

**Valoración de esteroides sexuales en testículos de ratones juveniles de
Peromyscus melanotis (Rodentia: Muridae).**

**Determination of sexual steroids in testes of juvenile mice of
Peromyscus melanotis (Rodentia: Muridae).**

**Arturo Salame-Méndez^{1*}, Joaquín Herrera-Muñoz^{3,4},
Alondra Castro-Campillo² 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 No. 186. Col. Vicentina. Iztapalapa, CP 09340. Apdo. Postal 55-535. México D. F. ⁴Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva, Hospital «Luis Castelazo Ayala» IMSS. CP 01090. México, D. F. MÉXICO. *Correspondencia; e-mail: asam@xanum.uam.mx

RESUMEN

Se valoraron los contenidos de esteroides sexuales (ES) en las gónadas de ratones juveniles con testículos escrotados de *Peromyscus melanotis*. Los ES cuantificados por radioinmunoanálisis (RIA) fueron pregnenolona (P5); progesterona (P4); 17 α -hidroxi-progesterona (17P4); androstendiona (A) y testosterona (T). Las concentraciones de los ES fueron significativamente diferentes ($P < 0.0001$). La concentración de T en relación con la de cada uno de los esteroides analizados, fue significativamente diferente ($P < 0.001$) en 2, 8, 26 y 11 veces más alta que la concentración de P5, P4, 17P4 y A. A su vez, la concentración de P5 fue significativamente mayor ($P < 0.001$) que la de P4, 17P4 y A con una diferencia de 5, 16 y 7 veces más, respectivamente, pero dos veces menor con respecto a la de T ($P < 0.001$). En la concentración de P4, 17P4 y A no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$). Las concentraciones encontradas son similares a las de roedores de laboratorio identificados como juveniles prepúberes; por ende, se concluye que el hecho de presentar testículos escrotados no es un criterio suficiente para considerar a los individuos juveniles de *P. melanotis* como sexualmente activos.

Palabras clave: Roedores, *Peromyscus melanotis*, testículos, esteroides sexuales, juveniles, pubertad, México.

ABSTRACT

The contents of sexual steroids (SS) were assessed in gonads of juvenile mice of *Peromyscus melanotis* with scrotal testes. The SS quantified, by radioimmunoassay (RIA), were pregnenolone (P5); progesterone (P4); 17 α -hydroxy-progesterone (17P4); androstendione (A) and testosterone (T). Concentration of T was of 2, 8, 26, and 11 times that of P5, P4, 17P4 and A, respectively. Also, concentrations of P5 surpassed 5, 16, and 7 times that of P4, 17P4, and A; there were no significant differences in the concentrations of the three latter steroids. These concentrations are very similar to those bored by prepuber laboratory rodents; therefore, it is concluded that the presence of scrotal testes in juvenile *P. melanotis* is not a sufficient criterion to consider them sexually mature.

Key words: Rodents, *Peromyscus melanotis*, testes, sexual steroids, juvenile, puberty, Mexico.

INTRODUCCIÓN

La madurez sexual en el ciclo biológico de una especie implica el establecimiento y mantenimiento de una serie de procesos endógenos que permiten la regulación y producción

de esteroides sexuales (ES). Los ES regulan la actividad reproductiva al producir cambios en diversos tejidos y en el comportamiento. De esta manera, se dice que los organismos que han alcanzado la

madurez son activos sexualmente y por tanto, con capacidad de reproducirse, siendo de quienes dependerá la perpetuación de su especie.

En el campo de la Mastozoología, es tradicional considerar la presencia de testículos escrotados en roedores silvestres como un indicador de madurez sexual y que, junto con su tamaño y peso, establecen una relación directa con la madurez sexual (Layne, 1968). Pero estas interpretaciones al basarse solamente en el aumento de la masa tisular, son indirectas y por tanto, no reflejan necesariamente los eventos fisiológicos de las gónadas.

En otros casos, como efecto de la manipulación de los individuos se produce estrés, lo que ocasiona la retracción de los testículos del escroto y por ello, se les clasificaría como inmaduros sexualmente. Sin embargo, en otras especies como *Neotomodon alstoni* en condiciones de bioterio no se observaron machos con testículos escrotados (Olivera *et al.*, 1986), aún cuando la colonia se reprodujo exitosamente.

Por lo tanto, más que la posición, peso y tamaño, la funcionalidad de los testículos depende de factores endocrinos no bien explorados todavía (Eleftheriou, 1968). Se sabe que en periodos bien definidos del ciclo de vida de los mamíferos, las dos funciones principales de los testículos son la espermatogénesis y la biosíntesis de ES (Bronson, 1989), destacando la producción de andrógenos que regulan diversos procesos biológicos (van Tienhoven, 1983).

Tanto la producción de espermatozoides como de andrógenos se coordinan con el sistema nervioso central por medio del eje hipotálamo-hipófisis-testículo (Hodgson *et al.*, 1983). Andrógenos como la testosterona (T) provocan en el hipotálamo la secreción del factor liberador de gonadotropinas (GnRH, siglas en inglés) que en la hipófisis regula la secreción de la hormona foliculo estimulante (HFE) y la hormona luteinizante (HL). La HFE

y la T coordinan la espermatogénesis en las células de Sertoli (McLachlan *et al.*, 1996) y la HL la producción de T en las células de Leydig (Ewing y Keeney, 1993).

La T producida por las células de Leydig tiene un papel fundamental en la biología reproductiva por sus múltiples funciones. Este andrógeno participa en la espermiogénesis (Vornberger *et al.*, 1994). Actúa en el establecimiento de los órganos accesorios (Bardin y Catteral, 1981; Russell *et al.*, 1987) y estimula el crecimiento corporal, modulando el desarrollo muscular (Joubert y Tobin, 1995; Sauerwein y Meyer, 1989) y óseo (Corvol *et al.*, 1992; Kasperk *et al.*, 1990). Asimismo, la T regula la manifestación de los caracteres sexuales secundarios como el crecimiento del pelo (Sawaya, 1994); el contenido de grasa en la piel (Desyhpere *et al.*, 1985) y coadyuva al despliegue de la conducta sexual (Mani *et al.*, 1994).

Para determinar con mayor precisión el inicio de la madurez sexual en los machos de especies de roedores silvestres, es necesario examinar los caracteres histomorfológicos y valorar los contenidos de ES en las gónadas y en los tejidos accesorios; además de consignar las características externas de los órganos sexuales secundarios.

Al estudiar la reproducción de *Peromyscus melanotis* en la Sierra del Ajusco, D. F., se ha observado que se reproduce durante todo el año (datos sin publicar) y que es frecuente encontrar individuos juveniles con los testículos escrotados. Estas dos observaciones plantean la posibilidad de que esos individuos estén participando activamente en la reproducción de la población si se les considera sexualmente maduros. Pero también es posible que los testículos en el escroto sean sólo un signo de que los individuos están empezando a madurar y que aún no producen suficientes espermatozoides (Layne, 1968; Clark, 1938) o andrógenos (Ramaley y Schwartz, 1980) para considerarse sexualmente maduros.

Por lo antes mencionado, se decidió explorar la relación existente entre testículos escrotados y la madurez sexual mediante la cuantificación de pregnenolona, progesterona, 17 α -hidroxi-progesterona, androstendiona y testosterona en los testículos de ratones juveniles de *Peromyscus melanotis*, información que se documenta por primera vez para esta especie.

MATERIALES y MÉTODOS

Recolección del Material Biológico. Se examinaron machos juveniles (edad I) de *P. melanotis* con los testículos escrotados recolectados en la Sierra del Ajusco, D. F. (0.85 Km. N, 3.5 Km. W Ecuamil, 3180 m; 19° 13' 37" N, 99° 15' 37" W). La captura se hizo de manera selectiva con trampas Sherman, cebadas con hojuelas de avena. En el laboratorio los ratones se mataron por dislocación cervical y se registraron las medidas convencionales (Kunz *et al.*, 1996; Ramírez-Pulido *et al.*, 1989). La clasificación de la edad se hizo de acuerdo con el desgaste de la superficie oclusal de los molares (Hoffmeister, 1951).

Valoración del Contenido de Esteroides Sexuales. Para la determinación del contenido de esteroides sexuales (ES) se utilizaron nueve pares de testículos. Cada par de testículos extirpados se colocaron en tubos Eppendorf con solución de Ringer isotónica y se almacenaron a -70°C. El par de testículos se homogeneizó por ultrasonido (Sonic Dismembrator-50, Fisher) y se le tomó una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976); se utilizó albúmina de suero de bovino como estándar para la curva patrón. El contenido de ES se estableció por técnicas radioinmunoanalíticas como sigue: 3 β -hidroxi-5-pregнено-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).

Separación de los Esteroides. Para determinar el porcentaje de eficiencia en la extracción y para la cuantificación de cada uno de los ES se utilizaron los esteroides radiactivos [7-³H]-pregnenolona (actividad específica -ae- 27 Ci/mmol), [1,2,6,7-³H]-progesterona (ae 83 Ci/mmol); [1,2-³H]-17progesterona (ae 44 Ci/mmol), [1,2,6,7-³H]-androstendiona (ae 84 Ci/mmol), [2,4,6,7,16,17-³H]-testosterona (ae 139 Ci/mmol). Cada uno de los esteroides mencionados se obtuvieron de New England Nuclear (Boston, MA) y se purificaron previamente al uso por cromatografía en capa fina (CCF), con una disolución de tolueno:acetato de etilo (2:1, v/v). La P5, P4, 17P4, A y T que se utilizaron como referencia, se obtuvieron de Steraloids (Pawling, N. Y.) y se purificaron antes de su uso por CCF. Los reactivos y disolventes orgánicos utilizados fueron de grado analítico procedentes de diversas casas comerciales.

La extracción de los esteroides totales se hizo sobre cada homogenizado con éter dietílico por duplicado, siendo la eficiencia del 98.6 \pm 0.6%. La separación de P5, P4, 17P4, A y T en cada uno de los extractos que contenían los esteroides totales se hizo por CCF, sobre cromatoplasmas cubiertas con gel de sílice e indicador de radiación UV (Merck) y se utilizaron tres sistemas cromatográficos: benceno; benzeno:acetato de etilo (7:3, v/v), y benzeno:metanol (95:5, v/v). La zona del cromatograma que coincidió con la distancia relativa de separación (Rf) del esteroide de referencia se raspó y el esteroide adsorbido al sílice se separó con una disolución de éter etílico:metanol (1:1, v/v). La disolución con el esteroide a cuantificar se recolectó en un tubo de ensaye y se evaporó a sequedad.

Cuantificación de los Esteroides. La concentración de P5, P4, 17P4, A y T se realizó por técnicas radioinmunoanalíticas (RIA) previamente descritas (Mendieta *et al.*, 1991). A cada tubo con el ES a

cuantificar, se le agregó solución amortiguadora de fosfatos (0.25 M pH 7, azida de sodio y gelatina al 1%), así como una dilución apropiada del antisuero contra el esteroide a ser cuantificado (Bermúdez *et al.*, 1975) y fue incubado por 18 hrs a 4°C. El esteroide unido al anticuerpo se separó con una disolución de carbón activado-dextrán (6.25 mg % y 62.5 mg % Dextrán T-70:Norit A, p/p en agua bidestilada) por centrifugación a 3000 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se decantó en viales a los que se les agregaron 5 ml de Instagel (Packard) y la cantidad del esteroide radiactivo libre se determinó en un espectrómetro de centelleo líquido (Beckman, LS-7000) con una eficiencia del 53% para tritio. El método de cada RIA fue validado por medio de curvas estándar de manera paralela, con coeficientes de variación intraensayos menores del 4%. Para comparar la concentración de los ES, se usó la prueba de Bartlett para varianzas iguales y la prueba de comparación múltiple de Tuckey (Zar, 1999).

RESULTADOS

Las concentraciones de los ES fueron significativamente diferentes (Bartlett ANOVA, $F_{4,40} = 42.47$, $P < 0.0001$). De hecho, la concentración de T fue significativamente mayor ($P < 0.001$) a la de P5, P4, 17P4 y A (Fig. 1) en 2, 8, 26 y 11 veces, respectivamente. Asimismo, la concentración de P5 fue significativamente mayor ($P < 0.001$) que la de P4, 17P4 y A (Fig. 1), superando la de estos esteroides por 5, 16 y 7 veces más, respectivamente ($P < 0.001$) (Fig. 1). Finalmente, en la concentración de P4, 17P4 y A no se demostraron diferencias significativas ($P > 0.05$).

DISCUSIÓN

La reproducción es un proceso multifactorial (Bronson, 1985; Bronson y Perigo, 1987) que involucra aspectos

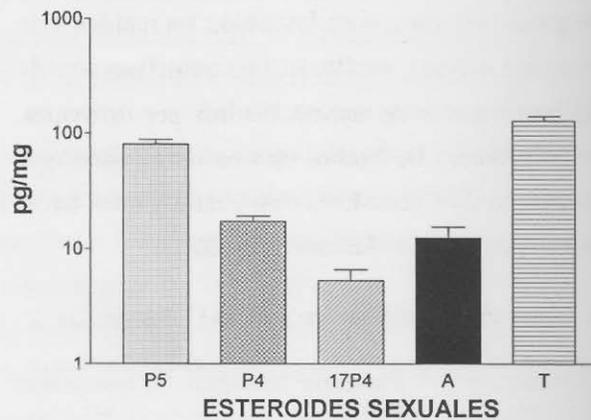


Fig. 1. Contenido de esteroides sexuales en los testículos escrotados de ratones juveniles ($n = 9$) de *Peromyscus melanotis* de la Sierra del Ajusco, D. F. Las barras representan la concentración y la línea vertical \pm una desviación estándar. P5 (pregnenolona), P4 (progesterona), 17P4 (17 α -hidroxi-progesterona), A (androstendiona) y T (testosterona).

ecológicos (estacionalidad, densidad de la población estructura de edades y proporción de sexos) y etológicos (cortejo, territorialidad, selección sexual), así como procesos fisiológicos y endocrinos que se expresan en diferentes etapas del ciclo biológico de una especie.

En los roedores como en otros grupos de mamíferos, para que un animal sea apto para reproducirse debe madurar sexualmente y, para ello, debe pasar gradualmente por las etapas neonatal, infantil, juvenil y adulta. De ahí que en los estudios de la biología reproductiva de una especie, sea fundamental considerar la edad de los individuos.

En estudios mastozoológicos, la determinación de clases de edad en especies del género *Peromyscus* puede ser subjetiva con los métodos convencionalmente

utilizados (Hoffmeister, 1951; Hooper, 1952), ya que el desgaste de la superficie oclusal de los molares, así como la condición, textura y color del pelaje, pueden ser interpretados de manera distinta por diferentes investigadores. De hecho, esto ha ocasionado que algunos de ellos consideren tres, cuatro y otros hasta seis grupos de edad (Anderson, 1989).

Pero más importante que esto, es que tales grupos de edad se hacen corresponder intuitivamente con una etapa del ciclo biológico de la especie, a la cual se le asocia un papel particular en el ciclo reproductivo. Así, por ejemplo, se dice que la edad I corresponde a juveniles, la II a subadultos, la III a adultos jóvenes, la IV a adultos de mediana edad, la V a adultos maduros y la VI a individuos viejos (Anderson, 1989). En cambio, otros identifican solamente tres tipos de edad: juveniles, adultos y viejos.

Anderson (1989) también indica que el término juvenil es aplicado de manera variable, pero que en general se refiere a individuos prepúberes y añade que se trata de individuos destetados, pero no menciona que participen o no en la reproducción. Aquí cabe destacar que durante la etapa juvenil se da la transición hacia la pubertad, periodo en que se llevan a cabo los cambios fisiológicos y etológicos que conllevan a la capacidad reproductora (Bronson y Rissman, 1986); de hecho, al inicio de la pubertad se reinicia la producción de andrógenos (Russell *et al.*, 1987).

En particular, si se asume que ni los juveniles ni los viejos participan en la reproducción de *Peromyscus melanotis*, el éxito reproductivo de la especie quedaría limitado a los adultos, de ahí la importancia para cuantificar los contenidos de P5, P4, 17P4, A y T en los testículos de individuos juveniles con testículos escrotados. Esto permitiría establecer la edad a partir de la cual los animales participan en ventos reproductivos.

El perfil de las concentraciones de esteroides sexuales muestran que los individuos analizados corresponden a prepúberes, no obstante que al tiempo de su captura presentaron los testículos escrotados. De hecho, los perfiles de la concentración de P5, P4, 17P4, A y, particularmente, el de T son muy similares a los de ratones albinos (*Mus musculus*) de la cepa CD1 (Salame-Méndez, datos no publicados) de 35 días (prepúberes) y de 42 días de edad (púberes tempranos), así como a los descritos para individuos prepúberes y púberes de la rata albina (*Rattus norvegicus*) (Clark y Price, 1981; Ramaley, 1979; Ramaley y Schwartz, 1980).

Por otro lado, la concentración de T en los juveniles de *P. melanotis* es un poco menor a la mitad (24.5 pg/mg) de la concentración que se encontró en los testículos de ratones subadultos (44 pg/mg) de la cepa CD1 (Salame-Méndez, datos no publicados). Por ende, los resultados obtenidos sugieren que en los juveniles de *P. melanotis*, la esteroidogénesis se ha iniciado y por tanto, se ha establecido el eje hipotálamo-hipófisis-testículo.

Cabe mencionar que la P4, 17P4 y A analizadas son los ES que conforman la vía $\Delta 4$ en la síntesis de T (Lipsett, 1986), que junto con la vía $\Delta 5$, constituyen las dos rutas esteroidogénicas para la producción de este andrógeno. La concentración de P5, que es el precursor en la síntesis de hormonas esteroides, así como la de los esteroides C19 (P4, 17P4 y A) que conforman la ruta esteroidogénica $\Delta 4$ (Lipsett, 1986), indican que la síntesis de T en *P. melanotis* puede seguir esta vía. Sin embargo, la ruta esteroidogénica precisa está en proceso de análisis.

La concentración elevada de T con respecto a los demás ES en los *P. melanotis* analizados, permite evaluar que este andrógeno participa en la regulación de los cambios en la transición a la pubertad. De tal

manera que su función estimula el crecimiento corporal (Joubert y Tobin, 1995; Corvol *et al.*, 1992), regula el crecimiento y el color del pelo (Sawaya, 1994), así como la producción y secreción de sebo (Desyhpere *et al.*, 1985) y, junto con el estradiol, coadyuva al despliegue del comportamiento sexual (Collado *et al.*, 1993).

Como desde el punto de vista de la endocrinología, los individuos examinados de *P. melanotis*, incluyen tanto individuos prepúberes (categoría peripuberales o púberes tempranos) como púberes propiamente, estamos realizando estudios para conocer su conducta sexual, así como análisis histológicos de los testículos y epidídimos para evaluar la presencia o no de espermatozoides, estos trabajos nos permitirán establecer si los animales juveniles participan o no en los eventos reproductivos. Sin embargo, con los resultados obtenidos en este trabajo, se fortalece el argumento de que la sola presencia de testículos escrotados en los ratones de la categoría de edad I (juveniles), es insuficiente para considerar que participen en la reproducción de la población. Condición que por otra parte, no refleja la relación entre la edad supuesta y la condición fisiológica de los individuos y, por ende, se concluye que, a los ratones juveniles de *Peromyscus melanotis* con testículos escrotados no se les puede considerar maduros sexualmente.

AGRADECIMIENTOS

Nuestro reconocimiento al Sr. Juan Patiño Rodríguez por su excelente trabajo, tanto en el campo como en el gabinete. También a la Biól. Olga Moreno Ramos por su ayuda en la recolección de los ejemplares examinados. Proyecto CBS, UAMI No.144.03.07 (ASM) y parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. 400200-5R29117N, JRP). Los resultados 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.
- Bardin, C. W., and J. F. Catteral. 1981. Testosterone: A major determinant of extragenital sexual dimorphisms. *Science*, 21:1285-1293.
- Bermúdez, J. A., V. Coronado, A. Mijares, C. León, A. Velazquez, and J. L. Mateos. 1975. Stereochemical approach to increase the specificity of steroid antibodies. *J. Steroid. Biochem.*, 6:283-290.
- 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.
- Bronson, F. H. 1985. Mammalian reproduction: An ecological perspective. *Biol. Reprod.*, 32:1-26.
- _____. 1989. Mammalian Reproductive Biology. The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Bronson, F. H., and E. Rissman. 1986. Biology of puberty. *Biol. Rev.*, 61:157-195.
- _____, and G. Perigo. 1987. Seasonal regulation of reproduction in muroid rodents. *Am. Zool.*, 27:929-940.

- Collado, P., A. Valencia, A. Del Abril, M. Rodríguez-Zafra, C. Pérez-Laso, S. Segovia, and A. Guillamon. 1993. Effects of estradiol on the development of sexual dimorphism in the bed nucleus of the accessory olfactory tract in the rat. *Dev. Brain. Res.*, 75:285-287.
- Corvol, M. O. Blanchard, and L. Tsagris. 1992. Bone and cartilage responsiveness to sex steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 43:415-418.
- Clark, F. H. 1938. Age of sexual maturity in mice of the genus *Peromyscus*. *J. Mamm.*, 19:230-234.
- Clark, B. R., and E. O. Price. 1981. Sexual maturation and fecundity of wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *J. Reprod. Fert.*, 63:215-220.
- Desylpere, J. P., L. Verdonck, and A. Vermeulen. 1985. Fat tissue: A steroid reservoir and site of steroid metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 61:564-570.
- Eleftheriou, B. E. 1968. Endocrinology. Pp. 312-339 in: *Biology of Peromyscus (Rodentia)*. J. A. King, ed. Amer. Soc. Mamm., Spec. Publ., 2:XIII+593.
- Ewing, L. L., and Keeney, D. S. 1993. Leydig Cell: structure and function. Pp. 137-165. In: *Cell and Molecular Biology of the Testis*. C. Desjardins and Ewing, L. L. (eds). Oxford University Press.
- Hodgson, Y., D. M. Robertson, and D. M. de Kretser. 1983. The regulation of testicular function. *Int. Rev. Physiol.*, 27:275-327.
- 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.
- Joubert, Y. and C. Tobin. 1995. Testosterone treatment results in quiescent satellite cells being activated and recruited into cell cycle in rat levator ani muscle. *Dev. Biol.*, 169:286-294.
- Kasperk, C., R. Fitzsimmons, D. Strong, S. Mohan, J. Jennings, J. Wergedal, and D. Baylink. 1990. Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 71:1322-1329.
- 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*. D. E. Wilson, F. R. Cole, J.D. Nichols, R. Pudran, and M. S. Foster, eds. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Layne, J. N. 1968. Ontogeny. Pp. 148-253. In *Biology of Peromyscus (Rodentia)* J. A. King, ed. Amer. Soc. Mamm., Spec. Publ., 2:XIII+593.
- Lipsett, M. B. 1986. Steroid hormones. In: *Reproductive Endocrinology*. S. S. C. Yen and R. Jaffe, eds. W. B. Saunders, Philadelphia. pp. 140-153.
- Mani, S. K., J. M. C. Allen, J. H. Clark, J. D. Blaustein, and B. M. O'Malley. 1994. Convergent pathways for steroid hormone- and neurotransmitter-induced rat sexual behavior. *Science*, 265:1246-1249.

- McLachlan, R. I., N. G. Wreford, L. O'Donnell, D. M. de Kretser, and D. M. Robertson. 1996. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J. Endocrinol.*, 148:1-9.
- Mendieta, E., A. Salame, J. Herrera, and F. Antón-Tay. 1991. Melatonin inhibition of androgen biosynthetic pathway in Leydig cell-enriched cell fractions from normal adult rat. *Mol. Androl.*, 3:319-329.
- 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.
- Ramaley, J. A. 1979. Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. *Biol. Reprod.*, 20:1-3 1.
- Ramaley, J. A., and N. B. Schwartz. 1980. The pubertal process in the rat. *Neuroendocrinology*, 30:213-219.
- Ramírez-Pulido, J., I. Lira, S. Gaona, C. Müdespacher y A. Castro. 1989. Manejo y mantenimiento de colecciones mastozoológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México.
- Russell, L. D., L. E. Alger, and L. G. Nequin. 1987. Hormonal control of pubertal spermatogenesis. *Endocrinology*, 120:1615-1632.
- Sauerwein, H., and H. H. D. Meyer. 1989. Androgen and estrogen receptors in bovine skeletal muscle: Relation to steroid-induced allometric muscle growth. *J. An. Sci.*, 67:206-212.
- Sawaya, M. E. 1994. Biochemical mechanisms regulating hair growth. *Skin Pharmacol.*, 7:5-7.
- Van Tienhoven, A. 1983. *Reproductive Physiology of Vertebrates*. Cornell University Press. 2nd ed.
- Vornberger, W., G. Prints., N. A. Musto., and C. A. Suarez-Quian. 1994. Androgen receptor distribution in rat testis: New implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology*, 134:2307-2316.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*. Prentice-Hall, Inc. 4th ed.