

## Descripción del perfil ontogénico de hormonas esteroides sexuales e intermediarios en testículos del ratón de orejas negras (*Peromyscus melanotis*, Allen y Chapman, 1897).

Ontogeny profile description of sexual steroid hormones and intermediates testes of black-eared mouse (*Peromyscus melanotis*, Allen y Chapman, 1897).

A. Salame-Méndez<sup>1\*</sup>, R. M. Viguera-Villaseñor<sup>5</sup>, A. Castro-Campillo<sup>2</sup>,  
J. Herrera-Muñoz<sup>3,4</sup>, E. Mendieta-Márquez<sup>3</sup> y J. Ramírez-Pulido<sup>2</sup>.

Departamentos de <sup>1</sup>Biología de la Reproducción, <sup>2</sup>Biología y <sup>3</sup>Ciencias 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. <sup>4</sup>Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva, Hospital «Luis Castelazo Ayala» IMSS. CP 01090. México, D. F. <sup>5</sup>Departamento de Histomorfología, Torre de Investigación «Dr. Joaquín Cravioto», Instituto Nacional de Pediatría, SSA. CP04530, México, D. F. \*Correspondencia; e-mail: asam@xanum.uam.mx

### RESUMEN

Se analizó por radioinmunoanálisis (RIA) el contenido de esteroides sexuales (ES), dos hormonas (progesterona -P4-y testosterona -T-) y tres intermediarios (pregnenolona -P5-; 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona -17P4-y androstendiona -A-), en cuatro categorías de edad de *Peromyscus melanotis*, así como la histología de sus testículos y epidídimos. Cuando se compararon las concentraciones de los ES entre su correspondiente categoría de edad (CE) se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.0001$ ), pero cuando la comparación se hizo entre P5, P4, 17P4 y A en las cuatro CE no hubo diferencias ( $P > 0.05$ ). Al comparar el contenido de T entre subadultos (CE II) y adultos jóvenes (CE III) la diferencia fue significativa ( $t_{1,7} = 30.80$ ,  $P < 0.0001$ ), pero entre adultos jóvenes y adultos maduros (CE III y IV, respectivamente) no hubo diferencias ( $P > 0.05$ ); en cambio sí existieron ( $t_{1,7} = 14.05$ ,  $P < 0.0001$ ) cuando la comparación se hizo entre adultos (CE IV) y viejos (CE V). El ciclo ontogénico de la testosterona, así como la espermatogénesis aumentan a partir de la pubertad, alcanzando su máximo en la edad adulta y decrecen progresivamente con el envejecimiento.

**Palabras clave:** roedores, *Peromyscus melanotis*, hormonas esteroides, testículos, madurez sexual, vejez, México.

### ABSTRACT

In testes of subadult, young adult, adult, and old *Peromyscus melanotis* mice, the contents of sexual steroids (SS) were valued by radioimmunoassay (RIA). Two hormones (progesterone-P4-testosterone -T-) and three intermediates (pregnenolone -P5-; 17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone-17P4-androstendione-A-) were measured; and the histology of their testicles and epididymis was determined. When all the SS concentrations were compared between the different age categories (AC), significant differences were found ( $P < 0.0001$ ), but when the comparison was made between P5, P4, 17P4, and A in the 4 AC, no differences were found ( $P > 0.05$ ). When T contents were compared between subadults (AC II) and young adults (AC III), significant differences were found ( $t_{1,7} = 30.80$ ,  $P < 0.0001$ ), but none were present ( $P > 0.05$ ) between young and mature adults (AC III and IV, respectively); however, when the comparison was made between adults (AC IV) and old animals (AC V), there were significant differences ( $t_{1,7} = 14.05$ ,  $P < 0.0001$ ). The ontogenic pattern of T concentrations, as well as spermatogenesis, increase from puberty, reaching their maximum in the adult age, and progressively decreasing through the aging process.

**Key words:** rodents, *Peromyscus melanotis*, steroid hormones, testes, sexual maturity, age, Mexico.

## INTRODUCCIÓN

En los roedores, como en otros mamíferos, la actividad reproductiva se inicia en la pubertad, se mantiene en la edad adulta y disminuye parcial o totalmente en la vejez. A cada una de estas etapas corresponde un incremento y paulatino descenso posterior en la producción de gametos, de esteroides sexuales y de la conducta sexual.

Los procesos fisiológicos, endocrinos y etológicos que se llevan a cabo durante la madurez sexual y el envejecimiento en los roedores de laboratorio están bien documentados (Meites, 1995; Ojeda y Urbanski, 1994). Pero, en el caso de los roedores silvestres en vida libre, algunos de los procesos antes mencionados han sido poco explorados todavía (Salame-Méndez et al., 2004, 2003a, b).

En el campo de la mastozoología, la actividad reproductiva de los machos de las especies silvestres en vida libre se infiere la mayoría de las veces a partir de evidencias indirectas como lo son la posición y tamaño de los testículos; el desarrollo de las vesículas seminales, así como la masa corporal y las características morfológicas del pelaje (Romero-Almaraz et al., 2000; Kunz et al., 1996; Ramírez-Pulido et al., 1989). Por otra parte, dentro de los elementos tradicionalmente utilizados para identificar la edad (categoría de edad: CE) de los roedores, se encuentran el grado de sutura de los huesos del cráneo y el desgaste de la superficie oclusal de los molares. De esta manera, tanto la determinación de la edad como de la condición reproductiva en las especies de roedores silvestres son insuficientes y subjetivos.

Por lo antes mencionado, es importante documentar hechos fisiológicos y endocrinos que permitan conocer de manera precisa los procesos de la biología reproductiva de estas especies en condiciones de vida libre. Con el objetivo de investigar los procesos fisiológicos y endocrinos involucrados en la biología reproductiva de roedores silvestres en vida libre, en este trabajo se describe la histología del epitelio seminífero, así como el perfil de los contenidos de hormonas esteroides sexuales y algunos de sus intermediarios en testículos de *Peromyscus melanotis* de ratones de las siguientes CE: subadultos, adultos jóvenes, adultos maduros y viejos.

## MATERIALES y MÉTODOS

Los ratones de *Peromyscus melanotis* fueron

recolectados a 0.85 Km N, 3.5 Km W Ecuamil, 3180 m; 19° 13' 37" N, 99° 15' 37" W, en la Sierra del Ajusco, D. F. Se utilizaron trampas Sherman cebadas con hojuelas de avena. Los ratones fueron trasladados el mismo día de su captura al laboratorio de Mamíferos de la UAMI, y se les sacrificó por dislocación cervical. A cada uno se le registraron sus medidas convencionales (Romero-Almaraz et al., 2000; Kunz et al., 1996) y se les preparó como ejemplares de referencia (Ramírez-Pulido et al., 1989), siendo depositados en la Colección de Mamíferos de la UAM como cráneo y esqueleto. La designación de la CE se hizo de acuerdo con el desgaste de la superficie oclusal de los molares, sensu Hoffmeister (1951).

Biopsias del par de testículos y epidídimos correspondientes a 8 ratones de la CE I (juvenil); 9 de la II (juvenil subadulto); 8 de la III (adulto joven); 8 de la IV (adulto maduro), y 7 de la categoría V (viejo), fueron fijadas en formol al 10% en solución amortiguadora de fosfatos, y procesados para ser incluidos en parafina. De cada tejido se obtuvieron cortes de 3-5 mm de grosor siendo teñidos con hematoxilina-eosina. Con el objetivo de tener un parámetro de comparación referente a la histomorfología de los testículos y los epidídimos de los ratones silvestres, se procesaron muestras de ambos tejidos de cinco ratones de la cepa CD1 con una edad conocida de 1 a 10 semanas, de acuerdo a la fecha registrada de su nacimiento.

Una vez tomada la muestra de tejido para el análisis histológico, el par de gónadas correspondientes a los ratones de las CE II a V se colocaron en un tubo Eppendorf que contenía una disolución de Ringer isotónica y se almacenaron a -70 °C. Posteriormente los testículos se descongelaron y se homogeneizaron por ultrasonido (Sonic Dismembrator-50, Fisher). Del homogeneizado se tomó una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976) utilizando para la curva estándar albúmina de suero de bovino. Una segunda alícuota fue utilizada para evaluar el contenido de: 3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnano-20-ona (pregnenolona, P5); 4-pregneno-3,20-diona (progesterona, P4); 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregneno-3,20-diona (17-hidroxi progesterona, 17P4); 4-androsteno-3,17-diona (androstendiona, A); 17 $\beta$ -hidroxi-4-androsteno-3-ona (testosterona, T).

Los procedimientos de extracción de los esteroides totales y la determinación de la eficiencia de este

procedimiento, así como los utilizados para la separación de cada uno de los esteroides sexuales para su posterior cuantificación por técnicas radioinmunoanalíticas (RIA) han sido descritos en previos estudios (Salame-Méndez *et al.*, 2003a, b).

Brevemente, la extracción de los esteroides totales (EET) se hizo con éter dietílico por duplicado, determinándose el porcentaje de eficiencia en cada extracción a partir de valorar la recuperación de los ES marcados con tritio, siendo la eficiencia de extracción en cada EET del  $98.6 \pm 0.6\%$ . La separación de P5, P4, 17P4, A y T se hizo por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando tres sistemas cromatográficos (benceno; benceno:acetato de etilo y benceno:metanol). Posteriormente, a cada tubo con el esteroide sexual a cuantificar, se le agregó solución tampón de fosfatos, así como una dilución apropiada del antisuero contra el esteroide a ser cuantificado, incubándose por 18 hrs a 4 °C. El esteroide unido al anticuerpo se separó al agregar a cada tubo una disolución de carbón activado-dextrán, centrifugándose a 3000 x g por 15 min a 4 °C. La cantidad del esteroide radiactivo libre se determinó en un espectrómetro de centelleo líquido (Beckman, LS-7000) con una eficiencia del 53% para tritio. Con el objetivo de validar el método de cada RIA realizado se hicieron de manera paralela curvas estándar, siendo los coeficientes de variación intra ensayos menores al 4%.

**Análisis Estadístico.** Para la comparación de la concentración de cada ES por grupo de categoría de edad, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de Bartlett para varianzas iguales y para la comparación de esteroides por grupo de edad se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey. Para comparar la concentración de cada ES entre dos grupos de categoría de edad se utilizó el análisis de regresión, pero siendo el interés probar si la diferencia entre categorías de edad era similar, se probó la hipótesis de pendiente uno (Zar, 1999). Todos los cálculos se hicieron con las rutinas de GraphPrisma (Motulsky, 1999) y SYSTAT (2000).

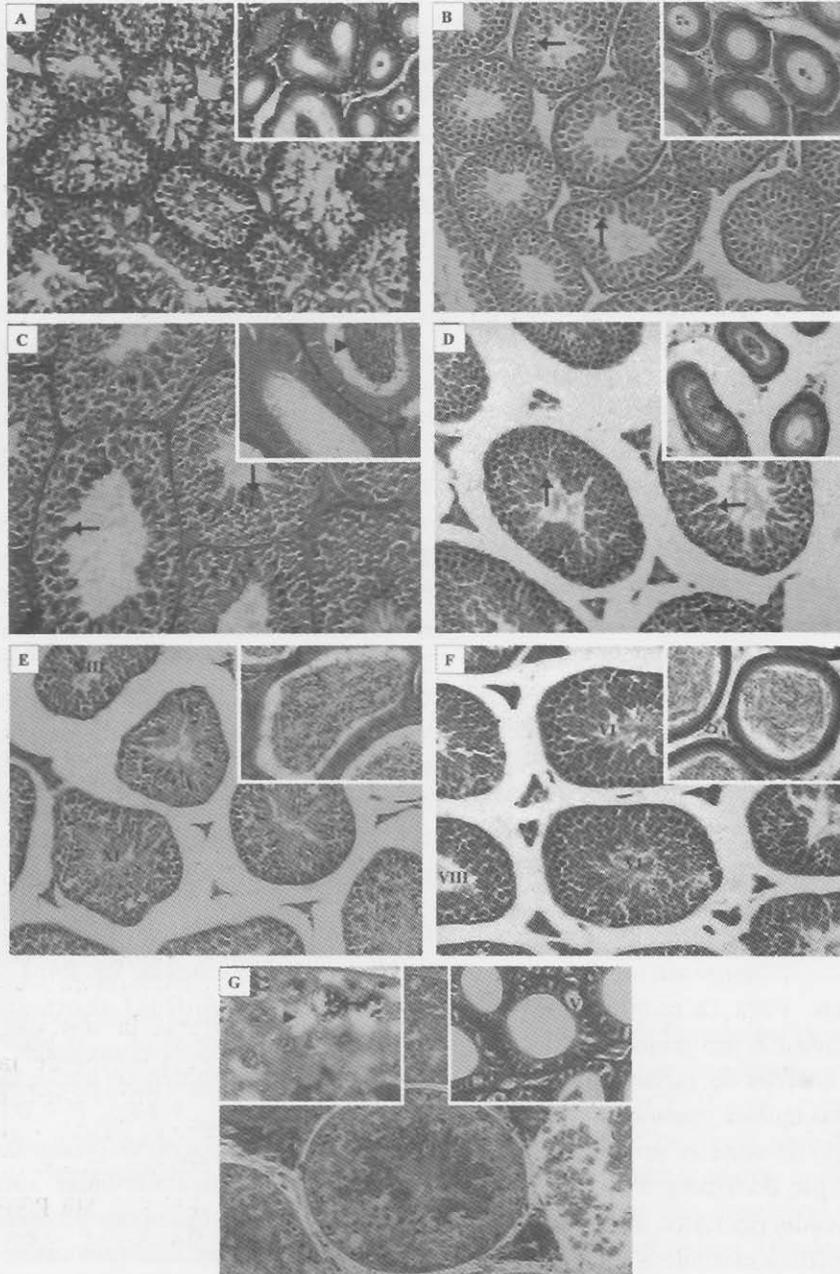
## RESULTADOS

**Histología.** El comparar la histología de los testículos y epidídimos de los ratones de *Peromyscus melanotis* con la de los ratones de la cepa CD1, permitió establecer con más precisión la edad en que se inició la espermatogénesis, así como su paulatino cese en los

ratones silvestres. En los ratones juveniles de la CE I, las imágenes histológicas de ambos tejidos fueron similares a la de los ratones CD1 de 4 semanas de edad (Fig. 1 A y B); los juveniles subadultos de la CE II a los ratones de la misma cepa de 7 semanas de edad (Fig. 1C), y tanto los adultos jóvenes (CE III) como los adultos maduros (CE IV) fueron similares a los ratones CD1 de 9-10 semanas de edad (Fig. 1 E y F). En los túbulos seminíferos de los ratones juveniles de la CE I se observaron abundantes espermatoцитos y espermátides elongadas (Fig. 1 A y B). En los ratones juveniles subadultos, sus túbulos seminíferos ya tenían espermatoцитos, espermátides elongadas y espermatozoides; por lo tanto, en estos ratones se inicia la espermiogénesis, apreciándose espermatozoides en la región caudal del epidídimo (Fig. 1 C y D). Por otra parte, tanto los ratones adultos jóvenes (CE III) como los adultos maduros (CE IV) presentan una mayor abundancia de los tipos celulares mencionados para los juveniles subadultos, resaltando los espermatozoides, los cuales también fueron muy abundantes en la cauda del epidídimo (Fig. 1 E y F). Por último, en los ratones viejos (CE V), tanto el epitelio germinativo como la región caudal del epidídimo mostraron procesos degenerativos, por ejemplo, vacuolización (Fig. 1 G). Sin embargo, en cuatro de estos ratones, ambos órganos presentaron espermatozoides.

**Contenido de Esteroides Sexuales.** La comparación de las concentraciones de P5, P4, 17P4 y A del grupo de CE II (subadultos) mostraron diferencias significativas entre sí ( $F_{4,40} = 66.96, P < 0.0001$ ), diferencias que también se presentaron en la CE III (adulto joven) ( $F_{4,40} = 64.5, P < 0.0001$ ), la CE IV (adulto maduro) ( $F_{4,40} = 55.99, P < 0.0001$ ) y la CE V (viejos) ( $F_{4,40} = 47.11, P < 0.0001$ ). Sin embargo, cuando la comparación se hizo para P5 en los cuatro grupos de categorías de edad, la diferencia no fue significativa ( $F_{3,28} = 0.652, P = 0.885$ ), diferencia que tampoco se presentó para P4 ( $F_{3,28} = 0.653, P = 0.885$ ), 17P4 ( $F_{3,28} = 1.258, P = 0.990$ ), A ( $F_{3,28} = 1.289, P = 0.732$ ), y T ( $F_{3,28} = 0.255, P = 0.968$ ) (Fig. 2).

En los testículos de los ratones subadultos y adultos jóvenes, el contenido de T fue diferente entre sí ( $t_{1,7} = 30.80, P < 0.0001$ ); cuando la comparación se hizo entre adultos jóvenes y adultos maduros, CE III y IV, respectivamente, no se encontraron diferencias entre ellos ( $P > 0.05$ ), pero con la prueba de pendiente uno sí las hubo ( $t_{1,7} = 86.68, P < 0.0001$ ). Cuando la comparación se hizo entre los adultos maduros y los



**Figura 1.** Microfotografías que muestran la histología de testículos y epidídimos de *Peromyscus melanotis* de diferente categoría de edad (A, C, E y G), así como de ratones de la cepa CD1 de edad conocida (B, D y F). Tanto en los testículos de los ratones juveniles de la categoría de edad -CE- I (A) como en los ratones de 4 semanas de edad (B) se aprecian espermatocitos y espermatídes tempranas (flecha) (100x). Por su parte, la región caudal del epidídimo (recuadros, 400x) aún no tiene espermatozoides. En los subadultos de la CE II (C) y en los ratones de 7 semanas (D), sus túbulos seminíferos (100x) tienen espermatídes (flechas) y espermatozoides, los cuales se aprecian en el epidídimo (punta de flecha) (recuadro, 400x). Los ratones adultos jóvenes de la CE III (E) y los de 9 semanas de edad (F) su epitelio seminífero (100x) tiene ciclos espermatogénicos completos y en diferentes estadios (Clermont, 1972). Por ejemplo, en los ratones silvestres se muestran los estadios VIII y IX, y en los de la cepa los estadios VI y VIII. Por su parte, en ambos casos, la región caudal del epidídimo (recuadro, 400x) tiene una conspicua abundancia de espermatozoides. Por último, en los túbulos seminíferos de ratones silvestres de la CE V o viejos (G), se aprecian signos de degeneración tales como vacuolas grandes (punta de flecha) y células necróticas (flecha) (ambas en el recuadro izquierdo, 400x). Por su parte, los túbulos del epidídimo están vacíos y su epitelio tiene vacuolas (V) (recuadro derecho, 400x).

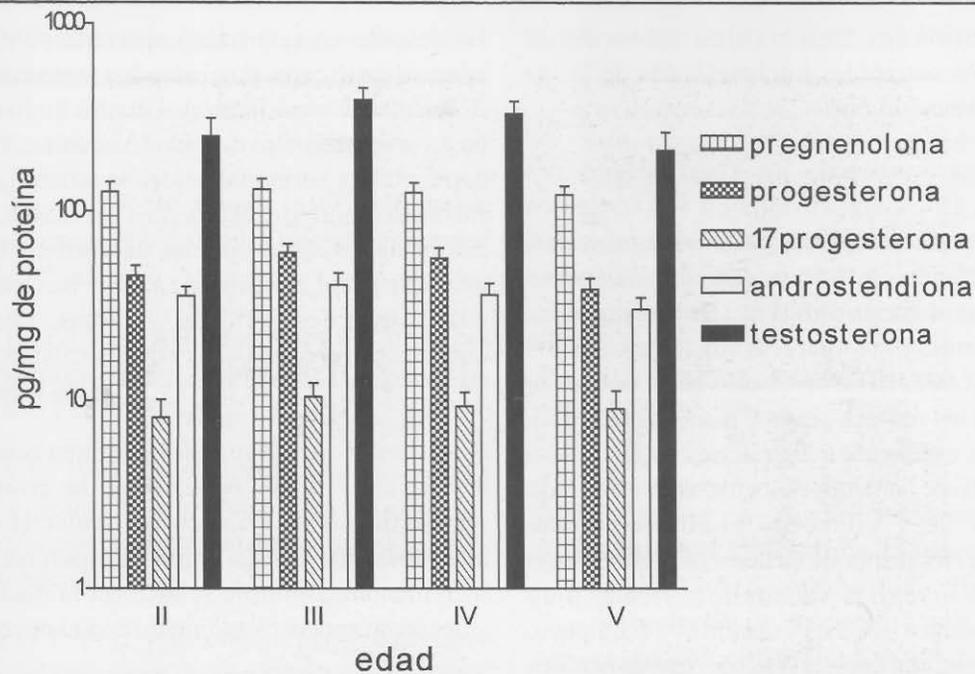


Fig. 2. Concentración de esteroides sexuales en los testículos de *Peromyscus melanotis* de diferente categoría de edad, provenientes de la Sierra del Ajusco, Distrito Federal. Categoría de edad II, subadulto (n = 9); III, adulto joven (n = 8); IV, adulto maduro (n = 8) y V, viejo (n = 7). La barra representa la media  $\pm$  una desviación estándar.

viejos (CE V), también se presentaron diferencias significativas ( $t_{1,7} = 14.05$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 2).

### DISCUSIÓN

La producción de esteroides sexuales se inicia con la biotransformación del colesterol en P5. A partir de este esteroide se sintetizan las progestinas (v. gr. P4), andrógenos (v. gr. T) y estrógenos (v. gr. E2), así como los glucocorticoides (cortisol) y mineralocorticoides (corticosterona) (Norman y Litwack, 1997). El hecho de que en individuos subadultos (categoría de edad - CE- II), adultos jóvenes (CE III), adultos maduros (CE IV) y viejos (CE V) de *P. melanotis*, el contenido de P5 haya sido similar, sugeriría que en esta especie, independientemente de su edad, el contenido de este precursor es constante.

Entre los esteroides sexuales producidos por el tejido intersticial del testículo y que tiene una relevante importancia en la biología reproductiva se encuentra la T. En mamíferos, así como en algunas otras especies de vertebrados, este andrógeno coordina diversos procesos implicados en su biología reproductiva. Por ejemplo, regula la espermiogénesis, la función de los órganos accesorios, repercutiendo en la manifestación de los caracteres sexuales secundarios como lo es el crecimiento del pelo y su color, estimula el crecimiento corporal, modulando el desarrollo óseo

y muscular, y coadyuva al despliegue de la conducta sexual (Bentley, 1998; Norris, 1997; Norman y Litwack, 1997; Griffin y Ojeda, 1992).

La producción de T se lleva a cabo en las células de Leydig por la vía de los intermediarios  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$ . Esta nomenclatura se refiere a la posición del enlace insaturado de los esteroides intermediarios que se biotransforman durante la síntesis del andrógeno. Los esteroides intermediarios de la vía  $\Delta 5$  son la P5, la  $17\alpha$ -hidroxi-pregnenolona (17P5), la dehidroepiandrosterona (DHA) y el androstendiol. En la vía  $\Delta 4$  los esteroides intermediarios son la P4, la 17P4 y la A. El que una vía predomine sobre la otra depende de la especie que se estudie.

En roedores, por ejemplo en ratones y ratas de laboratorio, predomina la vía  $\Delta 4$  (Henricks, 1991; Lipsett, 1986). En este sentido, hemos demostrado previamente que en *P. melanotis* esta última vía está presente; sin embargo, no se puede decir que sea la prevaleciente, ya que en este modelo no se han valorado los esteroides de la vía  $\Delta 5$  (Salame-Méndez *et al.*, 2004).

Los resultados de este trabajo apoyan el hecho de que en esta especie de *Peromyscus* se encuentran, en efecto en los ratones de las categorías de edad subadultos, adultos jóvenes, adultos maduros

y viejos, cantidades detectables tanto de la P5 como de los esteroides intermediarios de la vía D4 para la producción de T.

El análisis del contenido de T, así como sus intermediarios D4, cuantificados en los testículos de cada una de las categorías de edad analizadas, permitió dilucidar su perfil ontogénico, iniciándose su incremento en los ratones de la CE II o juveniles subadultos, siendo este incremento mayor en los adultos jóvenes (CE III) e iniciando posteriormente su descenso en los ratones adultos maduros (CE IV), siendo éste más evidente en los ratones de la CE V o viejos. Este perfil de aumento-descenso en el contenido intratesticular de T concordó cualitativamente con los cambios en la espermiogénesis, la cual se inició en los ratones juveniles subadultos, siendo muy evidente en los adultos jóvenes y maduros y disminuyó, casi totalmente, en los ratones viejos. Ambos perfiles constatados en este trabajo, coinciden con los reportados para los roedores de laboratorio, es decir, conforme avanza su edad, disminuye tanto la producción como el contenido del andrógeno, así como la espermatogénesis (vom Saal *et al.*, 1994; Hafez, 1970).

El contenido de T en los ratones de la CE II comparado con el de los ratones juveniles de la CE I (Salame-Méndez *et al.*, 2003b), así como con los ratones adultos jóvenes (CE III), indica que los ratones de la CE II denominados subadultos son púberes y están en transición a su madurez sexual. Lo anterior se apoya con el hecho de que aún cuando su espermiogénesis ya se inició, son escasos los espermatozoides tanto en los túbulos seminíferos como en la región caudal del epidídimo. Por su parte, al no haber diferencias en la concentración de T entre los ratones adultos jóvenes y adultos maduros, podemos sugerir que ambas categorías de edad, morfológicamente diferentes a partir del desgaste de la superficie oclusal de los molares, no lo son desde el punto de vista hormonal, lo cual concuerda con la evidencia de que ambas edades tienen una activa espermiogénesis. Por último, en los ratones de la categoría de edad V (viejos), al descender el contenido gonadal de T y la espermatogénesis con respecto a los ratones adultos maduros de la CE IV, se inicia el final de la etapa reproductiva de los ratones de esta especie de *Peromyscus*, a tal grado que en algunos ratones de la CE V su epitelio seminífero ya presenta procesos degenerativos.

Lo descrito en este trabajo permite confirmar que la edad identificada por métodos convencionales en *P. melanotis* y mediante los cuales se han propuesto hasta seis categorías de edad (Anderson, 1989) podría corresponder hormonalmente, de acuerdo al contenido intratesticular de esteroides sexuales, reforzado por el análisis del epitelio seminífero (espermatogénesis) y del epidídimo, a sólo tres categorías de edad: juveniles, adultos, y viejos. Los juveniles quedarían representados por las categorías de edad I y II, los adultos por la III y IV, y los viejos por la V.

Por lo tanto, estos resultados permiten concluir que en los machos de *P. melanotis*, la concentración intratesticular de P5 y en particular la de T y sus intermediarios D4, así como su espermatogénesis, se incrementan conforme se alcanza la madurez sexual y decrecen proporcionalmente con el envejecimiento.

### AGRADECIMIENTOS

Nuestro reconocimiento a Juan Patiño Rodríguez, por su valiosa colaboración tanto en el trabajo de campo como en el de gabinete. A la Biól. Olga Moreno Ramos le agradecemos su participación en la recolección del material biológico. A los revisores anónimos de este trabajo se les agradece tanto por sus comentarios como sugerencias. Este estudio forma parte de dos Proyectos apoyados por la División de CBS de la UAMI (144.03.07, ASM y 143.02.14, ACC), así como ser parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 400200-5R29117N, JRP). Los resultados de este trabajo forman parte del convenio Interinstitucional entre el Departamento de Biología de la Reproducción de la UAMI (ASM) y la Coordinación de Investigación del IMSS (JHM).

### LITERATURA CITADA

- Anderson, P. K. 1989. Dispersal in Rodents: A resident fitness hypothesis. Provo, UT. Amer. Soc. Mamm., Spec. Publ., 9:vii+141.
- Bentley, P. J. 1998. Comparative Vertebrate Endocrinology. Cambridge University Press. 3<sup>th</sup> ed.
- 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.

- Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.*, 52:198-236.
- Griffin, J. E., and S. R. Ojeda. 1992. *Textbook of Endocrine Physiology*. Oxford University Press. 2<sup>nd</sup> ed.
- Hafez, E. S. E. (Ed.). 1970. *Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals*. Lea and Febiger.
- Henricks, D. L. 1991. Biochemistry and physiology of the gonadal hormones. Pp. 81-118 in: *Reproduction in Domestic Animals*. P. T. Cupps, ed. Academic Press.
- Hoffmeister, D. F. 1951. A taxonomic and evolutionary study of the pinon mouse, *Peromyscus truei*. *Illinois Biol. Monogr.*, 21:IX+1-104.
- Kunz, T. H., C. Wemmer, and V. Hayssen. 1996. Sex, age, and reproduction. Pp. 279-290 in: *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Standard Methods for Mammals*. D. E. Wilson, F. R. Cole, J. D. Nichols, R. Pudran and M. S. Foster, eds. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Lipsett, M. B. 1986. Steroid hormones. Pp. 140-153 in: *Reproductive Endocrinology*. S. S. C. Yen and R. Jaffe, eds. W. B. Saunders.
- Meites, J. 1995. Neuroendocrine control of reproduction in aging rats and humans. Pp. 109-117 in: *The Reproductive Neuroendocrinology of Aging and Drug Abuse*. D. K. Sarkar and C. D. Banes, eds. CRC Press.
- Motulsky, H. J. 1999. *Analyzing data with Graph Pad Prisma Software*, Inc.
- Norman, A. W., and K. G. Litwack. 1997. *Hormones*. Academic Press. 2<sup>nd</sup> edition.
- Norris, D. O. 1997. *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press. 3<sup>th</sup> edition.
- Ojeda, S. R., and H. F. Urbanski. 1994. Puberty in the rat. Pp. 363-410, vol 2 in: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil and J. D. Nelly, eds. Raven Press. 2<sup>nd</sup> edition.
- Ramírez-Pulido, J., I. Lira, S. Gaona, C. Müdspacher y A. Castro. 1989. Manejo y mantenimiento de colecciones mastozoológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México.
- Romero-Almaraz M. L., C. Sánchez-Hernández, C. García-Estrada y R. D. Owen. 2000. Mamíferos pequeños: manual de técnicas de captura, preparación, preservación y estudio. Facultad de Ciencias, UNAM; Instituto de Biología, UNAM, y Centro de Investigaciones Biológicas, UAEM. México.
- Salame-Méndez, A., A. Castro-Campillo, I. Salgado-Ugarte, E. Mendieta-Márquez, J. Herrera-Muñoz y J. Ramírez-Pulido. 2004. Evaluación estacional de la producción de esteroides sexuales en testículos del ratón de orejas oscuras (*Peromyscus melanotis*, Allen y Chapma, 1897) de diferentes clases de edad. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 2(2):103-114.
- \_\_\_\_\_, R. M. Viguera-Villaseñor, J. Herrera-Muñoz, E. Mendieta-Márquez, I. H. Salgado-Ugarte, A. Castro-Campillo y J. Ramírez-Pulido. 2003a. Inmunolocalización y contenido de esteroides sexuales en ovarios de hembras de *Peromyscus melanotis* Allen y Chapma, 1897 (Rodentia: Muridae) durante la primera mitad de la preñez. *Acta Zool. Mex. (n.s.)* 88:43-57.
- \_\_\_\_\_, J. Herrera-Muñoz, A. Castro-Campillo y J. Ramírez-Pulido. 2003b. Valoración de esteroides sexuales en testículos de ratones juveniles de *Peromyscus melanotis*. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat., (3ª época)* 1:83-90.
- SYSTAT. 2000. 10 Graphics by SPSS Inc. Science Marketing Department, Chicago.
- vom Saal, F. S., C. E. Finch, and J. F. Nelson. 1994. Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates. Pp. 1213-1314 in: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil and J. D. Nelly, eds. Raven Press. 2<sup>nd</sup> edition.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall. 4<sup>th</sup> ed.