

Evaluación de la producción de hormonas esteroides en testículos y ovarios del ratón de las rocas (*Peromyscus difficilis felipensis*).

Evaluation of steroid hormones biosynthesis in testicles and ovaries of the rock-mouse (*Peromyscus difficilis felipensis*).

A. Salame-Méndez^{1*}, E. Mendieta-Márquez³, J. Herrera-Muñoz³,
A. Castro-Campillo² y J. 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. Correspondencia; e-mail: asam@xanum.uam.mx

RESUMEN

En este trabajo se reporta la evaluación de la producción de hormonas esteroides e intermediarios a partir de la biotransformación de colesterol tritiado por las gónadas de machos y hembras del ratón de las rocas -*Peromyscus difficilis felipensis*-. La síntesis de testosterona fue mayor en los testículos de ratones adultos y menor tanto en los ratones viejos como en los subadultos. En diestro I (metaestro) los ovarios producen más progesterona (P4) que estradiol (E2). Durante el diestro II, la síntesis de P4 tendió a ser menor que la de E2, mientras que en el proestro, esta relación se invirtió. Estos datos constituyen la primera evidencia de la producción *in situ* de esteroides sexuales en ambos sexos de esta especie de *Peromyscus* sin haber estado en condiciones previas de laboratorio.

Palabras clave: hormonas esteroides, síntesis, ovarios, testículos, *Peromyscus difficilis*.

ABSTRACT

We evaluated the synthesis of steroid hormones and intermediates in the rock-mouse -*Peromyscus difficilis felipensis*-, using the testicles of males from different ages and ovaries of females in different stages of the estrous cycle. Testosterone synthesis was higher in testicles of adult mice and lower in those of both older and subadult mice. In metestrus (diestrus I), the ovaries produce more progesterone (P4) than estradiol (E2). During diestrus II, P4 synthesis tended to be lower than that of E2, while during proestrus, this relationship is inverted. These data constitute the first record of the *in situ* sexual steroids production in both sexes of this species of *Peromyscus*.

Key words: steroid hormones, synthesis, ovaries, testis, *Peromyscus difficilis*.

INTRODUCCION

La actividad reproductiva de las especies de vertebrados está relacionada con la producción y acción de las hormonas esteroides (HE) las cuales tanto en las hembras como en los machos actúan, por ejemplo, en la gametogénesis y en la conducta de apareamiento. Su síntesis se lleva a cabo por vías biosintéticas bien establecidas en tejidos extragonadales y gonadales de diversas especies de vertebrados (Bentley, 1998; Norris, 1997; Gorbman *et al.*, 1983). Iniciándose con la biotransformación del colesterol en pregnenolona (P5), esteroide a partir del cual se producen las progestinas

(v. gr. progesterona), andrógenos (v. gr. testosterona), estrógenos (v. gr. estradiol), y corticosteroides (glucocorticoides -cortisol- y mineralocorticoides -aldosterona-) (Norman y Litwack, 1997).

En roedores la producción de andrógenos se lleva a cabo por dos rutas de síntesis alternas: las vías $\Delta 4$ y $\Delta 5$ (Hall, 1994), prevaleciendo la $\Delta 4$ en *Rattus norvegicus* y *Mus mus* (Henricks, 1991; Lipsett, 1986). Por su parte, los estrógenos se producen a partir de la aromatización de andrógenos (Akthar *et al.*, 1997); de la testosterona se produce el estradiol y de la androstendiona la estrona.

Por lo antes mencionado, conocer en una especie la síntesis de las HE en tejidos diana como lo son las gónadas, permite tener un parámetro de su endocrinología reproductiva. Los eventos endocrinos en especies de roedores silvestres principalmente han sido realizados en condiciones experimentales (v. gr. Good *et al.*, 2003; Lapsertis y Hayssen, 2001; Perrot-Sinal *et al.*, 1998). Aunque son importantes los resultados de estos estudios, no necesariamente documentan las condiciones fisiológicas de los roedores en vida libre. Razón por la cual, uno de los objetivos de nuestro grupo de trabajo ha estado enfocado al estudio de las estrategias reproductivas de roedores silvestres en vida libre desde un punto de vista endocrino.

En este trabajo se describe en el ratón de las rocas - *Peromyscus difficilis felipensis*- la producción *in vitro* de HE e intermediarios $\Delta 4$ por las gónadas de machos de diferente categoría de edad y de hembras en tres etapas del ciclo estral. En ambos casos, los ratones no permanecieron en condiciones previas de acondicionamiento a un bioterio.

MATERIALES y METODOS

Material Biológico. Los individuos de *Peromyscus difficilis felipensis* fueron recolectados de septiembre a noviembre de 1999 en el Parque Nacional Cumbres del Ajusco, México D. F. (0.85 Km N, 3.5 Km W Ecuamil, 3180 m; 19° 13' 37" N, 99° 15' 37" W), utilizando trampas Sherman cebadas con hojuelas de avena. Los roedores colectados el mismo día se trasladaron al laboratorio de Mamíferos de la UAM-Iztapalapa y se mataron por dislocación cervical. A cada espécimen se le determinaron sus medidas mastozoológicas 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 UAMI como cráneo y esqueleto. A las hembras se les realizó además, un frotis exfoliativo vaginal para determinar la etapa del ciclo estral; su descripción se hizo según lo reportado por Olivera y col. (1986) para el ratón de los volcanes -*Neotomodon alstoni*-. Por su parte, la determinación de la categoría de edad de los ratones se hizo considerando el desgaste de la superficie oclusal de los molares *sensu* Hoffmeister (1951).

Análisis de la Producción de Esteroides Sexuales. En testículos de machos juveniles, adultos y viejos, y

ovarios de hembras en tres estadios del ciclo estral, se evaluó la producción de los siguientes esteroides sexuales (ES): 3 β -hidroxi-5-pregnano-20-ona (pregnenolona, P5); 4-pregнено-3,20-diona (progesterona, P4); 17 α -hidroxi-4-pregнено-3,20-diona (17-hidroxiprogesterona, 17P4); 4-androsteno-3,17-diona (androstendiona, A); 17 β -hidroxi-4-androsteno-3-ona (testosterona, T), y 1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol (estradiol, E2—sólo en los ovarios-).

A las hembras y a los machos se les extirpó su gónada izquierda, y una vez eliminado el tejido graso de los ovarios y desprendida la túnica albuginea del testículo, cada gónada por separado se introdujo en tubos Eppendorf que contenían una disolución tampón de Krebs-Ringer, bicarbonato, adicionado con 2% de glucosa (KRBG, pH 7) y 20,000 cpm de colesterol tritiado (1,2-3H, actividad específica -ae- 47.7 Ci/mmol) (New England Nuclear, Boston, MA) (C27³H) previamente purificado por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando como fase móvil tolueno:acetato de etilo (2:1, v/v). Cada tubo con su tejido, y otros sin tejido utilizados como control, se incubaron a 36 °C por 1 hr; deteniéndose las reacciones metabólicas por congelación y almacenándose cada tubo a -70 °C hasta su previo análisis.

Los procedimientos de homogenización, determinación del contenido de proteínas, extracción de esteroides totales y la determinación de la eficiencia de este procedimiento, así como los utilizados para separar cada uno de los esteroides sexuales biosintetizados a ser valorados, han sido descritos en previos estudios (Salame-Méndez *et al.*, 2004, 1998). Brevemente, el tejido con su disolución de incubación se homogeneizó manualmente, tomándose una alícuota para evaluar la biotransformación del precursor (C27³H) en cada uno de los ES a analizar y otra alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976). La extracción de los esteroides totales (EET) contenidos en las alícuotas de cada homogeneizado se hizo por duplicado con éter dietílico. Para valorar el porcentaje de eficiencia en la EET 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 agregó como trazador »1,000 cpm de testosterona tritiada (1,2,6,7,16,17-3H) (ae 139 Ci/mmol) (New England Nuclear, Boston, MA) previamente purificada por CCF, siendo el promedio de eficiencia total de

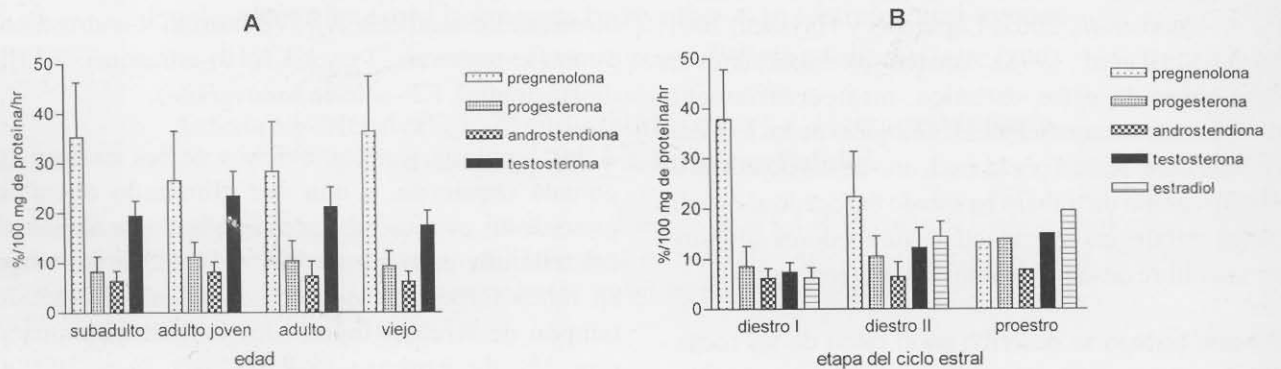


Figura 1. Producción de esteroides sexuales (ES) por los testículos y ovarios del ratón de las rocas *-Peromyscus difficilis felipensis-*. En **A** se muestra el perfil de producción de ES por los testículos de ratones de diferente categoría de edad, y en **B** los producidos por los ovarios en tres etapas del ciclo estral. La línea en cada barra representa la media \pm una desviación estándar. La producción de cada ES está referida como el porcentaje de biotransformación *in vitro* de colesterol tritiado (C27-³H) por cada 100 mg de proteína gonadal durante una hora de incubación a 36 °C.

extracción del $98 \pm 0.8\%$ y los resultados de cada una de las valoraciones de biotransformación se corrigieron a partir del porcentaje de recuperación.

A cada tubo conteniendo su correspondiente EET, así como a cada tubo control, se le agregó una disolución de éter dietílico:metanol (2:1, v/v) que se transfirió a cromatoplas cubiertas con gel de sílice, separándose por CCF la P5, P4, 17P4, T, utilizando como fase móvil tres 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 cromatoplas, se visualizó con luz UV y el reactivo de Oërtel (ácido sulfúrico:etanol, 2:1, v/v). El área del esteroide a ser valorado y que coincidió con la distancia relativa de separación (Rf) de cada esteroide de referencia se raspó, separándose el esteroide adsorbido al sílice con una disolución de éter dietílico:metanol (1:1, v/v); elución que se colectó en viales de vidrio, cuantificándose el metabolito radiactivo en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Beckman, LS-7000). 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 determinar la existencia de diferencias significativas entre cada esteroide evaluado tanto por categoría de edad en los machos y por cada etapa del ciclo estral en las hembras, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) de una vía con pruebas a posteriori de Tukey. Los análisis se hicieron con el paquete estadístico GraphPrisma (Motulsky, 1999).

RESULTADOS

Síntesis de Esteroides Sexuales en los Machos. Se analizaron 19 ratones; cuatro de la categoría de edad -CE- edad II (subadulto); 8 de la CE III (adulto joven); 4 de la CE IV (adulto maduro) y 3 de la CE V (viejo). Los testículos de cada uno de los ratones biotransformaron el precursor C27³H en P5, P4, A, y T; sin embargo, la producción de 17P4 estuvo por debajo del rango mínimo de detección por

lo que no se considero su síntesis. La P5 fue el esteroide de mayor producción, seguido por el de T, P4 y A, respectivamente (Fig. 1A), sin embargo, la producción de P5 no cambió con la CE ($P e > 0.05$) (Fig. 1A). Al comparar por CE la producción de P4 con la de A, la progestina fue significativamente mayor ($P d < 0.05$) que el andrógeno en los ratones de la CE II y IV, respectivamente (Fig. 1A). Por otra parte, la síntesis de ambos andrógenos -A y T- de acuerdo a la CE no presentó diferencias significativas ($P d < 0.05$), pero entre los adultos jóvenes y adultos maduros se aprecia una tendencia de producirse más T con respecto a su precursor -A- (Fig. 1A).

Aunque no hubo diferencias significativas ($P d < 0.05$) en la producción de T entre cada uno de los grupos de CE, se aprecia una tendencia a incrementarse en los ratones adultos jóvenes y adultos maduros con respecto a los subadultos, y disminuir su síntesis en los ratones viejos con respecto a los adultos maduros (Fig. 1A).

Síntesis de Esteroides Sexuales en las Hembras. De las 6 hembras analizadas, dos adultas (CE IV) estuvieron en diestro I (metaestro); dos adultas jóvenes (CE III) y una adulta (CE IV) estuvieron en diestro II, y una adulta joven en proestro. Como en el caso de los machos, la producción de 17P4 tampoco fue posible evaluar.

En el diestro I la producción de P5 fue significativamente diferente ($P d < 0.05$) con respecto a las de P4, A, T, y E2, respectivamente (Fig. 1B). Al comparar la síntesis de P4, A y T no hubo diferencias significativas ($P e > 0.05$), y aunque tampoco hubo diferencias significativas entre la síntesis de P4 y E2, la producción de la progestina tendió a ser mayor que la del estrógeno (Fig. 1B).

En las hembras en diestro II la producción de P5 fue significativamente diferente ($P d < 0.05$) con respecto a las de P4, A, T, y E2 (Fig. 1B). Como en el caso del diestro I, la producción de P4 no fue significativamente mayor ($P e > 0.05$) que la de A y T. Sin embargo, la síntesis de T tendió a ser mayor que la de A (Fig. 1B). Al comparar la relación entre la producción de P4 con la de E2, la del estrógeno tendió a ser mayor (Fig. 1B).

En el proestro, aunque no se pudo realizar análisis estadístico alguno debido a que sólo se analizó una hembra, se constató que la producción

de P5, P4 y T fueron similares, siendo la de A muy baja con respecto a los esteroides anteriores (Fig. 1B). Al comparar la relación entre la producción de P4 con la de E2, la del estrógeno tendió a ser mayor (Fig. 1B).

DISCUSION

En ambos sexos de *Peromyscus difficilis felipensis*, como en los roedores de laboratorio (Hall, 1994; Henricks, 1991; Lipsett, 1986), la producción de T e intermediarios se llevó a cabo por la vía $\Delta 4$, siendo estos datos el primer reporte referente a su producción *in situ* en ratones de vida libre de esta especie.

Al ser la tendencia de la producción de T mayor en los testículos de los adultos jóvenes (CE- III) con respecto a la de las gónadas de los roedores viejos (CE V), muestra que la producción del andrógeno disminuye pero no cesa *de facto* con la edad, patrón que concuerda con lo reportado tanto para roedores de laboratorio (vom Saal *et al.*, 1994), como para el ratón de orejas oscuras -*P. melanotis*- (Salame-Méndez *et al.*, 2004).

La producción de T en los ratones jóvenes subadultos, al ser similar al de los adultos jóvenes, indica que estos ratones están en transición a su madurez sexual y por ende podrían participar en la reproducción; sin embargo, su participación estaría condicionada tanto a su fenotipo como a su conducta social (Nelson, 1995; Meisel y Sachs, 1994). El incremento de la síntesis de este andrógeno -siendo su pico en los adultos jóvenes- coincide con el hecho de que los ratones adultos son los individuos más activos en el proceso reproductivo, y por ende en ellos recae el peso de mantener su población (Anderson, 1989). Por último, la tendencia a disminuir la producción de T en los ratones viejos, sugeriría que estos individuos podrían a un tener actividad reproductiva, aunque su vigor biológico fuese menor con respecto a los ratones adultos (Chambers, 1995; Meites, 1995).

Long y Evans (1922) en las hembras de rata hicieron la primera correlación entre el frotis exfoliativo vaginal con algunos cambios de su tracto reproductivo, y lo mismo hizo Allen (1922) para las hembras de ratón. Posteriormente, Smith y col. (1975) durante el ciclo estral de *Rattus norvegicus*, correlacionaron la concentración en el plasma de P4, E2 y prolactina, así como de gonadotropinas (FSH y LH).

El ciclo estral en roedores de laboratorio, en particular de *Rattus norvegicus* y *Mus* sp. (Bentley, 1998; Freeman, 1994; Rowlands y Weir, 1984; Gorbman *et al.*, 1983) está conformado por: diestro (también nombrado metaestro II, diestro I, inicio del diestro, final del metaestro II, diestro II, o diestro tardío); proestro (diestro II o tardío, mañana del proestro); estro, y metaestro (metaestro I, diestro I o diestro tardío). También se ha descrito dicho ciclo en especies silvestres, previamente condicionadas a un bioterio (v. gr. Olivera *et al.*, 1986; Conaway, 1971), pero sin considerar algún estimado endocrino. De tal manera que en nuestro estudio se pudo correlacionar la información obtenida de los frotis vaginales en hembras de *P. difficilis felipensis* con la producción de esteroides sexuales en tres estadios de su ciclo estral (diestro I, diestro II y proestro), sin que hubiesen estado en condiciones previas de acondicionamiento en un bioterio, por lo que esta evidencia endocrina, aunque preliminar, es una primera contribución a la biología reproductiva de hembras de esta especie en condiciones lo más cercanas posible a su condición silvestre.

El diestro I (metaestro) corresponde a la fase lútea; a esta etapa del ciclo se le considera ser el estadio final del estro el cual se inicia al medio día, razón por la que se le denomina estro tardío, y durante el cual se puede dar la ovulación. Referente a la relación entre la concentración de progesterona y estradiol en el plasma, la $P4 \gg E2$ (Bentley, 1998; Freeman, 1994; Smith *et al.*, 1975); donde el mayor contenido de la progesterona se debe a que el ovario durante esta etapa del ciclo estral tiene cuerpos lúteos secretores, los cuales son los principales productores de la progestina (Niswender y Nett, 1988). Aunque no encontramos diferencias significativas en la síntesis de ambas hormonas esteroides sexuales, sí hubo una tendencia a ser mayor la producción de P4 que E2. La ausencia de una diferencia significativa pudo deberse a que las dos hembras analizadas estuviesen en transición del estro al diestro I. Una relación fisiológica que pudiera tener la elevada producción de la P4 durante el diestro I sería que la hormona provocara cambios en el endometrio para que este estuviese apto para una posible implantación de blastocistos (Salame-Méndez *et al.*, 2003), así como estimular en las glándulas mamarias el desarrollo del sistema alveolar productor y secretor de leche (Austin y Short, 1978).

Durante el diestro II, que viene siendo el final del diestro I, la $P4 < E2$ en el plasma; hecho que se debe a la luteólisis e inicio del desarrollo folicular (Niswender y Nett, 1988; Freeman, 1994)., de tal manera que la relación en la producción de P4 y E2 encontrada en *P. difficilis felipensis* concordó con el hecho de la relación de sus contenidos en el plasma descrito para los roedores de laboratorio (Freeman, 1994; Smith *et al.*, 1975).

Por último, el proestro, que corresponde al final del diestro II, es el estadio de inicio del «calor» (estro) que es el preámbulo de la conducta sexual de apareamiento. Este estadio se caracteriza por un considerable desarrollo folicular en donde algunos ya alcanzan su madurez (folículos de Graaf), así como por haber una conspicua baja en el contenido de P4 y un notable aumento de E2 en el plasma. La relación anterior ($P4 \ll E2$) concordó con la producción de ambas hormonas esteroides sexuales en los ovarios de *P. difficilis felipensis* en proestro, por lo que en esta etapa del ciclo estral la mayor producción de E2, principalmente producido por el tejido folicular (Norman y Litwack, 1997), estimularía la proliferación de las células del endometrio para que este tejido pudiese estar capacitado para una futura implantación (Salame-Méndez *et al.*, 2003; Austin y Short, 1978).

En conclusión, en ambos sexos del ratón de las rocas -*Peromyscus difficilis felipensis*- la producción de esteroides sexuales se lleva a cabo dependiendo de la edad de los machos y la etapa del ciclo estral en las hembras. En los machos, la síntesis de esteroides sexuales, especialmente de T, se incrementa conforme maduran, alcanzando su máxima producción durante la edad adulta y disminuye en la vejez. En las hembras, durante el diestro I la producción de P4 tiende a ser mayor que la de E2; y en el diestro II el estrógeno comienza a aumentar, incrementándose aun más en el proestro.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro reconocimiento a Juan Patiño Rodríguez, por su valiosa colaboración tanto en el trabajo de campo como en el de gabinete, así como a la Biol. Olga Moreno Ramos por su participación en la recolección del material biológico. A los revisores anónimos les agradecemos sus comentarios y sugerencias para este trabajo. Este estudio forma parte de dos Proyecto apoyados por la División de CBS de la UAMI (144.03.07 y 144.03.12 para ASM,

y 143.02.14 y 223 para ACC), así como ser parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT 400200-5R29117N y 2002-COI-39619-Q para JRP).

LITERATURA CITADA

- Akthar, M., P. Lee-Robichaud, M. E. Akthar and J. N. Wraith. 1997. The impact of aromatase mechanism on other P450s. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 61:127-132.
- Allen, E. 1922. The oestrus cycle in mouse. *Am. J. Anat.*, 30:297-325.
- Anderson, P. K. 1989. Dispersal in Rodents: A Resident Fitness Hypothesis. Provo, UT. *Amer. Soc. Mamm., Spec. Publ.*, 9:vii+141.
- Austin, C. R., and R. V. Short, editors. 1978. *Hormones in Reproduction: Reproduction in Mammals*, vol 3. Cambridge University Press.
- Bentley, P. J. 1998. *Comparative Vertebrate Endocrinology*. Cambridge University Press. 3th 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.
- Conaway, C. H. 1971. Ecological adaptation and mammalian reproduction. *Biol. Reprod.*, 4:239-247.
- Chambers, K. C. 1995. The Roles of Regulatory and Modulatory Processes in the Decline of Reproductive Behavior of Males. Pp. 119-150 *in: The Reproductive Neuroendocrinology of Aging and Drug Abuse*. Dipak K. Sarkar and Charles D. Banes, eds. CRC Press.
- Freeman, M. E. 1994. The Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Rat. Pp 613-658 *in: The physiology of Reproduction*. E. Knobil and J. D. Nelly, eds. Raven Press, Ltd.. 2nd ed.
- Good, T., M. Z. Khan and J. W. Lynch. 2003. Biochemical and physiological validation of a corticosteroid radioimmunoassay for plasma and fecal samples in oldfield mice (*Peromyscus polinotus*). *Physiol Behav.*, 80:405-11.
- Gorbman, A., W. W. Dickhoff, S. R. Vigna, N. B. Clark and Ch. L. Ralph. 1983. *Comparative Endocrinology*. John Wiley and Sons.
- Hall, P. F. 1994. Testicular Steroid Synthesis: Organization and Regulation. Pp. 1335-1361 *in: The Physiology of Reproduction*. E. Knobil and J. D. Neill, eds. Raven Press. 2nd ed.
- Henricks, D. L. 1991. Biochemistry and Physiology of the Gonadal Hormones. Pp. 81-118 *in: Reproduction in Domestic Animals*. Perry 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: Estandar Methods for Mammals*. Don E. Wilson, F. Russell Cole, James D. Nichols, Rasanayagam Rudran and Mercedes S. Foster, eds. Smithsonian Institution Press. Washington and London.
- Lapseritis, J. M. and V. Hayssen. 2001. Thyroxine levels in agouti and non-agouti deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 130(2):295-299.
- Lipsett, M. B. 1986. Steroid Hormones. Pp. 140-153 *in: Reproductive Endocrinology*. S. S. C. Yen and R. Jaffe, eds. W. B. Saunders.
- Long, J. A. and H. M. Evans. 1922. The estrous cycle of the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. Calif.*, 6:1-148.
- Meites, J. 1995. Neuroendocrine Control of Reproduction in Aging Rats and Humans. Pp. 109-117 *in: The Reproductive Neuroendocrinology of Aging and Drug Abuse*. Dipak K. Sarkar and Charles D. Banes, eds. CRC Press.
- Meisel, R. L. and B. D. Sachs. 1994. The Physiology of Male Sexual Behavior. Pp 3-105 *in: The Physiology of Reproduction*. E. Knobil and J. D. Neill, eds. Raven Press. 2nd ed.

- Motulski, H. J. 1999. Analyzing data with Graph Pad Prisma Software, Inc.
- Nelson, R. J. 1995. An Introduction to Behavioral Endocrinology. Sinauer Associates, Inc.
- Niswender, G. D. and T. M. Nett. 1988. The Corpus Luteum and its Control. Pp 489-526 In: The Physiology of Reproduction. E. Knobil and J. D. Neil, eds. Raven Press.
- Norman, A. W. and G. Litwack. 1997. Hormones. Academic Press. 2nd ed.
- Norris, D. O. 1997. Vertebrate Endocrinology. Academic Press. 3th ed.
- Olivera, J., J. Ramírez-Pulido y S. L. Williams. 1986. Reproducción de *Peromyscus (Neotomodon) alstoni* (Mammalia:Muridae) en condiciones de laboratorio. Acta Zool. Mex. (n. s.), 16:1-27.
- Perrot-Sinal, T. S., M. Kavaliers and K. -P. Ossenkoop. 1998. Spatial and hippocampal volume in male deer mice: relations to age, testosterone and adrenal gland weight. Neuroscience, 86(4):1089-1099.
- 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.
- Rowlands, I. W., and D. B. J. Weir. 1984. Mammals: Non-primate Eutherians. Pp. 1455-659 in: Marshall's Physiology of Reproduction: Reproductive Cycles of Vertebrates. G. E. Lamming, ed. Churchill Livingstone. 4th ed.
- Salame-Méndez, A., E. Mendieta-Márquez, I. H. Salgado-Ugarte, J. Herrera-Muñoz, A. Castro-Campillo y J. Ramírez-Pulido. 2004. Evaluación estacional de la producción de esteroides sexuales en testículos del ratón de orejas oscuras (*Peromyscus melanotis*, Allen y Chapman, 1897) de diferentes clases de edad. Acta Zool. Mex (n. s.) 20(2):103-114.
- _____, R. M. Viguera-Villaseñor, J. Herrera-Muñoz, E. Mendieta-Márquez, I. H. Salgado-Ugarte, A. Castro-Campillo y J. Ramírez-Pulido. 2003. Inmunolocalización y contenido de esteroides sexuales en ovarios de hembras de *Peromyscus melanotis* Allen y Chapman, 1897 (Rodentia: Muridae) durante la primera mitad de la preñez. Acta Zool. Mex. (n. s.) 88:43-57.
- _____, J. Herrera-Muñoz, N. Moreno-Mendoza and H. Merchant-Larios. 1998. Response of diencephalon but not the gonad to female-promoting temperature with elevated estradiol levels in the sea turtle *Lepidochelys olivacea*. J. Exp. Zool., 280:304-313.
- Smith, M. S., M. E. Freeman and J. D. Neil. 1975. The control of progesterone during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. Endocrinology 96:219-226.
- vom Saal, F. S., C. E. Finch and J. F. Nelson. 1994. Natural history and Mechanism f Reproductive Aging in Humans, Laboratory Rodents, and Other Selected Vertebrates. Pp. 1213-1314 in: The Physiology of Reproduction. E. Knobil and Jimmy D. Neill, eds. Raven Press. 2nd ed.