

Efecto de una reproducción continuada o intermitente sobre la función reproductiva de hembras de ratón de edad avanzada

Effect of continuous or intermittent reproduction on reproductive function of aged female mice

Gómez-Piquer V¹, Rausell F¹, Hermenegildo C^{2,3}, García-Pérez MA^{2,4}, Cano A⁵, Tarín JJ¹

¹Departamento de Biología Funcional y Antropología Física. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia.

²Unidad Mixta de Investigación, Hospital Clínico Universitario de Valencia.

³Departamento de Fisiología, Universidad de Valencia.

⁴Departamento de Genética, Universidad de Valencia.

⁵Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia.

Resumen

Objetivos: Determinar el efecto del grado de paridad de hembras de ratón de edad reproductiva avanzada sobre su eficacia reproductiva y cese de su vida reproductiva.

Métodos: Ratonas híbridas F1 (hembra C57BL/6Jlco X macho CBA/6Jlco) de 51 semanas de edad se emparejaron, por primera vez y hasta el cese de su vida reproductiva, con machos híbridos vírgenes de 12-14 semanas de edad siguiendo un sistema de reproducción continuada (las hembras y sus machos respectivos se mantuvieron siempre juntos) o intermitente (las hembras permanecieron aisladas sin la presencia de sus machos respectivos durante el embarazo y el periodo de lactancia).

Resultados: El sistema de reproducción continuada (alta paridad) se asoció con un menor porcentaje de camadas con al menos un lechal canibalizado, mayor tamaño de camada tanto en el nacimiento como en el destete, menor mortalidad pre-destete de las crías y mayor peso corporal de los lechales en el destete, cuando se comparó con el sistema de reproducción intermitente (baja paridad). No obstante, la mortalidad de las hembras sometidas al sistema de reproducción continuada antes del cese de la vida reproductiva fue mayor que la exhibida por las ratonas expuestas al sistema de reproducción intermitente. No se encontraron diferencias significativas entre grupos con respecto a la edad de las hembras en el momento del cese de la vida reproductiva.

Correspondencia: Dr. Juan J. Tarín
Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia
Avda. Blasco Ibañez 17,
46010 Valencia;
e-mail: tarinjj@uv.es

Conclusiones: Un sistema de reproducción continuada o de alta paridad se asocia con una mayor eficacia reproductiva que un sistema de reproducción intermitente o de baja paridad. El grado de paridad no afecta el momento del cese de la vida reproductiva de las hembras cuando éstas se aparean por primera vez a una edad reproductiva avanzada.

Palabras clave: Edad materna. Eficacia reproductiva. Envejecimiento. Paridad. Sistema de reproducción.

Summary

Purpose: To ascertain the effect of parity degree of reproductively old female mice on reproductive fitness and end of reproductive life.

Methods: Hybrid F1 female mice (female C57BL/6Jlco X male CBA/6Jlco) of 51 weeks of age were paired for the first time and until the end of their reproductive life with virgin hybrid males of 12-14 weeks of age following a continuous (females and their respective males were kept always together) or intermittent (females were kept alone without the presence of their respective males during pregnancy and lactation) system of reproduction.

Results: The continuous system of reproduction (high parity) was associated with lower percentage of litters with at least a pup cannibalized, higher litter size at birth and at weaning, decreased pre-weaning mortality and higher body weight at weaning of pups when compared to the intermittent system of reproduction (low parity). However, the mortality of females before reaching the end of their reproductive life put under the continuous system of reproduction was higher than that exhibited by females put under the intermittent system of reproduction. No significant differences between groups in age of females at the end of their reproductive life were detected.

Conclusions: A continuous system of reproduction or a system of high parity is associated with higher reproductive fitness than an intermittent system of reproduction or system of low parity. The parity degree has no effect on cessation of female reproductive life when females are paired for the first time at an advanced reproductive age.

Key words: Aging. Maternal age. Parity. Reproductive fitness. Reproduction system.

INTRODUCCIÓN

En hembras de mamíferos, la reserva de folículos primordiales disminuye desde el nacimiento hasta el cese de la vida reproductiva de las hembras, momento en el cual, está prácticamente agotada (1). En otras palabras, el número de folículos primordiales limita la fertilidad de las hembras, así como el periodo de vida reproductiva de las mismas (2, 3).

Es bien conocido que los ciclos ováricos se inhiben durante el periodo de gestación y lactancia. La inhibición durante la gestación podría deberse a los elevados niveles de progesterona circulantes que se alcanzan durante el embarazo. De hecho, se ha demostrado que, en ratonas preñadas, existe un menor número de folículos que comienzan el crecimiento por unidad de tiempo (4). Además, en ratas de mediana edad tratadas con implantes de progesterona u obligadas a experimentar múltiples gestaciones, se ha observado un retraso en la edad a la que alcanzan el final de su vida reproductiva. También, el tratamiento

prolongado de ratas jóvenes con implantes de progesterona se asocia con la conservación de la reserva folicular cuando alcanzan una edad reproductiva avanzada (5).

Por otro lado, durante parte del periodo de lactancia se suprimen los ciclos ováricos debido a las señales nerviosas, causadas por la succión, que llegan al hipotálamo procedentes de las mamas. Estas señales nerviosas provocan la secreción de prolactina e inhibición de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas en el hipotálamo, lo cual inhibe a su vez la liberación de las gonadotropinas hipofisarias, hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH), necesarias para el reclutamiento folicular y ovulación, respectivamente.

No es de extrañar, por lo tanto, que numerosos estudios epidemiológicos indiquen que las mujeres con elevada tasa de paridad muestran un retraso en la aparición de la menopausia (6). Además, en ratones, se ha observado que si se retiran las crías de la madre inmediatamente tras el nacimiento, no permitiendo la lactación, las hembras experimentan un retraso en el

agotamiento de la reserva folicular asociada con el envejecimiento reproductivo femenino (7).

El presente estudio tiene como objetivo determinar los efectos del grado de paridad de hembras de ratón sobre su eficacia reproductiva y edad del cese de su vida reproductiva. No obstante, debido a que la tendencia actual de las mujeres de la sociedad occidental es retrasar la maternidad hasta bien entrada la década de los 30 ó incluso los 40, es decir cerca del final de la vida reproductiva, nuestro estudio se centra en ratonas emparejadas con machos por primera vez a edades reproductivas avanzadas. Con esta estrategia, se pretende averiguar si el efecto beneficioso de una paridad elevada sobre la eficacia reproductiva femenina, observado en trabajos previos utilizando hembras jóvenes (8), acontece también en hembras de edad reproductiva avanzada, cuando la reserva folicular está mermada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepa y mantenimiento de los ratones

Todos los animales de experimentación utilizados en este estudio fueron tratados siguiendo las directrices del National Research Council's (NRC) publication Guide for Care and Use of Laboratory Animals (1996). Las hembras híbridas (hembra C57BL/6Jlco X macho CBA/6Jlco) de ratón se mantuvieron desde el destete, en grupos de 10, en jaulas de plástico de 35,5 x 23,5 x 18,5 cm, y se alimentaron con dieta estándar de laboratorio y agua ad libitum, en una habitación bajo condiciones controladas de fotoperiodo (14 horas de luz:10 horas de oscuridad, encendiéndose la luz a las 0800 h) y temperatura (21-23°C). Las hembras vírgenes seleccionadas al azar se cruzaron individualmente a las 51 semanas de edad en jaulas de plástico de 26,5 x 20,5 x 13,5 cm con un macho híbrido de 12-14 semanas de edad, también seleccionado al azar. Las hembras se cruzaron utilizando dos sistemas de reproducción distintos: continuo (23 hembras) e intermitente (32 hembras).

Sistema de reproducción continuada

En este sistema de reproducción, las hembras se mantuvieron de forma individual con el mismo macho durante el resto de su vida reproductiva. El cese de la vida reproductiva femenina se definió como la edad de la hembra en el último parto (parto tras el cual no se obtuvo más descendencia durante un periodo de 3 meses). A partir del día décimo-octavo desde

el cruce con el macho y hasta el final de la vida reproductiva de cada hembra, las hembras se examinaron diariamente para determinar el día del parto y registrar el tamaño de la camada y sexo de las crías en el nacimiento. En el momento del destete, se pesaron y, a continuación, se sacrificaron los lechales. Cuando una hembra alcanzó el final de su vida reproductiva, se comprobó la fertilidad del macho cruzándolo con una hembra joven de 10-12 semanas de edad.

Sistema de reproducción intermitente

En este sistema de reproducción, las hembras no permanecieron con un macho durante toda su vida reproductiva. En particular, a partir del décimo día de cruce con el macho, las hembras se examinaron diariamente hasta evidenciar la característica distensión abdominal asociada con la gestación. Cuando el investigador (VGP) estuvo seguro que la hembra estaba preñada, se retiró el macho de la jaula y la hembra permaneció aislada durante el embarazo y el periodo de lactancia. Al igual que en el grupo de reproducción continuada, en el día del parto se registraron los tamaños de camada y los sexos de las crías y, en el momento del destete, los lechales se pesaron y sacrificaron. Tras el destete, las hembras permanecieron una semana más de aislamiento antes del siguiente cruce con otro macho híbrido de 12-14 semanas de edad, seleccionado al azar. Esta secuencia de eventos se repitió hasta que las hembras alcanzaron el final de su vida reproductiva. Llegado ese momento, se comprobó la fertilidad de cada uno de los machos emparejándolos con una hembra joven de 10-12 semanas de edad.

Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico, los datos obtenidos de hembras de reproducción continuada (alta paridad) o reproducción intermitente (baja paridad) fueron agrupados en 6 intervalos de 8 semanas comenzando a las 53 semanas de edad (la edad más pequeña de las hembras de reproducción continuada en el momento del primer parto). Se seleccionaron intervalos de 8 semanas porque las hembras de reproducción intermitente mostraron intervalos entre partos de (8 semanas).

Se aplicaron diseños anidados de efectos mixtos y fijos de análisis de la varianza (ANOVA) y covarianza (ANCOVA) para la comparación de medias. Los diseños anidados se emplearon para controlar la posible correlación entre ratones hermanos procedentes de una madre particular y evitar un aumento sesgado

del tamaño muestral (9). La prueba de Kolmogorov-Smirnov de una muestra se aplicó para comprobar que las variables estaban normalmente distribuidas. Con objeto de estabilizar la varianza, se utilizó la transformación arcoseno de los porcentajes. Las diferencias en la proporción de machos entre grupos se evaluó utilizando métodos de regresión logística binomial automatizada, basada en la selección de variables por pasos hacia adelante. Se aplicó la prueba binomial de una muestra para contrastar la hipótesis nula que la probabilidad de ser macho en cada grupo era de 0,5. El efecto del sistema de reproducción sobre la proporción de camadas con al menos una cría canibalizada se determinó usando un modelo log-lineal jerárquico basado en la eliminación por pasos hacia atrás de aquellos términos que no satisfacían el criterio para permanecer en el modelo. Los modelos log-lineal son similares a los de regresión múltiple, a excepción que están formulados para el análisis de datos categóricos. Los modelos log-lineal son útiles para revelar las complejas relaciones que en potencia pueden existir entre varias variables categóricas dispuestas en una tabla cruzada de múltiples vías. La prueba exacta de Fisher se utilizó para comparar frecuencias en tablas de contingencia de 2 x 2. La significatividad de una prueba se definió como P (0,05). El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el Paquete Estadístico para Ciencias Sociales (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

Tal como era de esperar por el diseño experimental, las hembras del grupo de reproducción continuada presentaron un número significativamente ($P < 0,0005$) mayor de partos con respecto al grupo de hembras de reproducción intermitente ($4,2 \pm 0,2$ partos vs. $2,3$ ($0,1$ partos; Fig. 1).

El porcentaje de camadas con al menos un lechal canibalizado fue significativamente ($P \leq 0,05$) mayor en el grupo de hembras con reproducción intermitente (Fig. 2). Este porcentaje aumentó significativamente ($P \leq 0,05$) a medida que se incrementó la edad de las madres.

Además, el grupo de hembras con reproducción intermitente exhibieron un tamaño de camada en el nacimiento ($P \leq 0,0005$; Fig. 3A) y en el destete ($P \leq 0,0005$; Fig. 3B) significativamente menor que el presentado por el grupo de hembras con reproducción continuada. Por otra parte, la mortalidad pre-destete de los lechales de hembras con reproducción intermitente fue significativamente ($P \leq 0,05$) mayor que la

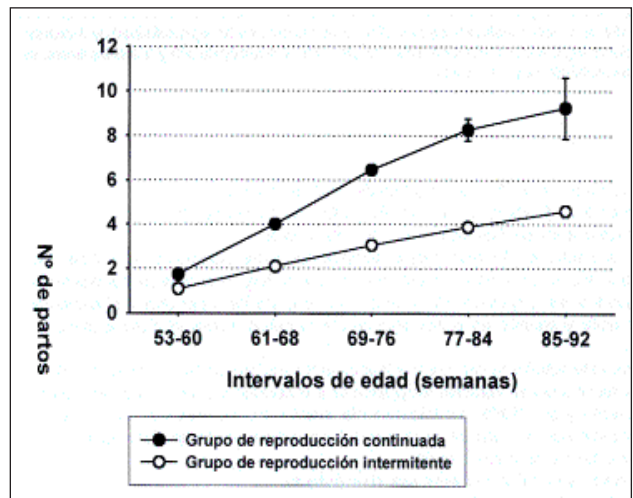


Figura 1

Efecto de la edad de las hembras sobre el número de partos experimentados por ratonas sometidas a un sistema de reproducción continuada o intermitente.

mortalidad pre-destete de los lechales del grupo de hembras con reproducción continuada (Fig. 3C). Los tamaños de camada en el nacimiento y en el destete disminuyeron significativamente a medida que aumentó tanto la edad de las hembras ($P \leq 0,001$ y $P \leq 0,002$, respectivamente) como el número de partos (covariable; $P \leq 0,05$ y $P \leq 0,05$, respectivamente). La mortalidad pre-destete se incrementó ($P \leq 0,001$) con la edad de las hembras y disminuyó a medida que aumentó el tamaño de la camada en el nacimiento

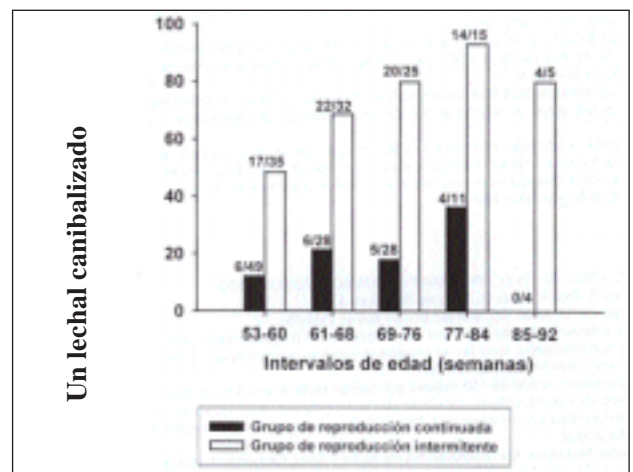


Figura 2

Efecto de la edad de las hembras sobre el porcentaje de camadas con al menos un lechal canibalizado en ratonas sometidas a un sistema de reproducción continuada o intermitente.

(covariable; $P \leq 0,001$; coeficiente de regresión = - 0,240 (0,111).

El porcentaje de machos en el nacimiento (Fig. 4A) y en el destete (Fig. 4B) no se vio afectado por el sistema de reproducción de las hembras, la edad de las hembras, ni el tamaño de la camada en el nacimiento. Sin embargo, el porcentaje total de machos en el nacimiento y en el destete fue significativamente menor a la frecuencia esperada del 50% en el grupo de hembras de reproducción continuada (44%,

232/523, $P \leq 0,05$, en el nacimiento y 43%, 217/501, $P \leq 0,005$, en el destete).

El peso de los lechales en el destete fue significativamente ($P \leq 0,0005$) menor en el grupo de hembras de reproducción intermitente que en el grupo de hembras de reproducción continuada (Fig. 5). El peso de los lechales en el destete aumentó ($P \leq 0,0005$) con la edad de las hembras, pero disminuyó a medida que aumentó el tamaño de la camada en el destete (covariable; $P \leq 0,0005$; coeficiente de regresión = - 0,710

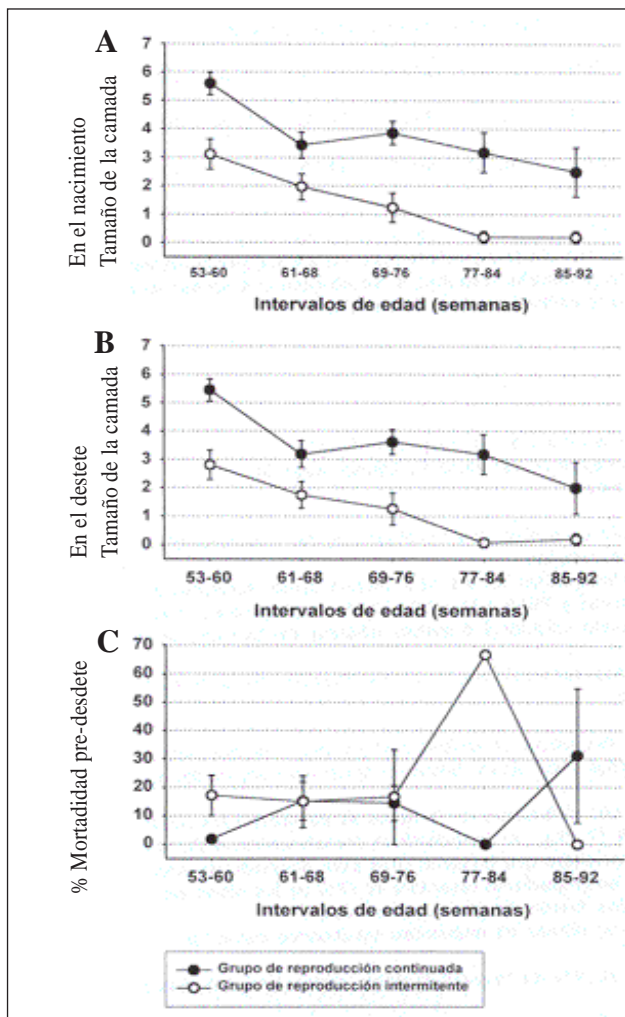


Figura 3

Efecto de la edad de las hembras sobre el tamaño de las camadas en el nacimiento (A) y en el destete (B) en ratonas sometidas a un sistema de reproducción continuada o intermitente. El panel C muestra el efecto de la edad de las hembras sobre el porcentaje de mortalidad pre-destete exhibido por los lechales procedentes de ratonas sometidas a un sistema de reproducción continuada o intermitente.

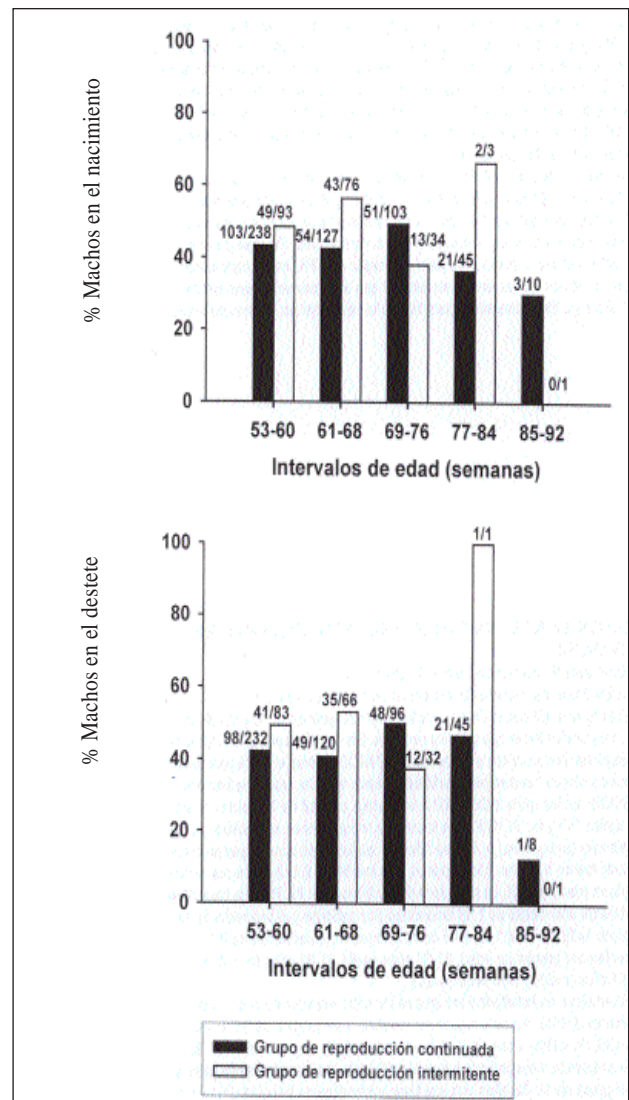


Figura 4

Efecto de la edad de las hembras sobre el porcentaje de machos en el nacimiento (A) y en el destete (B) en los lechales procedentes de ratonas sometidas a un sistema de reproducción continuada o intermitente.

$\pm 0,408$). Los machos presentaron un mayor peso corporal en el destete que las hembras ($P \leq 0,0005$; $12,1 \pm 0,1$ en machos vs. $11,5 \pm 0,1$ en hembras).

El sistema de reproducción continuada se asoció con una mayor mortalidad de las ratonas madres antes de concluir su vida reproductiva. En concreto, antes de terminar su vida reproductiva, se murieron 11 de las 23 (48%) hembras del grupo de reproducción continuada (8 por razones desconocidas, 2 durante el embarazo y 1 durante el parto). Por el contrario, sólo 7 de las 32 (22%) hembras con reproducción intermitente perecieron antes de concluir su vida reproductiva (2 durante el parto o pocos días después del mismo, 3 con signos de infección uterina tras practicar una necropsia y 2 por razones desconocidas).

Finalmente, una vez eliminadas del análisis las ratonas que murieron antes de terminar su vida reproductiva y tras añadir 4 semanas a la edad del último parto en el grupo de hembras con reproducción intermitente, para de esta forma corregir el sesgo ocasionado por el aislamiento de 4 semanas sufrido por estas hembras después de cada parto, no se encontraron diferencias significativas entre grupos con respecto a la edad de la madre en el último parto ($73,9 \pm 3,5$ semanas en el grupo de hembras con reproducción continuada vs. $80,0 \pm 1,7$ semanas en el grupo de hembras con reproducción intermitente). Tampoco se encontraron diferencias significativas entre grupos

con respecto a la edad de la madre en el último parto con al menos un hijo nacido vivo ($73,4 \pm 3,6$ semanas en el grupo de hembras con reproducción continuada vs. $67,3 \pm 2,0$ semanas en el grupo de hembras con reproducción intermitente). Todos los machos mostraron ser todavía fértiles cuando sus respectivas hembras alcanzaron el final de su vida reproductiva.

DISCUSIÓN

Aunque cabría esperar que un sistema de reproducción continuado redujese la viabilidad de las crías, debido a la demanda nutricional por parte de los lechales mientras la madre está gestante de la siguiente camada, nuestros datos muestran que un sistema de reproducción continuada (alta paridad) se asocia con un menor porcentaje de camadas con al menos un lechal canibalizado, mayor tamaño de camada tanto en el nacimiento como en el destete, menor mortalidad pre-destete de las crías y mayor peso corporal de los lechales en el destete, cuando se compara con un sistema de reproducción intermitente (baja paridad). Estos datos apoyan el trabajo de Schreiber et al. (8), el cual muestra que la supervivencia post-parto de las crías de ratón procedentes de hembras aisladas en un periodo pre y post-parto se ve altamente reducida comparando con el grupo de lechales procedentes de madres que permanecen continuamente con el macho.

Nuestro estudio también está en consonancia con el trabajo de Asdell et al. (10) que muestra que el proceso de reproducción por sí solo podría estimular la capacidad reproductiva de hembras de rata. En concreto, Asdell et al. (10) encontraron que las hembras vírgenes presentan una aparición más temprana de irregularidades y cese de los ciclos estrales, comparadas con hembras parideras. Es decir, a mayor paridad, mayor eficacia reproductiva.

Stephanson et al. (11) analizaron un grupo de mujeres suecas entre su primera y segunda gestación. Tras ajustar los datos a las características maternas (edad, nivel de educación, hábito fumador, país de nacimiento, etc) e historia reproductiva previa (mortalidad neonatal temprana, hijos de bajo peso para la edad gestacional en el primer parto, etc), observaron que intervalos de tiempo cortos entre gestaciones sucesivas, a diferencia de intervalos más prolongados, no se asocian con muerte fetal y mortalidad neonatal temprana. Este hecho ya había sido observado por Asdell et al. (10) en hembras de rata mediante la asociación de intervalos de tiempo cortos entre gestaciones con tamaños de camada mayores aunque, al con-

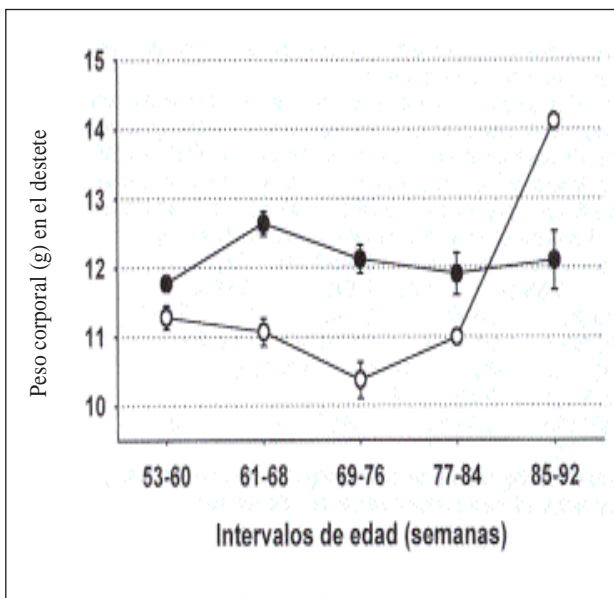


Figura 5

Efecto de la edad de las hembras sobre el peso corporal de los lechales procedentes de ratonas sometidas a un sistema de reproducción continuada o intermitente.

trario de lo observado en nuestro estudio, se estableció una relación inversa entre tamaño de camada y peso de las crías.

En el presente estudio, a pesar de la mayor eficacia reproductiva encontrada en el grupo de hembras con un sistema de reproducción continuada, las hembras presentaron una mayor mortalidad antes de concluir su vida reproductiva. Este hecho podría explicarse por los repetidos episodios de exposición a bajos recursos biológicos y nutritivos a los que se ven sometidas las hembras durante cada gestación y la lactancia.

Nass et al. (12) propusieron que, a pesar de que existe un descenso en la ciclicidad reproductiva y en la fertilidad asociado con el envejecimiento femenino en muchas especies de mamíferos (13-17), esta situación podría deberse también a otros factores no relacionados con la edad. Sus resultados demostraron que los ciclos estrales regulares y la secreción normal de gonadotropinas en ratas se podían mantener durante un mayor periodo de tiempo si éstas se emparejaban con machos fértiles. De hecho, encontraron que después de 5 meses de cohabitación con el macho, la regularidad de sus ciclos estrales a los 13-17 meses de edad fue similar al observado en hembras de 9-13 meses de edad que permanecían aisladas de los machos. Además, observaron que la magnitud y tiempo de la secreción de LH en hembras de 15 meses de edad que cohabitaban con machos eran similares a los de hembras más jóvenes de 9 meses de edad. Por otro lado, otros estudios muestran que hembras de rata de 10-12 meses de edad que no cohabitan con machos presentan un retraso, así como una menor secreción de LH durante el ciclo estral (18-21).

Miller et al. (22) también observaron que la magnitud del pico de LH en la tarde de proestro no cambia en hembras de rata entre los 9 y 14 meses de edad que cohabitan de forma continua con machos. Todos estos datos, por lo tanto, nos indican que la convivencia con machos no sólo retrasa el cese de la ciclicidad regular, sino que también interviene en el mantenimiento de la secreción normal de gonadotropinas en ratas.

Con un sistema de reproducción continuado, se asegura la posibilidad de estabilización social o familiar (8), ya que siempre es el mismo macho quien permanece con la hembra hasta el final de su vida reproductiva, evitándose, de este modo, cambios sociales que podrían alterar los ciclos estrales de las hembras. De hecho, la convivencia o condiciones sociales pueden influir en la edad a la cual las hembras dejan de ciclar de forma regular: las hembras cruzadas con machos alcanzan el final de su vida reproductiva más

tarde que las hembras que cohabitan con otras hembras (12). Por otra parte, se sabe que el hecho de vivir aisladas acelera la pérdida de ciclicidad en las hembras de rata (23).

A pesar de estas observaciones, en el presente estudio no hemos encontrado diferencias significativas con respecto a la edad de la madre en el último parto entre los dos grupos de reproducción. Este resultado podría deberse al hecho de que las ratonas utilizadas en el estudio se aparearon por primera vez con machos a una edad reproductiva avanzada, momento en el cual la reserva folicular está muy mermada y, por tanto, el factor paridad o sistema reproductivo utilizado ya no podría ejercer su efecto sobre el cese de la vida reproductiva de las hembras.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido realizado gracias a la ayuda FIS 01/0138 del Instituto de Salud Carlos III, Fondo de Investigación Sanitaria, Ministerio de Sanidad y Consumo y la ayuda BFI2003-04761 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

BIBLIOGRAFÍA

1. **Gosden RG, Faddy MJ.:** Ovarian depletion, and steroidogenesis. *Exp Gerontol.* 1994; 29: 265-74.
2. **Mazaud S, Guigon CJ, Lozach A, Coudouel N, Forest MG, Coffigny H, Magre S.:** Establishment of the reproductive function and transient fertility of female rats lacking primordial follicle stock after fetal gamma-irradiation. *Endocrinology* 2002; 143: 4775-87.
3. **McGee EA, Hsueh AJ.:** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev.* 2000; 21: 200-14.
4. **Pedersen T, Peters H.:** Follicle growth and cell dynamics in the mouse ovary during pregnancy. *Fertil Steril* 1971; 22: 42-52.
5. **LaPolit PS, Yu SM, Lu JKH.:** Early treatment of young female rats with progesterone delays the aging-associated reproductive decline: A counteraction by estradiol. *Biol Reprod* 1988; 38: 987-995.
6. **Cramer DW, Welsh WR, Cassells S, Scully RB.:** Mumps, menarche, menopause, and ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 147: 1-6.
7. **Jones EC.:** 1957. Thesis, University of Birmingham.
8. **Schreiber RA, Ferret LK, Holbert D.:** The effects of parity, litter size, season, and breeding protocol on the number of DBA/2J Ten mice available for weaning. *Lab Anim Sci*, 1975; 25: 602-8.
9. **Wainwright PC.:** Issues of design and analysis rela-

ting to the use of multiparous species in developmental nutritional studies. *J Nutr* 1997; 128: 661-3.

10. **Asdell SA, Bogart R, Sperling G.:** The influence of age and rate of breeding upon the ability of the female rat to reproduce and raise young. *Mem Cornell Univ Agric Exp Stat* 1941; 238: 1-26.
11. **Stephanson O, Dickman PW, Cnattingius S.:** The influence of interpregnancy interval on the subsequent risk of stillbirth and early neonatal death. *Obstetr Gynecol* 2003; 102: 101-8.
12. **Nass TE, LaPolt PS, Lu JKH.:** Effects of prolonged caging with fertile males on reproductive functions in aging female rats. *Biol Reprod* 1982; 27: 609-15.
13. **Jones EC, Krohn PL.:** The relationships between age, numbers of oocytes and fertility in virgin and multiparous mice. *J Endocrinol* 1961; 21: 469-94.
14. **Talbert GB.:** Effect of maternal age on reproductive capacity. *Am J Obstet Gynecol* 1968; 102: 451-77.
15. **Meites J, Huang HH.:** Relation of neuroendocrine system to loss of reproductive functions in aging rats. *Neuroendocrine Regulation of Fertility* (Anand Kurman ed.) Karger, Basel 1976: 246-58.
16. **Finch CE.:** Reproductive senescence in rodents: factors in the decline of fertility and loss of regular estrous cycles. *The Aging Reproductive System* (E.L. Schneider ed.) Raven Press, New York 1978: 193-292.
17. **Lu JKH, Hopper BR, Vargo TM, Yen SSC.:** Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod* 1979; 21: 193-203.
18. **Gray GD, Tennent B, Smith ER, Davidson JM.:** Luteinizing hormone regulation and sexual behavior in middle-aged female rats. *Endocrinology* 1980; 107: 187-94.
19. **Cooper RL, Conn PM, Walker RF.:** Characterization of the LH surge in middle-aged female rats. *Biol Reprod* 1980; 23: 611-5.
20. **Wise PM.:** Alteration in proestrous LH, FSH, and prolactin surges in middle-aged rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982; 169: 348-54.
21. **Nass TE, LaPolt PS, Judd HL, Lu JKH.:** Alterations in ovarian steroid and gonadotrophin secretion preceding the cessation of regular oestrous cycles in ageing female rats. *J Endocrinol* 1984; 100: 43-50.
22. **Miller AE, Wood SM, Riegler GD.:** The effect of age on reproduction in repeatedly mated female rats. *J Gerontol* 1979; 34: 15-20.
23. **Le Fevre J, McClintock MK.:** Isolation accelerates the rate of reproductive senescence and alters its predictors in female rats. *Horm Behav* 1991; 25: 258-72.