

EVALUACIÓN ESTACIONAL DE LA PRODUCCIÓN DE ESTEROIDES SEXUALES EN TESTÍCULOS DEL RATÓN DE OREJAS OSCURAS (*PEROMYSCUS MELANOTIS*, ALLEN & CHAPMAN, 1897) DE DIFERENTES CLASES DE EDAD

Arturo SALAME-MÉNDEZ^{1*}, Alondra CASTRO-CAMPILLO², Isaías SALGADO-UGARTE^{2,4}, Enrique MENDIETA-MÁRQUEZ³, Joaquín HERRERA-MUÑOZ³ Y José RAMÍREZ-PULIDO²

Departamentos de ¹Biología de la Reproducción, ²Biología y ³Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Av San Rafael Atlixco # 186. Col. Vicentina. Iztapalapa, CP 09340. Apdo. Postal 55-535. México D.F. MÉXICO

⁴Biología. FES "Zaragoza", UNAM. CP 09220, México D. F. MÉXICO

E-mail: asam@xanum.uam.mx

RESUMEN

Se evaluaron la producción ontológica y estacional de esteroides sexuales (ES) en testículos de ratones de orejas oscuras (*Peromyscus melanotis*) asignados a cinco grupos de edad, de acuerdo con el desgaste de las coronas molares. La producción de testosterona e intermediarios $\Delta 4$ (progesterona y androstendiona) se incrementan conforme los roedores alcanzan la edad adulta y decrecen con el envejecimiento, pero sin dejar de producirse. Desde un punto de vista endocrino, las cinco categorías de edad estudiadas en esta especie, se reagrupan en tres edades: juveniles (juveniles y subadultos), adultos (jóvenes y maduros) y viejos. El análisis de la producción estacional de ES sugiere que en esta especie, se presenta un patrón unimodal con su pico en el verano. Estas son las primeras evidencias sobre la producción de ES que se documentan en individuos de vida libre, tanto para el género *Peromyscus* como para *P. melanotis*.

Palabras Clave: Roedores, *Peromyscus melanotis*, testículos, esteroides sexuales, vida libre, México.

ABSTRACT

Ontological and seasonal production of sexual steroids (SS) were evaluated in testicles of dark-eared mice (*Peromyscus melanotis*), assigned to five age groups, according to wear of molar crowns. Testicular production of testosterone and $\Delta 4$ intermediates (progesterone and androstendione) increases with the onset of adulthood and decreases with senescence, though it does not stop completely. From an endocrine point of view, the five age categories become three age stages: juveniles (juveniles and subadults), adults (young and mature), and old individuals. Analysis of seasonal production of SS in this species, suggests a one-modal pattern with its peak in Summer. These are the first evidences on production of SS documented from free-living individuals of both the genus *Peromyscus* and *P. melanotis*.

Key Words: Rodents, *Peromyscus melanotis*, testes, sexual steroids, wild mice, Mexico.

INTRODUCCIÓN

La reproducción de los roedores, como en otros órdenes de mamíferos, está relacionada con la función de las gónadas, en las cuales se lleva a cabo la gametogénesis y la producción de hormonas, destacando entre éstas las hormonas

esteroides (HE). Las HE regulan diferentes procesos en la biología reproductiva de las especies (*v. gr.* despliegue de caracteres sexuales secundarios durante la época de apareamiento) y se clasifican, tanto por sus características físico-químicas como por su función, en progestinas, andrógenos, estrógenos y corticosteroides (mineralocorticoides y glucocorticoides).

A los tres primeros grupos de hormonas también se les conoce como hormonas esteroides sexuales debido a su participación en diversos procesos de la reproducción sexual. La progesterona (P4) es la hormona esteroide representativa de las progestinas; la testosterona (T) de los andrógenos y el estradiol (E2) de los estrógenos. Cada una de estas hormonas tiene un papel en la función reproductiva; por ejemplo, la P4 coadyuva a la implantación del embrión sobre el endometrio; la T regula etapas específicas de la espermatogénesis y el E2 estimula la ruptura del folículo durante el proceso de la ovulación.

En los machos la producción de andrógenos, y en particular de la T, se lleva a cabo en las células de Leydig del tejido intersticial. Su síntesis se inicia con la biotransformación del colesterol en pregnenolona (P5), esteroide a partir del cual se biosintetizan los cuatro grupos de HE. La producción de andrógenos, como son la dehidroepiandrosterona (DHA), el androstendiol (AD), la androstendiona (A) y la T, se efectúa por dos vías esteroideogénicas alternas: la $\Delta 5$ y la $\Delta 4$. Esta terminología se refiere a la posición del enlace insaturado de los esteroides intermediarios que se forman durante los procesos de síntesis de la testosterona. Los esteroides intermediarios de la vía $\Delta 5$ son la 17hidroxi-pregnenolona (17P5), la DHA y el AD. Por su parte, en la vía $\Delta 4$ los esteroides intermediarios son la P4, la 17hidroxi-progesterona (17P4) y la androstendiona (A). El que prevalezca una vía sobre la otra depende de la especie; por ejemplo, en ratones (*Mus musculus*, *v. gr.* cepa BALBc) y ratas (*Rattus norvegicus*) de laboratorio la vía que predomina es la $\Delta 4$ (Henricks 1991, Lippset 1986).

La ontogenia de los eventos fisiológicos, endocrinos y etológicos, característicos de su respectiva biología reproductiva, está ampliamente documentada en la rata y el ratón de laboratorio (Chambers 1995, Meites 1995, Ojeda & Urbanski 1994, vom Saal *et al.* 1994, Vornberger *et al.* 1994). En cambio, en ratones silvestres, en particular del género *Peromyscus*, solo existe algo de esta información (*v. gr.* Feist *et al.* 1988, Dewsbury 1981, Steger *et al.* 1980, Whitsett *et al.* 1979, Finlay 1974, Eisenberg 1968, Eleftheriou 1968), sin embargo, la mayoría de los datos han sido obtenidos en estudios realizados bajo condiciones de laboratorio; es decir, a partir de ejemplares criados en una colonia en el biotero, o bien, después de adaptar a los animales capturados en el campo a ciclos circadianos controlados, mantenerlos a una temperatura constante y suministrarles agua y alimento balanceado (Purina®) *ad libitum*, entre las condiciones más comunes. En consecuencia, los resultados obtenidos bajo tales condiciones, aun cuando son relevantes, no permiten conocer lo que sucede en animales de vida libre.

Una alternativa para conocer tanto los procesos fisiológicos como endocrinos involucrados en la ontogenia reproductiva de ratones silvestres del género *Peromyscus* es capturar ejemplares de distintas edades en el campo y realizar de manera inmediata

la determinación de sus hormonas esteroides; es decir, sin que se les exponga a condiciones controladas. Sin embargo, uno de los problemas que se enfrentan en este tipo de estudios es que, a diferencia de los animales criados en una colonia (Millar & Iverson 1976, Dayson & Irland 1972), se desconoce la edad postparto absoluta de los individuos capturados directamente en el campo, ya sea en días o en semanas.

Para solventar este problema, decidimos recurrir a criterios extensamente usados en trabajos mastozoológicos (Anderson 1989) que, si bien implican una aproximación indirecta de la ontogenia de las especies silvestres, permiten obtener información interesante con relación a grupos de individuos asignados a una categoría discreta de edad. Entre los criterios empleados se encuentra el aspecto del pelaje (aparición, textura, color y presencia de mudas), el cual permite establecer grupos de individuos inmaduros (infantes y juveniles) y maduros (adultos y viejos). Además, en roedores con dientes molariformes de crecimiento continuo, como es el caso del género *Peromyscus*, se usa el desgaste de la superficie oclusal de las coronas respectivas (Hooper 1952, Hoffmeister 1951). Cuando se combinan ambos criterios (Castro-Campillo *et al.* 1999, Williams & Ramírez-Pulido 1984, Schmidly 1973, 1972), se puede considerar un mayor número de categorías de edad (infantes; juveniles; subadultos; adultos jóvenes; adultos maduros; adultos viejos).

Con la ayuda de esos criterios, y a partir de la posición y el tamaño de los testículos (longitud y anchura), se suele inferir la condición reproductiva de ratones machos silvestres (machos activos = testículos escrotados; machos inactivos = testículos inguinales) en diferentes grupos de edad (Romero-Almaraz *et al.* 2000, Kunz *et al.* 1996). Asimismo, la incidencia de "machos activos" a lo largo del año (junto con los datos reproductivos de las hembras y los datos de la estructura poblacional), permite determinar el patrón reproductivo poblacional de la especie en estudio (*v. gr.* Chávez-Tapia & Gallardo-Villegas 1993, Adler & Tamarin 1983).

Sin embargo, para conocer de manera más precisa algunos procesos reproductivos durante la ontogenia de ratones silvestres de vida libre, es necesario valorar tanto parámetros fisiológicos como endocrinos, por lo que en este trabajo se evalúa la producción estacional de P5, T y sus intermediarios $\Delta 4$, a partir de la biotransformación *in vitro* de colesterol, en los testículos de ratones de orejas oscuras (*Peromyscus melanotis* J. A. Allen & Chapman 1897) asignados a distintos grupos de edad, de acuerdo a los criterios mencionados arriba. Este ratón de campo cuasi-endémico para México (Greenbaum *et al.* 1978, Bowers 1974, Bowers *et al.* 1973, consideran que hay algunas poblaciones en Arizona) es la especie monotípica (Hall 1981, Osgood 1909) con distribución más amplia en el territorio nacional (Ramírez-Pulido & Castro-Campillo 1993) y constituye una de las especies pequeñas del grupo *maniculatus* dentro del género (Hall 1981).

MATERIALES y MÉTODOS

Material Biológico. Los ejemplares de *Peromyscus melanotis* fueron recolectados mensualmente de diciembre de 1998 a diciembre de 1999 en el Parque Nacional

Cumbres del Ajusco, D. F. (0.85 Km N, 3.5 Km W Ecuamil, 3180 msnm; 19° 13' 37" N, 99° 15' 37" W). Su colecta se hizo utilizando trampas Sherman® (8 x 9 x 23 cm, H. B. Sherman Traps, Inc. Tallahassee, Florida, USA) cebadas con hojuelas de avena. El día de su captura, los animales fueron trasladados al laboratorio de Mamíferos de la UAM-Iztapalapa (UAMI) en donde se les mató por dislocación cervical.

De cada ratón se obtuvieron las medidas convencionales (Kunz *et al.* 1996, Hall 1981), y se les preparó como ejemplares de referencia (Ramírez-Pulido *et al.* 1989); depositándose en la Colección de Mamíferos de la UAMI como cráneo y esqueleto. La estimación de la edad se hizo considerando el desgaste de la superficie oclusal de los dientes molariformes *sensu* Hoffmeister (1951) y cada animal fue asignado a una de cinco categorías de edad (juveniles = edad I; subadultos = edad II; adultos jóvenes = edad III; adultos maduros = edad IV; adultos viejos = edad V).

El periodo considerado para cada una de las estaciones del año se hizo por trimestres: marzo, abril y mayo = primavera; junio, julio y agosto = verano; septiembre, octubre y noviembre = otoño, y diciembre, enero y febrero = invierno.

Esteroides Sexuales de Referencia. Se usaron (nomenclatura *sensu* Kime 1995): colestano-5-3 β -ol (colesterol); 3 β -hidroxi-4-pregnano-5-20-ona (pregnenolona, P5); 4-pregneno-3,20-diona (progesterona, P4); 17 α -hidroxi-4-pregneno-3,20-diona (17-hidroxiprogesterona, 17P4); 4-androsteno-3,17-diona (androstendiona, A); 17 β -hidroxi-4-androsteno-3-ona (testosterona, T). Cada uno fue obtenido de Steraloids® (Pawling, NY) y purificado, previo uso, por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando como fase móvil tolueno:acetato de etilo (2:1, v/v).

Biotransformación de Colesterol Tritiado. A 59 ratones correspondientes a las categorías de edad I (juveniles, n = 8); II (subadultos, n = 12); III (adultos jóvenes, n = 15); IV (adultos maduros, n = 13) y V (adultos viejos, n = 11), se les extirpó el testículo derecho, al cual se le desprendió la túnica albugínea.

El tejido gonadal se colocó en un tubo Eppendorf que contenía una disolución tampón Krebs-Ringer con glucosa (KRBG, pH 7) sin cofactores metabólicos, a la cual se le adicionaron 20,000 cpm de colesterol tritado (1,2-³H actividad específica -ae-47.7 Ci/mmol) (C27³H) (New England Nuclear®, Boston, MA). El precursor tritado se purificó previo uso por CCF, utilizando una disolución de tolueno: acetato de etilo (2:1, v/v).

Los tubos experimentales (con tejido) y los tubos control (sin tejido), se incubaron a 36°C durante 1 hr. Para detener las reacciones metabólicas se congelaron y se almacenaron los tubos a -70°C hasta su análisis.

Homogeneización de Tejidos. Una vez que fueron descongelados los tubos, tanto el tejido como la disolución de incubación se transfirieron a un homogenizador de vidrio. El tejido homogeneizado se vertió a un tubo cónico del cual se tomaron dos alícuotas; una para evaluar la biotransformación del precursor (C27³H) en cada uno de los esteroides sexuales a analizar y la otra para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero de bovino para obtener la curva estándar.

Extracción de Esteroides Totales. La extracción de los esteroides totales contenidos en las alícuotas de cada homogeneizado se hizo por duplicado con éter dietílico. Una vez mezclado vigorosamente el disolvente y el homogeneizado, la fase orgánica -que contenía el extracto total de esteroides- se separó de la fase acuosa colocando los tubos en hielo-seco: acetona. Congelada la fase acuosa, la fase orgánica se decantó a otro tubo cónico y se evaporó a sequedad. Para valorar el porcentaje de eficiencia en la extracción total de esteroides se utilizaron muestras al azar y se les tomó una alícuota de 100 ml que se transfirió a un tubo de ensaye, al cual se le agregaron . 1,000 cpm de testosterona tritlada (1,2,6,7,16,17-³H) (ae 139 Ci/mmol) (New England Nuclear[®], Boston, MA) como trazador previamente purificada por CCF, utilizando tolueno: acetato de etilo (2:1, v/v). El promedio de eficiencia total de extracción fue del 98.5±0.8% y los resultados de cada una de las valoraciones de biotransformación se corrigieron a partir del porcentaje de recuperación.

Separación y Valoración de Esteroides Sexuales. A cada tubo conteniendo su correspondiente extracto total de esteroides, así como a cada tubo control, se le agregó una disolución de éter dietílico: metanol (2:1, v/v) que se transfirió a cromatoplasmas de vidrio (20 x 20 cm) cubiertas con gel de sílice e indicador de radiación UV (Merck[®]). La P5, P4, 17P4, A y T contenidas en los extractos aplicados sobre las cromatoplasmas, se separaron por CCF, utilizando como fase móvil los siguientes sistemas cromatográficos: i) benceno; ii) benceno:acetato de etilo (7:3, v/v) y iii) benceno:metanol (95:5, v/v). La zona correspondiente a cada uno de los esteroides de referencia aplicados en las cromatoplasmas, se visualizó con una lámpara de UV (254 y 366 nm) y el reactivo de Oërtel (ácido sulfúrico:etanol, 2:1, v/v). Luego se raspó el área del esteroide a ser valorado que coincidía con la distancia relativa de separación (Rf) de cada esteroide de referencia. El esteroide adsorbido al sílice se separó con disolución de éter dietílico: metanol (1:1, v/v) y la elusión se recolectó en viales de vidrio.

A cada vial se le agregó Instagel (Packard[®]), cuantificándose el metabolito radiactivo en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Beckman[®], LS-7000) con una eficiencia máxima para tritio del 53%.

La producción de P5, de T y sus intermediarios $\Delta 4$ se estimó a partir de valorar el porcentaje de biotransformación del precursor (C27³H) en cada uno de los esteroides por cada 100 mg de proteína gonadal por hora de incubación.

Análisis Estadísticos. Para examinar el comportamiento promedio de los esteroides sexuales por edad y estación, se aplicaron análisis de varianza (ANOVAS) de una o dos vías de clasificación, seguidos por pruebas a posteriori de Bonferroni (Winer *et al.* 1991). En todas las comparaciones el nivel de significancia considerado fue de $p= 0.05$. La diferencia de nivel de la concentración de los esteroides, se representa gráficamente con diagramas de caja (Salgado-Ugarte 1992). Asimismo, con el propósito de manifestar las tendencias (perfiles) de aumento-decremento de las concentraciones de cada esteroide, tanto por edad como por estación del año, se hicieron gráficos bivariados de dispersión en los que se enlazaron las medianas de cada valor. Los

cálculos se realizaron con los algoritmos contenidos en el paquete estadístico Stata® (StataCorp 2001).

RESULTADOS

En la figura 1 se muestran los esteroides producidos a partir de la biotransformación de colesterol, conforme se lleva al cabo su biosíntesis (P5, P4, A y T). Nótese que el esteroide sexual de mayor producción fue la pregnenolona (P5), seguido por la testosterona (T), androstendiona (A) y progesterona (P4), respectivamente (Fig. 1). Asimismo, cabe destacar que la 17hidroxi-progesterona (17P4) estuvo por debajo del rango mínimo de detección o “quenching” (radiactividad detectada por el espectrofotómetro en los viales que contienen únicamente el líquido de centelleo). En consecuencia, los datos obtenidos de este último esteroide no se consideraron para estimar su producción.

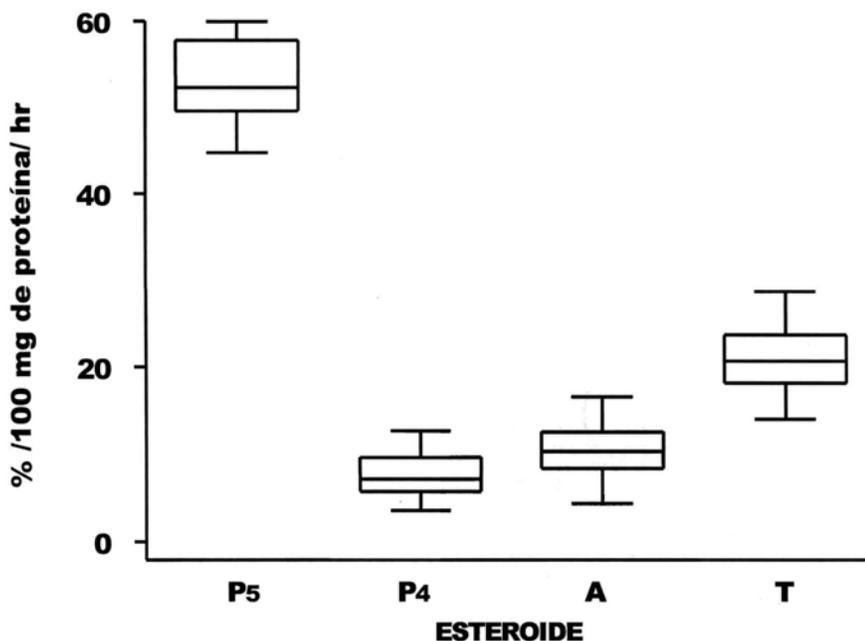


Figura 1

Producción de esteroides sexuales (ES) por los testículos de *Peromyscus melanotis*. Los ES se presentan de izquierda a derecha conforme al orden en que se lleva a cabo su biosíntesis en la ruta $\Delta 4$. La síntesis de P5 (pregnenolona), P4 (progesterona), A (androstendiona) y T (testosterona), están referidas como el porcentaje de biotransformación de colesterol tritizado ($C27^3H$) en cada uno de los esteroides enlistados por cada 100 mg de proteína gonadal por una hora de incubación a $36^{\circ}C$. En los diagramas de caja, de abajo hacia arriba, las líneas verticales indican el valor mínimo y máximo; los límites de las cajas corresponden al percentil 25 y 75, y la línea en el interior de la caja es el valor de la mediana.

La producción de P5, P4, A y T se muestra para cada grupo de edad, considerando a los individuos capturados en cada estación (Fig. 2). Aunque no se presentaron diferencias significativas ($p= 0.05$) en la producción de ninguno de los esteroides entre los grupos de edad, el comportamiento de los datos permite dilucidar su perfil de producción. En todos los esteroides, la producción tendió a ser menor en los ratones juveniles (edad I), incrementándose en los ratones subadultos (edad II) para alcanzar su máximo nivel en los ratones adultos jóvenes (edad III). Posteriormente, la producción tiende a disminuir nuevamente en los ratones adultos maduros (edad IV), siendo el descenso más patente en los ratones viejos (edad V). Sin embargo, en esta última parte, y a diferencia de los esteroides sexuales (P4, A y T) en donde la producción es semejante entre ratones juveniles y viejos, en la P5 la producción tiende a ser mayor en los ratones viejos que en los juveniles.

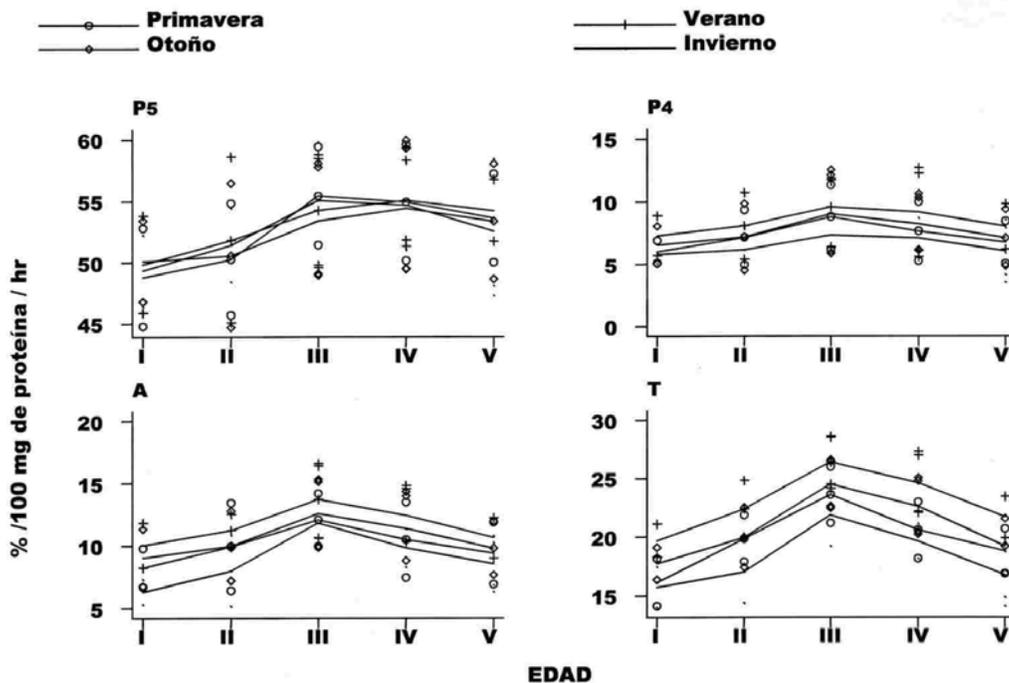


Figura 2

Producción de esteroides sexuales por los testículos de *Peromyscus melanotis* de diferente edad. La categoría de edad I corresponde a los ratones juveniles; la II a los subadultos; la III a los adultos jóvenes; la IV a los individuos adultos maduros, y la V corresponde a los ratones viejos. La designación de las cinco categorías de edad se hizo a partir del desgaste de la superficie oclusal de los dientes molariformes sensu Hoffmeister (1951). La producción de P5 (pregnenolona), P4 (progesterona), A (androstendiona) y T (testosterona), están referidas como se menciona en la Figura 1.

Cuando los datos se analizaron considerando la producción estacional de esteroides en los grupos de edad (Fig. 3), tampoco se encontraron diferencias significativas ($p=$

0.05). No obstante, como en el caso anterior, el comportamiento estacional en la producción de P5 es diferente al de los demás esteroides. En este esteroide la producción individual siguió diversos patrones de aumento-decremento, de acuerdo con el grupo de edad, que no tiene un perfil general relacionado con la estación del año. En cambio, en la producción de P4, A y T, los ratones de todas las edades muestran una tendencia de aumento en la producción de la primavera al verano, cuando alcanzan el valor máximo, para disminuir paulatinamente hacia el otoño y alcanzar los valores más bajos en el invierno.

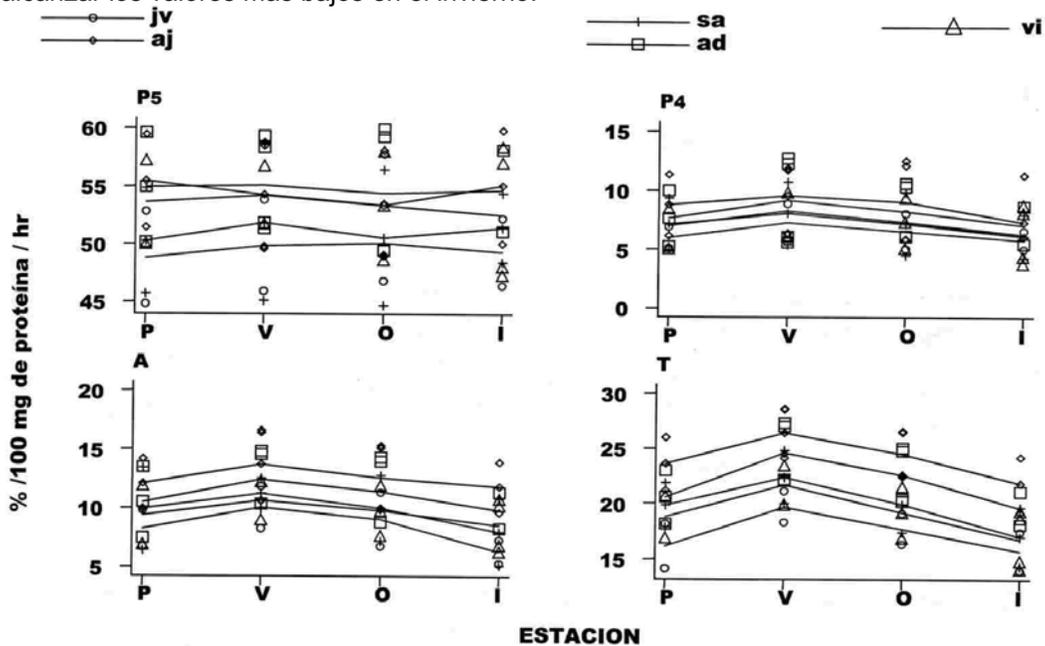


Figura 3

Producción estacional de esteroides sexuales por los testículos de *Peromyscus melanotis*. En donde juv se refiere a los ratones juveniles de la categoría I; sa a los subadultos de categoría II; aj son los ratones adultos jóvenes de la categoría de edad III; ad son los individuos adultos maduros de la categoría IV, y vi son los ratones viejos correspondientes a la categoría de edad V. La producción de P5 (pregnenolona), P4 (progesterona), A (androstendiona) y T (testosterona), están referidas como se menciona en la Figura 1.

DISCUSIÓN

El hecho de que la pregnenolona (P5) fuese el esteroide de mayor producción en *Peromyscus melanotis* es congruente con lo descrito para la biosíntesis de las hormonas esteroides en otros mamíferos (Makin 1975), ya que, por un lado, es el primer esteroide producido a partir de la biotransformación del colesterol, y por otro lado, es la materia prima para la producción de las hormonas esteroides.

Asimismo, la presencia de P4 y A permite constatar que la biosíntesis de testosterona (T) se realiza por la vía $\Delta 4$ en *P. melanotis*. De hecho, también se detectó

la 17P4, aún cuando su producción no pudo medirse. Asimismo, los crecientes niveles de producción encontrados en P4 y A, intermediarios de la ruta $\Delta 4$, sugieren una eficiente conversión hacia T. Sin embargo, para dilucidar si la T también es sintetizada por la vía $\Delta 5$ en *P. melanotis*, es necesario evaluar la producción de los respectivos esteroides intermediarios (17P5, DHA y AD); estos análisis también permitirían determinar cuál de las dos rutas metabólicas predomina en esta especie.

Los perfiles de producción de P4, A y T obtenidos para ratones de distintas edades, permiten establecer la ontogenia de la producción de estos esteroides sexuales en *P. melanotis*. Así, la producción de andrógenos es baja en los ratones jóvenes, los cuales se hallan en pleno desarrollo por lo que es poco plausible que participen en la reproducción. Luego la producción tiende a aumentar conforme se va alcanzando la maduración sexual en los subadultos, quienes podrían estar ya listos para participar en los eventos reproductivos, pero cuya intervención estaría controlada por otros factores como la apariencia externa y las conductas sociales. La producción de andrógenos tiende a alcanzar su mayor producción en los adultos jóvenes y maduros, los cuales son individuos definitivamente activos en la reproducción. Finalmente, la producción de andrógenos en los testículos de individuos viejos de *P. melanotis* vuelve a disminuir al nivel de los subadultos y juveniles, indicando una menor capacidad de síntesis en estos animales. La participación de los animales viejos en la reproducción de la población puede disminuir o no, ya que cuentan con la capacidad y la experiencia para una reproducción exitosa.

El perfil ontogénico de la producción gonadal de T y de sus intermediarios $\Delta 4$ (P4 y A) en *P. melanotis* es congruente con el de roedores de laboratorio (Meites 1995; vom Saal *et al.* 1994; Hafez 1970), en los cuales se ha demostrado que al avanzar la edad, la androgénesis (y la espermatogénesis) disminuye pero no cesa. Así, tanto en *P. melanotis* como en la rata y en el ratón de laboratorio, la ontogenia reproductiva (que se inicia en la pubertad, se mantiene en la edad adulta y disminuye parcial o totalmente en la vejez) muestra un incremento inicial de la esteroidogénesis que alcanza su máximo en la edad adulta, seguido por un paulatino decremento en la producción de las hormonas esteroides sexuales. Esta producción diferencial es responsable de los distintos estadios fisiológicos por los que pasa el individuo durante la ontogenia de su vida reproductiva.

El incremento en la producción de P4, A y T entre los ratones juveniles y subadultos con respecto de los adultos jóvenes, indica que los subadultos están en transición hacia la pubertad y, con ello, hacia la madurez sexual. Por su parte, la ausencia de diferencias en la concentración de esteroides entre los ratones adultos jóvenes y adultos maduros, los ubica en un mismo grupo, aún cuando sean morfológicamente diferentes en términos del desgaste dental. Sin embargo, se aprecia una etapa de transición de este grupo hacia los animales viejos, ya que en los ratones adultos, la producción de T y de sus dos intermediarios $\Delta 4$, tiende a descender, lo cual sugiere que a partir de esta categoría de edad se da el paso hacia la vejez. En breve, los resultados obtenidos para *P. melanotis*, permiten reagrupar a las cinco categorías de edad consideradas a partir del desgaste dental en tres grupos con características particulares de esteroidogénesis: juveniles (grupos de edad I y II), adultos (grupos III y IV) y viejos (grupo V).

Por su parte, el perfil estacional de producción de esteroides sexuales en los testículos de *P. melanotis* demuestra que la de P5 se sintetiza durante todo el año, independientemente de la edad de los individuos, ya que fue similar en los testículos de ratones juveniles, subadultos, adultos jóvenes, adultos maduros y viejos. Lo anterior indica que en *P. melanotis*, la producción de este precursor es constante durante todo el año, independientemente de la edad de los individuos.

En cambio, en el caso de los demás esteroides (P4, A y T), los resultados evidencian una producción diferencial a lo largo del año, con su mayor síntesis en el verano. El perfil estacional de producción de esteroides coincide con el tamaño máximo que alcanzan los testículos y que se da en los meses de junio y, especialmente, julio (datos no publicados de un estudio que se está realizando sobre el patrón reproductivo de las mismas poblaciones). Aún cuando las diferencias entre las estaciones no fueron significativas, el perfil obtenido aquí y la recrudescencia de los testículos con un solo pico en el verano, sugieren un patrón de reproducción unimodal en la población estudiada. Probablemente este patrón está ligado con las características ecológicas del área de estudio en cuanto a la disponibilidad de alimento, ya que las etapas fenológicas de la vegetación dependen del régimen de lluvias. Para abordar estas ideas, actualmente estamos analizando la producción de esteroides en los tejidos gonadales de las hembras, así como el patrón reproductivo de la misma población.

En conclusión, los datos presentados en este trabajo son los primeros tanto para el género como para la especie y, en conjunto, permiten establecer que en machos silvestres de *Peromyscus melanotis*, la producción gonadal de testosterona e intermediarios $\Delta 4$ se incrementa conforme los machos se desarrollan hasta alcanzar la madurez sexual y decrece con el envejecimiento, pero sin dejar de producirse. Además, desde un punto de vista endocrino, los animales examinados se agrupan en tres edades: juveniles, adultos y viejos. Finalmente, el perfil de producción de T por la vía $\Delta 4$ en la gónada masculina, sugiere que en esta especie hay una tendencia a aumentar en el verano.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro reconocimiento a Juan Patiño Rodríguez, técnico recolector y taxidermista de la Colección de Mamíferos de la UAMI, por su trabajo de campo y de gabinete. A la Biól. Olga Moreno Ramos por su ayuda en las colectas y al Q.F.B. Héctor Macías Hernández por su asistencia en el procesamiento de muestras para este estudio. Agradecemos a los dos revisores anónimos, cuyos comentarios coadyuvaron a mejorar la presentación final del trabajo. Este estudio fue apoyado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAMI (C.B.S.-144.03.07 para A.S.M. y C.B.S.-143.02.14 para A.C.C.) y parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT-400200-5R29117N y 2002-COI-39619-Q para J.R.P.).

LITERATURA CITADA

- Adler, G. H. & R. H. Tamarin.** 1983. Demography and reproduction in island and mainland white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in southeastern Massachusetts. *Can. J. Zool.* 62:58-64.
- Allen, J. A. & Chapman.** 1897. On a collection of mammals from Jalapa and Las Vigas, State of Veracruz, Mexico. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 9:197-203.

- Anderson, P. K.** 1989. *Dispersal in rodents: a resident fitness hypothesis*. Amer Soc Mamma., Spec Publ., 9:XX+141.
- Bowers, J. H.** 1974. Genetic compatibility of *Peromyscus maniculatus* and *Peromyscus melanotis*, as indicated by breeding studies and morphometrics. *J. Mamm.* 55:720-737.
- Bowers, J. H., R. J. Baker & M. H. Smith.** 1973. Chromosomal, electrophoretic, and breeding studies of selected population of deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and black-eared mice (*P. melanotis*). *Evolution* 27:378-386.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Castro-Campillo, A., H. R. Roberts, D. J. Schmidly & R. D. Bradley,** 1999. Systematic status of *Peromyscus boylii ambiguus* based on morphologic and molecular data. *J. Mamm.* 80:1214-1231.
- Chambers, K. C.** 1995. The roles of regulatory and modulatory processes in the decline of reproductive behavior of males. Chp 7. Pp. 119-150 *In:* Dipak K. Sarkar and Charles D. Banes (Eds) *The Reproductive Neuroendocrinology of Aging and Drug Abuse*. CRC Press. Boca Raton, Fl. USA.
- Chávez-Tapia, C. & R. Gallardo-Villegas.** 1993. Demografía y reproducción de *Neotomodon alstoni* en la Sierra del Ajusco, México. Parte III: Conducta y Ecología. Pp. 317-331 *In:* Rodrigo A. Medellín y Gerardo Ceballos (Eds.) *Avances en el Estudio de los Mamíferos de México*. Asociación Mexicana de Mastozoología, A. C. México. Publ. Esp., 1:xxi-464 pp.
- Dayson, R. W. & J. M. Irland.** 1972. An accurate method of determining age in small mammals. *J. Mamm.* 53:100-106.
- Dewsbury, D. A.** 1981. Social dominance, copulatory behavior, and differential reproduction in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *J. Comp. Physiol. Psychol.* 95:880-895.
- Eisenberg, J. F.** 1968. Behavior patterns. Pp. 451-495 *In:* John A. King (Ed.) *Biology of Peromyscus* (Rodentia). Amer. Soc. Mamma., Spec Publ., 2:XII+593 pp.
- Eleftheriou, B. E.** 1968. Endocrinology. Pp. 312-339 *In:* John A. King (Ed.) *Biology of Peromyscus* (Rodentia). Amer. Soc. Mamma., Spec Publ., 2:XII+593 pp.
- Feist, C. F., D. D. Feist & G. R. Lynch.** 1988. The effects of castration and testosterone on thermogenesis and pelage condition in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) at different photoperiods and temperatures. *Physiol. Zool.* 61:26-33.
- Finlay, M. -F.** 1974. Comparative responses of *Peromyscus* (white-footed mice) to estradiol benzoate. *Comp. Biochem. Physiol.* 48A:229-236.
- Greenbaum, I. F., R. J. Baker & J. H. Bowers.** 1978. Chromosomal homology and divergence between sibling species of deer mouse: *Peromyscus maniculatus* and *P. melanotis* (Rodentia, Circetidae). *Evolution* 32:334-341.
- Hafez, E. S. E.** (Ed.). 1970. *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. Lea and Febiger, PH. USA. 375 pp.
- Hall, E. R.** 1981. *The mammals of North America*. John Wiley and Sons, New York, NY. USA. 2:VI+601+1181+1-90.
- Henricks, D. L.** 1991. Biochemistry and physiology of the gonadal hormones. Chp 3. Pp. 81-118 *In:* Perry T. Cupps (Ed.) *Reproduction in domestic animals*. Academic Press, Inc., San Diego, CA. USA.
- Hoffmeister, D. F.** 1951. A taxonomic and evolutionary study of the pinon mouse, *Peromyscus truei*. *Illinois Biol. Monogr.* 21:IX+1-104.
- Hooper, E.T.** 1952. A systematic review of the harvest mice (genus *Reithrodontomys*) of Latin America. Misc. Publ. Mus. Zool., Univ. Michigan, 77:1-225.
- Kime, D. E.** 1995. Steroid nomenclature. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98:119-120.
- Kunz, T. H., C. Wemmer & V. Hayssen.** 1996. Sex, age, and reproduction. Pp. 279-290 *In:* Don E. Wilson, F. Russell Cole, James D. Nichols, Rasanayagam Rudran, and Mercedes S.

- Foster (Eds.) *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Estandar Methods for Mammals*. Smithsonian Institution Press. Washington and London.
- Lipsett, M. B.** 1986. Steroid hormones. Pp. 140-153 *In*: S. S. C. Yen and R. Jaffe (Eds.) *Reproductive Endocrinology*. W. B. Saunders, PH. USA.
- Makin, H. L.** 1975. *Biochemistry of steroid hormones*. Blackwell, Oxford, UK. 728 pp.
- Meites, J.** 1995. Neuroendocrine control of reproduction in aging rats and humans. Chp 6. Pp. 109-117 *In*: Dipak K. Sarkar and Charles D. Banes (Eds.) *The Reproductive Neuroendocrinology of Aging and Drug Abuse*. CRC Press. Boca Raton, FL. USA.
- Millar, J. S. & S. L. Iverson.** 1976. Weight of eye lens as an indicator of age in *Peromyscus*. *Can. Field. Nat.* 90:36-41.
- Ojeda, S. R. & H. F. Urbanski.** 1994. Puberty in the rat. Vol. 2. Chp 40. Pp. 363-410 *In*: E. Knobil & Jimmy D. Neill (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2° ed. Raven Press, New York, USA.
- Osgood, W. H.** 1909. Revision of the mice of the American genus *Peromyscus*. 28:1-285.
- Ramírez-Pulido & Castro-Campillo.** 1993. Diversidad mastozoológica en México. Pp 49-67 *In*: R. Gío-Argáez y E. López-Ochoterena (Eds.). *Diversidad Biológica en México*. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat. Publ. Esp.* 44:VIII+427+2.
- Ramírez-Pulido, J., I. Lira, S. Gaona, C. Müdespacher & A. Castro.** 1989. *Manejo y mantenimiento de colecciones mastozoológicas*. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. México. 127 pp.
- Romero-Almaraz, M. L., C. Sánchez-Hernández, C. García-Estrada & R. D. Owen.** 2000. *Mamíferos pequeños: manual de técnicas de captura, preparación, preservación y estudio*. UNAM-UAEM. México. 151 pp + IV.
- Salgado-Ugarte, I. H.** 1992. *El análisis exploratorio de datos biológicos: fundamentos y aplicaciones*. FES-Zaragoza, U.N.A.M. Marc Editores, México. 223 pp.
- Schmidly, D. J.** 1973. Geographic variation and taxonomy of *Peromyscus boylii* from Mexico and the southern United States. *J. Mamm.* 54:111-130.
- _____. 1972. Geographic variation in the white-ankled mouse, *Peromyscus pectoralis*. *Southwestern Nat.* 17:113-138.
- StataCorp.** 2001. *Stata statistical software: release 7*. College Station, TX. USA. 386 pp.
- Steger, R. W., J. J. Peluso, H. H. Huang, C. A. Hodson, F. C. Leung, J. Meites & G. Sacher.** 1980. Effects of advancing age on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis of the female white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*). *Exp. Aging Research* 6:329-339.
- von Saal, F. S., C. E. Finch & J. F. Nelson.** 1994. Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates. Vol. 2. Chp 61. Pp. 1213-1314 *In*: E. Knobil and Jimmy D. Neill (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2° ed. Raven Press, New York, NY. USA.
- Vornberger, W., G. Prints., N. A. Musto & C. A. Suarez-Quian.** 1994. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134:2307-2316.
- Whitsett, J. M., L. E. Gray, Jr. & G. M. Bediz.** 1979. Gonadal hormones and aggression toward juvenile conspecifics in prairie deer mice. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 6:165-168.
- Williams, S. L. & J. Ramírez-Pulido.** 1984. Morphometric variation in the Volcano Mouse, *Peromyscus (Neotomodon) alstoni* (Mammalia: Cricetidae). *Ann. Carnegie Mus. Nat. Hist.*, 53:163-183.
- Winer, B. J., D. R. Brown & K. M. Michels.** 1991. *Statistical principles in experimental design*. 3th ed. McGraw-Hill, Nueva York, NY. USA. 929 pp.

Recibido: 30 de septiembre 2003
Aceptado: 2 de marzo 2004