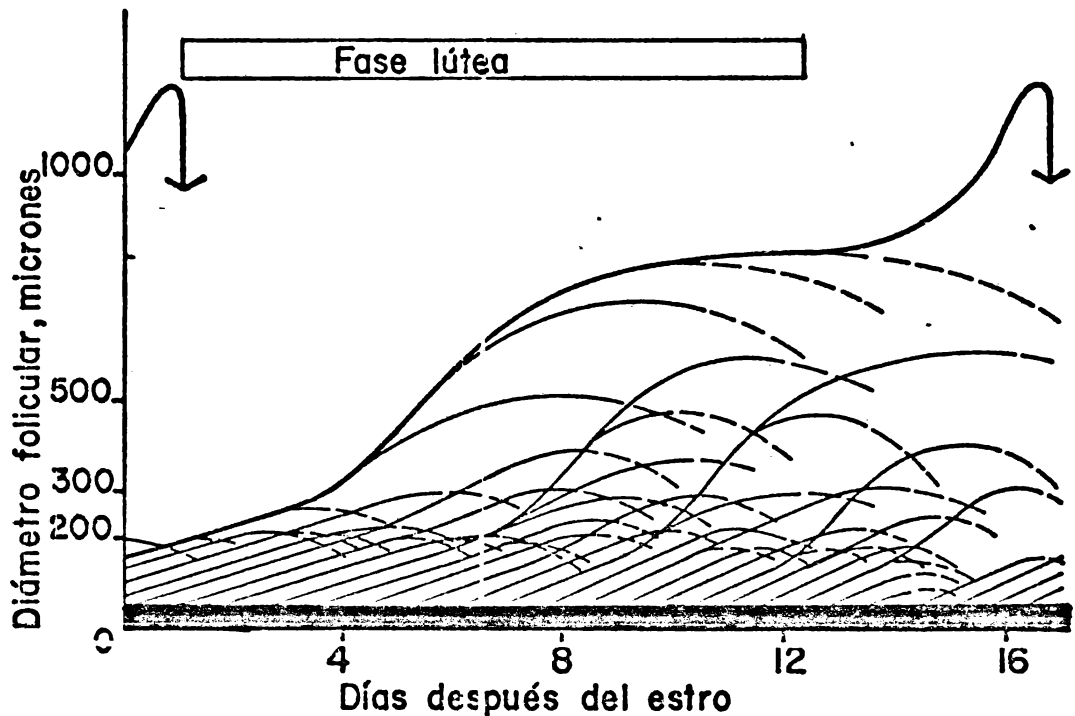


Figura 1.4.- Representación esquemática del ciclo folicular en el coyo. La línea continua más gruesa corresponde al diámetro de los folículos de mayor tamaño, recalculado de los datos de Myers, Young & Dempsey (188). Las puntas de flecha indican la ovulación. El resto de las líneas continuas y discontinuas dan la idea del crecimiento y atresia, respectivamente, de otros grupos de folículos que no alcanzan la ovulación. Este dibujo fue tomado de Everett (78).

equivalente al de las especies citadas.

A medida que el folículo o los folículos destinados a ovular van madurando se segrega mayor cantidad de estrógenos. Durante la fase lútea de la oveja se han descrito incrementos de estrógenos (130, 199) que podrían ser provenientes de los folículos que se vuelven atrésicos. Pero el mayor incremento de estradiol (199) se produce al final de la fase lútea, proveniente de la teca interna del folículo destinado a ovular (131). Este elevado nivel de estradiol en sangre será el responsable de desencadenar la conducta de receptividad sexual y, también, liberar las gonadotrofinas hipofisarias.

Las manifestaciones de la conducta de receptividad sexual de la hembra son el resultado de la estimulación de los estrógenos sobre determinadas zonas del SNC. Pero para que ocurra esta conducta es condición que el nivel plasmático de Pg sea bajo. Sin embargo en vacas y ovejas ovariectomizadas se encontró una mayor respuesta de receptividad sexual cuando al tratamiento con mínimas dosis de estrógeno se le sumó otro previo con Pg durante 8 a 12 días. Esto indicaría que la secreción de Pg por el cuerpo lúteo es un factor importante en sensibilizar al SNC para facilitar la posterior acción de los estrógenos en la conducta de receptividad sexual y descarga de gonadotrofinas (83). Las ovejas sin fase lútea previa (e.g.: primera ovulación durante la pubertad, o primera

ovulación luego del anestro estacional) a menudo ovulan sin manifestación de la conducta estral. Este estro "silencioso" es posiblemente causado por la falta de la previa estimulación de la Pg sobre el tejido neural que media la conducta sexual (220).

El aumento del nivel sanguíneo de estradiol, es también el responsable de la ovulación. Una detallada descripción de los niveles hormonales unos días antes y durante el período periovulatorio, ha sido determinado en la oveja. Legan & Karsch (160) analizan una serie de resultados experimentales y describen los eventos hormonales que llevan a la ovulación en esta especie. Resumidamente estos pasos son: a) La Pg segregada por el cuerpo lúteo ejercería una acción inhibitoria sobre la secreción basal de LH. Esta secreción basal de LH, durante la fase lútea, presenta incrementos pulsátiles cada 2 horas (16). b) Como resultado de la luteólisis la concentración de Pg cae abruptamente. Esta disminución de la Pg permite que se aumente el nivel basal de LH y la frecuencia de sus pulsos a más de uno por hora (14). Este incremento de la LH dura alrededor de 48 horas. c) Esta particular secreción de LH estimula la secreción de estradiol del folículo(s) preovulatorio. El incremento del estradiol comienza alrededor de un día antes del inicio del estro conductual y alcanza concentraciones 5 veces mayores a las del comienzo. d) Por último, los niveles circulantes de estradiol alcanzan el umbral necesario para desencadenar la

descarga ovulatoria de LH (al mismo tiempo aumentan las concentraciones de FSH). El pico de ambas gonadotropinas se produce 21-26 horas antes de la ovulación (54). Al igual que en los roedores la LHRH estimula la descarga de LH y FSH (140). Una máxima secreción de LHRH ocurre inmediatamente antes del inicio del estro conductual (92) y coincide con la mayor sensibilidad de la adenohipofisis para responder a la hormona hipotalámica (91). La oveja es también similar a la rata en que una previa exposición de LHRH a la hipófisis sensibiliza a la glándula para subsecuentes exposiciones del péptido (51).

Como principal conclusión de esta secuencia de eventos, Legan & Karsch (160) proponen la hipótesis de que la Pg cumpliría el papel más importante en la iniciación de los eventos que llevan a la ovulación; ya que el incremento de los estrógenos sería una consecuencia del previo descenso de la Pg. Por lo tanto, la Pg sería "la organizadora" de la ciclicidad estral en la oveja. Este papel organizador de la Pg, también se ha sugerido para la vaca (246).

FASE LUTEA. Termino medio la fase lútea dura 14-15 días en la oveja y 16-17 días en la vaca, cerda y yegua. El cuerpo lúteo se forma a partir de las células granulosas y de la teca interna del folículo(s) ovulatorio, y su actividad funcional será reflejada por la síntesis y descarga -en la sangre periférica- de Pg. La Tabla 1.5 muestra los

Tabla 1.5.- Características de la fase lútea, en relación con las concentraciones de progesterona plasmática, en animales de interés zootécnico.

	Período con elevados niveles de Pg ³ (Fase de mantenimiento)	Máxima concentración de Pg (ng/ml)	Momento de la caída de Pg ³ (Fase de descenso)
Oveja ¹	3 a 11 días	2	día 14
Vaca ¹	4 a 12 días	4,5	día 17 - 19
Cerda ¹	3 a 12 días	32 ⁴	día 14 - 16
Yegua ²	1 a 13 días	7	día 14 - 18

El día 0 corresponde al momento de la ovulación.

¹ Tomado de Hansel & Echternkamp (118).

² Tomado de Evans & Irvine (75).

³ De acuerdo con Rothchild (224).

⁴ Esta significativa diferencia sería debida a la mayor cantidad de tejido luteal, ya que la cerda en cada ovulación, descarga un promedio de 16 óvulos.

momentos en que la Pg plasmática se mantiene elevada y cuando desciende, en las diferentes especies.

Los factores postulados como responsables de la formación del cuerpo lúteo (luteinización) han sido comentados en la sección 1.2. Con relación a las sustancias que desencadenan y mantienen la secreción de Pg, dijimos que eran diferentes entre las especies.

a) Oveja. En esta especie factores aun no bien determinados de origen hipofisario, serían los responsables de la activación y mantención de la fase lútea (144). Esta conclusión fue el resultado de la ausencia de formación del cuerpo lúteo luego de realizar hipofisectomía inmediatamente después de la ovulación. Cuando la hipofisectomía se realizó en un estadio más avanzado del ciclo estral, el cuerpo lúteo involucionó inmediatamente. Una de las sustancias posiblemente involucradas sería la PRL, aunque su grado de importancia ha sido objeto de debate (69, 145, 147, 233). Cuando se redujo la cantidad de PRL en la sangre por la administración de bromoergocriptina (sustancia inhibidora de la descarga de PRL) en ovejas cíclicas, la longitud del ciclo no fue alterada como tampoco la secreción de Pg ni la regresión del cuerpo lúteo (168, 196). Por otra parte, varios investigadores consideran que la LH cumpliría el papel más importante en la mantención de la fase lútea (68, 144, 145, 146). Esta hipótesis estaría avalada por el hallazgo de

que la administración pulsátil de LHRH, durante la fase lútea, aumenta los niveles de LH e impide la luteólisis (3). Hasta el presente, lo más aceptable sería suponer que la LH y la PRL son ambas luteotróficas y pueden actuar en combinación para mantener la actividad del cuerpo lúteo del ciclo (68, 146).

b) Vaca. Los resultados experimentales existentes son dudosos como para poder determinar la importancia de la PRL como sustancia luteotrófica. La única evidencia que apoya esto, es la obtenida por Henricks et al. (133) que observaron una continua secreción de Pg (aunque con niveles inferiores al normal) luego de la sección del tallo hipofisario* en el día 2 de la fase lútea. Por el contrario, el mayor número de investigadores se inclina por considerar que la LH sería la hormona luteotrófica en esta especie (117). Una prueba in vivo de considerable importancia fue la administración de un antisuero anti-LH bovina (245). La inyección de este antisuero entre

* Es importante recordar que este procedimiento experimental libera a la adenohipófisis del control inhibitorio de la descarga de PRL, por lo tanto los niveles de esta hormona se mantienen elevados.

los días 2 a 6 de la fase lútea produjo la disminución del peso y la cantidad de Pg del cuerpo lúteo. Carlson et al. (40) encontraron un significativo incremento del nivel plasmático de Pg, que duró 5 horas, en vaquillonas intactas e histerectomizadas que se les administró dosis subcutáneas de LH. No obstante estos resultados, el nivel de LH a lo largo de la fase lútea es bajo y constante (132) y Rothchild (224) encuentra una falta de correlación entre los niveles de Pg y LH durante el ciclo estral.

c) Cerda. La hipofisectomía inmediatamente después de la ovulación no modifica la longitud del ciclo ni la actividad del cuerpo lúteo (181). Esto indicaría que luego del estímulo ovulatorio no serían necesarios factores luteotróficos hipofisarios adicionales para la normal actividad lútea. En la cerda se ha demostrado que los estrógenos son luteotróficos (152). Cuando se inyectó dietilestilbestrol en el día 11 del ciclo estral, se observó una prolongación de la actividad del cuerpo lúteo.

La finalización de la actividad funcional del cuerpo lúteo estaría controlada por un mecanismo luteolítico. En las especies de interés zootécnico este mecanismo tiene gran trascendencia ya que es el responsable de la duración del ciclo estral en cada animal. Como consecuencia de la disminución de los niveles de Pg se inician, en estas especies los eventos que culminan en la ovulación. Es por esto que la inducción artificial de luteólisis acorta la

duración de la fase lútea y permite sincronizar el estro en lotes de animales.

a) Oveja. Tal como expresamos en la sección 1.2, para la oveja parece no existir dudas de que el mecanismo luteolítico es mediado por la PGF_{2a} de origen uterino (102, 141, 177). Scaramuzzi & Baird (230) han confirmado esto último al lograr bloquear la luteólisis por administración de un antisuero anti-PGF_{2a}. La Pg actuando sobre el útero induciría la síntesis de la PGF_{2a}, también los estrógenos aumentarían su producción si el tejido ha sido estimulado -previamente- por la Pg (165). Las demostraciones de la actividad luteolítica de la PGF_{2a} han sido obtenidas con la ayuda de una preparación que permitió trasplantar el útero-ovario (con su correspondiente irrigación) a la región subcutánea del cuello de la oveja (53, 126). Esta preparación posibilitó mantener el ciclo estral normal y extraer muestras de sangre de la circulación útero-ovárica, en el animal conciente.

Una importante cantidad de trabajos de investigación [consultar Baird (15) para revisión] han permitido postular el posible mecanismo fisiológico de luteólisis en la oveja: la PGF_{2a} abandonaría el útero por medio de la vena uterina para luego ser transferida a la sangre arterial ovárica por una difusión a través de las paredes de la vena útero-ovárica hacia la arteria ovárica. Este pasaje de la PGF_{2a} desde la sangre venosa a la arterial es posible

gracias a un estrecho contacto entre la vena útero-ovárica y la arteria ovárica (esta última se dirige hacia el ovario enrollada sobre la vena) (100). De esta manera, en la oveja, cada cuerno uterino controla al cuerpo lúteo del ovario ipsilateral.

b) Vaca. En la vaca se ha confirmado la hipótesis, descrita en la oveja, del mecanismo luteolítico de la PGF_{2a} uterina (139). También son iguales que en la oveja las relaciones anatómicas entre la vena útero-ovárica y la arteria ovárica. No obstante esto, Hansel & Fortune (119) enumeran una serie de resultados experimentales recientes que -en parte- complican la explicación del mecanismo luteolítico fisiológico de la vaca. Estos investigadores postulan que a la acción de la PGF_{2a} uterina habría que sumarle otros mecanismos aun no del todo dilucidados.

En 1958, Greenstein et al. (107) fueron los primeros en demostrar que inyecciones de estradiol durante la fase lútea, del ciclo estral del bovino, inducen luteólisis. Aunque este tratamiento con estradiol es luteolítico en vaquillonas histerectomizadas, su total efecto necesita la presencia del útero. Si recordamos que los estrógenos comienzan a incrementarse al final de la fase lútea, antes de la caída de la Pg, un paso inicial en la luteólisis normal podría ser debida a los estrógenos.

c) Cerda. Parece poseer el mismo mecanismo que la oveja.

La única diferencia es que existe una anastomosis entre las venas uterinas de cada lado, por lo cual el efecto de cada cuerno uterino es sobre ambos ovarios (180).

d) Yegua. Los estudios de Ginther & First (101) con yeguas histerectomizadas, demostraron que el cuerpo lúteo del ciclo estral esta controlado por sustancias luteolíticas del útero. Pero a diferencia de otras especies (e.g.: oveja, vaca) la luteolisina uterina de la yegua, no llega al ovario por una circulación local entre el útero y la gonada, ya que no existe contacto entre la vena útero-ovárica y la arteria ovárica (100). Como el agente luteolítico uterino alcanza el ovario por medio de la circulación general, la histerectomía unilateral no impide la luteólisis en el ovario adyacente. La brusca caída de los niveles plasmáticos de Pg al final de la fase lútea coinciden con un incremento en las concentraciones de 13,14-dihidro-15-ceto-prostaglandina F2a (un metabolito de la PGF2a que se forma por oxidación, en el pulmón), lo que indicaría que -al igual que en otras especies- la PGF2a es probablemente el mayor componente de la luteolisina uterina en la yegua (249).

1.5.- CARACTERISTICAS DE LA FASE LUTEA O PSEUDOPREÑEZ DE LA RATA.

Los mecanismos neuroendocrinos que controlan la fase

lútea, a excepción de la rata y el ratón, son poco conocidos. Fuera de estas dos especies poco se sabe acerca de los factores que regulan la función de la adenohipófisis durante la fase lútea del ciclo ovárico; como tampoco, sobre las hormonas hipofisarias u otros factores luteotróficos que mantienen la actividad del cuerpo lúteo.

Tal como fue comentado en la sección 1.3, durante el ciclo estral de la rata -al igual que las demás hembras de interés zootécnico- posee una espontánea descarga cíclica de LH que provoca la ovulación. El cuerpo lúteo que se forma en el sitio de ovulación (cuerpo lúteo del ciclo) es activo durante un corto período, generalmente 2 o 3 días, para luego involucionar. La cantidad de Pg que segrega es muy poca (33, 194) no alcanzando a preparar al útero para la implantación del embrión. Al producirse el coito, los estímulos del macho inducen una serie de respuestas neuroendócrinas en la rata hembra, entre las que cuenta la prolongación de la vida del cuerpo lúteo (cuerpo lúteo de la pseudopreñez o preñez). Long & Evans (164) fueron los primeros en observar que la estimulación mecánica del tracto genital de la rata producía una prolongación del diestro vaginal. A partir de ellos, se denominó pseudopreñez a la fase lútea de la rata inducida por un coito estéril o un estímulo artificial. Otros estímulos también son efectivos para desencadenar la pseudopreñez: la estimulación eléctrica de cérvix (238) o la continua succión de los pezones por varios días (236). Esta

respuesta de pseudopreñez se correlaciona con la presencia de grandes cuerpos lúteos en el ovario (s.: cuerpos lúteos de la pseudopreñez); responsables del aumento progresivo de los niveles circulantes de Pg (274). Esta Pg permitirá la prolongación del diestro vaginal y la preparación del útero para recibir al embrión (210).

En 1938, Westman & Jacobsohn (273), encontraron que la pseudopreñez no se producía cuando las ratas habían sido hipofisectomizadas antes de la estimulación cervical. Dos hallazgos posteriores, demostraron que la activación lútea en la pseudopreñez y primera mitad de la preñez, era la consecuencia de la elevada secreción de PRL: a) inyecciones de PRL mantenían la función lútea en ratas hipofisectomizadas (13, 76) y b) que la estimulación cervical disminuía la cantidad de PRL en la adenohipófisis (134, 157). Dos tipos de neuronas neurosecretoras, ubicadas en la región mediobasal del hipotálamo, serían las responsables de controlar la secreción de PRL: las que la inhiben y las que estimulan. Las neuronas inhibitorias parecen predominar ya que la desconexión experimental de las influencias del hipotálamo sobre la hipófisis (i.e.: sección del tallo hipofisario, lesiones de la eminencia media, trasplante de hipófisis a sitios ectópicos, incubación in vitro) induce una rápida y prolongada elevación de la secreción de PRL (81, 161). Esto último, es debido a que un grupo de neuronas neurosecretoras hipotalámicas poseen una secreción tónica de factores

inhibitorios de la descarga de PRL (PIFs), de los cuales el más importante es la dopamina. También han sido descritos un gran número de factores liberadores de la descarga de PRL (Prfs), de todos ellos el más importante es la hormona liberadora de tirotrófina (TRH) (65). Tanto los factores inhibidores como los liberadores de la descarga de PRL llegan a la adenohipófisis, por medio de la circulación porta-hipofisaria, para modificar la actividad de las células prolactínicas (s.: lactotropas).

La vía que recorre el reflejo de pseudopreñez es compleja y poco conocida. Se inicia por un receptor sensorial ubicado en la región cervicovaginal (164). Desde aquí nace la vía sensorial aferente que recorre el nervio pélvico (39, 153), el cual penetra en la médula espinal a la altura de la región sacra. Ascende a lo largo de lugares no determinados de la médula espinal y llega al cerebro. En el cerebro atraviesa regiones aún desconocidas para, luego, alcanzar la región mediobasal del hipotálamo. Las neuronas neurosecretoras de esta región del hipotálamo modifican su actividad, volcando en el sistema porta-hipofisario adecuadas cantidades de PIFs y/o PRfs. De esta forma, la influencia del estímulo cervicovaginal alcanza finalmente a las células prolactínicas de la adenohipófisis y se ordena la liberación de PRL. La PRL inicia la vía eferente del reflejo, responsable de estimular la actividad funcional del cuerpo lúteo.

El aumento en la descarga de PRL en respuesta a la estimulación cervicovaginal, presenta un patrón de dos picos diarios que se repiten a lo largo de la pseudopreñez y primera mitad de la preñez (6, 25, 33, 64, 94, 212, 247). Estas dos descargas diarias de PRL están en estrecha relación con el ritmo de luz diario al que se someten las ratas (95). Uno de estos picos se inicia cuando la luz está prendida alcanzando su máximo nivel al apagarse ésta; se lo conoce como pico diurno. El otro pico diario, se denomina nocturno pues comienza a liberarse cuando la luz está apagada y llega a su máximo cuando ésta se prende.

Este patrón de secreción de PRL típico de la pseudopreñez, hace que este reflejo neuroendócrino tenga características inusuales (192). Un reflejo neuroendócrino "ideal" es aquel en el cual la descarga de una hormona se produce luego de la aplicación del estímulo; cuando este estímulo cesa, la hormona deja de liberarse. Por ejemplo, el estímulo de la succión que la cría produce sobre la rata madre hace descargar PRL, pero cuando termina el estímulo, no se libera mas hormona (67, 109). En la pseudopreñez el estímulo cervicovaginal es suficiente para inducir una prolongada descarga de PRL que dura alrededor de 10-12 días (95). Esto hizo pensar en la existencia de un mecanismo de "memoria" (282), ubicado en alguna región del cerebro aún no determinada, capaz de retener la información del estímulo cervicovaginal y expresarlo periodicamente. La estimulación cervicovaginal durante el diestro precedente a

la ovulación puede inducir una pseudopreñez diferida (108), siendo esta otra evidencia del mecanismo de "memoria". Luego de la estimulación en diestro la hembra puede "almacenar" en su cerebro esta información (alrededor de 6 días), durante este período los folículos maduran y alcanzan la ovulación, se forma un nuevo cuerpo lúteo que recibirá el estímulo luteotrófico previamente "almacenado" y así se inicia la fase lútea diferida.

La pseudopreñez o fase lútea de la rata, es homóloga a la fase lútea "espontánea" que normalmente ocurre en el ciclo estral de los mamíferos de interés zootécnico (vaca, oveja, cabra, cerda, yegua). La duración de la pseudopreñez de la rata es entre 12-14 días (77), equivalente a la duración de las fases lúteas en las hembras antes citadas. La principal diferencia entre ambas fases lúteas es la naturaleza refleja y "espontánea" de cada una. También existiría cierta similitud entre la duración de la fase folicular del ciclo estral de las especies de interés zootécnico y la fase folicular de la pseudopreñez de la rata. Durante la pseudopreñez de la rata, el tiempo que demora el folículo antral hasta su ovulación se incrementa de 4 (tiempo que, normalmente, demora durante el ciclo estral) hasta 12-14 días (272). Este enlentecimiento del desarrollo folicular posiblemente sea debido al efecto de los elevados niveles plasmáticos de Pg. Esta prolongada fase folicular es equivalente a la que normalmente comentamos que ocurría en las especies de

interés zootécnico (ver sección 1.4). Cuando se induce una reducción de los niveles de Pg durante la fase lútea de vacas u ovejas por enucleación del cuerpo lúteo o luteólisis por PGF_{2a}, se produce una inmediata aceleración de la maduración folicular que culmina -dentro de los 3 días del tratamiento- en la ovulación; de esta manera se acorta el ciclo estral. Robertson (219) sugirió que una oveja con ausencia de tejido luteal luego de su ovulación puede tener un ciclo estral de 4 días, análogo al que presenta la rata. El fenómeno contrario, i.e.: que la rata tenga ciclos semejantes al de las especies de interés zootécnico, también es posible natural o experimentalmente. Naturalmente puede ocurrir en ratas viejas en las que se observan pseudopreñeces a repetición con estro y ovulación entre cada fase lútea (27). Los distintos procedimientos experimentales para inducir ciclos con pseudopreñez son: a) el estímulo de succión continuo a partir del postpartum, prolongo la lactancia un año e indujo ciclos con ovulación cada 18 días (30); b) cuando se le coloca un implante de adenohipófisis bajo la cápsula renal a una rata que, además, mantiene su propia hipófisis intacta (211); c) lesiones en distintos centros del hipotálamo anterior o de sus aferencias del sistema límbico (50, 97, 135). El factor común en todos estos ciclos con pseudopreñez es el elevado nivel de PRL.

Es interesante remarcar que el término pseudopreñez es utilizado para referir diferentes fenómenos fisiológicos y

patológicos (42). Entre algunos de sus usos podemos citar a la pseudopreñez de la perra, que es una prolongación espontánea de la fase lútea del ciclo (alcanzando una duración similar a la de la preñez normal con desarrollo de las mamas y lactación); y que -inclusive- se presenta en hembras que no han tenido coito (12). También se denomina pseudopreñez a la fase lútea iniciada luego del coito estéril en aquellas hembras que poseen ovulación inducida (por ejemplo: coneja, gata, hurón); pero en este caso, la formación y activación del cuerpo lúteo es consecuencia de la ovulación refleja. Respuestas de pseudopreñez que pueden considerarse equivalentes a la de la rata, son las que se encuentran en diversas especies de Múridos y Cricétidos, entre ellas el ratón y el hamster.

2° PARTE:

DETALLES EXPERIMENTALES

2.1.- ANIMALES DE EXPERIMENTACION.

Los animales usados en este trabajo son hembras vírgenes, entre 170-260 grs de peso, de la cepa Wistar; criadas en el Laboratorio de Reproduccion y Lactancia (LARLAC-CONICET, Mendoza). Durante el experimento los animales permanecieron alojados en el bioterio bajo condiciones de luz (luces prendidas entre las 06.00 y 20.00 hs) y temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) controladas. Todos los animales tuvieron libre acceso a pellets de alimento balanceado y agua. Salvo cuando se indique lo contrario, las hembras fueron alojadas en jaulas colectivas con 7 a 8 animales en cada una.

2.2.- DETERMINACION DEL CICLO ESTRAL.

Los cambios de la citología vaginal fueron el indicador de los estadios del ciclo estral. Se utilizó el método descrito por Long & Evans (164), con algunas modificaciones. Diariamente se efectuó un lavaje de la vagina, con la ayuda de un pequeño gotero cargado con una gota de agua corriente. Por medio de este lavaje se recuperan las células descamadas del epitelio vaginal y los polimorfonucleares que migran a través de la pared vaginal. El lavaje vaginal sin tinción, se observó en un microscopio óptico a bajo aumento (100x), las células presentes fueron distinguidas por su forma, tamaño y presencia o no del

núcleo. A cada estadio del ciclo estral le corresponde una característica imagen de la citología vaginal: estro vaginal, células epiteliales cornificadas y ausencia de polimorfonucleares; diestro vaginal, presencia de polimorfonucleares además de células epiteliales; proestro vaginal, células epiteliales ovales con núcleo y ausencia de polimorfonucleares.

Para determinar por medio del extendido vaginal, la duración del ciclo estral y el momento aproximado de la ovulación, se siguió el criterio de Everett (77). En la rata con ciclo estral de 4 días se observa: día 1 y 2, el extendido vaginal de diestro; día 3, un proestro vaginal; y día 4, el extendido vaginal de estro. La ovulación ocurre durante la noche previa al 4to. día. La secuencia de los extendidos vaginales en las ratas con 5 días de ciclo estral se presenta de dos formas: a) en la primer forma, se observan 3 días sucesivos de diestro vaginal, en el 4to. se produce el proestro vaginal y el día 5to. el estro vaginal; b) en la otra forma, los dos primeros días corresponden al diestro vaginal, en el 3er. día se observa un proestro vaginal (similar al que presentan al 3er. día las ratas con ciclo estral de 4 días), el 4to. día el extendido vaginal es una mezcla de células ovales con cornificadas, y el 5to. día corresponde al estro vaginal. En ambos grupos de ratas con 5 días de ciclo estral la ovulación se produce durante la noche que precede al 5to. día.

De acuerdo con lo comentado previamente se deduce que una sola muestra de extendido vaginal, no es suficiente para determinar precisamente el momento del ciclo estral de cada hembra. Es por ésto que, a las hembras seleccionadas para este trabajo se les estudió la secuencia de tres ciclos estrales antes de iniciar el correspondiente tratamiento experimental. Salvo cuando se indique lo contrario, se usaron hembras que presentaban ciclos estrales regulares de 4 días.

2.3.- ESTIMULACIONES SENSORIALES.

2.3.1.- ESTIMULACION CERVICOVAGINAL.

Para realizar la estimulación cervicovaginal artificial, se utilizó un estimulador diseñado por Castro-Vazquez & Carreño (44). El mismo consistió de una barra cilíndrica de acero, de 4,8 mm de espesor, pulida y con los bordes romos. Un tope deslizante adaptado a la forma del perineo de la rata permitió graduar la penetración de la barra dentro de la vagina. Dos procedimientos de estimulación cervicovaginal fueron usados, los que se distinguieron en la manera de tomar a la hembra durante la aplicación del estímulo:

Tipo I: La rata se tomó por el dorso (los dedos del

investigador rodeando los miembros anteriores y el torax) y el estimulador fue rápidamente introducido en la vagina hasta que el tope (que había sido previamente ajustado para obtener la penetración deseada) se apoyó sobre el perineo del animal. Durante la estimulación la rata permaneció a unos 45° de la vertical, reposando ligeramente sobre la palma de la mano, y con su cabeza hacia arriba.

Tipo II: La rata, parada sobre la superficie de una mesa, fue tomada por los flancos con el índice y pulgar de la mano izquierda del investigador en un modo similar al usado por el macho durante el abrazo sexual. Inmediatamente, después, con el estimulador en la mano derecha, se lateralizó la base de la cola con el índice y mayor de esta mano. Trás encontrar con el pulpejo de ambos dedos el ostium vaginal y clítoris se introdujo rápidamente la varilla del estimulador en la vagina, cuyo tope fue fijado previamente para obtener la penetración deseada.

En ambos procedimientos el rango de penetraciones fue entre 0 y 24 mm, la varilla permaneció dentro de la vagina sin aplicarle movimientos. La duración de la estimulación fue de 5 segundos, salvo en aquellos casos en que se indique lo contrario.

2.3.2.- ESTIMULACION DE LA REGION PERINEAL.

Tipo III: En esta forma de estimulación la rata no se

extrajo de su caja pero fue tomada, de la extremidad distal de su cola, por medio de la mano izquierda del investigador. La estimulación fue realizada con el pulpejo del dedo índice de la mano derecha durante unos pocos segundos, y consistió de una suave fricción de la piel que rodea la vagina y el clítoris.

2.4.- EVALUACION DE LA RESPUESTA LUTEA.

La activación lútea fue evaluada por la prolongación del diestro, el que ocurrió como consecuencia de la estimulación cervicovaginal o algún otro tratamiento experimental. Se consideró respuesta de pseudopreñez positiva a aquellos animales que presentaron 9 o más días de diestro vaginal (i.e.: presencia de polimorfonucleares en el extendido vaginal).

En casos determinados, también se evaluó la actividad lútea, por medio de la determinación de los niveles de Pg plasmática en el séptimo día de diestro vaginal. Este día fue elegido porque la secreción de Pg durante la pseudopreñez alcanza niveles máximos entre el sexto y octavo día (60, 128, 202).

2.5.- EXTRACCION DE SANGRE Y DETERMINACION DE PROGESTERONA.

2.5.1.- MUESTRA DE SANGRE.

La sangre fue obtenida de la vena yugular externa con jeringas heparinizadas. En todos los casos las ratas fueron anestesiadas con éter. Las muestras se tomaron entre las 11.00-12.00 hs y el lapso transcurrido entre la introducción del animal en el frasco con éter y el final de la extracción de sangre fue menor de 2 minutos. El plasma se separó por centrifugación a baja velocidad y se guardó congelado hasta el ensayo.

2.5.2.- RADIOINMUNOENSAYO DE PROGESTERONA.

Se utilizó la técnica de Abraham et al. (2), con algunas modificaciones.

Reactivos.

a) Buffer fosfato 0,05 mM con 1% de gelatina (pH 7,0)

Fosfato dibásico..... 33mM

Fosfato monobásico..... 17mM

Acido etilendiaminotetracético..... 1mM

Azida sódica.....0,1%

Gelatina.....0,1%

Cloruro de sodio.....0,9%

Agua destilada.....c.s.p. 1 lts.

b) Eter de petróleo (B.P. 40°-70° C).

c) [1,2,6,7 -3H]Progesterona diluída en benceno (New England Nuclear; actividad específica 90-115 Ci/mM).

Standard de 10.000 cpm: Se preparó una dilución para determinar el porcentaje de extracción del esteroide luego de la extracción etérea. Se tomó 25 μ l de Pg marcada (se dejó evaporar el benceno a temperatura ambiente) y se diluyó en 1,25 ml de alcohol absoluto. La solución resultante tendrá aproximadamente 10.000 cpm en 25 μ l.

Solución de Pg marcada de aproximadamente 10.000 cpm en 200 μ l: Se diluyó la cantidad necesaria de Pg marcada en buffer fosfato (previamente se evaporó el benceno).

d) Suero antiprogesterona.

Fue generado en conejo por el Dr. L. E. Bussman, en el Laboratorio de Reproducción y Lactancia (Mendoza). Teniendo en cuenta el título obtenido se diluyó el suero antiprogesterona con el buffer fosfato, de tal forma que la máxima capacidad de unión a la Pg fue algo menor del 50% (entre el 40 a 50%). Sin olvidar la dilución que se realiza en el tubo de reacción.

e) Progesterona patrón.

Para conocer los valores de Pg en las muestras problema fue necesario compararlas en una curva patrón realizada con valores conocidos de Pg no marcada (s.: Pg fría). Para construir esta curva patrón se usó Pg cristalina diluída en alcohol absoluto hasta la concentración de 4 µg/ml, las diluciones siguientes se hicieron en buffer fosfato. El rango de concentración de la curva patrón fue de 12,5 a 800 pg por tubo.

f) Suspensión de carbón-dextrano.

Esta suspensión se usó para separar la hormona libre de la unidad al antisuero. Se agregó 0,5% de carbón

activado y 0,05% de dextrano en buffer fosfato.

g) Líquido centelleador.

Se usó para transformar la emisión de radioactividad en emisión de luz, ya que los contadores de centelleo líquido cuantifican la intensidad lumínica. Se tomó 4 gr de Omnifluor (producto comercial fluorescente) y se diluyó en 1 lts. de tolueno (solvente).

Metodología.

El primer paso fue extraer el esteroide de la muestra. Se tomaron 100 ul de plasma problema y se realizó una doble extracción con éter de petróleo. En cada extracción se usó 1,5 ml de éter y se agitó durante 1 minuto. Las dos fases se separan congelando la fase acuosa y volcando la etérea (que contiene el esteroide) en tubos apropiados. Esta última se evaporó a sequedad por medio de un evaporador rotativo a presión reducida.

El residuo seco fue resuspendido en 4 ml de buffer fosfato, a partir de esta solución (solución problema) se tomó alícuotas por duplicado.

Para calcular el porcentaje de extracción se

prepararon los tubos denominados Rx y R100. Todos se cargaron con 10.000 cpm de Pg. y plasma que contenía alta concentración de Pg. Se incubaron a 37°C durante 2 hs, agitándose periódicamente. De los tubos R100 se tomaron 100 μ l para ser contados al final del ensayo. De los Rx se tomó 100 μ l para realizar la extracción etérea, una vez obtenido el residuo seco se resuspendió en 4 ml de buffer fosfato; de esta solución se tomó 700 μ l para su posterior conteo.

Protocolo tipo.

	Solución Problema	Sol. patrón de Pg fría	Buffer	Sol. suero Anti-Pg.	Pg marcada
Muestra	200 μ l	-	-	100 μ l	200 μ l
Curva patrón	-	200 μ l	-	100 μ l	200 μ l
Blanco (NSB)	-	-	300 μ l	-	200 μ l
Total	-	-	500 μ l	-	200 μ l
Referencia (Bo)	-	-	200 μ l	100 μ l	200 μ l

Cada tubo se agitó e incubó, como mínimo, durante 16 hs a 4°C.

Una vez transcurrido este período se le agregó a cada tubo, excepto a los totales, 200 μ l de la suspensión de carbón-dextrano. Esta suspensión se agitó vigorosamente durante 15 minutos en baño a 0°C y se mantiene en agitación durante el tiempo que tarda su agregado a cada tubo (para evitar la sedimentación del carbón y por ende diferente agregado del mismo a los tubos). La Pg libre se fija al carbón, mientras que la unida al antisuero permanece en solución.

Los tubos se centrifugaron a 1.200 g durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante, libre de carbón, se volcó en frascos de vidrio. A este sobrenadante se le agregó 10 ml del líquido centellador y se deja estabilizar durante 12 a 15 hs a 7°C en oscuridad.

Por último los frascos fueron llevados a un contador de centelleo líquido. Cada frasco fue leído durante 1 a 2 minutos.

Confiabilidad de los resultados.

La capacidad de unión del ensayo fue calculada a partir de: $[Bo - NSB/T - NSB] \times 100$.

La concentración de Pg en las muestras fue calculada por interpolación en la curva patrón.

El porcentaje medio de recuperación fue del 84,2%. La exactitud del método fue calculado dosando cantidades conocidas de Pg en plasma de machos (que no contiene hormona endógena); siendo ésta del 110% para 1 y 5 ng de Pg. La precisión de cada ensayo fue calculada teniendo en cuenta el coeficiente de variación de una misma muestra dosada por sextuplicado, que fue del 5,25%. Esta misma muestra se dosó en todos los ensayos para calcular el coeficiente de variación interensayo, que fue del 12,2%. La sensibilidad del método, definida como la menor cantidad de Pg fría que causó desplazamiento de la hormona marcada, fue de aproximadamente 25 pg.

2.6.- SECCION DEL NERVIO PUDENDO.

Las ratas fueron anestesiadas con éter. Se realizó una incisión longitudinal bilateral en la piel de la cara dorsal, a ambos lados de la base de la cola. Ambos nervios pudendo fueron visualizados por debajo de los músculos de la cola, apoyados sobre el piso de un canal muscular formado entre la columna vertebral y el íleon (de acuerdo con Kow & Pfaff, 1955). Estos nervios recorren el canal muscular sin presentar ramificaciones y terminan en el

tejido graso que contacta con la piel del perineo.

A las hembras del grupo experimental se les extrajo un pequeño segmento de ambos nervios pudiendo. En el grupo de animales control (con operación simulada) los nervios fueron observados pero no tocados. Se suturó solamente la piel ya que los músculos fueron separados por divulsión roma.

2.7.- ADMINISTRACION DE DROGAS.

Progesterona: Se usó Pg cristalina disuelta en alcohol benzílico y aceite vegetal purificado (1:10). Las concentraciones utilizadas (2,5; 5 y 10 mg) fueron administradas subcutáneamente (s.c.) en un volumen de 0,2 ml. Las inyecciones fueron realizadas entre las 10.00 y 10.20 hs.

En un grupo experimental, 10 mg de Pg fueron administrados por vía intraperitoneal (i.p.). La Pg inyectada por esta vía posee efectos anestésicos (Selye, 1942), induciendo la pérdida del reflejo de enderezamiento en los animales tratados. Las ratas con la inyección i.p. de Pg fueron ubicadas en decúbito dorsal, y el tiempo entre la desaparición y la restitución total del reflejo de enderezamiento fue tomado para medir la duración del efecto anestésico.

LHRH, LH y FSH: Estas hormonas fueron disueltas en solución fisiológica (0,9% de ClNa). Las diferentes concentraciones utilizadas fueron administradas en un volumen de 0,2 ml por vía s.c.. Todas estas hormonas fueron inyectadas durante el proestro, el LHRH (Sigma) a las 12.00 hs mientras que la LH (NIAMDD-oLH-23) y la FSH (NIAMDD-oFSH-14) a las 12.30 hs.

2.8.- LESIONES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Las lesiones en el sistema nervioso se efectuaron en base al atlas de de Groot (63). En dicho atlas el cerebro de la rata se halla sistematizado de acuerdo a tres coordenadas que siguen los planos horizontal, vertical y lateral, de tal manera que un punto dado se puede ubicar perfectamente en el espacio y reproducir mediante un aparato estereotáxico. El animal se coloca en el aparato estereotáxico, fijándolo mediante los siguientes puntos de apoyo: una barra anterior en donde se apoyan los incisivos superiores, y dos barras horizontales (perpendiculares al eje longitudinal de la cabeza) que penetran en el conducto auditivo externo (formando la línea interaural). De esta manera se puede conseguir que la cabeza del animal adopte una inclinación igual a la utilizada por de Groot (63) cuando sistematizó las estructuras del cerebro de la rata. El sistema de coordenadas tomado como guía para localizar

las diferentes estructuras del cerebro fue: el plano cero horizontal, se sitúa a 5.0 mm por encima de la línea interaural, tangente a la barra de los incisivos superiores; el plano cero vertical, pasa a lo largo de la línea interaural y perpendicular al plano horizontal; y el plano cero lateral, se corta en ángulo de 90° con los planos vertical y horizontal, dividiendo al cerebro en dos mitades simétricas. Comúnmente, se usa como referencia del cero lateral al bregma (punto donde los huesos frontal y parietal se unen en la línea media) o al seno sagital.

SECCION DEL TECHO DEL AREA PREEPTICA.- Para realizar éste corte se utilizó una modificación de la cuchilla descrita por Halasz & Pupp (115). Fue construída con una cánula de aproximadamente 4 cm de largo y 0,8 mm de diámetro que lleva en su interior un alambre de acero de 0,3 mm de espesor. Un extremo de este alambre se dobló en ángulo recto respecto a su eje y se afiló hasta obtener una lámina de 2 mm de longitud, formando el extremo cortante de la cuchilla (Fig. 2.1). En el otro extremo se formó un asa. Todo el conjunto se fijó en el estereotáxico de tal manera que la cánula quedo inmóvil, sirviendo de guía de la cuchilla que puede girar en su interior.

Se operaron hembras entre 170-176 grs de peso, bajo anestesia con éter. Los animales se colocaron en el estereotáxico y, posteriormente, se expuso el seno sagital. La hoja horizontal de la cuchilla se ubicó

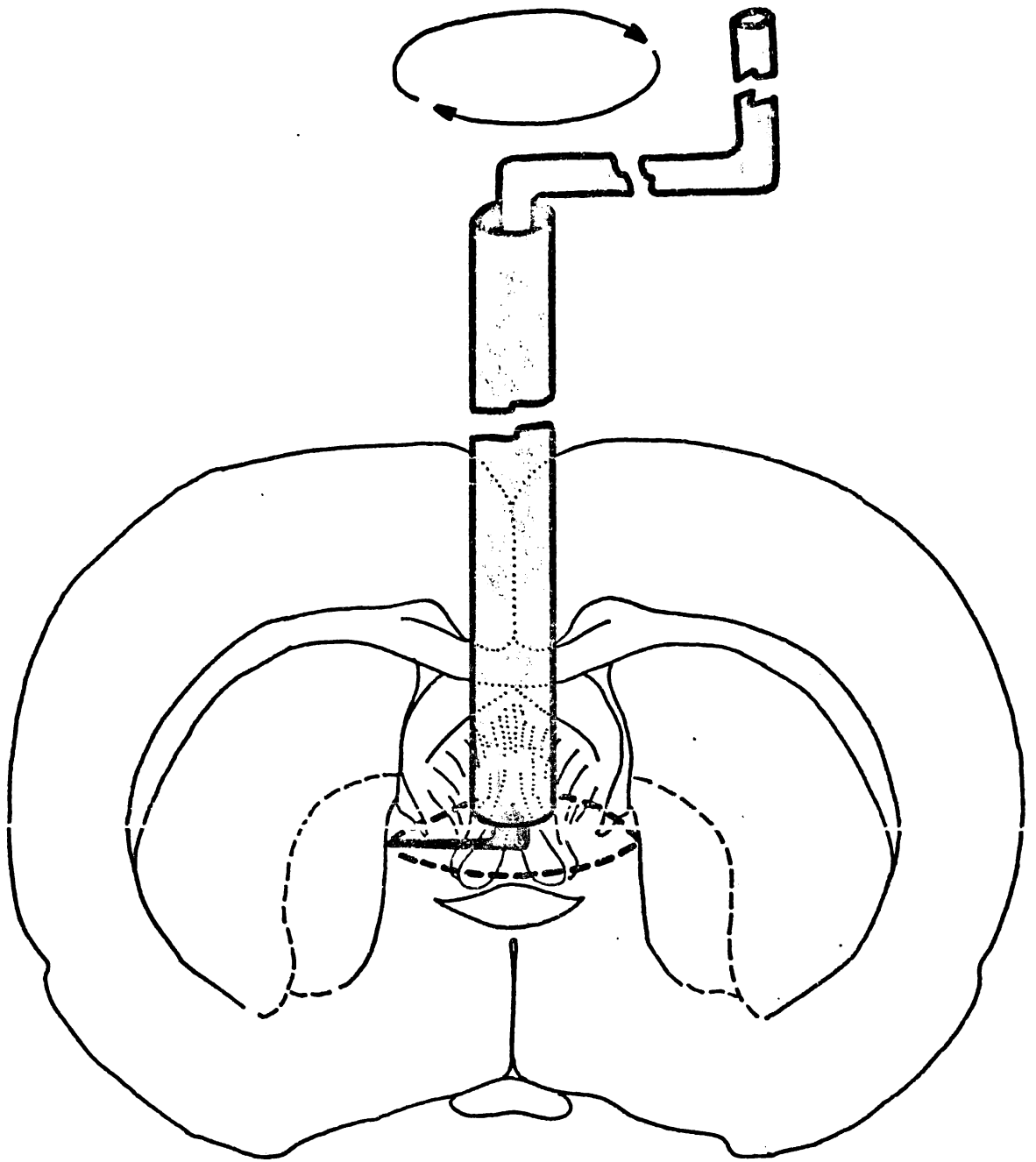


Figura 2.1.- Representación gráfica a escala de la cuchilla utilizada para seccionar el techo del área preóptica. La cuchilla se encuentra ubicada en un plano frontal del cerebro de la rata.

longitudinalmente al seno sagital. Se dirige al borde caudal de la comisura anterior, descendiendo hasta la cara dorsal de dicha comisura. Una vez en su lugar la cuchilla se giró 360° para producir una sección circular de 4 mm de diámetro. Inmediatamente después de retirar la cuchilla se suturó la piel. El grupo de animales control, con operación simulada, se le realizó el mismo procedimiento pero sin girar la cuchilla.

LESION DEL SEPTUM: El procedimiento fue similar al descrito por Velasco & Taleisnik (262). Se realizó una lesión electrolítica mediante un electrodo de acero, de aproximadamente 0,25 mm de diámetro. El electrodo se aisló perfectamente con un barniz adecuado, salvo una reducida zona de la extremidad inferior (para realizar la lesión) y otra mayor en el extremo superior (que se unirá al estimulador).

Se tomaron hembras entre 170-176 grs de peso, que se anestesiaron con tribromoetanol (2,5 mg/100 grs de peso), antes de colocarlas en el instrumento estereotáxico. Las coordenadas utilizadas, para ubicar la zona de lesión, fueron: anteroposterior, 6,5 mm por delante del eje interaural; vertical, 0 y 1 mm por encima del cero horizontal; y lateral, 0,5 mm a ambos lados del seno sagital.

Se realizaron cuatro focos de lesión (dos de cada

lado) por medio del pasaje, a través del electrodo, de una corriente catódica continua de 2 mA durante 10 segundos. Luego de ésto, se suturó la piel. En el grupo de animales control se realizó el mismo procedimiento pero sin pasar corriente a través del electrodo.

Todos los animales con las operaciones arriba comentadas fueron alojados en jaulas individuales durante los 10 días postoperatorios, ya que se observa un aumento de la agresividad de los animales después de estas operaciones. Transcurrido este período se reagruparon en sus jaulas colectivas y se inició la toma del extendido vaginal.

Una vez culminado el experimento, los animales fueron matados con éter y sus cerebros extraídos para ser fijados por inmersión en formol al 20%. El estudio posterior de los cerebros se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Guzman-Flores et al. (112). Luego de la fijación, los cerebros se congelaron y se hicieron cortes seriados de aproximadamente 40 micras. Estos cortes seriados son observados, sin coloración, bajo microscopio estereoscópico (entre 50x a 320x) para delimitar -histológicamente- la zona de la lesión.

2.9.- EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LA HORMONA LIBERADORA DE HORMONA LUTEINIZANTE.

En uno de los experimentos se quiso determinar la potencia biológica de 500 ng de LHRH. Para tal fin, se tomaron grupos de ratas en proestro a las que se les administró pentobarbital sódico (30 mg/kg de peso, i.p.) a las 15.00 hs, para bloquear la descarga endógena de LH. A un grupo de estas ratas bloqueadas se les administró la LHRH y su respuesta ovulatoria fue comparada con la de los otros grupos de ratas que habían sido inyectadas con dosis conocidas de LH. La LHRH y la LH fueron inyectadas s.c. el día del proestro. Durante la mañana siguiente se contaron los ovocitos que se encontraban alojados en el oviducto. Para ello se extrajeron ambos oviductos y bajo un microscopio estereoscópico se ubicó la ampolla oviductal la que, posteriormente, se rompió para permitir la salida de su contenido. Este contenido de la ampolla oviductal fue volcado sobre un cubreobjeto, pudiéndose así, contar los ovocitos presentes en el oviducto.

2.10.- ANALISIS ESTADISTICO (241, 244).

La prueba de Fisher o la prueba de χ^2 para dos muestras independientes, fueron usadas para evaluar la significación de las diferencias entre el porcentaje de inducción de pseudopreñez de dos grupos de animales. La prueba de aleatorización fue utilizada para determinar las diferencias en la inducción de pseudopreñez entre dos

curvas estímulo-respuesta con dos tratamientos distintos (por ejemplo: vehículo versus la inyección de una droga) cuando los puntos de ambas curvas fueron apareados de acuerdo con la magnitud del estímulo aplicado.

Para determinar el grado de significación entre las medias de los valores de Pg plasmática, cuando estos seguían la distribución gaussiana, se utilizó la prueba de Student. Cuando los valores de Pg plasmática no seguían la distribución de Gauss, se utilizó la prueba U de Man-Whitney (para comparar dos grupos entre sí) o el análisis de varianza de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis (para comparar más de dos muestras).

En los grupos con distribución no gaussiana, se usó la mediana como medida de la tendencia central y para medir la dispersión se usaron los límites de confianza del 95%.

3° PARTE:

CONTROL NEURAL DE LA
INDUCCION DE PSEUDOPREÑEZ

3.- CONTROL NEURAL DE LA INDUCCION DE PSEUDOPREÑEZ GENERALIDADES.

La copulación en la rata ocurre en una manera estereotipada y coincide con un código sensorial de la hembra, que es típico de la especie y de ese modo se incrementan las posibilidades del éxito reproductivo. El macho realiza varias intromisiones no eyaculatorias, entre 5 y 10, antes de alcanzar la eyaculación. Junto con el depósito del esperma se forma un coágulo denominado tapón vaginal. Cada acto copulatorio consta de varias series eyaculatorias.

Ball (17), en el año 1934, fue la primera en demostrar una relación cuantitativa entre el estímulo del coito y la frecuencia de inducción de pseudopreñez. En su estudio compara la respuesta de pseudopreñez entre hembras intactas, con ablación del cérvix uterino y con eliminación parcial del cuerno uterino; todos los animales fueron estimulados por machos vasectomizados. Indistintamente del tratamiento previo, la frecuencia de pseudopreñez estuvo en relación directa con el número de eyaculaciones que cada grupo recibió. Las hembras que recibieron intromisiones pero sin permitir la eyaculación del macho, mostraron un 0% de respuesta, por el contrario, cuando se permitió más de dos eyaculaciones la respuesta fue del 100%.

La inducción de pseudopreñez es una respuesta del todo

o nada. Con relación a los factores críticos para desencadenar el reflejo en la rata, recientemente, han sido publicados dos trabajos. Baumgardner & Dewsbury (19) encontraron que la morfología del pene estaba relacionada con la inducción de pseudopreñez; cuando el pene era reducido y con menor número de espículas el porcentaje de pseudopreñez disminuía. Castro-Vazquez & Carreño (44) utilizaron un procedimiento de estimulación artificial que permitió graduar la intensidad de la penetración intravaginal de una barra cilíndrica. De esta forma pudieron modificar la magnitud del estímulo cervicovaginal, ya sea en su penetración como en duración. La probabilidad de la respuesta progestacional mostró estar en relación directa con el grado de penetración vaginal, pareciendo ser éste el estímulo clave para desencadenar -con esta metodología- la pseudopreñez de la rata. Esta interpretación le quitaría importancia a la participación de los otros estímulos extravaginales que la hembra recibe durante el coito.

La estimulación mecánica del cérvix y la vagina, sea natural o artificial, es traducida o codificada en señales neurales que entran a la médula y ascienden por las columnas anterolaterales de ésta, hasta alcanzar el cerebro. La importancia del sistema nervioso en el control de la pseudopreñez, ha sido de gran interés experimental. El hallazgo hecho por Vogt (265) de un bloqueo parcial de la respuesta de pseudopreñez causado por la gangliectomía

cervical superior, pareció confirmar la presunción prevalente en la primera mitad de la década del 30 de que las terminaciones simpáticas originadas en este ganglio eran la vía del control neural de la hipófisis. Pero este resultado de Vogt no pudo ser repetido, cuando las hembras se estimularon con machos vasectomizados (17) ni tampoco cuando se usó un estímulo cervicovaginal mecánico (43).

El área preóptica y el hipotálamo mediobasal cumplen un papel muy importante en el control neural de la pseudopreñez. La interrupción de las conexiones nerviosas entre el área preóptica y el hipotálamo (por medio del corte retroquiasmático) suprime la respuesta de pseudopreñez (41, 95, 263). En un estudio realizado con lesiones del área medial preóptica se encontró que la destrucción de esta zona resulta en pseudopreñeces espontáneas; siempre que la lesión no dañe el núcleo supraquiasmático (50). La participación del estímulo luminoso y del núcleo supraquiasmático en la respuesta luteal, también ha sido investigada (22, 23, 280), encontrándose un bloqueo de la descarga de PRL en hembras con lesión de este núcleo. En base a estos resultados se concluyó que, el responsable de generar el ritmo circadiano de la liberación de PRL luego de la estimulación cervicovaginal sería el núcleo supraquiasmático (al igual que ocurre para otros ritmos biológicos).

Menos aún se conoce sobre la participación de algunas

aferencias extrahipotalámicas en el reflejo de pseudopreñez. La interrupción de aferencias provenientes del sistema límbico (septum, amígdala e hipocampo) produce una facilitación de ciertas respuestas sexuales de la rata, como por ejemplo, la vibración de las orejas (254) y de la respuesta de lordosis (191). La misma interrupción de las vías del sistema límbico mostró un descenso del umbral a la inducción de pseudopreñez (97).

Para estudiar si esta facilitación de la inducción de la fase lútea, en los animales con sección del techo del área preóptica, era debida a cambios en la sensibilidad cutánea del perineo, realizamos la desnervación de la región (por sección del nervio pudendo) en grupos de ratas lesionadas. En otro experimento lesionamos los núcleos del septum con el objeto de estudiar el papel de éstos, en el reflejo de pseudopreñez.

3.1.- RESULTADO DE LA SECCION DEL TECHO DEL AREA PREOPTICA EN ANIMALES CON DESNERVACION DE LA REGION PERINEAL.

Esta lesión del techo del área preóptica interrumpe algunas aferencias que vienen del sistema límbico (Fig. 3.1). La sección del fornix se produce a la altura en que éste se vuelve vertical. La stria terminalis fue cortada cuando se expande en su núcleo propio, en la mayoría de los

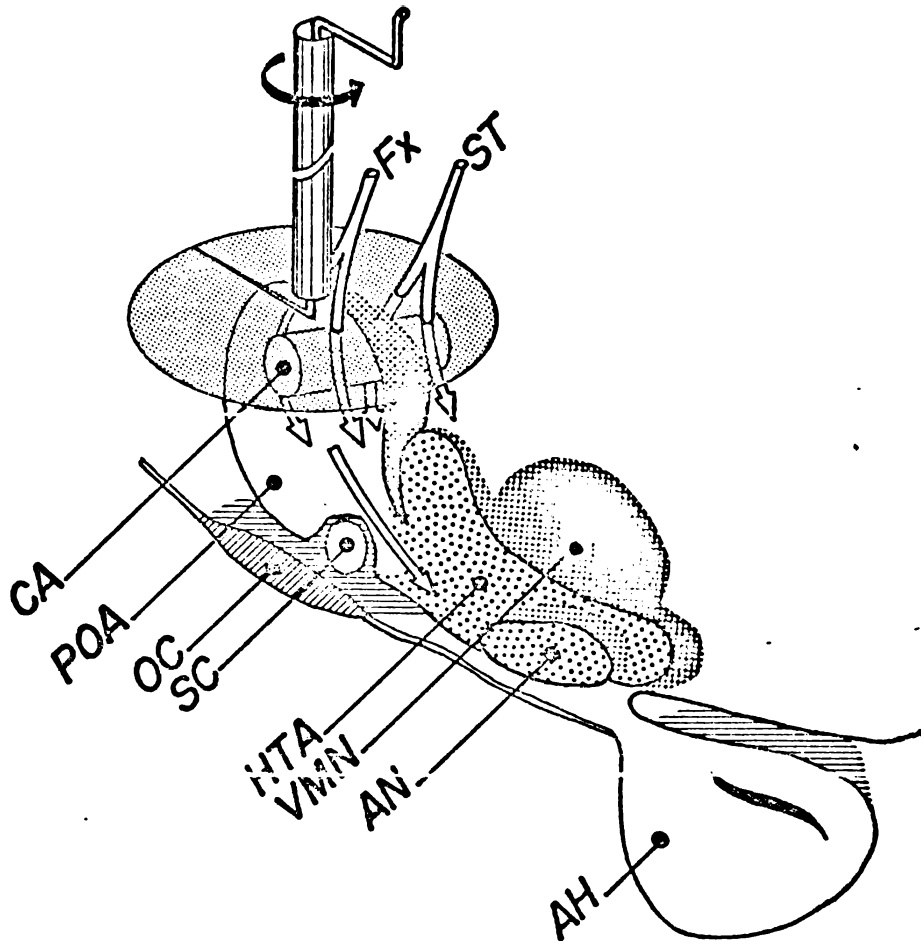


Figura 3.1.- Representación esquemática de la sección del techo del área preóptica (POA) en la rata. Se grafica el hipotálamo, POA y estructuras relacionadas. El corte realizado por la cuchilla está indicado por el círculo punteado. Fx, fornix; ST, stria terminalis; CA, comisura anterior; OC, quiasma óptico; SC, núcleo supraquiasmático; AN, núcleo arcuato; VMN, núcleo ventromediano. El dibujo fue tomado de Velasco & Rothchild (261).

casos se seccionaron las striae de ambos lados. Los núcleos medial, triangular y lateral del septum ubicados siempre por encima del corte quedaron desconectados del hipotálamo, mostrando distintos grados de necrosis (Fig. 3.2).

Los animales lesionados muestran una facilitación de la inducción de pseudopreñez cuando se los comparó con las hembras con operación simulada. Alrededor del 90% de los animales con sección del techo del área preóptica tuvieron, al menos una pseudopreñez espontánea (i.e.: sin estimulación cervicovaginal) durante el mes y medio postoperatorio. Por el contrario, en los animales control las pseudopreñeces espontáneas fueron menores del 10%. A partir del segundo mes postoperatorio los animales lesionados comienzan a presentar actividad estral cíclica, cada 4 o 5 días. Luego de verificar dos o tres ciclos estrales normales a todos los animales se les aplicó una estimulación cervicovaginal de intensidad creciente.

Cada animal recibió una intromisión vaginal (estimulación tipo 1) de 18 mm de penetración durante 15 segundos a las 17.00 hs del estro. Si esta estimulación no resultó efectiva para inducir pseudopreñez, se aplicó otra estimulación cervicovaginal cada dos ciclos estrales aumentándose 2 mm la intromisión; hasta -finalmente- alcanzar el umbral de la respuesta de cada animal.

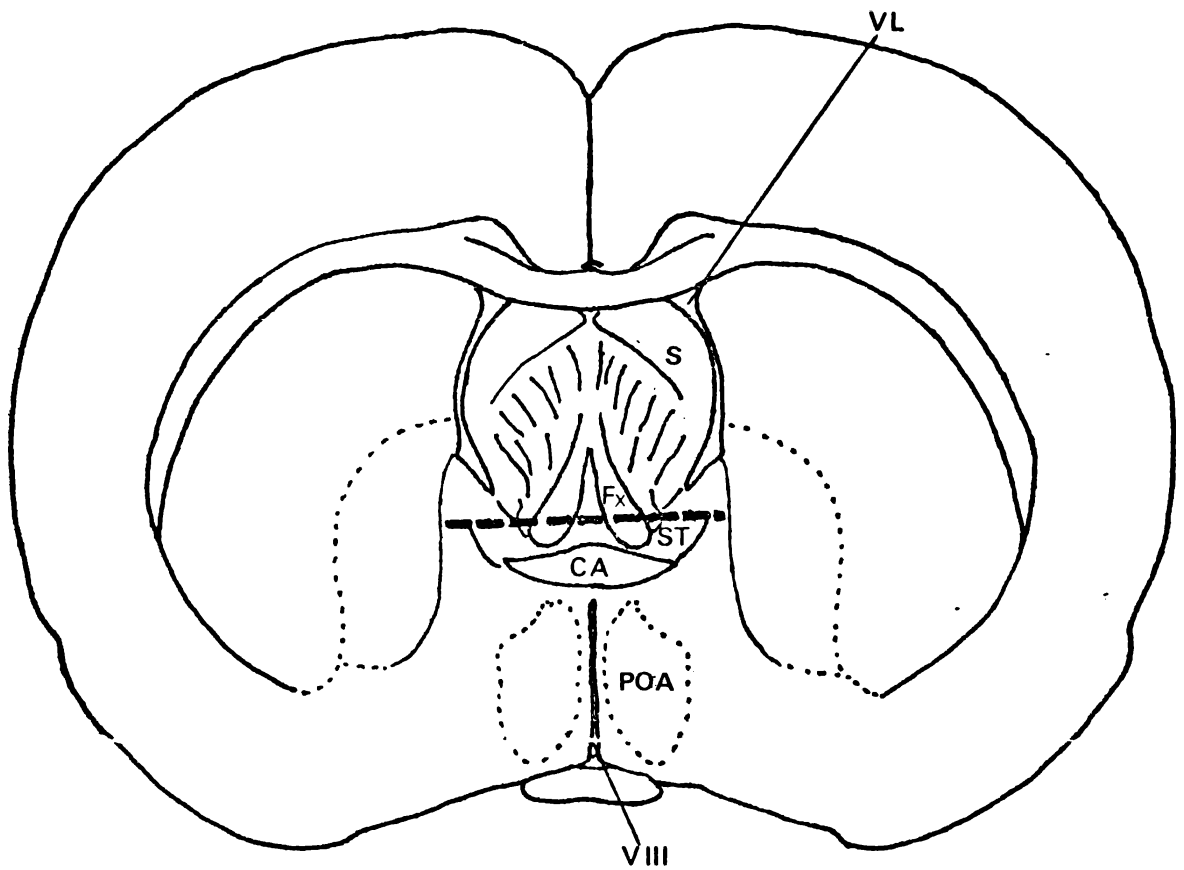


Figura 3.2.- Corte frontal esquemático del cerebro de la rata mostrando la sección del techo del área preóptica (línea discontinua gruesa). Fx, fornix; ST, stria terminalis; CA, comisura anterior; S, núcleos del septum; POA, área preóptica; VL, ventrículo lateral; VIII, tercer ventrículo.

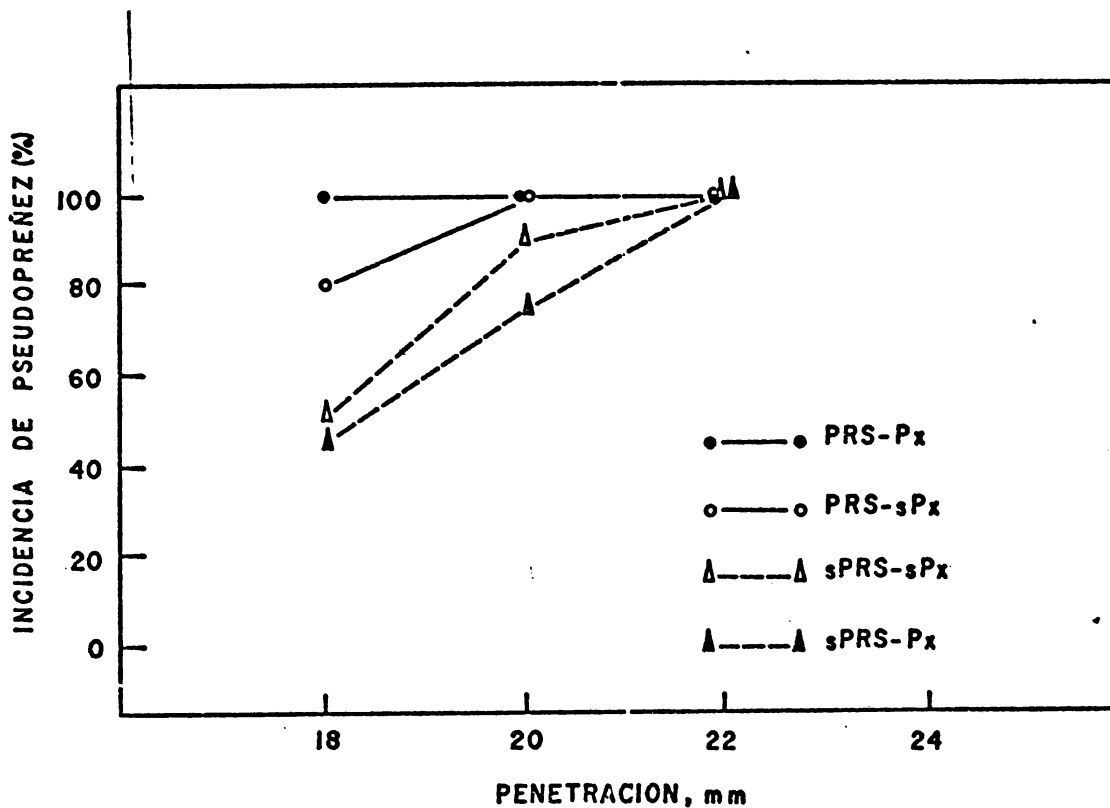


Figura 3.3.- Porcentaje acumulativo de pseudopreñez como respuesta a la estimulación cervicovaginal de intensidad creciente, en la tarde del estro, a grupos de ratas en diferentes condiciones experimentales. PRS-Px, sección del techo del área preóptica y sección del nervio pudendo (n= 6); PRS-sPx, sección del techo del área preóptica y operación simulada del nervio pudendo (n= 8); sPRS-sPx, operación simulada del techo del área preóptica y operación simulada del nervio pudendo (n= 14); sPRS-Px, operación simulada del techo del área preóptica y sección del nervio pudendo (n= 14).

En la Fig. 3.3 aparece graficado el porcentaje acumulativo de pseudopreñez luego de aplicar la estimulación cervicovaginal de intensidad creciente. Las curvas estímulo-respuesta correspondientes a los animales lesionados están cercanas al 100% de respuesta, indicando un menor umbral que en los grupos control. Con la idea de estudiar algún mecanismo periférico que participe en la facilitación de la respuesta en los animales lesionados, realizamos la deservación de la región perineal (por sección del nervio pudendo). La importancia de la vía sensorial del nervio pudendo en la inducción de pseudopreñez, se estudiará más adelante (ver 4° PARTE). De acuerdo con los resultados presentados en la Fig. 3.3, la deservación de la región perineal no modifica significativamente la respuesta de pseudopreñez en los animales con sección del techo del área preóptica. Tampoco se alteró el porcentaje de pseudopreñeces espontáneas en el grupo con deservación perineal (93%).

3.2.- RESULTADO DE LA LESION DEL SEPTUM.

Debido a que la sección del techo del área preóptica interrumpe, entre otras, las aferencias desde los núcleos del septum, se lesionó únicamente esta zona. La lesión produjo una extensa destrucción de los núcleos medial, triangular y lateral del septum, dejando las proyecciones de la amígdala y del hipocampo (stria terminalis y fornix)

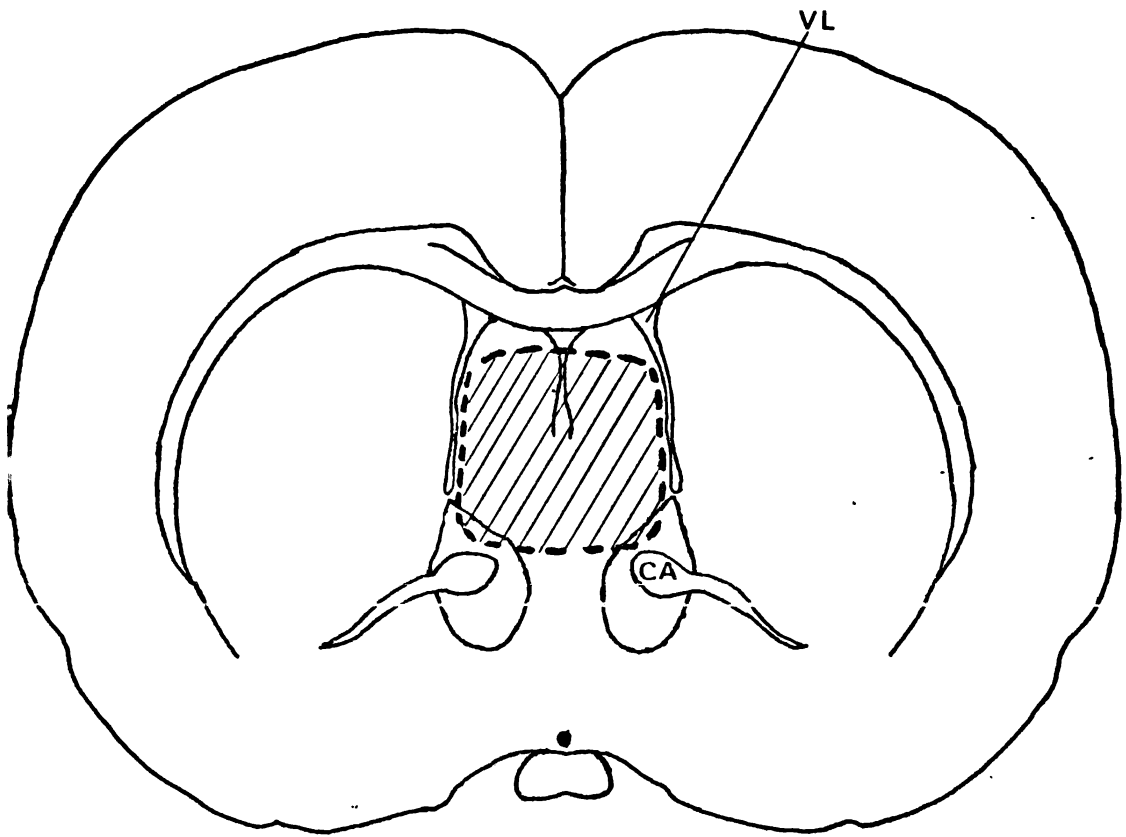


Figura 3.4.- Corte frontal esquemático del cerebro de la rata mostrando la zona de lesión de los núcleos del septum. La zona rayada corresponde al área destruida en todos los animales. CA, comisura anterior; VL, ventrículo lateral.

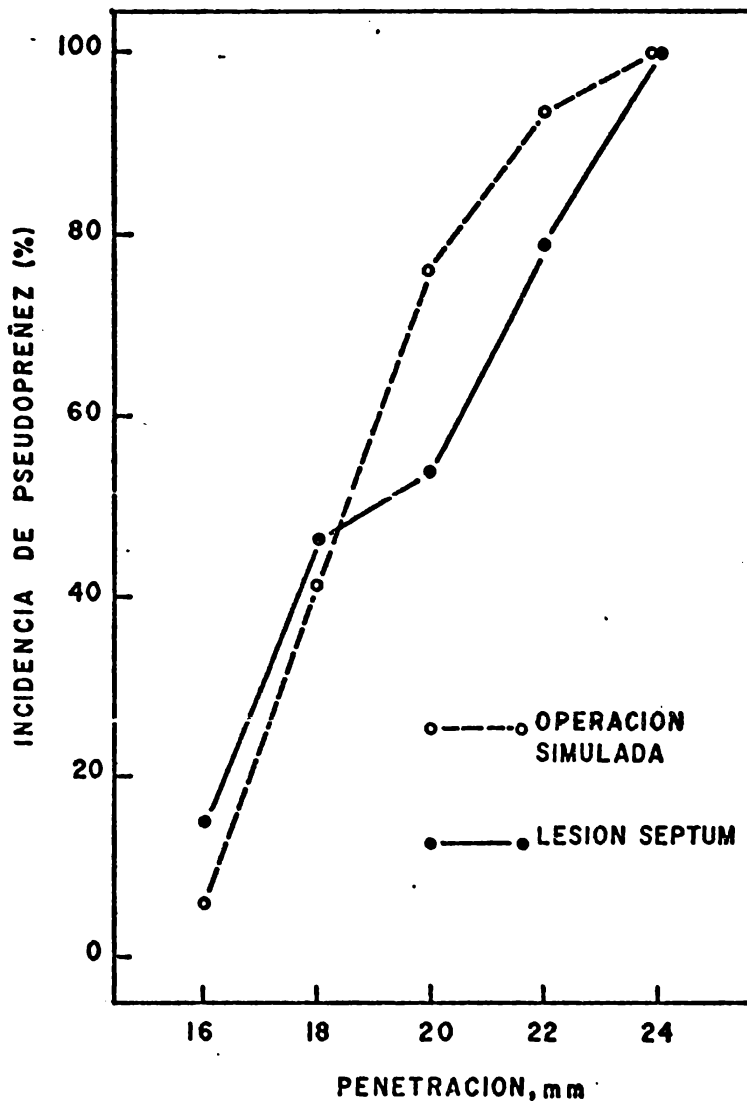


Figura 3.5.- Porcentaje acumulativo de pseudopreñez como respuesta a la estimulación cervicovaginal de intensidad creciente, en la tarde del estro, a un grupo de ratas con lesión del septum (n= 12) y al grupo control con operación simulada (n= 17).

sin afectar (Fig. 3.4).

Esta lesión a diferencia de la anterior, no produjo una alta incidencia de pseudopreñeces espontáneas (solamente 15%) en el primer mes y medio postoperatorio.

Después de presentar dos o tres ciclos estrales de 4 o 5 días, los animales lesionados y con operación simulada, recibieron la estimulación cervicovaginal (tipo I) de intensidad creciente similar a la aplicada a los animales del experimento anterior. Las únicas diferencias fueron que se comenzó con 16 mm de penetración intravaginal, y que en todos los casos se disminuyó a 5 segundos la duración de la estimulación.

El umbral para la respuesta de pseudopreñez a la estimulación cervicovaginal no fue diferente entre los animales lesionados y los controles con operación simulada (Fig. 3.5). Una prueba limitada a sólo tres animales, en los cuales se lesionó el fornix, mostró una respuesta normal a la estimulación cervicovaginal.

3.3.- DISCUSION SOBRE EL EFECTO DE LAS LESIONES EN EL SISTEMA NERVIOSO.

Se confirmaron los resultados ya publicados (97) sobre una facilitación de la inducción de pseudopreñez en los

animales con sección del techo del área preóptica. Esta respuesta no fue debida a un aumento de la sensibilidad cutánea en la región perineal. La lesión del septum no modificó la incidencia de pseudopreñez.

La integridad de las conexiones entre el área preóptica y el hipotálamo mediobasal son indispensables para la normal expresión del mecanismo reflejo de pseudopreñez (11, 41, 95, 263). Nuestros resultados indican que otras estructuras telencefálicas, que proyectan al área preóptica, poseen un papel modulador de esta continuidad preóptico-hipotalámica. Podemos descartar a los núcleos del septum como estructuras moduladoras como también, tentativamente, al hipocampo. Por ello, se podría concluir que la facilitación observada luego de la sección del techo del área preóptica es el resultado de suprimir la influencia de la amígdala (por la sección de la stria terminalis).

La destrucción selectiva del área medial preóptica induce pseudopreñeces repetidas (50, 93). Estas pseudopreñeces se caracterizan por presentar solamente una sola de las dos descargas diarias de PRL, la nocturna (93). Además, en animales que habían recibido estimulación cervicovaginal, cuando se les realizó la lesión del área medial preóptica se suprimió la expresión de la descarga diurna de PRL sin afectar la nocturna. Estos datos permiten sugerir una regulación diferencial, en el área

medial preóptica, para las dos descargas de PRL. En el animal no estimulado el área medial preóptica posee neuronas inhibitorias de la expresión de la descarga nocturna de PRL. Cuando se produce la lesión se anula la información inhibitoria y aparecen las pseudopreñeces espontáneas. En nuestro caso, las pseudopreñeces generadas por sección del techo del área preóptica, se podría pensar que estamos anulando la actividad inhibitoria que estas neuronas ejercen sobre la descarga nocturna de PRL. Si ésto fuera así, esta actividad inhibitoria de neuronas ubicadas en el área medial preóptica estaría modulada por estímulos telencefálicos. Esta tónica actividad inhibitoria sobre la descarga del complejo luteotrófico posibilitaría a la rata tener su característico ciclo estral, extremadamente corto, debido a que presenta -si no hay un apareamiento- una fase lútea frusta después de cada ovulación.

4° PARTE:

CONTROL HORMONAL DE LA
INDUCCION DE PSEUDOPREÑEZ

4.- CONTROL HORMONAL DE LA INDUCCION DE PSEUDOPREÑEZ: GENERALIDADES.

A lo largo de toda su extensión los circuitos reflejos de la pseudopreñez, reciben influencias de distinta naturaleza que son capaces de modificar su actividad. Entre las de origen hormonal podemos considerar la que producen los esteroides ováricos (estrógenos y Pg). La influencia de estas hormonas es ejercida, en parte, a través del SNC o por acción directa sobre la adenohipófisis. El aumento de la concentración plasmática de Pg, en respuesta a un estímulo luteotrófico, produce un estímulo de retroalimentación positivo sobre el eje hipotálamo-hipofisario, favoreciendo la mantención de los picos diarios de PRL a lo largo de la pseudopreñez (8, 66, 221, 222). Otros datos que apoyan la observación anterior son la inducción de pseudopreñez, en ratas sin estimulación cervicovaginal, por administración de una alta dosis de Pg en el día del proestro o estro (9, 79, 225) o por implantes de Pg en el hipotálamo (200). También, una alta dosis de estrógeno administrada a una hembra en estro induce pseudopreñez (7, 28, 62, 99).

Sin embargo, hay evidencias presentadas por Smith & Neill (243) y Freeman & Sterman (96) de que el sistema puede funcionar aún en ausencia de los esteroides ováricos, aunque la sensibilidad a la estimulación y la amplitud de la respuesta estén disminuidas. Estos investigadores

encuentran que pequeños picos de PRL pueden ser iniciados y mantenidos por varios días (entre 6 a 8) luego de la estimulación del cérvix en ratas ovariectomizadas dos semanas antes o el mismo día de la estimulación. Es importante comentar que el estímulo cervical aplicado por estos investigadores fue una doble estimulación eléctrica del cérvix, con un intervalo de 12 hs. Este procedimiento, posiblemente, es mucho más drástico que el utilizado por Castro-Vazquez & Carreño (44); pudiéndose inferir que este último sea más semejante al estímulo cervicovaginal que -fisiológicamente- produce el macho durante el coito.

Recientemente se ha observado (45) que la inducción de pseudopreñez en la rata, varía de acuerdo con el momento del ciclo estral en que se aplica el estímulo. La mayor sensibilidad se encontró en, aquellas hembras estimuladas en la noche del proestro y, por el contrario, la menor respuesta en las estimuladas en el segundo día del diestro. Estos resultados concuerdan con la idea de la presencia de una modulación hormonal del reflejo de pseudopreñez en relación a los cambios de secreción del ovario, durante el ciclo estral.

Los experimentos que presentamos a continuación fueron diseñados con el objeto de determinar algunos de los mecanismos hormonales que tienen participación en la inducción de pseudopreñez.

4.1.- EFECTO DE LA PROGESTERONA EN LA INDUCCION DE PSEUDOPREÑEZ.

La inducción de pseudopreñez por una dosis farmacológica de Pg, en ratas sin estimulación cervicovaginal, ha sido demostrada (9, 62, 79, 187, 225). Esto estaría indicando que otros estímulos sensoriales, a parte del cervicovaginal, podrían mediar el efecto de la Pg. Cuando un grupo de hembras inyectadas con Pg fueron aisladas en jaulas individuales y no se les tomó el extendido vaginal durante 4-5 días post-tratamiento se encontró una significativa disminución en el porcentaje de inducción de pseudopreñez (79). En base a esto se interpretó que el efecto de la Pg se debía a una disminución del umbral a estímulos no específicos, tales como la manipulación diaria de los animales, el lavaje vaginal y el contacto con las otras hembras.

A continuación presentamos los resultados de nuestro estudio sobre los mecanismos sensoriales involucrados en la inducción de pseudopreñez por Pg.

4.1.1.- ADMINISTRACION DE PROGESTERONA EN DIFERENTES ESTADIOS DEL CICLO ESTRAL.

La proporción de animales que entraron en pseudopreñez dependió del estadio del ciclo estral en que se administró

la Pg y de la dosis (Tabla 4.1; Fig. 4.2) La mayor incidencia se observó en estro (73%) con 10 mg de Pg, este porcentaje fue menor (30%) cuando se bajó la dosis a 5 mg (Fig. 4.3). Respuestas de pseudopreñez también se indujeron en proestro, aunque con menor frecuencia que en el estro. La inyección de 10 mg de Pg en diestro prolongó la duración del diestro vaginal pero sin inducir pseudopreñez.

Los niveles plasmáticos de Pg circulante fueron determinados en las ratas con pseudopreñez luego de la inyección de Pg (Tabla 4.1) Estos valores fueron no significativamente diferentes de aquellos encontrados en dos grupos adicionales de ratas con pseudopreñez inducida por estimulación cervicovaginal en proestro (n= 8) o en estro (n= 10) (proestro, mediana: 56 ng/ml, límites de confianza 95%: 38-66 ng/ml; estro, mediana: 59 ng/ml, límites de confianza 95%: 38-66 ng/ml). Los valores de Pg plasmática observados en las pseudopreñeces inducidas por 5 o 10 mg de Pg no mostraron diferencias significativas entre ellos.

4.1.2.- EFECTO ANESTESICO DE LA PROGESTERONA Y SU RELACION CON LA INDUCCION DE PSEUDOPREÑEZ.

Cuando se inyectó 10 mg de Pg por via i.p. (en vez de la s.c.) las ratas sufrieron los efectos anestésicos del

Tabla 4.1.- Inducción de pseudopreñez en ratas inyectadas con progesterona o su vehículo en diferentes esta-
díos del ciclo estral,¹

Estadío del ciclo	Dosis (mg)	N° de casos	Incidencia de pseudopreñez (%)	Duración del Diestro		Progesterona (ng/ml)	
				Mediana	(rango)	Mediana	Límites confianza 95%
Proestro		10	0				
	2,5	12	0				
	5	15	13	10	(9-10)	65	(63 - 66)
	10	10	40	11	(9-11)	71	(54 - 74)
		10	0				
Estro	2,5	10	0				
	5	10	30	10	(9-10)	42	(33 - 70)
	10	11	73 ²	10	(9-12)	58	(39 - 65)
	10 ³	11	9		9		
Diestro							
Día 1	10	19	0				
Día 2	10	10	0				

Los animales se ubicaron en jaulas colectivas y diariamente se les tomó las muestras para el extendido vaginal.

¹ Solamente los animales que presentaron pseudopreñez (i.e: 9 ó más días de diestro vaginal). Las muestras de sangre se tomaron el día 7 del diestro.

² $P < 0.05$ vs el control respectivo inyectado con vehículo (Prueba de Fisher).

³ La administración de Pg fue i.p. en vez de s.c.

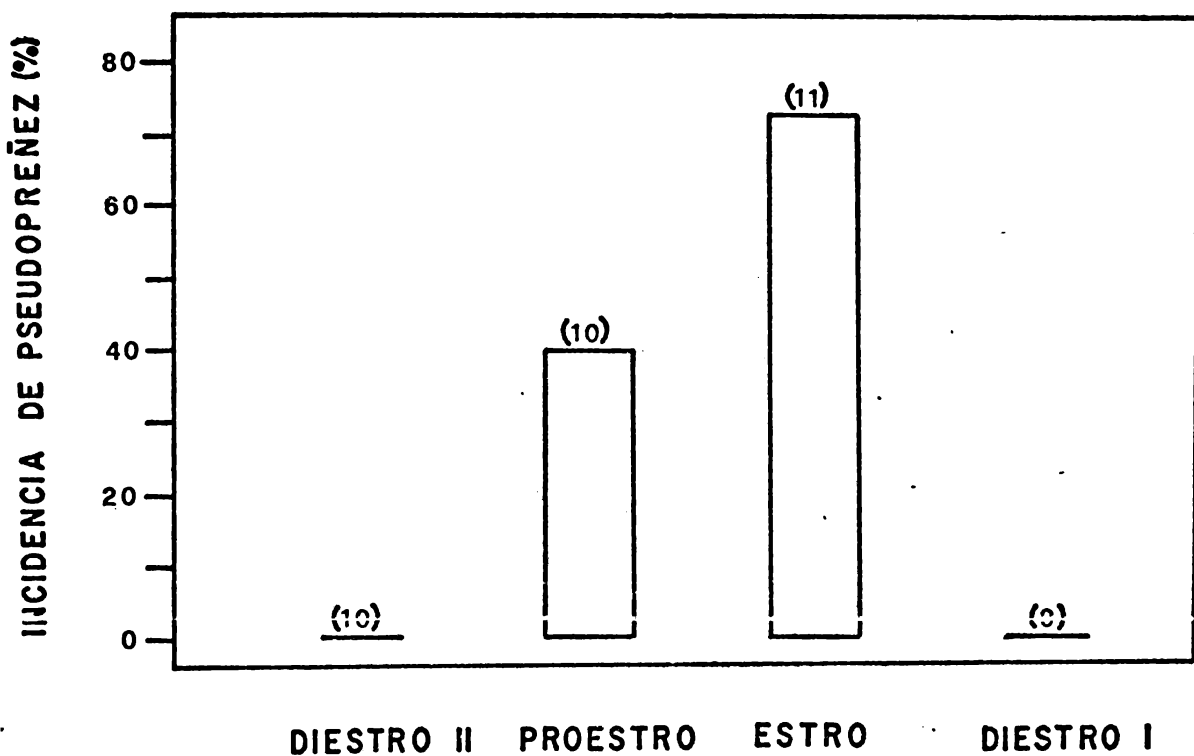


Figura 4.2.- Probabilidad de la respuesta de pseudopreñez luego de la inyección de 10 mg de progesterona s.c. (a las 10.00 hs) en los distintos estadios del ciclo estral (datos tomados de la Tabla 4.1). En esta y en las figuras siguientes, los números entre paréntesis indican el número de casos de cada grupo.

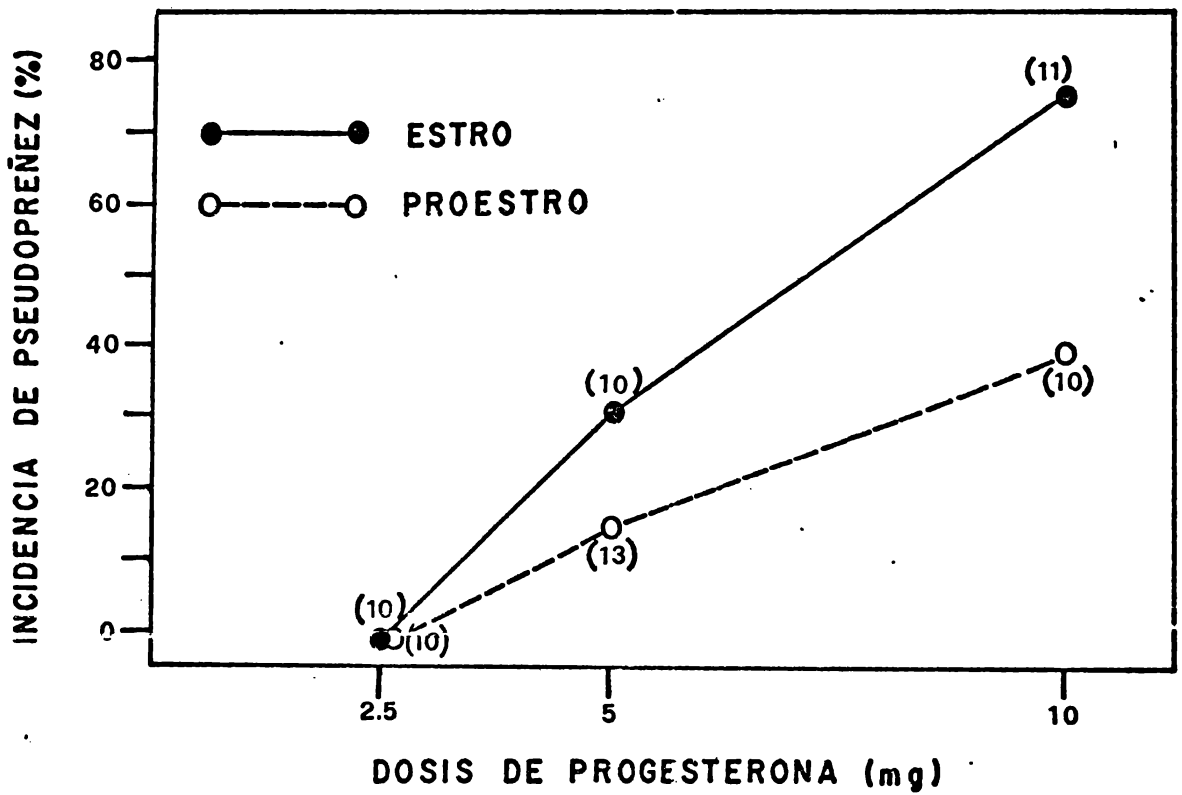


Figura 4.3.- Probabilidad de la respuesta de pseudopreñez luego de la administración de distintas dosis de progesterona en estro y proestro (datos tomados de la Tabla 4.1).

esteroide (235). A los 10 minutos del tratamiento las ratas perdieron el reflejo de enderezamiento, recuperandolo 50-80 minutos mas tarde. Solamente una rata de las 11 tratadas (9%, Tabla 4.1) entró en pseudopreñez, demostrando una clara disociación entre el efecto anestésico de la Pg y su acción inductora de pseudopreñez.

4.1.3.- FACILITACION DE LA RESPUESTA A LA ESTIMULACION CERVICOVAGINAL POR UNA DOSIS BAJA DE PROGESTERONA.

La inducción de pseudopreñez por inyección de Pg, en ausencia de estimulación cervicovaginal, fue claramente observada cuando se usaron dosis altas de la hormona. A continuación probamos si una pequeña dosis de Pg podría ser efectiva para aumentar la sensibilidad a la estimulación cervicovaginal. Para ello, se utilizó un tratamiento con Pg (5 mg a las 10.00 hs del proestro), que producía sólo una baja incidencia de pseudopreñez, no significativamente diferente de la de los animales inyectados con vehículo ($P > 0,05$, Prueba de Fisher; Tabla 4.1). Una única estimulación cervicovaginal (tipo II) con un rango de penetración entre 0-24 mm fue aplicada durante 5 segundos, 10 hs después de la inyección de Pg (i.e.: 20.00 hs del proestro).

La incidencia de pseudopreñez después de la estimulación cervicovaginal fue significativamente más alta

en las ratas tratadas con Pg que en las controles inyectadas con vehículo ($P= 0.02$, Prueba de aleatorización para pares igualados de acuerdo con la magnitud del estímulo; Fig. 4.4). Sorpresivamente, encontramos un significativo incremento en el porcentaje de pseudopreñez en los animales inyectados con Pg y que se les aplicó -solamente- la extremidad anterior del estimulador sobre el perineo (0 mm de penetración; $P<0,05$, Prueba de Fisher; Fig. 4.4).

4.1.4.- IMPORTANCIA DE LA ESTIMULACION PERINEAL EN LA INDUCCION DE PSEUDOPREÑEZ LUEGO DE LA ADMINISTRACION DE PROGESTERONA.

El efecto observado cuando se aplicó la extremidad anterior del estimulador sobre el perineo de ratas tratadas con Pg, sugiere la posible participación de la sensibilidad perineal en la inducción de pseudopreñez luego del tratamiento con el esteroide. La reducción del efecto de la Pg (10 mg en estro) comunicado por Everett (79) como resultado de la combinación entre la aislación en jaulas individuales mas la ausencia del manoseo correspondiente a la toma del extendido vaginal, puede ser debido a la ausencia de la estimulación perineal.

A continuación realizamos una serie de grupos experimentales, todos los cuales recibieron 10 mg de Pg en estro, con el objeto de determinar más precisamente cuales

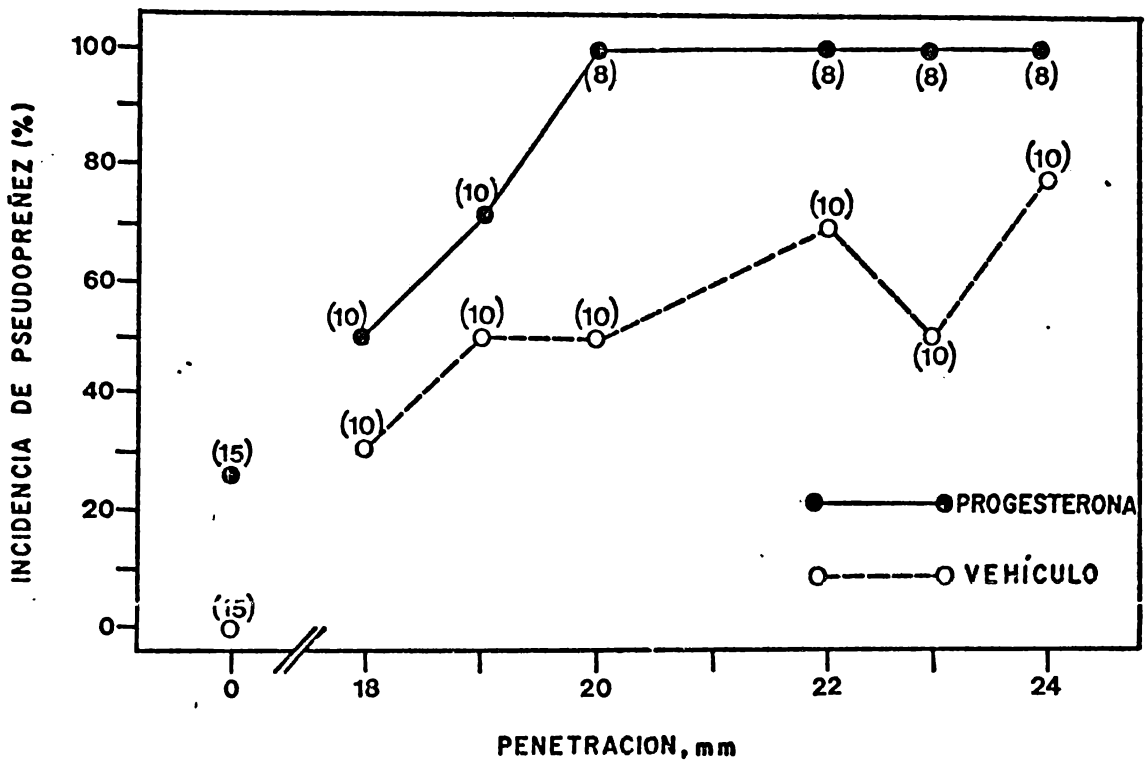


Figura 4.4.- Facilitación de la respuesta de pseudopreñez a distintas penetraciones intravaginales (estimulación tipo II), aplicadas 10 hs después de la inyección de 5 mg de Pg (10.00 hs del proestro). La penetración 0 mm, corresponde a aplicar -sobre el perineo de la rata- el tope del estimulador, sin introducir la barra dentro de la vagina. La diferencia entre la curva de los animales con Pg y la de los inyectados con vehículo, fue estadísticamente significativa ($P= 0,02$; Prueba de aleatorización).

eran los estímulos sensoriales involucrados en la inducción de pseudopreñez por Pg. Una significativa disminución de la respuesta se observó en el grupo de ratas, mantenidas en sus jaulas colectivas, pero que los 5 días posteriores al tratamiento no se les realizó la toma del extendido vaginal (Fig. 4.5); mientras que en otro grupo de similares características (i.e.: sin extendidos vaginales durante 5 días) pero las hembras aisladas en jaulas individuales, no presentaron una mayor reducción del porcentaje de pseudopreñez. La estimulación perineal (tipo III), aplicada diariamente durante los 5 días posteriores a la inyección de Pg (período en que no se tomó el extendido vaginal), recuperó el porcentaje de la respuesta luteal. Esto último sugirió que la estimulación intravaginal durante la toma del extendido vaginal, no estaría involucrada en la inducción de pseudopreñez luego de la administración de Pg. Por último, la importancia de la sensibilidad perineal en la inducción de pseudopreñez por Pg fue demostrada por el bloqueo del efecto del esteroide en ratas con la toma diaria del extendido vaginal pero sometidas a la sección del nervio pudendo. El nervio pudendo es el responsable de la inervación de la piel perineal (154, 155).

Los niveles de Pg plasmática fueron medidos durante las pseudopreñeces inducidas en los diferentes grupos, pero no se observaron diferencias significativas (Tabla 4.6).

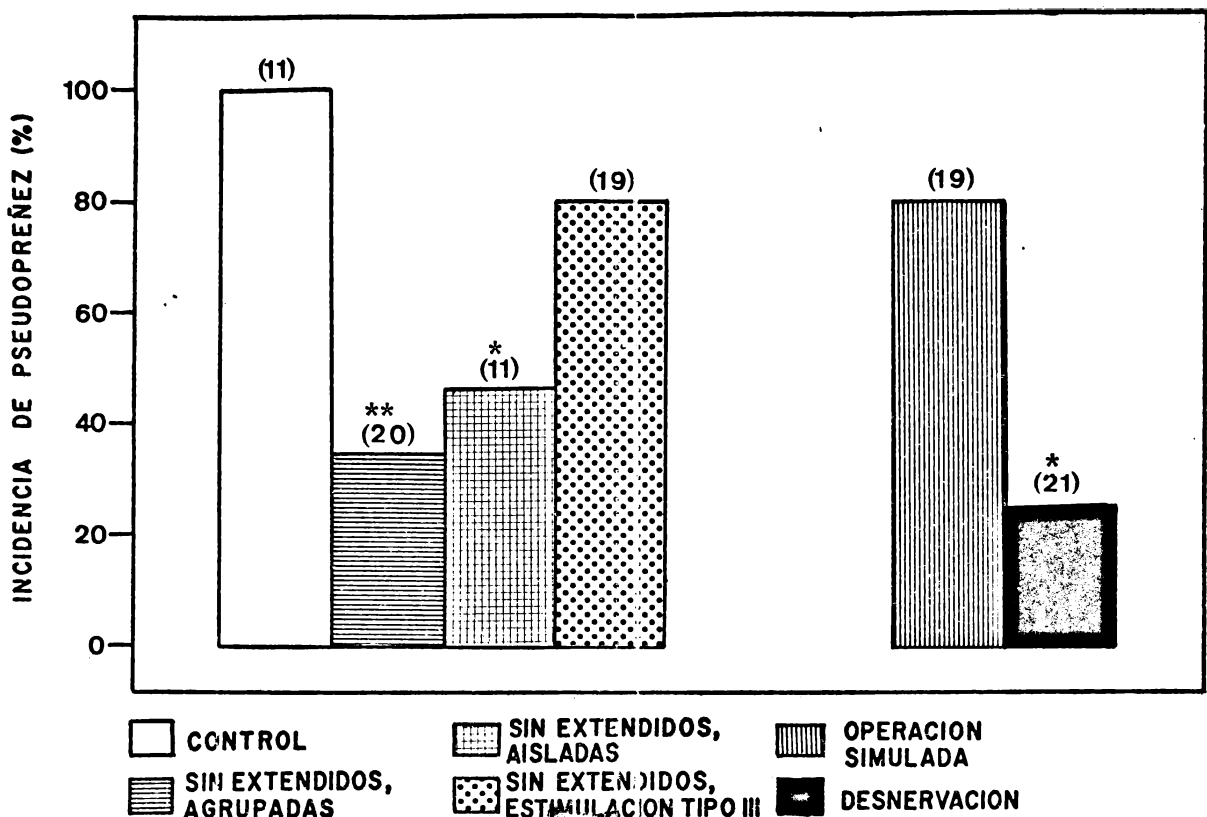


Figura 4.5.- Efecto de la toma del extendido vaginal, estimulación perineal y desnervación perineal sobre la incidencia de pseudopreñez luego de la administración de Pg (10 mg en estro). Si no se indica lo contrario, las ratas se ubicaron en jaulas colectivas (7 a 8 en cada una) y a lo largo del experimento se les tomó -diariamente- el extendido vaginal. Los grupos "sin extendidos" son los que se les extrajo muestra vaginal durante los 5 días posteriores a la inyección de Pg. Las ratas "aisladas" se ubicaron en jaulas individuales durante el experimento. La estimulación perineal (tipo III) fue aplicada diariamente por unos segundos durante los 5 días siguientes al tratamiento con Pg, en ese período no se tomó la muestra vaginal. La desnervación perineal y la operación simulada fueron realizadas de acuerdo con lo comentado en la sección 2.6. (* $P < 0,001$; ** $P < 0,01$ vs. respectivo control, Prueba de Fisher).

Tabla 4.6.- Efecto de la toma del extendido vaginal, estimulación perineal, o denervación perineal sobre la concentración plasmática de progesterona en el día 7 de pseudopreñez (mismo experimento que en la Fig. 4.3.).

Tratamiento	N° de casos	Progesterona plasmática (ng/ml)	
		Mediana	(Límites de Confianza del 95%)
Control (agrupado, con extendido vaginal)	14	64	(53 - 76)
Sin extendido vaginal, agrupado	7	49	(41 - 76) ¹
Sin extendido vaginal, aislado	5	35	(32 - 47) ¹
Sin extendido vaginal, estimulación perineal.	15	34	(28 - 63) ¹
Operación simulada (agrupado, con extendido vaginal)	14	56	(46 - 67)
Denervación perineal (agrupado, con extendido vaginal)	3	49	(29 - 56) ²

¹ Diferencias no significativas vs grupo control (análisis de varianza de una clasificación por rangos de / Kruskal-Wallis)..

² Diferencias no significativas vs grupo control con operación simulada (prueba U de Mann-Whitney).

4.1.5.- DISCUSION SOBRE LA INDUCCION DE PSEUDOPREÑEZ POR PROGESTERONA.

Estudios previos han señalado la importancia de la estimulación intravaginal (19, 44) y de la integridad de las aferencias del nervio pélvico (39, 153) para la inducción de pseudoreñez. Los resultados presentados por nosotros indican la presencia de un sistema aferente secundario, el del nervio pudendo, el que se activa en la rata tratada con Pg.

Nuestros resultados sobre la variación del efecto de la Pg en función del momento del ciclo estral y de la dosis concuerdan en general con lo observado por Alloiteau & Vignal (9), Everett (79), Rothchild & Schubert (225) y de Greef & Zeilmaker (62), aunque estan parcialmente en desacuerdo con los datos publicados por Murakami et al. (187). Estos últimos autores encuentran un único y corto período de sensibilidad a la Pg entre las 07.00 y 10.00 hs del estro, y solamente observan pseudopreñeces tras la inyección de 10 mg de Pg.

Alloiteau & Vignal (9) sugirieron la posibilidad de que la acción de la Pg sobre la pseudopreñez, estuviera asociada al efecto depresor de esta hormona sobre el sistema nervioso. Sin embargo, cuando los animales fueron administrados con 10 mg de Pg i.p., se observó una clara disociación entre el efecto anestésico y la inducción de la

fase lútea.

La principal acción de la Pg fue la de incrementar la sensibilidad a la estimulación del área sensorial del nervio pudendo, ya que esta respuesta fue suprimida en los animales desnervados. Este efecto de la Pg exógena puede indicar un papel fisiológico de esta hormona modulando la reactividad del reflejo de pseudoreñez en el animal no tratado. La mayor descarga de PRL que se obtiene después del pico de Pg del proestro, también sugiere esta posibilidad (47). Los resultados presentados en la Fig. 4.4 muestran como la inyección de Pg en la mañana del proestro adelanta el período de máxima sensibilidad, que en la rata no tratada se produce en la noche del proestro (45). Todo esto nos permite suponer que el aumento del nivel de Pg durante la tarde del proestro (32) tenga una importante participación en determinar la mayor sensibilidad al estímulo del coito durante el período de receptividad sexual de la hembra.

4.2.- FACILITACION DE LA INDUCCION DE PSEUDOPREÑEZ POR ADMINISTRACION DE HORMONA LIBERADORA DE HORMONA LUTEINIZANTE.

La descarga de oxitocina (218), PRL (47), FSH y TSH (48) en respuesta a la estimulación cervicovaginal varía durante el ciclo estral. La ovariectomía inhibe la

descarga de MSH que se induce luego de la estimulación cervicovaginal (253), la administración de estrógenos facilita la ovulación en respuesta a la estimulación vaginal (229) y la Pg facilita la inducción de pseudopreñez (de acuerdo con lo presentado en la Fig. 4.4). También se encontró que una continua secreción de Pg es indispensable para que ocurran los picos de PRL y MSH luego de la estimulación cervicovaginal (61, 66, 186, 253, 267).

En base a los antecedentes arriba citados, Castro-Vazquez et al. (45) estudiaron los cambios periovulatorios de la respuesta de pseudopreñez. Se observaron variaciones en la incidencia de pseudopreñez en relación con cambios en la actividad secretoria del ovario. La mayor sensibilidad para la inducción de pseudopreñez se encontró en el grupo de animales estimulados durante la noche del proestro (luego de la descarga preovulatoria de las gonadotrofinas hipofisarias). Trabajos previos (comentados en la sección 1.3) han señalado que, en la rata hembra cíclica, la descarga preovulatoria de gonadotrofinas está relacionada con la aparición de la conducta de receptividad sexual. También fue sugerida una participación de la LHRH (responsable del incremento de las gonadotrofinas preovulatorias) en el desencadenamiento de la conducta de receptividad sexual (183, 203). Todo esto nos despertó el interés por explorar si la LHRH cumple algún papel modulador del reflejo de pseudopreñez.

4.2.1.- EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE HORMONA LIBERADORA DE HORMONA LUTEINIZANTE SOBRE LA RESPUESTA DE PSEUDOPREÑEZ.

Dado que la máxima sensibilidad al estímulo cervicovaginal había sido encontrada a las 23.00 hs del proestro (45), alrededor de 8 horas después del comienzo del "período crítico" para la descarga de LH (82), decidimos intentar avanzar este período de máxima sensibilidad por la administración -antes del inicio del "período crítico"- de LHRH, LH o FSH.

En un primer experimento se administró 500 ng de LHRH o su vehículo, al medio día del proestro (3 horas antes del inicio del "período crítico", que en nuestra colonia es a las 15.00 hs) y diferentes penetraciones intravaginales (estimulación tipo I) fueron aplicadas 8 horas más tarde de la inyección del péptido (i.e.: 20.00 hs). La frecuencia de la respuesta entre ambos grupos aparece graficada en la Fig. 4.7. Los animales tratados con vehículo mostraron una curva con dos componentes, uno ascendente hasta los 21 mm de penetración y otro descendente entre 21 y 24 mm. Este tipo de curva de respuesta es característico de las estimulaciones en proestro, ya que en otras etapas del ciclo sólo aparece el primer componente (45). Pero, en los animales tratados con LHRH, se produce una facilitación de la respuesta tanto en el primero como en el segundo componente; siendo la curva resultante de un solo

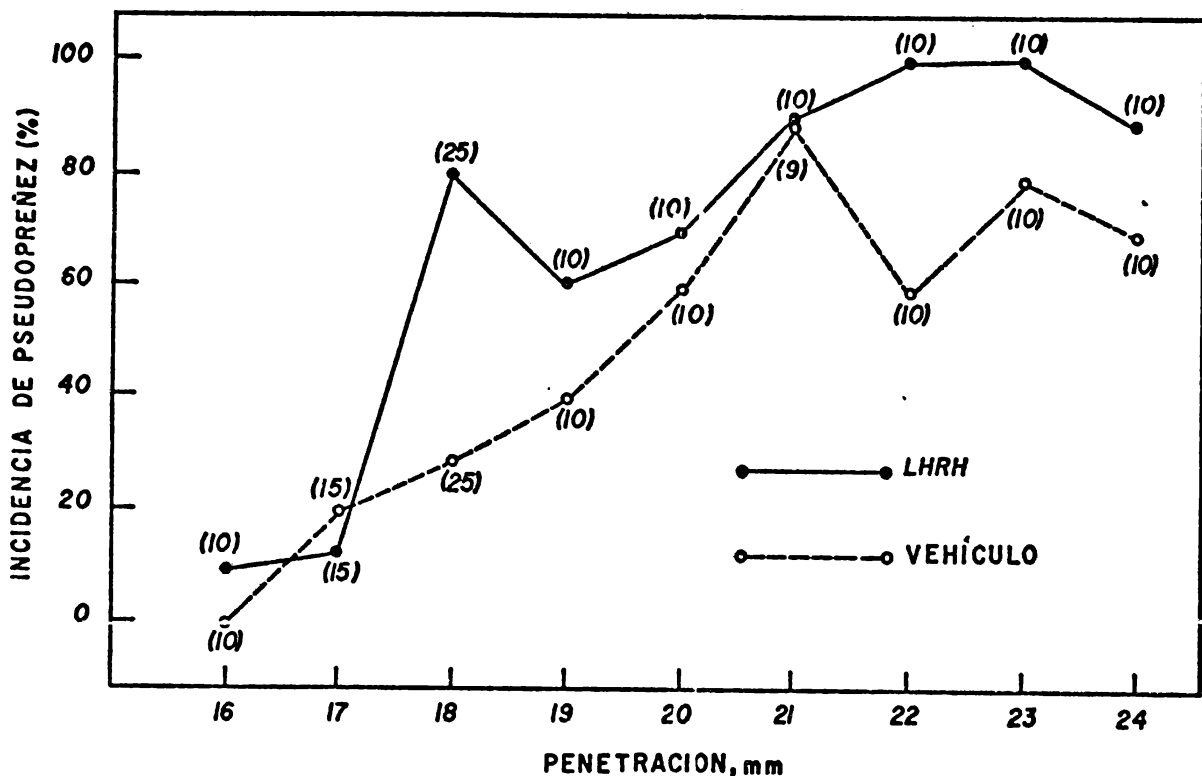


Figura 4.7.- Resultado de la administración de hormona liberadora de hormona luteinizante (círculos oscuros) o su vehículo (círculos blancos) sobre la respuesta de pseudopreñez en grupos de animales con distintas penetraciones intravaginales. Los 500 ng de LHRH se inyectaron al medio día del proestro y la estimulación vaginal (tipo I) se realizó 8 hs después (i.e.: 20.00 hs). La curva de los animales tratados con el péptido mostró una facilitación de la respuesta en relación a la del control ($P= 0,006$; Prueba de aleatorización).

componente y significativamente distinta de la del grupo control ($P= 0,006$, Prueba de aleatorización para pares igualados de acuerdo con la magnitud del estímulo). El efecto más pronunciado del péptido ocurrió con las penetraciones de 18 y 22 mm; por el contrario, no se observaron efectos con bajas penetraciones (16-17 mm) ni en el punto que divide ambos componentes de la curva control (21 mm).

En un segundo experimento se inyectaron diferentes dosis de LHRH (0; 50; 150; 250; 500; 750; 1000 ng) o su vehículo (12.00 hs del proestro) y una sola penetración intravaginal (estimulación tipo I, 18 mm) fue aplicada 8 horas más tarde. Un claro incremento en la incidencia de pseudopreñez se observó en los grupos inyectados con 250 y 500 ng del péptido ($P<0,05$, Prueba de Fisher; Fig. 4.8). La administración de 50 y 150 ng de LHRH no fueron efectivas, mientras que 750 y 1000 ng tendieron a ser menos efectivas que 500 ng.

La acción facilitatoria de la LHRH fue ejercida sobre la respuesta a la estimulación cervicovaginal más que por un efecto directo del péptido sobre la inducción de pseudopreñez. Esta conclusión surge por la ausencia de respuesta de pseudopreñez (0%) en un grupo de 10 ratas inyectadas con 500 ng de LHRH y sin estimulación cervicovaginal.

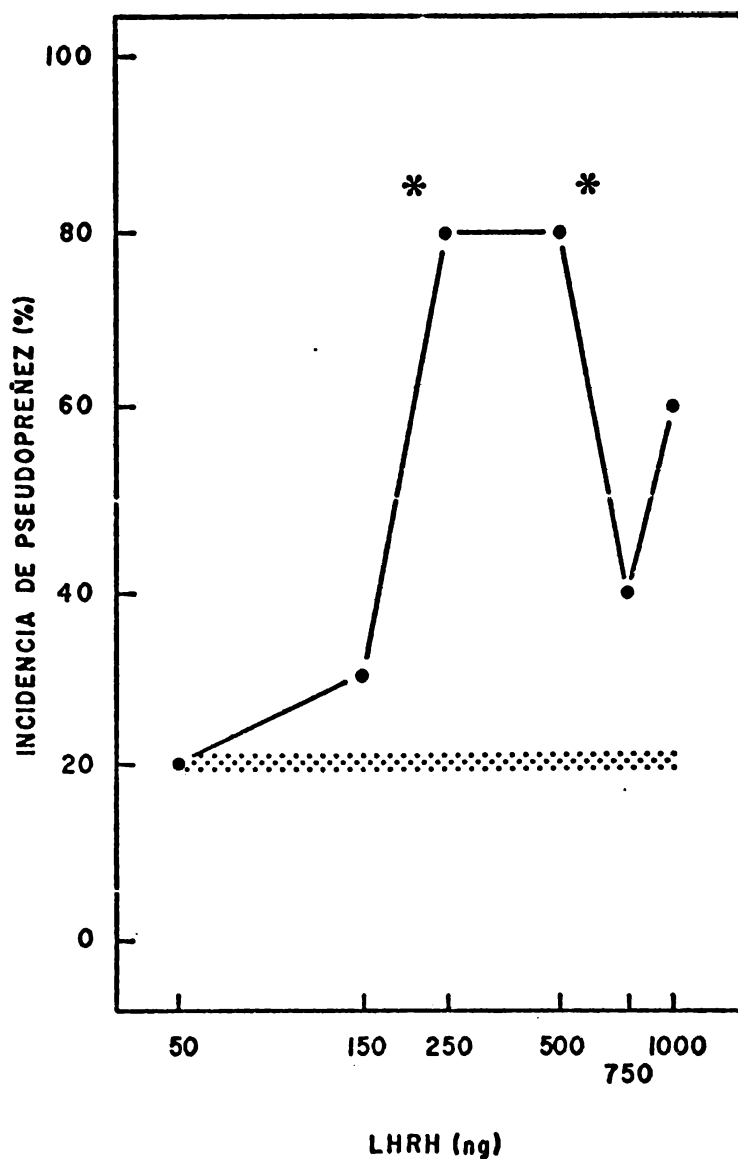


Figura 4.8.- Modificaciones de la respuesta de pseudopreñez a 18 mm de penetración vaginal (estimulación tipo I, 20.00 hs del proestro) luego de administrar diferentes dosis de hormona liberadora de hormona luteinizante o su vehículo (12.00 hs del proestro). La banda punteada indica la incidencia de pseudopreñez en el grupo control. Todos los grupos fueron de 10 animales cada uno. Los asteriscos in indican diferencia estadísticamente significativa vs. control ($P < 0,05$; Prueba de Fisher).

La acción de la LHRH tampoco fue asociada con un incremento en el número de nuevos cuerpos lúteos, ya que el número de ovocitos descargados en cada ciclo no fue modificado por la administración de la LHRH en hembras con estímulo cervicovaginal (vehículo: 10,0 2,5; LHRH: 9,8 1,1, Prueba de Student; Fig. 4.9). Además, de acuerdo con lo presentado en la Tabla 4.10, tampoco hay diferencias entre los niveles circulantes de Pg en las pseudopreñeces del grupo tratado con LHRH o con vehículo.

4.2.2.- EFECTO DE LA ADMINISTRACION DE LH Y FSH SOBRE LA RESPUESTA DE PSEUDOPREÑEZ.

Para verificar si la acción facilitadora de la LHRH era ejercida a través de su acción liberadora de las gonadotrofinas hipofisarias, realizamos una serie de grupos experimentales a los que administramos diferentes dosis de LH y/o FSH.

Las ratas fueron inyectadas a las 12.30 hs del proestro con vehículo o con una sola dosis de LH (2,2; 11; 44 mU), FSH (3,7; 11; 33 mU) o una combinación de ambas gonadotrofinas (se combinó cada dosis de FSH con 11 mU de LH). Todos los animales fueron estimulados (tipo I) con 18 mm de penetración a las 20.00 hs del día del tratamiento.

No se encontró ninguna facilitación luego de la administración de las diferentes dosis de LH y FSH (Tabla

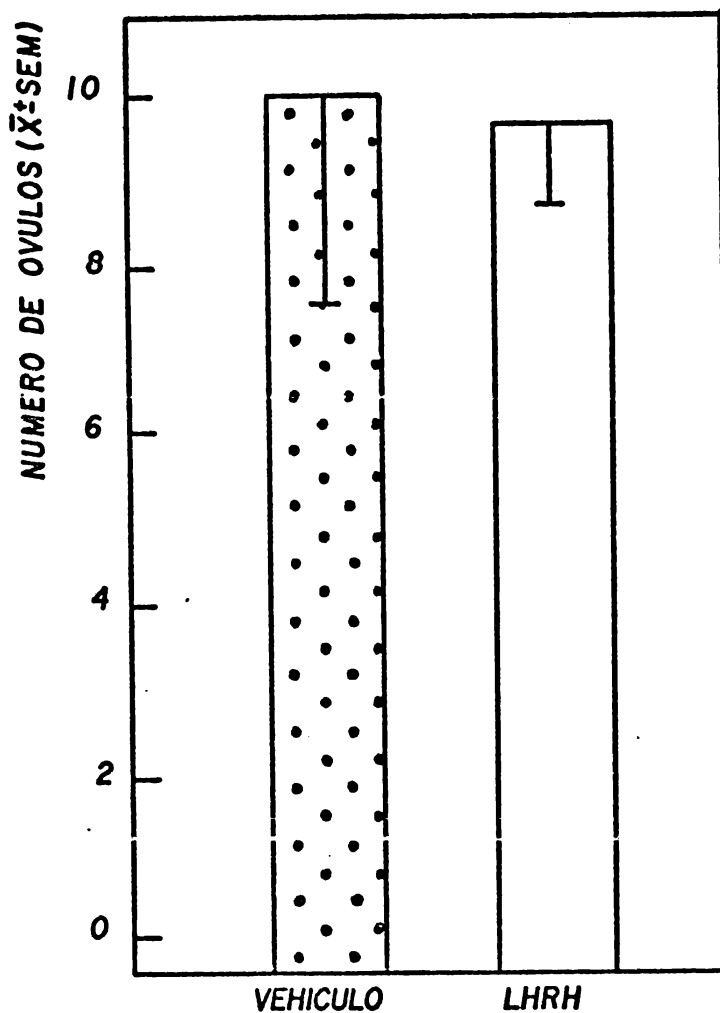


Figura 4.9..- Representación gráfica del número de óvulos recuperados del oviducto en la mañana del estro, en dos grupos de ratas inyectadas con 500 ng de hormona liberadora de hormona luteinizante o su vehículo (12.00 hs del proestro), y 18 mm de penetración vaginal (tipo I, 20.00 hs del proestro).

Tabla 4.10.- Niveles de progesterona plasmática en el día 7 de pseudo-preñez en animales tratados con hormona liberadora de hormona luteinizante (500 ng, 12.00 hs del proestro) o su vehículo y dos penetraciones intravaginales (tipo I, 20.00 hs del proestro).

PENETRACION (mm)	PROGESTERONA (ng/ml; $\bar{X} \pm$ S.E.M.)	
	VEHICULO	LHRH
18	44±8	40±6
22	41±7	41±4

4.11). Las dosis más altas de las gonadotropinas mostraron una tendencia inhibitoria en la inducción de pseudopreñez; y esta tendencia alcanza significación estadística luego de la administración de LH ($P < 0,05$, Prueba de Fisher; Tabla 4.11). Tampoco la dosis de 11 mU de LH, cuya actividad ovulatoria se aproximó a la de 500 ng de LHRH en ratas bloqueadas con pentobarbital sódico (Fig. 4.12), presentó una acción facilitadora luego de combinarla con las diferentes dosis de FSH.

4.2.3.- DISCUSION SOBRE EL EFECTO FACILITADOR DE LA INDUCCION DE PSEUDOPREÑEZ POR ADMINISTRACION DE HORMONA LIBERADORA DE HORMONA LUTEINIZANTE.

De acuerdo con los resultados presentados podemos concluir que la LHRH cumple un papel modulador de la reactividad del reflejo de pseudopreñez, y que esta acción no es ejercida a través de la descarga de las gonadotropinas hipofisarias.

Es interesante notar que la máxima sensibilidad para las respuestas inducidas por el coito, frecuencia de lordosis y pseudopreñez, aumentan bruscamente unas horas después de la descarga preovulatoria de la LHRH hipotalámica. Esta asociación temporal llevó a algunos investigadores a estudiar la participación de la LHRH en la modulación de la conducta de receptividad sexual (183,

Tabla 4.11.- La administración de varias dosis de LH, FSH y sus combinaciones no reproducen el efecto facilitador de la inducción de pseudopreñez que produce el LHRH.

LH (mU)	FSH (mU)	Nº de casos	Incidencia de pseudopreñez (%)
-	-	25	28
2,2	-	10	30
11	-	10	30
44	-	15	0*
-	3,7	10	20
-	11	10	10
-	33	10	0
11	3,7	11	18
11	11	10	20
11	33	10	0

Las diferentes dosis de LH y/o FSH fueron administradas a las 12,30 hs del proestro. Todos los animales fueron estimulados (tipo I) con 18 mm a las 20,00 hs. del proestro.

* Diferencia estadísticamente significativa vs grupo control inyectado con vehículo ($P < 0.05$, Prueba de Fisher).

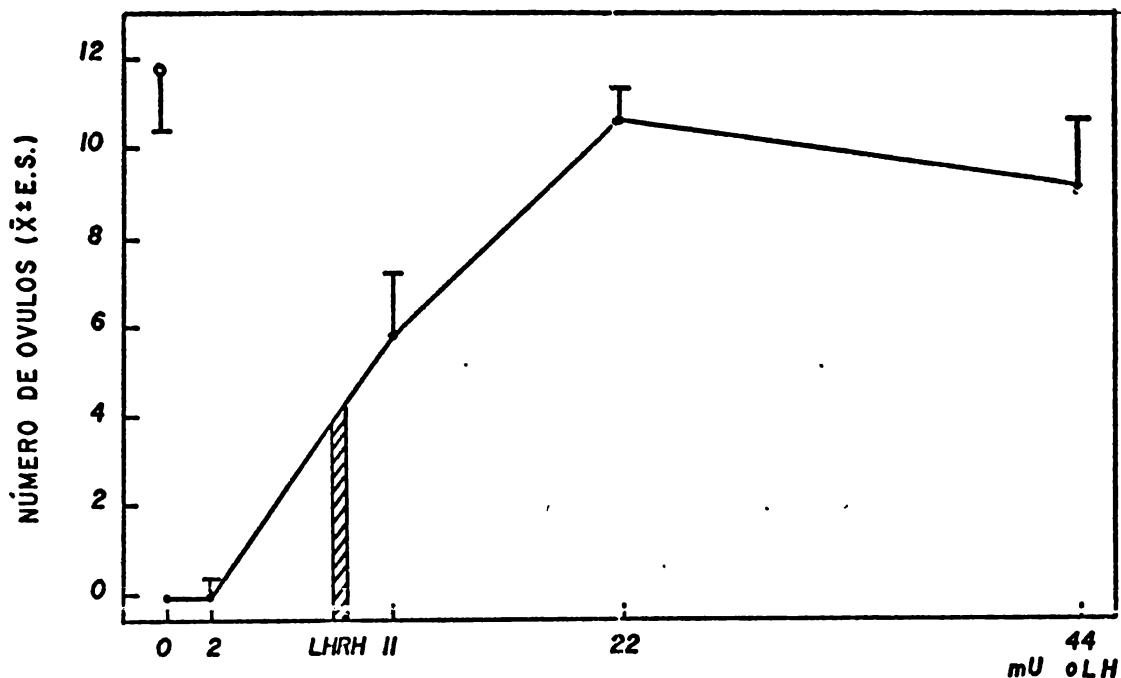


Figura 4.12.- Curva de ovulaciones para valorar la actividad ovulatoria de 500 ng de hormona liberadora de hormona luteinizante, mediante su acción liberadora de LH endógena. Los animales fueron administrados con dosis conocidas de LH exógena (12.30 hs del proestro) y otro grupo con LHRH (12.00 hs del proestro); posteriormente (15.00 hs del mismo proestro) se les inyectó pentobarbital sódico para bloquear la descarga endógena de LH. El círculo blanco corresponde a la media del número de óvulos en el grupo de animales tratados solamente con el vehículo del pentobarbital sódico.

203). Siguiendo esta misma idea intentamos avanzar el período de máxima sensibilidad a la inducción de pseudopreñez luego de la administración de LHRH. Tanto la Fig. 4.6 como la 4.7 muestran una clara facilitación de la respuesta de pseudopreñez. En la Fig. 4.7 se observa como las dosis altas (750 y 1000 ng de LHRH) poseen un menor efecto, aunque sin ser estadísticamente significativo. Este tipo de curva dosis-respuesta con forma de campana ha sido, también, encontrada en algunas respuestas conductuales inducidas por neuropéptidos (148). En nuestro caso podría ser interpretada como una desensibilización del mecanismo reflejo de pseudopreñez al LHRH o por un efecto inhibitorio directo del péptido sobre la función lútea.

La imposibilidad de las gonadotrofinas para reproducir los efectos facilitadores de la LHRH sobre la frecuencia de pseudopreñez o de lordosis (183) indicaría que la acción del péptido sería ejercida fuera de la hipófisis. Para la respuesta de lordosis se ha demostrado que la infusión intraneural de LHRH en el área preóptica, eminencia media y la sustancia gris que rodea al acueducto mesencefálico es efectiva para desencadenar la respuesta (182, 217, 227). Estos resultados, sumados a la inhibición de la respuesta de lordosis después de administrar -dentro del tercer ventrículo- un antisuero anti-LHRH (156), son fuertes pruebas en apoyo de una acción central del LHRH en la conducta de receptividad sexual. También se podría pensar en una acción central para la respuesta de pseudopreñez, ya

que existen coincidencias entre la localización de la LHRH en el SNC y los resultados de la lesión de algunas de estas zonas. En un completo estudio histoquímico (151) se observó una importante concentración de LHRH alrededor del receso preóptico del tercer ventrículo; también se describió un tracto de fibras de LHRH que se inicia en el septum, llega al área preóptica en donde se divide en dos tractos laterobasales y otro mediobasal para todos terminar en la eminencia media. Los experimentos que han lesionado el área preóptica o el hipotálamo anterior resultaron en alteración de la inducción de pseudopreñez (111). Recientemente, Kawakami & Arita (150) han encontrado una inhibición de la descarga de PRL en respuesta a la estimulación cervicovaginal, luego de lesionar la región inmediatamente posterior al receso preóptico por donde pasan las fibras de LHRH. Aunque estos investigadores no han interpretado sus resultados como debidos a la interrupción de las fibras de LHRH, nuestros experimentos permitirían sugerir esta posibilidad como válida.

En contra de una acción de la LHRH administrada periféricamente sobre las estructuras neurales mencionadas, están una serie de investigadores que consideran cuestionable que el péptido atraviese la barrera hematoencefálica. Este mismo problema se ha presentado para otros efectos sobre el sistema nervioso luego de la administración periférica de péptidos (149). Si bien una inyección intracarotidia de LHRH no atravieza la barrera

hematoencefálica (264), es posible que el péptido administrado periféricamente entre al cerebro a través de los órganos circunventriculares (198), en donde la barrera no está presente (277). Por medio de una de estas estructuras, el órgano vasculoso de la lámina terminalis, la LHRH tiene un acceso directo al área preóptica (197), siendo ésta última de gran importancia en el reflejo de pseudopreñez. No obstante, no se puede descartar un efecto de la LHRH fuera de la barrera hematoencefálica, si tenemos presente que se han descrito receptores del péptido en otros tejidos no cerebrales (143).

A modo de resumen de lo comentado hasta aquí podemos decir que: 1) la lesión de áreas del SNC que contienen fibras o terminales con LHRH produce un bloqueo de la respuesta de pseudopreñez en animales estimulados; 2) la descarga de LHRH durante la tarde del proestro es seguida, unas horas más tarde, por la máxima sensibilidad a la inducción de pseudopreñez; 3) la administración de una dosis fisiológica del péptido (a las 12.00 hs del proestro) adelanta el momento de la máxima sensibilidad a la inducción de pseudopreñez, y que este efecto no fue reproducido por la inyección de distintas dosis de LH, FSH o una combinación de ambas.

Finalmente, podemos considerar a la LHRH como una hormona de importancia central en la organización de los mecanismos reproductivos. Su actividad reproductiva se

inicia en los bulbos olfatorios accesorios, en los cuales se ha encontrado inmunoreactividad a la LHRH en las terminales nerviosas, lo que constituye una base morfológica para mediar los efectos endócrinos relacionados con los olores sexuales (20, 204, 279). Esta acción se completaría con la integración temporal entre la descarga ovulatoria de las gonadotropinas, la facilitación de la conducta de receptividad sexual y el mecanismo inductor de la fase lútea. La precisa sincronización de estos eventos neuroendócrinos, son una parte esencial del éxito de la actividad reproductiva.

RESUMEN

En la primera parte de la introducción se discuten aspectos generales de la Neuroendocrinología de la Reproducción. Se analizan, con mayor énfasis, las interacciones neuroendócrinas que ocurren -durante el ciclo estral- en hembras mamíferas, y se describen algunos aspectos del ciclo estral de la rata y de especies de interés zootécnico. Asimismo, se hace una revisión de los estudios previos sobre la fase lútea o pseudopreñez de la rata, y también se remarcan sus similitudes y diferencias con la fase lútea del ciclo estral de distintas especies de interés zootécnico.

La parte experimental está dividida en: "Control neural de la inducción de pseudopreñez", y "Control hormonal de la inducción de pseudopreñez".

Control Neural de la Inducción de Pseudopreñez

Para estudiar la participación de las influencias neurales en la inducción de la fase lútea de la rata, realizamos lesiones en zonas determinadas del sistema nervioso. La interrupción de las aferencias del sistema límbico al área preóptica, por la sección del techo del área preóptica, facilitó la respuesta de pseudopreñez. Esta facilitación se observó tanto por la inducción de pseudopreñeces espontáneas (alrededor del 100%) a repetición durante el mes y medio postoperatorio, como por un descenso del umbral a la estimulación cervicovaginal de intensidad graduada. A un grupo de animales con sección del techo del área preóptica se les realizó -además- la sección del nervio pudiendo o la operación simulada. La facilitación de la respuesta de pseudopreñez, ya sea espontánea o luego de la estimulación cervicovaginal, no fue diferente entre ambos grupos.

Dado que la sección del techo del área preóptica interrumpe, entre otras, las aferencias desde los núcleos del septum se lesionó únicamente esta zona. Esta lesión a diferencia de la anterior, no produjo una alta incidencia de pseudopreñeces espontáneas (solamente 15%) durante el primer mes y medio postoperatorio. Tampoco se modificó el umbral para la respuesta de pseudopreñez a la estimulación cervicovaginal entre los animales con lesión del septum y los controles con operación simulada. Una prueba piloto limitada a tres animales, en los cuales se lesionó el fornix (vía que lleva al área preóptica las aferencias del hipocampo), mostró una respuesta normal a la estimulación cervicovaginal.

Como conclusión de los resultados obtenidos luego de las lesiones en el sistema nervioso central podemos decir que: a) la sección del techo del área preóptica induce pseudopreñeces espontáneas y facilita la respuesta a la estimulación cervicovaginal; b) esta facilitación, por sección del techo del área preóptica, no sería debida a una modificación en la sensibilidad de la región perineal; c) la lesión de los núcleos del septum no modifica la respuesta de pseudopreñez; d) se podría especular que la facilitación de la respuesta de pseudopreñez producida por la sección del techo del área preóptica sería el resultado de interrumpir las aferencias de los núcleos de la amígdala.

Control Hormonal de la Inducción de Pseudopreñez

1) Efecto de la administración de progesterona (Pg) sobre la inducción de pseudopreñez

Se estudiaron los mecanismos sensoriales que participan en la inducción de pseudopreñez luego de una inyección de Pg. Salvo cuando no se indica lo contrario, las ratas se alojaron en jaulas colectivas (7 a 8 en cada una) y los extendidos vaginales fueron tomados diariamente. La inyección de 10 mg de Pg, a ratas

en diferentes estadios del ciclo estral, indujo pseudopreñez solamente cuando la Pg se administró en estro (73%) o en proestro (30%). Con dosis menores de Pg, la respuesta de pseudopreñez descendió considerablemente.

A grupos de ratas en proestro se les inyectó 5 mg de Pg a las 10.00 hs y a las 20.00 hs del mismo día, se les realizó la estimulación cervicovaginal con diferentes penetraciones intravaginales. Los animales inyectados con Pg mostraron una facilitación de la respuesta al estímulo cervicovaginal, aún cuando esta dosis de Pg no fue significativamente efectiva en inducir pseudopreñez en ratas no estimuladas. Sin embargo, con la simple aplicación del tope del estimulador (penetración 0 mm) sobre la región perineal se indujo una significativa incidencia de pseudopreñez en las ratas tratadas con Pg. Esto último fue un indicio de la participación del esteroide en la sensibilidad perineal.

El efecto inductor de pseudopreñez luego de la administración de 10 mg de Pg, en animales sin estimulación cervicovaginal, fue inhibido cuando durante los 5 días post-tratamiento no se realizó la toma del extendido vaginal. Esta inhibición de la respuesta de pseudopreñez no fue mayor cuando a los animales, además de no tomarles la muestra vaginal, se les ubicó en jaulas individuales durante el experimento. El porcentaje normal de inducción de pseudopreñez fue recuperado en un grupo de ratas que, durante el período en que no se les tomó la muestra vaginal, se realizó -diariamente- una fricción de la región perineal con el pulpejo del dedo índice. Finalmente, la respuesta a la inyección de Pg fue claramente disminuída cuando se seccionó el nervio pudiendo antes del tratamiento.

Cuando se determinaron los valores plasmáticos de Pg en las pseudopreñeces inducidas por inyección de Pg exógena o por otros procedimientos experimentales, nunca se observaron diferencias respecto de sus grupos control.

A modo de conclusión podemos decir que: a) la Pg induce pseudopreñez cuando se administra en estro o en proestro, siendo mayor la incidencia en el primero; b) hay una relación dosis-respuesta, al disminuir la dosis de Pg desciende rápidamente la respuesta; c) la administración de una baja dosis de Pg facilita la respuesta a la estimulación cervicovaginal; d) la inducción de pseudopreñez por inyección de Pg se debería a una modificación de la sensibilidad a la estimulación perineal, lo que suiere que el nervio pudendo sería una vía sensorial aferente accesoria en la inducción de la fase lútea de la rata.

2) Efecto de la administración de hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) sobre la inducción de pseudopreñez.

La máxima sensibilidad para la inducción de pseudopreñez luego de la estimulación cervicovaginal, ocurre a las 23.00 hs del día del proestro, alrededor de 8 hs después del comienzo del "período crítico" para la descarga de LH (82). Por medio de la administración previa de LHRH, LH y/o FSH se intentó modificar la sensibilidad a la estimulación cervicovaginal.

Se administró 500 ng de LHRH o su vehículo al medio día del proestro (3 hs antes del inicio del "período crítico" en nuestra colonia) y diferentes penetraciones intravaginales fueron aplicadas a las 20.00 hs del mismo día. Los grupos inyectados con el péptido mostraron una facilitación de la inducción de pseudopreñez, aunque el efecto más pronunciado ocurrió con las penetraciones de 18 y 22 mm. En otro experimento utilizamos 18 mm de penetración intravaginal pero se administraron distintas dosis de LHRH o su vehículo. Una clara facilitación se obtuvo con las dosis de 250 y 500 ng, las dosis de 50 y 150 ng no fueron efectivas, mientras que 750 y 1000 ng tendieron a ser menos efectivas que 500 ng.

Una dosis del péptido (500 ng) fue inefectiva para inducir pseudopreñez en ratas que no habían recibido estimulación cervicovaginal, lo que indica que la acción de la LHRH es a través de una facilitación de la respuesta a la estimulación cervico-

vaginal. Esta misma dosis de LHRH no modificó el número de cuerpos lúteos funcionales en hembras con estimulación cervicovaginal; esto último fue confirmado por medio de la determinación de los niveles plasmáticos de Pg y por conteo del número de ovocitos liberados. La administración (a las 12.30 hs del proestro) de diferentes dosis de LH y FSH o la combinación de ambas, no fue capaz de reproducir la facilitación demostrada luego de la inyección de LHRH.

Los resultados presentados nos permiten concluir que la LHRH podría cumplir -en el sistema nervioso- un papel modulador de la inducción de la fase lútea en la rata, además de su papel ya conocido en la ovulación y la conducta sexual. El análisis de la participación de este péptido en estas distintas etapas de la reproducción nos permite sugerir un papel fundamental de la LHRH en la sincronización precisa de los eventos neuroendócrinos y conductuales indispensables para el éxito del proceso reproductivo.

BIBLIOGRAFIA.

- 1) Abel, M. H. & D. T. Baird (1980): The effect of 17 β -estradiol and progesterone on prostaglandin production by human endometrium maintained in organ culture. *Endocrinology* 106: 1599.
- 2) Abraham, G. E.; R. Swerdloff; C. Tulchinsky & W. Odell (1971): Radioimmunoassay of progesterone. *J. Clin. Endocr. Metab.* 32: 619.
- 3) Adams, T. E.; J. E. Kinder; T. K. Chakraborty; V. L. Estergreen & J. J. Reeves (1975): Ewe luteal function influenced by pulsatile administration of synthetic LHRH/FSHRH. *Endocrinology* 97: 1460.
- 4) Aiyer, M. S.; S. A. Chiappa & G. Fink (1974): A priming effect of luteinizing hormone releasing factor on the anterior pituitary gland in the female rat. *J. Endocr.* 62: 573.
- 5) Aiyer, M. S.; M. C. Sood & K. Erown-Grant (1976): The pituitary response to exogenous luteinizing hormone releasing factor in steroid-treated gonadectomized rats. *J. Endocr.* 69: 255.
- 6) Alonso, N. & R. P. Deis (1973): Hypophyseal and serum concentration of prolactin in the rat after vaginal stimulation. *Neuroendocrinology* 13: 63.
- 7) Alloiteau, J. J. (1957): Pseudogestation por injection unique d'oestradiol non sterifie chez la Ratte. *C. R. Acad. Sci. [D] (Paris)* 244: 946.
- 8) Alloiteau, J. J. (1962): Le controle hypothalamique de l'adenohypophyse. III Regulation de la fonction gonadotrope femelle. *Activite LTH. Biol. Med.* 51: 250.
- 9) Alloiteau, J. J. & A. Vignal (1958): Pseudogestation apres injection de progesterone chez la Ratte. *C. R. Acad. Sci. [D] (Paris)* 246: 2804.
- 10) Amoroso, E. C. & J. S. Perry (1977): Ovarian activity during gestation. In: *The ovary, Vol. II. L. Zuckerman & B. J. Weir (eds.). Academic Press, New York: 315.*
- 11) Arai, Y. (1969): Effect of hypothalamic de-afferentation on induction of pseudopregnancy by vaginal-cervical stimulation in the rat. *J. Reprod. Fert.* 19: 573.

- 12) Asdell, S. A. (1946): Patterns of Mammalian Reproduction. Comstock Publishing Company, Ithaca-New York.
- 13) Astwood, E. B. (1941): The regulation of corpus luteum function by hypophysial luteotrophin. *Endocrinology* 28: 309.
- 14) Baird, D. T. (1978): Pulsatile secretion of LH and ovarian estradiol during the follicular phase of the sheep estrous cycle. *Biol. Reprod.* 18: 359.
- 15) Baird, D. T. (1978): Local utero-ovarian relationships. In: Control of Ovulation. D. B. Crighton, N. B. Haynes, G. R. Foxcroft & G. E. Lamming (eds.). Butterworths, London-Boston: 217.
- 16) Baird, D. T.; I. Swanston & R. J. Scaramuzzi (1976): Pulsatile release of LH and secretion of ovarian steroids in sheep during the luteal phase of the estrous cycle. *Endocrinology* 98: 1490.
- 17) Ball, J. (1934): Demonstration of quantitative relation between stimulus and response in pseudopregnancy in rat. *Am. J. Physiol.* 107: 698.
- 18) Barraclough, C. A. (1966). Modifications in the CNS regulation of reproduction after exposure of prepuberal rats to steroid hormones. *Recent Progr. Hormone Res.* 22: 503.
- 19) Baumgardner, D. J. & D. A. Dewsbury (1980): Pseudopregnancy in female rats: effects of hormonal manipulations of the male. *Physiol. Behav.* 24: 693.
- 20) Beltramino, C. & S. Taleisnik (1979): Effect of electrochemical stimulation in the olfactory bulbs on the release of gonadotropin hormones in rats. *Neuroendocrinology* 28: 320.
- 21) Bernard, C. (1855): Sur le mecanisme de la formation du sucre dans le foie. *C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris* 41: 461.
- 22) Bethea, C. L. & J. D. Neill (1979): Prolactin secretion after cervical stimulation of rats maintained in constant dark or constant light. *Endocrinology* 104: 870.
- 23) Bethea, C. L. & J. D. Neill (1980): Lesions of the suprachiasmatic nuclei abolish the cervically stimulated prolactin surges in the rat. *Endocrinology* 107: 1.
- 24) Berthold, A. A. (1849): Transplantation der Hoden.

Arch. Anat. Physiol. wiss. Med. 16: 42.

- 25) Bishop, W.; R. Orias; C. P. Fawcett; L. Krulich & S. M. McCann (1971): Plasma gonadotrophin and prolactin in pseudopregnancy in the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137: 1411.
- 26) Blake, C. A. (1976): A detailed characterization of the proestrous luteinizing hormone surge. Endocrinology 98: 445.
- 27) Bloch, S. & E. Flury (1959): Untersuchungen uber Klimakterium und Menopause an Albino-Ratten. II Mitteilung. Gynaecologia 147: 414.
- 28) Bogdanove, E. M. (1966): Preservation of functional corpora lutea in the rat by estrogen treatment. Endocrinology 79: 1011.
- 29) Brazeau, P.; J. Rivier; W. Vale & R. Guillemin (1974): Inhibition of growth hormone secretion in the rat by synthetic somatostatin. Endocrinology 94: 184.
- 30) Bruce, H. M. (1961): Observations on the suckling stimulus and lactation in the rat. J. Reprod. Fert. 2: 17.
- 31) Burgus, R.; T. F. Dunn; D. Desiderio & R. Guillemin (1969): Structure moleculaire du facteur hypothalamique hypophysiotrope TRF d'origine ovine: evidence par spectrometrie de masse de la sequence PCA-His-Pro-NH₂. C. R. Acad. Sci. [D] (Paris) 269: 1870.
- 32) Butcher, R. L.; W. E. Collins & N. W. Fugo (1974): Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone, and estradiol-17B during the 4-day estrous cycle of the rat. Endocrinology 94: 1704.
- 33) Butcher, R. L.; N. W. Fugo & W. E. Collins (1972): Semicircadian rhythm in plasma levels of prolactin during early gestation in the rat. Endocrinology 90: 1125.
- 34) Butcher, R. L. & R. D. Page (1981): Role of aging ovary in cessation of reproduction. In: Dynamics of Ovarian Function. N. B. Schwartz & M. Hunzicker-Dunn (eds.). Raven Press, New York: 253.
- 35) Caceres, A. & S. Taleisnik (1981): Pathways by which stimuli originating in the cingulate cortex inhibiting LH secretion reach the hypothalamus. Neuroendocrinology 32: 317.
- 36) Cahill, L. P.; J. Saumande; J. P. Ravault; M.

- Blanc, J. Thimonier; J. C. Mariana & P. Mauleon (1981): Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. *J. Reprod. Fert.* 62: 141.
- 37) Caligaris, L.; J. J. Astrada & S. Taleisnik (1967): Pituitary FSH concentrations in the rat during the estrous cycle. *Endocrinology* 81: 1261.
- 38) Caligaris, L.; J. J. Astrada & S. Taleisnik (1971): Release of luteinizing hormone induced by estrogen injection into ovariectomized rats. *Endocrinology* 88: 810.
- 39) Carlson, R. R. & V. J. DeFeo (1965): Role of the pelvic nerve vs. the abdominal sympathetic nerves in the reproductive function of the female rat. *Endocrinology* 77: 1014.
- 40) Carlson, J. C.; N. Kazama & W. Hansel (1971): Effect of LH on peripheral progesterone concentrations in intact and hysterectomized heifers. *Endocrinology* 89: 1530.
- 41) Carrer, H. F. & S. Taleisnik (1970): Induction and maintenance of pseudopregnancy after interruption of preoptic hypothalamic connections. *Endocrinology* 86: 231.
- 42) Castro-Vazquez, A. (1981): The dawn of Neuroendocrinology: conquests and heroes. *Acta Physiol. L. A.* 31: 151.
- 43) Castro-Vazquez, A. & B. Carreno (1978): Efecto de la gangliectomia cervical superior (GCSX) sobre el reflejo de pseudoprenex en la rata. VII Congreso Argentino de Biología, Resumen: 2.
- 44) Castro-Vazquez, A. & Carreno (1981): A study of the sensory requirements for eliciting the pseudopregnancy response. *Brain Res.* 230: 205.
- 45) Castro-Vazquez, A.; E. H. Luque & B. Carreno (1982): The pseudopregnancy response: control by sensory inputs, ovarian steroids and luteinizing hormone-releasing hormone. International Conference on Integrative Neurohumoral Mechanisms, Budapest, Hungary.
- 46) Castro-Vazquez, A. & S. M. McCann (1975): Cyclic variations in the increased responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) induced by LHRH. *Endocrinology* 97: 13.
- 47) Castro-Vazquez, A. & S. M. McCann (1979): Cyclic changes in the reflex release of prolactin following

- cervicovaginal stimulation. *Neuroendocrinology* 28: 3.
- 48) Castro-Vazquez, A.; S. R. Ojeda; L. Krulich & S. M. McCann (1981): TSH release during the estrous cycle of the rat: variations in responsiveness to cervicovaginal stimulation. *Neuroendocrinology* 33: 193.
- 49) Celis, M. E.; S. Taleisnik & R. Walter (1971): Regulation of formation and proposed structure of the factor inhibiting the release of melanocyte-stimulating hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 1428.
- 50) Clemens, J. A.; E. B. Smalstig & B. D. Sawyer (1976): Studies on the role of the preoptic area in the control of reproductive function in the rat. *Endocrinology* 99: 728.
- 51) Crighton, D. B. & J. F. Foster (1977): Luteinizing hormone release after two injections of synthetic luteinizing hormone releasing hormone in the ewe. *J. Endocr.* 72: 59.
- 52) Cropper, M.; M. El-Fouly; B. Cook & A. V. Naibandov (1970): Corpus luteum formation of ovariectomized follicles treated with LH. *Endocrine Soc. Meeting, 52nd, Abstr., St. Louis Mo.*: 80.
- 53) Cumming, I. A. (1975): The ovine and bovine oestrous cycle. *J. Reprod. Fert.* 43: 583.
- 54) Cumming, I. A.; J. M. Buckmaster; M. A. De Blockey; J. R. Coding; C. G. Winfield & R. W. Baxter (1973): Constancy of interval between luteinizing hormone release and ovulation in the ewe. *Biol. Reprod.* 9: 24.
- 55) Channing, C. P. (1969): The use of tissue culture of granulosa cells as a method of studying the mechanism of luteinization. In: *The Gonads*. K. W. McKerns (ed.). Appleton, New York: 245.
- 56) Channing, C. P. & J. F. Seymour (1970): Effects of dibutyryl cyclic-3',5'-AMP and other agents upon luteinization of porcine granulosa cells in culture. *Endocrinology* 87: 165.
- 57) Dees, W. L. & N. H. McArthur (1981): Immunohistochemical localization of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the bovine hypothalamus and infundibulum. *Anat. Rec.* 200: 281.
- 58) Dees, W. L.; A. M. Sorensen; W. M. Kemp & N. H. McArthur (1981): GnRH-localization in the equine

- brain and infundibulum: An immunohistochemical study. *Brain Res.* 208: 123.
- 59) Dees, W. L.; A. M. Sorensen; W. M. Kemp & N. H. McArthur (1981): Immunohistochemical localization of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the brain and infundibulum of sheep. *Cell Tissue Res.* 215: 181.
- 60) de Greef, W. J. & G. H. Zeilmaker (1974): Blood progesterone levels in pseudo-pregnant rats: effects of partial removal of luteal tissue. *Endocrinology* 95: 565.
- 61) de Greef, W. J. & G. H. Zeilmaker (1978): Regulation of prolactin secretion during the luteal phase in the rat. *Endocrinology* 102: 1190.
- 62) de Greef, W. J. & G. H. Zeilmaker (1979): Serum prolactin concentrations during hormonally induced pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 105: 195.
- 63) de Groot, J. (1959): The rat forebrain in stereotaxic coordinates. N. V. Noord-Hollandsche Uitgeeves Maatschoppij, Amsterdam.
- 64) Deis, R. P. & N. A. Alonso (1971): Serum prolactin levels in pseudopregnant rats. XXV International Congress of Physiological Sciences, Munich: 134.
- 65) Deis, R. P. & N. A. Alonso (1973): Prolactin release induced by synthetic thyrotropin releasing factor in female rats. *J. Endocr.* 38: 673.
- 66) Deis, R. P.; N. A. Alonso & N. T. Vermouth (1973): Neurohormonal control of prolactin release. *Acta Physiol. L. A.* 23: 485.
- 67) Deis, R. P. & J. Prilusky (1976): Prolactin release induced by suckling in lactating rats after L-DOPA treatment. *J. Reprod. Fert.* 46: 265.
- 68) Denamur, R. (1974): Lutetrophic factors in the sheep. *J. Reprod. Fert.* 38: 251.
- 69) Denamur, R.; J. Martinet & R. V. Short (1973): Pituitary control of the ovine corpus luteum. *J. Reprod. Fert.* 32: 207.
- 70) Dey, F. L. (1941): Changes in ovaries and uteri in guinea pigs with hypothalamic lesions. *Am. J. Anat.* 69: 61.
- 71) Dey, F. L. (1943): Evidence of hypothalamic control of hypophyseal gonadotropic function in the female guinea pig. *Endocrinology* 33: 75.

- 72) El-Flouly, M. A.; B. Cook & A. V. Nalbandov (1970): Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology* 87: 293.
- 73) El-Fouly, M. A.; B. Cook; M. Nekola & A. V. Nalbandov (1970): Role of the ovum in follicular luteinization. *Endocrinology* 87: 288.
- 74) Evans, W. S.; B. J. Boykin; D. L. Kaiser; J. L. C. Borges & M. O. Thorner (1983): Biphasic luteinizing hormone secretion response to gonadotropin-releasing hormone during continuous perfusion of dispersed rat anterior pituitary cells: changes in total release and the phasic components during the estrous cycle. *Endocrinology* 112: 535.
- 75) Evans, M. J. & C. H. G. Irvine (1975): Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrus cycle and early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fert., Suppl.* 23: 193.
- 76) Evans, H. M.; M. E. Simpson; W. R. Lyons & K. Turpeinen (1941): Anterior pituitary hormones which favor the production of traumatic uterine placentomata. *Endocrinology* 28: 933.
- 77) Everett, J. W. (1948): Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat. *Endocrinology* 43: 389.
- 78) Everett, J. W. (1961): The mammalian female reproductive cycle and its controlling mechanisms. In: *Sex and Internal Secretion*. W. C. Young (ed.). Williams & Wilkins, Baltimore: 497.
- 79) Everett, J. W. (1963): Pseudopregnancy in the female rat from brief treatment with progesterone: effect of isolation. *Nature* 198: 695.
- 80) Everett, J. W. (1964): Central neural control of reproductive functions of the adenohipophysis. *Physiol. Rev.* 44: 373.
- 81) Everett, J. W. & M. Nikitovitch-Winer (1963): Physiology of the pituitary gland as affected by transplantation or stalk section. In: *Advances in Neuroendocrinology*. A. V. Nalbandov (ed.). University of Illinois Press, Urbana: 289.
- 82) Everett, J. W. & C. H. Sawyer (1950): A 24-hour periodicity in the "LH-release apparatus" of female rats disclosed by barbiturate sedation. *Endocrinology*

47: 198.

- 83) Feder, H. H. & B. L. Marrone (1977): Progesterone: its role in the central nervous system as a facilitator and inhibitor of sexual behavior and gonadotropin release. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 286: 331.
- 84) Fee, A. R. & A. S. Parkes (1929): Studies on ovulation. I. The relation of the anterior pituitary body to ovulation in the rabbit. *J. Physiol. (Lond.)* 67: 383.
- 85) Fee, A. R. & A. S. Parkes (1930): Studies on ovulation. III. Effect of vaginal anaesthesia on ovulation in the rabbit. *J. Physiol. (Lond.)* 70: 385.
- 86) Ferin, M.; A. Tempone; P. E. Zimmering & R. L. Vande Wiele (1969): Effect of antibodies to 17 β -estradiol and progesterone on the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 85: 1070.
- 87) Fink, G. (1979): Feedback actions of target hormones on hypothalamus and pituitary with special reference to gonadal steroids. *Ann. Rev. Physiol.* 41: 571.
- 88) Fink, G.; R. Nallar & W. C. Worthington Jr. (1966): Determination of luteinizing hormone releasing factor (L.R.F.) in hypophysial portal blood. *J. Physiol. (Lond.)* 183: 20P.
- 89) Flack, B. (1959): Site of production of estrogen in rat ovary as studied in microtransplants. *Acta Physiol. Scand.* 47 Suppl. 163: 1.
- 90) Flament-Durand, J. (1965): Observations on pituitary transplants into the hypothalamus of the rat. *Endocrinology* 77: 446.
- 91) Foster, J. P. & D. B. Crighton (1976): Pituitary responsiveness to a single injection of synthetic luteinizing hormone releasing hormone before and after the natural preovulatory plasma luteinizing hormone peak in the sheep. *J. Endocr.* 71: 269.
- 92) Foster, J. P.; S. L. Jeffcoate; D. B. Crighton & D. T. Holland (1976): Luteinizing hormone and luteinizing hormone releasing hormone-like immunoreactivity in the jugular venous blood of sheep at various stages of the oestrous cycle. *J. Endocr.* 68: 409.
- 93) Freeman, M. E. & J. A. Banks (1980): Hypothalamic sites which control the surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. *Endocrinology* 106:

668.

- 94) Freeman, M. E. & J. D. Neill (1972): The pattern of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat: a daily nocturnal surge. *Endocrinology* 90: 1292.
- 95) Freeman, M. E.; M. S. Smith; S. J. Nazian & J. D. Neill (1974): Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 94: 875.
- 96) Freeman, M. E. & J. R. Serman (1978): Ovarian steroid modulation of prolactin surges in cervically stimulated ovariectomized rats. *Endocrinology* 102: 1915.
- 97) Galleano, J. P. & A. Castro-Vazquez (1979): Aumento de la sensibilidad a la estimulación cervicovaginal en ratas con lesiones del cerebro anterior. *Arch. Biol. Med. Exper. (Abs.)* 12: 515.
- 98) Gay, V. L. & R. L. Tomacari (1974): Follicle-stimulating hormone secretion in the female rat: cyclic release is dependent on circulating androgen. *Science* 184: 75.
- 99) Gilmore, D. P. & P. G. McDonald (1969): Induction of prolonged diestrus in the rat by a low level of estrogen. *Endocrinology* 85: 946.
- 100) Ginther, O. J. (1974): Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. *J. Anim. Sci.* 37: 550.
- 101) Ginther, O. J. & N. L. First (1971): Maintenance of the corpus luteum in hysterectomized mares. *Am. J. Vet. Res.* 32: 1687.
- 102) Goding, J. R. (1974): The demonstration that PGF_{2a} is the uterine luteolysin in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 38: 261.
- 103) Gorski, R. A. & C. D. Jacobson (1981): Sexual differentiation of the brain. In: *Clinics in Andrology: Pediatric Andrology*. S. J. Kogen & E. S. E. Hafez (eds.). Martinus Nijhoff, The Netherlands: 109.
- 104) Grady, K. L. & G. S. Greenwald (1968): Studies on interactions between the ovary and pituitary follicle-stimulating hormone in the golden hamster. *J. Endocr.* 40: 85.
- 105) Green, J. D. & G. W. Harris (1947): The

neurovascular link between the neurohypophysis and adenohypophysis. *J. Endocr.* 5: 136.

- 106) Green, J. D. & G. W. Harris (1949): Observation of the hypophysiportal vessels of the living rat. *J. Physiol. (Lond.)* 108: 359.
- 107) Greenstein, J. S.; R. W. Murray & R. C. Foley (1958): Effect of exogenous hormones on the reproductive processes of the cycling dairy heifer. *J. Dairy Sci. (Abst)* 41: 1834.
- 108) Greep, R. O. & F. L. Hisaw (1938): Pseudopregnancies from electrical stimulation of the cervix in the diestrus. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 39: 359.
- 109) Grosvenor, C. E. & N. Whitworth (1974): Evidence for a steady rate of secretion of prolactin following suckling in the rat. *J. Dairy Sci.* 57: 900.
- 110) Guillemin, R. & B. Rosenberg (1955): Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures. *Endocrinology* 57: 599.
- 111) Gunnet, J. W. & M. E. Freeman (1963). The mating-induced release of prolactin: a unique neuroendocrine response. *Endocrine Rev.* 4: 44.
- 112) Guzman-Flores, C.; M. Alcaraz & A. Fernandez Guardiola (1958): A rapid procedure to localize electrodes in experimental neurophysiology. *Boletín del Instituto de Estudios Médicos y Biológicos, Universidad Nacional de México* 16: 29.
- 113) Hafez, E. S. E.; M. C. Levasseur & C. Thibault (1980): Folliculogenesis, egg maturation and ovulation. In: *Reproduction in Farm Animals*. E. S. E. Hafez (ed.). Lea & Febiger, Philadelphia: 150.
- 114) Halasz, B. & R. A. Gorski (1967): Gonadotrophic hormone secretion in female rats after partial or total interruption of neural afferents to the medial basal hypothalamus. *Endocrinology* 80: 608.
- 115) Halasz, B. & L. Pupp (1965): Hormone secretion of the anterior pituitary gland after physical interruption of all nervous pathways to the hypophysiotropic area. *Endocrinology* 77: 553.
- 116) Halasz, B.; L. Pupp; S. Uhlarik & L. Tima (1965): Further studies on the hormone secretion of the anterior pituitary transplanted into the hypophysiotrophic area of the rat hypothalamus. *Endocrinology* 77: 343.

- 117) Hansel, W. (1967): Studies on the formation and maintenance of the corpus luteum. In: *Reproduction in the Female Mammal*. G. E. Lamming & E. C. Amoroso (eds.). Butterworths, London: 346.
- 118) Hansel, W. & S. E. Echterkamp (1972): Control of ovarian function in domestic animals. *Amer. Zool.* 12: 225.
- 119) Hansel, W. & J. E. Fortune (1978): The applications of ovulation control. In: *Control of Ovulation*. D. B. Crighton, N. B. Haynes, G. R. Foxcroft & G. E. Lamming (eds.). Butterworths, London-Boston: 237.
- 120) Harman, S. M.; J. P. Louvet & G. T. Ross (1975): Interaction of estrogen and gonadotrophins on follicular atresia. *Endocrinology* 96: 1145.
- 121) Harris, G. W. (1936): The induction of pseudopregnancy in the rat by electrical stimulation through the head. *J. Physiol. (Lond.)* 88: 361.
- 122) Harris, G. W. (1955): *The Neural Control of the Pituitary Gland*. Edward Arnold, Ltd, London.
- 123) Harris, G. W. (1961): The pituitary stalk and ovulation. In: *Control of Ovulation*. C. A. Vilee (ed.). Pergamon Press, New York: 56.
- 124) Harris, G. W. & D. Jacobsohn (1952): Functional grafts of the anterior pituitary gland. *Proc. Roy. Soc. (Lond.), Ser. B* 139: 263.
- 125) Harrison, R. J. (1946): The early development of the corpus luteum in the mare. *J. Anat.* 80: 160.
- 126) Harrison, F. A.; R. B. Heap & J. L. Linzell (1968): Ovarian function in the sheep after autotransplantation of the ovary and uterus to the neck. *J. Endocr.* 40: XIII.
- 127) Harrison, R. J. & B. J. Weir (1977): Structure of the mammalian ovary. In: *The ovary*, Vol. I.L. Zuckerman & B. J. Weir (eds.). Academic Press, New York: 113.
- 128) Hashimoto, I.; D. M. Henricks; L. L. Anderson & R. M. Melampy (1968): Progesterone and pregn-4-en-20a-ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocrinology* 82: 333.
- 129) Materius, H. O. (1933): Partial sympathectomy and induction of pseudopregnancy. *Am. J. Physiol.* 103: 97.

- 130) Hauger, R. L.; F. J. Karsch & D. L. Foster (1977): A new concept for control of the estrous cycle of the ewe based on the temporal relationships between luteinizing hormone, estradiol and progesterone in peripheral serum and evidence that progesterone inhibits tonic LH secretion. *Endocrinology* 101: 807.
- 131) Hay, M. F. & R. M. Moor (1975): Functional and structural relationships in the Graafian follicle population of the sheep ovary. *J. Reprod. Fert.* 45: 583.
- 132) Henricks, D. M.; J. F. Dickey & G. D. Niswender (1970): Serum luteinizing hormone and plasma progesterone levels during the estrous cycle and early pregnancy in cows. *Biol. Reprod.* 2: 346.
- 133) Henricks, D. M.; S. L. Oxenreider & L. L. Anderson (1969): Ovarian function after stalk transection in the cow. *Am. J. Physiol.* 216: 1213.
- 134) Herlyn, U.; H. F. Celler; I. von Eerswordt-Wallrabe & R. von Berswordt-Wallrabe (1965): Demonstrated that the pituitary concentration of prolactin decreases rapidly after glass rod stimulation of the vaginal cervix. *Acta Endocrinol. (Copen.)* 48: 220.
- 135) Hillarp, N. A. (1949): Studies on the localization of hypothalamic centres controlling the gonadotrophic function of the hypophysis. *Acta Endocrinol.* 2: 11.
- 136) Hinsey, J. C. (1937): The relation of the nervous system to ovulation and other phenomena of the female reproductive tract. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 5: 269.
- 137) Hinsey, J. C. & J. E. Markee (1933): Pregnancy following bilateral section of the cervical sympathetic trunks in the rabbit. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 31: 270.
- 138) Hisaw, F. L. (1947): Development of the Graafian follicle and ovulation. *Physiol. Rev.* 27: 95.
- 139) Nixon, J. E. & W. Hansel (1974): Evidence for preferential transfer of prostaglandin F2a to the ovarian artery following intrauterine administration in cattle. *Biol. Reprod.* 11: 543.
- 140) Hooley, R. D.; R. W. Baxter; W. A. Chamley; I. A. Cumming; H. A. Jonas & J. K. Findlay (1974): FSH and LH response to gonadotropin-releasing hormone during the ovine estrous cycle and following

- progesterone administration. *Endocrinology* 95: 937.
- 141) Horton, E. W. & N. L. Poyser (1976): Uterine luteolytic hormone: a physiological role for prostaglandin F_{2a}. *Physiol. Rev.* 56: 595.
- 142) Houssay, B. A.; A. Biasotti & R. Sammartino (1935): Modifications fonctionnelles de l'hypophyse apres les lesions infundibulo-tuberiennes chez le crapaud. *C. r. Seanc. Soc. Biol.* 120: 725.
- 143) Hsueh, A. J. W. & P. B. C. Jones (1981): Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrine Rev.* 2: 437.
- 144) Kaltenbach, C. C.; J. W. Graber; G. D. Niswender & A. V. Nalbandov (1968): Effect of hypophysectomy on the formation and maintenance of corpora lutea in the ewe. *Endocrinology* 82: 753.
- 145) Kaltenbach, C. C.; J. W. Graber; G. D. Niswender & A. V. Nalbandov (1968): Luteotrophic properties of some pituitary hormones in nonpregnant or pregnant hypophysectomized ewes. *Endocrinology* 82: 818.
- 146) Kann, G. & R. Denamur (1974): Possible role of prolactin during the oestrous cycle and gestation in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 39: 473.
- 147) Karsch, F. J.; J. E. Cook; A. R. Ellicott; D. L. Foster; G. L. Jackson & A. V. Nalbandov (1971): Failure of infused prolactin to prolong the life span of the corpus luteum of the ewe. *Endocrinology* 89: 272.
- 148) Kastin, A. J.; R. D. Olson; A. V. Schally & D. H. Coy (1979): CNS effects of peripherally administered brain peptides. *Life Sci.* 25: 401.
- 149) Kastin, A. J.; L. A. Wade; D. H. Coy; A. V. Schally & R. D. Olson (1980): Peptides and the blood-brain barrier. In: *Brain and Pituitary Peptides*. W. Wuttke; A. Weindl; K. H. Voigt & R. R. Dries (eds.). Karger, Basel: 76.
- 150) Kawakami, M. & J. Arita (1981): Circadian rhythm of prolactin surges induced by stimulation of the uterine cervix in the ovariectomized rat: its sexual differentiation and preoptic regulation. *J. Endoor.* 91: 325.
- 151) Kawano, H. & S. Daikoku (1981): Immunohistochemical demonstration of LHRH neurons and their pathways in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 32: 179.
- 152) Kidder, H. E.; L. E. Casida & R. H. Grummer

- (1955): Some effects of estrogen injections on the estrual cycle of gilts. *J. Anim. Sci.* 14: 470.
- 153) Kollar, E. J. (1953): Reproduction in the female rat after pelvic nerve neurectomy. *Anat. Rec.* 115: 641.
- 154) Komisaruk, B. R.; N. T. Adler & J. Hutchison (1972): Genital sensory field: enlargement by estrogen treatment in female rats. *Science* 178: 1295.
- 155) Kow, L. M. & D. W. Pfaff (1973): Effects of estrogen treatment on the size of receptive field and response threshold of pudendal nerve in the female rat. *Neuroendocrinology* 13: 299.
- 156) Kozlowski, G. P. & G. Hostetter (1978): Cellular and subcellular localization and behavioral effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the rat. In: *Brain-Endocrine Interaction III. Neural Hormones and Reproduction.* D. E. Scott; G. P. Kozlowski & Weindl (eds.). Karger, Basel: 138.
- 157) Kuroshima, A.; A. Arimura; C. Y. Bowers & A. V. Schally (1966): Inhibition by pig hypothalamic extracts of depletion of pituitary prolactin in rats following cervical stimulation. *Endocrinology* 78: 216.
- 158) Lamming, G. E. (1978): Reproduction during lactation. In: *Control of Ovulation.* D. B. Crighton; N. B. Haynes; G. R. Foxcroft & G. E. Lamming (eds.). Butterworths, London-Boston: 335.
- 159) Legan, S. J. & F. J. Karsch (1975): A daily signal after the LH surge in the rat. *Endocrinology* 96: 57.
- 160) Legan, S. J. & F. J. Karsch (1979): Neuroendocrine regulation of the estrous cycle and seasonal breeding in the ewe. *Biol. Reprod.* 20: 74.
- 161) Leong, D. A.; L. S. Frawley & J. D. Neill (1983): Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Ann. Rev. Physiol.* 45: 109.
- 162) Levasseur, M. C. & C. Thibault (1980): Reproductive life cycles. In: *Reproduction in Farm Animals* E. S. E. Hafez (ed.). Lea & Febiger, Philadelphia: 130.
- 163) Levine, J. E.; K. Y. F. Pau; V. D. Ramirez & G. L. Jackson (1982): Simultaneous measurement of luteinizing hormone-releasing hormone and luteinizing

- hormone release in unanesthetized, ovariectomized sheep. *Endocrinology* 111: 1449.
- 164) Long, J. A. & H. M. Evans (1922): The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif.* 6: 1.
- 165) Louis, T. M.; D. M. Farry; J. S. Robinson; G. D. Thorburn & J. R. G. Challis (1977): Effects of exogenous progesterone and oestradiol on prostaglandin F and 13,14-dihydro-15-oxo-prostaglandin F_{2a} concentrations in uteri and plasma of ovariectomized ewes. *J. Endocr.* 73: 427.
- 166) Louvet, J. P.; S. M. Harman; J. R. Schreiber & G. T. Ross (1975): Evidence for a role of androgens in follicular maturation. *Endocrinology* 97: 366.
- 167) Louvet, J. P. & J. L. Vaitukaitis (1976): Induction of follicle-stimulating hormone (FSH) receptors in rat ovaries by estrogen priming. *Endocrinology* 99: 758.
- 168) Louw, B. P.; A. W. Lishman; W. A. Botha & J. P. Baumgartner (1974): Failure to demonstrate a role for the acute release of prolactin at oestrus in the ewe. *J. Reprod. Fert.* 40: 455.
- 169) Malven, P. V. & C. H. Sawyer (1966): Formation of new corpora lutea in mature hypophysectomized rats. *Endocrinology* 78: 1259.
- 170) Marder, M. L.; C. P. Channing & N. B. Schwartz (1977): Suppression of serum follicle stimulating hormone in intact and acutely ovariectomized rats by porcine follicular fluid. *Endocrinology* 101: 1639.
- 171) Marshall, F. H. & E. B. Verney (1936): The occurrence of ovulation and pseudopregnancy in the rabbit as a result of central nervous stimulation. *J. Physiol. (Lond.)* 86: 327.
- 172) Matsuo, H.; Y. Baba; R. M. G. Nair; A. Arimura & A. V. Schally (1971): Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. Proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43: 1334.
- 173) McCann, S. M. (1962): A hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor. *Am. J. Physiol.* 202: 395.
- 174) McCann, S. M. (1980): Control of anterior pituitary hormone release by brain peptides. *Neuroendocrinology* 31: 355.

- 175) McCann, S. M.; S. Taleisnik & H. M. Friedman (1960): LH-releasing activity in hypothalamic extracts. Proc. Soc. Exp. Biol. 104: 432.
- 176) McClintock, J. A. & N. B. Schwartz (1968): Changes in pituitary and plasma follicle stimulating hormone concentrations during the rat estrous cycle. Endocrinology 83: 433.
- 177) McCracken, J. A.; J. C. Carlson; M. E. Glew; J. R. Coding; D. T. Baird; K. Green & B. Samuelsson (1972): Prostaglandin F2a identified as a luteolytic hormone in sheep. Nature (New Biol.) 238: 129.
- 178) Meites, J. & W. E. Sonntag (1981): Hypothalamic hypophysiotropic hormones and neurotransmitter regulation: current views. Ann. Rev. Pharm. Toxicol. 21: 295.
- 179) Menon, K. M. J. & K. P. Gunaga (1976): Cytoplasmic and nuclear receptor-estradiol complex in the hypothalamus and pituitary: Relationship with pituitary sensitivity to gonadotropin releasing hormone and gonadotropin secretion in the rat, Neuroendocrinology 22: 8.
- 180) du Mesnil du Buisson, F. (1961). Regression unilaterale des corpus jaunes apres hysterectomie partielle chez la truie. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 1: 105.
- 181) du Mesnil du Buisson, F. & P. C. Leglise (1963): Effect de l'hypophysectomie sur les corps jaunes de la truie. Compt. Rend. 257: 261.
- 182) Moss, R. L. & M. M. Foreman (1976): Potentiation of lordosis behavior by intrahypothalamic infusion of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone (LRH). Neuroendocrinology 20: 176.
- 183) Moss, R. L. & S. M. McCann (1973): Induction of mating behavior in rats by luteinizing hormone-releasing factor. Science 181: 177.
- 184) Mossman, H. W. & K. L. Duke (1973): Comparative morphology of the mammalian ovary. Univ. of Wisconsin Press, Madison.
- 185) Motta, M.; F. Piva & L. Martini (1970): The hypothalamus as the center of endocrine feedback mechanisms. In: The Hypothalamus. L. Martini; M. Motta & Fraschini (eds.). Academic Press, New York: 463.
- 186) Murakami, N.; M. Takahashi & Y. Suzuki (1979): Indispensable role of peripheral progesterone level

for the occurrence of prolactin surges in pseudopregnant rats, Biol. Reprod. 21: 263.

- 187) Murakami, N.; M. Takahashi & Y. Suzuki (1980): Induction of pseudopregnancy and prolactin surges by a single injection of progesterone. Biol. Reprod. 22: 253.
- 188) Myers, H. Y.; W. C. Young & E. W. Dempsey (1936): Graafian follicles development throughout the reproductive cycle in the guinea pig, with especial reference to changes during estrus (sexual receptivity). Anat. Rec. 65: 381.
- 189) Nair, R. M. G.; A. J. Kastin & A. V. Schally (1971): Isolation and structure of hypothalamic MSH releasing-inhibiting hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun. 43: 1376.
- 190) Nalbandov, A. V. (1973): Control of luteal function in mammals. In: Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology. R. O. Greep & E. B. Astwood (eds.). American Physiological Society, Washington, DC: 153.
- 191) Nance, D. M.; J. Shryne & R. A. Gorski (1974): Septal lesions: Effects on lordosis behavior and pattern of gonadotropin release. Horm. Behav. 5: 73.
- 192) Neill, J. D. (1980): Neuroendocrine regulation of prolactin secretion. In: Frontiers in Neuroendocrinology. L. Martini & W. F. Ganong (eds.). Raven Press, New York: 129.
- 193) Neill, J. D.; M. E. Freeman & S. A. Tillson (1971): Control of the proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. Endocrinology 89: 1448.
- 194) Neill, J. D. & S. M. Smith (1974): Pituitary-ovarian interrelationship in the rat. In: Current Topics in Experimental Endocrinology. V. H. T. James & L. Martini (eds.). Academic Press, New York: 73.
- 195) Nikitovitch-Winer, M. & J. W. Everett (1958): Comparative study of luteotropin secretion by hypophysial autotransplants in the rat. Effects of site and stages of the estrous cycle. Endocrinology 62: 522.
- 196) Niswender, G. D. (1974): Influence of 2-Br-a-ergocryptine on serum levels of prolactin and the estrous cycle in sheep. Endocrinology 94: 612.

- 197) Palkovits, M.; E. Mezey; G. Ambach & P. Kivovics (1978): Neural and vascular connections between the organum vasculosum laminae terminalis and preoptic nuclei. In: Brain-Endocrine Interaction III. Neural Hormones and Reproduction. D. E. Scott; G. P. Kozlowski & Weindl (eds.). Karger, Basel: 302.
- 198) Pardridge, W. M. (1983): Neuropeptides and the blood-brain barrier. Ann. Rev. Physiol. 45: 73.
- 199) Pant, H. C.; C. N. R. Hopkinson & R. J. Fitzpatrick (1977): Concentration of estradiol, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the jugular venous plasma of ewes during the estrous cycle. J. Endocr. 73: 247.
- 200) Pasteels, J. L. & F. Ectors (1968): Sensibilite de l'hypothalamus anterieur a la progesterone et a la medroxyprogesterone. Ann. Endocr. (Paris) 29: 663.
- 201) Pelletier, J. & J. Thimonier (1975): Interactions between ovarian steroids or progestagens and LH-release. Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 15: 131.
- 202) Pepe, G. J. & I. Rothchild (1974): A comparative study of serum progesterone levels in pregnancy and in various types of pseudopregnancy in the rat. Endocrinology 95: 275.
- 203) Pfaff, D. W. (1973): Luteinizing hormone-releasing factor (LRF) potentiates lordosis behavior in hypophysectomized ovariectomized female rats. Science 182: 1148.
- 204) Phillips, H. S.; B. T. Ho & J. G. Linner (1982): Ultrastructural localization of LHRH-immunoreactive synapses in the hamster accessory olfactory bulb. Brain Res. 246: 193.
- 205) Pineda, M. H.; M. C. Garcia & O. J. Cinther (1973): Effect of antiserum against an equine pituitary fraction on corpus luteum and follicles in mares during diestrus. Am. J. Vet. Res. 34: 181.
- 206) Pineda, M. H. & O. J. Cinther (1972): Inhibition of estrus and ovulation in mares treated with an antiserum against an equine pituitary fraction. Am. J. Vet. Res. 33: 1775.
- 207) Popa, C. T. & U. Fielding (1930): A portal circulation from the pituitary to the hypothalamic region. J. Anat. 65: 88.
- 208) Popa, C. T. & U. Fielding (1933): Hypophysioportal vessels and their colloid accompaniment. J. Anat.

67: 227.

- 209) Powers, J. B. (1970): Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. *Physiol. Behav.* 5: 831.
- 210) Psychoyos, A. (1973): Hormonal control of ovoimplantation. *Vitams. Horm.* 31: 201.
- 211) Quilligan, E. J. & I. Rothchild (1960): The corpus luteum-pituitary relationship: The luteotrophic activity of homotransplanted pituitaries in intact rats. *Endocrinology* 67: 48.
- 212) Rabii, J. & C. L. Kragt (1972): Plasma levels of prolactin, FSH and LH in the pseudopregnant rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 141: 359.
- 213) Raj, H. G. M. & N. R. Moudgal (1970): Hormonal control of gestation in the intact rat. *Endocrinology* 86: 874.
- 214) Rayford, P. L.; H. J. Brinkley; E. F. Young & L. E. Reichert (1974): Radioimmunoassay of porcine FSH. *J. Anim. Sci.* 39: 348.
- 215) Reiter, J. (1974): Circannual reproductive rhythms in mammalian related to photoperiod and pineal function: a review. *Chronobiologia* 1: 365.
- 216) Richards, J. S. & A. R. Jr. Midgley (1976): Protein hormone action: A key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. *Biol. Reprod.* 14: 82.
- 217) Riskind, P. & R. L. Moss (1979): Midbrain central grey: LHRH infusion enhances lordotic behavior in estrogen-primed ovariectomized rats. *Brain Res. Bull.* 4: 203.
- 218) Roberts, J. S. (1975): Cyclic fluctuations in reflexive oxytocin release during the estrous cycle of the goat. *Biol. Reprod.* 13: 314.
- 219) Robertson, H. A. (1969): The endogenous control of estrus and ovulation in sheep, cattle and swine. *Vitams. Horm.* 27: 91.
- 220) Robertson, H. A. (1977): Reproduction in the ewe and goat. In: *Reproduction in Domestic Animals*. H. H. Cole & P. T. Cupps (eds.). Academic Press, New York: 477.
- 221) Rothchild, I. (1960): The corpus luteum-pituitary relationship: The association between the cause of luteotrophin secretion and the cause of follicular

- quiescence during lactation; the basis for a tentative theory of the corpus luteum-pituitary relationship in the rat. *Endocrinology* 67: 9.
- 222) Rothchild, I. (1960): The corpus luteum-pituitary relationship: The lack of an inhibiting effect of progesterone on the secretion of pituitary luteotrophin. *Endocrinology* 67: 54.
- 223) Rothchild, I. (1965): The corpus luteum-hypophysis relationship. *Acta Endocrinol. (Copen.)* 49: 107.
- 224) Rothchild, I. (1981): The regulation of mammalian corpus luteum. *Recent Prog. Horm. Res* 37: 183.
- 225) Rothchild, I. & R. Schubert (1963): Corpus luteum-pituitary relationship: Induction of pseudopregnancy in the rat by progesterone. *Endocrinology* 72: 969.
- 226) Saffran, M.; A. V. Schally & B. G. Benfey (1955): Stimulation of the release of corticotropin from the adenohypophysis by a neurohypophysial factor. *Endocrinology* 57: 439.
- 227) Sakuma, Y. & D. W. Pfaff (1980): LHRH in the mesencephalic central grey can potentiate lordosis reflex of female rats. *Nature* 283: 566.
- 228) Sarkar, D. K.; S. A. Chiappa; G. Fink & N. M. Sherwood (1976): Gonadotropin-releasing hormone surge in pro-oestrous rats. *Nature* 264: 461.
- 229) Sawyer, C. H. & J. E. Markee (1959): Estrogen facilitation of release of pituitary ovulating hormone in the rabbit in response to vaginal stimulation. *Endocrinology* 65: 614.
- 230) Scaramuzzi, R. J. & D. T. Baird (1976): The oestrous cycle of the ewe after active immunization against prostaglandin F2a. *J. Reprod. Fert.* 46: 39.
- 231) Scharrer, E. (1928): Die Lichtenpfindlichkeit blinder Elritzen. *Z. vergl. Physiol.* 7: 1.
- 232) Schillo, K. K.; P. J. Hansen; L. A. Kamwanja; D. J. Gierschke & E. R. Hauser (1983): Influence of seasonal on sexual development in heifers: Age at puberty as related to growth and serum concentrations of gonadotropins, prolactin, thyroxine and progesterone. *Biol. Reprod.* 28: 329.
- 233) Schroff, C.; J. M. Klindt; C. C. Kaltenbach; J. W. Graber & G. D. Niswender (1971): Maintenance of corpora lutea in hypophysectomized ewes. *J. Anim.*

Sci. 33: 268.

- 234) Schwartz, N. B. (1969): A model for the regulation of ovulation in the rat. *Recent Prog. Horm. Res.* 25: 1.
- 235) Selye, H. (1942): Correlations between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. *Endocrinology* 30: 437.
- 236) Selye, H. & T. McKeown (1934): Studies on pseudopregnancy. *Am. J. Physiol.* 109: 96.
- 237) Sen, K. K. & M. J. Menon (1978): Oestradiol receptors in the rat anterior pituitary gland during the oestrous cycle: Quantitation of receptor activity in relation to gonadotrophin releasing hormone-mediated luteinizing hormone release. *J. Endocr.* 76: 211.
- 238) Shelesnyak, M. C. (1931): Induction of pseudopregnancy in the rat by means of electrical stimulations. *Anat. Rec.* 49: 179.
- 239) Sherwood, N. M.; S. A. Chiappa & G. Fink (1976): Immunoreactive luteinizing hormone releasing factor in pituitary stalk blood from female rats: Sex steroid modulation of response to electrical stimulation of preoptic area or median eminence. *J. Endocr.* 70: 501.
- 240) Short, R. V. (1964): Steroid hormones. Ovarian steroid synthesis and secretion in vitro. *Recent Prog. Horm. Res.* 20: 303.
- 241) Siegel, S. (1956): Non parametric statistics for the behavioral sciences. McGraw-Hill, New York.
- 242) Silverman, A. J. & E. A. Zimmerman (1978): Pathways containing luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) in the mammalian brain. In: *Brain-Endocrine Interaction III. Neural Hormones and Reproduction*. D. E. Scott; G. P. Kozlowski & Weindl (eds.). Karger, Basel: 83.
- 243) Smith, M. S. & J. D. Neill (1976): A "critical period" for cervically stimulated prolactin release. *Endocrinology* 98: 324.
- 244) Snedecor, G. W. & W. G. Cochran (1967): *Statistical methods*. The Iowa State University Press, Ames.
- 245) Snook, R. B.; M. A. Brunner; R. R. Saatman & W. Hansel (1969): The effect of antisera to bovine LH in hysterectomized and intact heifers. *Biol. Reprod.*

1: 49.

- 246) Snook, R. B.; R. R. Saatman & W. Hansel (1971): Serum progesterone and luteinizing hormone levels during the bovine estrous cycle. *Endocrinology* 88: 678.
- 247) Spies, H. G. & G. D. Niswender (1971): Levels of prolactin, LH and FSH in the serum of intact and pelvic neurectomized rats. *Endocrinology* 88: 937.
- 248) Spiess, J.; J. Rivier; C. Rivier & W. Vale (1981): Primary structure of corticotropin releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6517.
- 249) Stabenfeldt, G. H.; H. Kindahl; J. P. Hughes; O. P. Neely; I. Liu & D. Pascoe (1981): Control of luteolysis in the mare. *Acta Vet. Scand., Suppl.* 77: 159.
- 250) Stockard, C. R. & G. N. Papanicolaou (1917): The existence of a typical oestrous cycle in the guinea-pig with study of its histological and physiological changes. *Am. J. Anat.* 22: 225.
- 251) Takahashi, M.; J. J. Ford; K. Yoshinaga & R. O. Greep (1974): Induction of ovulation in hypophysectomized rats by progesterone. *Endocrinology* 95: 1322.
- 252) Taleisnik, S.; L. Caligaris; A. Beltramino & A. Caceres (1978): Stimulatory and inhibitory effects of ovarian steroids on gonadotropin secretion in ovariectomized rats after anterior hypothalamic deafferentation. *J. Endocr.* 77: 11.
- 253) Taleisnik, S. & M. E. Tomatis (1970): Mechanisms that determine the changes in pituitary MSH activity during pseudopregnancy induced by vaginal stimulation in the rat. *Neuroendocrinology* 6: 368.
- 254) Taleisnik, S.; M. E. Velasco & J. J. Astrada (1970): Effect of hypothalamic deafferentation on the control of luteinizing hormone secretion. *J. Endocr.* 46: 1.
- 255) Thatcher, W. W. (1974): Effects of season, climate and temperature on reproduction and lactation. *J. Dairy Sci.* 57: 360.
- 256) Thibault, C. (1977): Are follicular maturation and oocyte maturation independent processes?. *J. Reprod. Fert.* 51: 1.
- 257) Thibault, C. & M. C. Levasseur (1978): La fonction

ovariennes chez les Mammiferes Masson, Paris.

- 258) Thorburn, G. D. & J. R. G. Challis (1979): Endocrine control of parturation. *Physiol. Rev.* 59: 863.
- 259) Turnbull, K. E.; A. W. H. Eraden & P. E. Mattner (1977): The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Aust. J. Biol. Sci.* 30: 229.
- 260) Uchida, K.; M. Kadowaki & T. Miyake (1969): Ovarian secretion of progesterone and 20 α -hydroxypregn-4-en-3-one during rat estrous cycle in chronological relation to pituitary release of luteinizing hormone. *Endocrinol. Jpn.* 16: 227.
- 261) Velasco, M. E. & I. Rothchild (1973): Factors influencing the secretion of luteinizing hormone and ovulation in response to electrochemical stimulation of the preoptic area in rats. *J. Endocr.* 58: 163.
- 262) Velasco, M. E. & S. Taleisnik (1969): Effect of hippocampal stimulation on the release of gonadotropin. *Endocrinology* 85: 1154.
- 263) Velasco, M. E.; A. Castro-Vazquez & I. Rothchild (1974). Effects of hypothalamic deafferentation on criteria of prolactin secretion during pregnancy and lactation in the rat. *J. Reprod. Fert.* 41: 385.
- 264) Verheugen, C.; L. R. Laufer; J. L. DeFazio; W. B. Pardridge; J. K. H. Lu & H. L. Judd (1983): Impermeability of the rat blood-brain barrier to exogenously administered gonadotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* 36: 102.
- 265) Vogt, M. (1931): Über den Mechanismus der Auslösung der Gravidität und Pseudogravidität zugleich ein physiologischer Beweis für die sympathische Innervation des Hypophysenvorderlappens. *Arch. exp. Path. Pharmak.* 162: 197.
- 266) Vogt, M. (1933): Über den Mechanismus der Auslösung der Gravidität. II. Mitteilung. *Arch. exp. Path. Pharmak.* 170: 72.
- 267) Volosin, M. & M. E. Celis (1979): Serum melanocyte-stimulating hormone levels and pituitary melanocyte-stimulating hormone content during pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 105: 541.
- 268) Weinberger, L. M. & F. C. Grant (1941): Precocious puberty and tumors of the hypothalamus. *Arch. Int. Med.* 67: 762.
- 269) Weiner, R. I. & W. F. Ganong (1978): Role of

brain monoamines and histamine in regulation of anterior pituitary secretion. *Physiol. Rev.* 58: 905.

- 270) Weir, B. J. & I. W. Rowlands (1977): Ovulation and atresia. In: *The Ovary*, W.L.L. Zuckerman & B. J. Weir (eds.). Academic Press, New York: 265.
- 271) Welschen, R. & J. Dullaart (1976): Administration of antiserum against ovine^{Follicle} stimulating hormone or ovine luteinizing hormone at proestrus in the rat: Effects on follicular development during the oncoming cycle. *J. Endocr.* 70: 301.
- 272) Welschen, R.; P. Osman; J. Dullaart; W. J. de Greef; J. Th. J. Uilenbroek & F. H. de Jong (1975): Levels of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol-17B and progesterone and follicular growth in the pseudopregnant rat. *J. Endocr.* 64: 37.
- 273) Westman, A. & D. Jacobsohn (1938): Endokrinologische Untersuchungen an Ratten mit durchtrenntem Hypophysenstiel. VI. Produktion und Abgabe der gonadotropen Hormone. *Acta path. et microbiol. scandinav.* 15: 445.
- 274) Wiest, W. G. (1970): Progesterone and 20 α -hydroxypregn-4-en-3-one in plasma, ovaries and uteri during pregnancy in the rat. *Endocrinology* 87: 43.
- 275) Wislocki, G. B. (1937): The vascular supply of the hypophysis cerebri of the cat. *Anat. Rec.* 69: 361.
- 276) Wislocki, G. B. (1938): The vascular supply of the hypophysis cerebri of the rhesus monkey and man. *Proc. Assoc. Res. Nervous Mental Disease* 17: 48.
- 277) Wislocki, G. B. & L. S. King (1936): The permeability of the hypophysis to vital dyes, with study of the hypophyseal vascular supply. *Am. J. Anat.* 58: 421.
- 278) Wuttke, W. & J. Meites (1971): Luteolytic role of prolactin during the estrous cycle of the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 137: 988.
- 279) Wysocki, C. J. (1980): Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 3: 301.
- 280) Yogev, L. & J. Terkel (1980): Effects of photoperiod, absence of photic cues, and suprachiasmatic nucleus lesions on nocturnal prolactin surges in pregnant and pseudopregnant rats.

Neuroendocrinology 31: 26.

- 281) Young, W. C. (1961): The hormones and mating behavior. In: Sex and Internal Secretion. W. C. Young (ed.). Williams & Wilkins, Baltimore: 1173.
- 282) Zeilmaker, G. H. (1965): Normal and delayed pseudopregnancy in the rat. Acta Endocrinol. (Copen.) 49: 558.

La Facultad no se hace solidaria
de las opiniones vertidas en una
tesis.