

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

**División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biología de la Reproducción**

Evaluación Interanual del Contenido de Testosterona en Testículos del Ratón de Orejas Oscuras (*Peromyscus melanotis*) de Diferente Edad.

T E S I S

**Que para obtener el Grado Académico de
Maestra en Biología de la Reproducción Animal
presenta**

Biol. MARIA LILIANA ALTAMIRANO LEÓN

Director de Tesis: Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

México, D. F.

2001

**El Jurado Designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa Aprobó la Tesis que Presento:**

Biol. Maria Liliana Altamirano León

Diciembre del 2001

Comité Tutorial

Director Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

Sinodal M. en B.R.A. José Luis Contreras Montiel

Sinodal M. en B.E. Enrique Mendieta Márquez

**El Jurado Designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
Unidad Iztapalapa Aprobó la Tesis que Presento:**

Biol. Maria Liliana Altamirano León

Diciembre del 2001

Comité Tutorial

Director Dr. Pablo Arturo Salame Méndez

Sinodal M. en B.R.A. José Luis Contreras Montiel

Sinodal M. en B.E. Enrique Mendieta Márquez

AGRADECIMIENTOS

En especial al Dr. Arturo Salame Méndez y al M. en B.E. Joaquín Herrera Muñoz por su apoyo desinteresado y asesoría en la realización de esta tesis.

A los sinodales M. en B.R.A. José Luis Contreras Montiel y M. en B.E. Enrique Mendieta Márquez por sus comentarios acertados en la revisión de la tesis.

Al Departamento de Biología de la Reproducción de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa y a la Unidad de Investigación Médica en Biología de la Reproducción (UIMBR), con sede en el Hospital de Gineco-obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala", del IMSS, por su apoyo en la realización de mi posgrado y trabajo experimental. Haciendo notar que esta formó parte del proyecto "*Determinación de los Contenidos de Esteroides Sexuales en Dos Especies de Roedores del Género Peromyscus de Dos Parques Nacionales del D. F.*" bajo la responsabilidad del Dr. Arturo Salame Méndez, así como del Convenio Interinstitucional específico entre la Rectoría de la UAM-Iztapalapa (UAMI), la Dirección de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAMI, y la Jefatura del Departamento de Biología de la Reproducción de la UAMI con la Coordinación de Investigación Médica y la Jefatura de la División de investigación Biomédica del IMSS con el proyecto "*Endocrinología Reproductiva de Pequeños Mamíferos del Eje Volcánico Transversal*".

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por su apoyo económico durante la Maestría en Biología de la Reproducción, con la Beca número **56742891**.

Al señor Juan Patiño técnico de la Colección de Mastozoología de la UAMI y a la Biól. Olga Moreno Mendoza del Lab. de Mamíferos de la UAMI por su ayuda en la recolecta de los ratones. A la Dra. Alondra Castro Campillo responsable del Laboratorio de Mamíferos de la UAMI por permitirme hacer uso de su laboratorio, así como por su ayuda en la determinación de las edades de los ratones. Al Q.F.B. Héctor Macías Hernández y al Sr. David Martínez técnicos de la UIMBR por su ayuda en la cuantificación de testosterona, así como al Dr.

Alfredo Ulloa Aguirre jefe de la UIMBR por permitirme hacer uso de las instalaciones para realizar el procesamiento de las muestras y la cuantificación de testosterona.

A todos los profesores que tuvieron que ver con mi enseñanza durante la maestría.

A mis Padres y hermanos, en especial a Doni por su asesoría técnica computacional.

A mis amados Oscar y Mariana

por su apoyo y comprensión

ÍNDICE

RESUMEN	9
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	11
TESTOSTERONA y FISIOLOGÍA REPRODUCTIVA	12
<i>Peromyscus melanotis</i>	16
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
MATERIALES y MÉTODOS	19
Áreas de Estudio	19
Recolecta de Roedores	22
Determinación de la Edad	23
Cuantificación de Testosterona	24
Obtención de los Homogenados para la Cuantificación de Testosterona	24
Extracción de Esteroides Totales	25
Cuantificación de Testosterona (RIA)	25
RESULTADOS	25
Contenido Mensual de Testosterona	27
Patrón Mensual del Contenido de Testosterona	28
Contenido de Testosterona Estacional	28
Patrón Estacional del Contenido de Testosterona	29
Patrón Ontogenético del Contenido de Testosterona	30
DISCUSIÓN	30
Patrón Mensual de Testosterona en Testículos de <i>Peromyscus melanotis</i>	30

Patrón Estacional del Contenido de Testosterona en Testículos de <i>Peromyscus melanotis</i>	33
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXO 1. Descripción de las Edades	47
ANEXO 2. Comparación entre la Cuantificación de Testosterona con y sin Cromatografía	49
ANEXO 3. Contenido de Testosterona Mensual Correspondiente al Periodo 1996-1997	53
ANEXO 4. Contenido de Testosterona Estacional Correspondiente al Periodo 1996-1997	54

RESUMEN

En México se tiene escaso conocimiento de la biología reproductiva de especies de mamíferos silvestres, siendo importante estudiarlas ya que su composición es amplia tanto que ocupa el segundo lugar mundial, que corresponde a un tercio de todas las especies registradas. Siendo el orden Rodentia uno de los más grandes. Dentro de la biología reproductiva del macho la secreción de hormonas esteroides es importante para conocer desde un punto de vista fisiológico aspectos reproductivos. En este sentido se considero a la testosterona hormona esteroide que durante la vida postnatal regula el desarrollo de varias características corporales y funcionales; además inicia y mantiene la espermatogénesis entre otras muchas funciones. Los anteriores procesos están bien documentados en roedores de laboratorio pero no en los silvestres. Con el objetivo de estudiar la endocrinología reproductiva del ratón endémico *Peromyscus melanotis* en este trabajo se describe el patrón mensual y estacional de testosterona testicular de machos de diferente edad. Esta especie se recolectó de junio de 1996 a febrero del 2000 en los Parques Nacionales Cumbres del Ajusco y Desierto de los Leones, México, D. F. En el laboratorio se mataron por dislocación cervical y registrando sus medidas mastozoológicas convencionales. Los testículos se extirparon colocándose en una solución Ringer isotónica, almacenándose a -70°C . La edad de los roedores se estimó por el desgaste oclusal de los molares; agrupándose en cinco categorías de edad: edad I (juvenil); edad II (subadulto); edad III (adulto joven); edad IV (adulto), y edad V (viejo). La cuantificación de testosterona se hizo por radioinmunoanálisis (RIA). La distribución estacional de los machos recolectados fue similar en primavera y otoño, siendo mayor en invierno. Las tendencias del patrón mensual y estacional del contenido de testosterona testicular de *P. melanotis* permitieron dilucidar que este fue menor en roedores de edad I, intermedio en los de edad II y V, y mayor en los de edad III y IV, respectivamente. Siendo su concentración más alta en junio y julio y la más baja en los meses de diciembre y enero. Resultados que permitieron demostrar que *P. melanotis* produce testosterona todo el año siendo su pico en el verano, así como ser su patrón ontogenético similar en cada una de las estaciones del año. Por lo que endocrinamente los machos de este roedor endémico se pueden agrupar en tres edades reproductivas: juveniles (edad I-II), adultos (edad III-IV) y viejos (edad V).

INTRODUCCIÓN

La composición mastofaunística terrestre de nuestro país es amplia y variada (450 especies) tanto que ocupa el segundo lugar a nivel mundial. Teniendo un alto número de especies endémicas (33%) que, junto con las especies que ocupan áreas geográficas reducidas, son más susceptibles de ver alterado su estado de conservación (Ceballos y Navarro, 1991; Ceballos y Rodríguez, 1993; Ramírez-Pulido y Castro-Campillo, 1993). A pesar de esto es notable el escaso conocimiento que se tiene sobre su biología reproductiva (Ramírez-Pulido y Müdespacher, 1987; Ramírez-Pulido y Castro Campillo, 1993).

Para coadyuvar al conocimiento de la biología reproductiva de estas especies se requiere estudiar, por ejemplo, la producción y regulación de hormonas implicadas en su reproducción, hecho importante a considerar, ya que la mayoría de los estudios que se han publicado sobre la biología reproductiva de mamíferos silvestres se han enfocado en su ecología poblacional (Terman, 1968; Bowles, 1972; Helm, 1975; Smolen *et al.* 1980; Hodischek y Best, 1983; Myers y Master, 1983; Bronson, 1989; Hilton, 1992; Sánchez-Cordero, 1993; Chávez-Tapia y Gallardo Villegas, 1993, entre otros), y unos cuantos trabajos hacen referencia a algún aspecto fisiológico (Eleftherius, 1968; Gustafson y Weir, 1979; Lombardi y Whitsett, 1980; Martín y Álvarez, 1982; Jeniolo, 1983; Cushing, 1985; Miller *et al.*, 1987; Olivera *et al.* 1986; Bronson, 1989; Heideman y Powell, 1998).

El Orden Rodentia es uno de los más grandes dentro de los mamíferos terrestres tanto en términos de número de géneros como de especies. Tiene aproximadamente 1/3 de todas las especies de mamíferos del mundo; estado en México 110 especies endémicas de roedores (Ramírez-Pulido y Castro campillo, 1993; Villa y Whisson, 1995).

Otros aspectos importantes para estudiar a los roedores urbanos y de campo, es el económico y sanitario, ya que afectan bienes inmuebles, cosechas y la salud. La FAO ha estimado que el 20% de la producción agrícola se pierde antes o después de las cosechas.

Por ejemplo, en la caña de azúcar, por cada dólar invertido en su control, se evitan pérdidas por 10 dólares. En el caso del maíz en el año 1990 durante la precosecha fue necesario derogar 25 millones de dólares para su control, así como de registrarse pérdidas hasta de un 50% en mercancías almacenadas. Además, los roedores tienen un gran impacto sobre casas habitación; tan solo en los Estados Unidos son responsables del 80% de los incendios cuyo origen no ha sido atribuido a otra causa y en lo referente a salud, provocan la muerte de animales domésticos y el hombre (González, 1994; Villa y Whisson, 1995).

Por otra parte, es importante mantener lo más intacto posible los ecosistemas donde viven los roedores silvestres, ya que estos son importantes en la dieta de muchos animales económicamente importantes, así como de otra fauna (Bellicoq y Smith, 1992). Por ejemplo, varias especies consumen insectos que causan daño a los árboles, como es el caso de *Peromyscus maniculatus* que consume hasta un 13% del gorgojo de pino (*Pinus banksiana*) (Maser *et. al.* 1981).

ANTECEDENTES

Los roedores se diferencian de otros mamíferos por la forma y ubicación de sus dientes. Tienen solamente un par de incisivos en cada mandíbula, y éstos están separados de los molares por un espacio vacío, la diastema.

Se ha estudiado la biología del roedor doméstico (*Mus musculus*) con diferentes enfoques, desde el epidemiológico hasta el de la biología del desarrollo hasta el punto en que se han obtenido diversas cepas a partir de las cuales se han efectuado cambios en su genoma. Sin embargo, poca atención se ha tenido sobre la biología de roedores silvestres y sobre todo en condiciones de campo. En los trabajos existentes, algunos hacen referencia a cuestiones reproductivas puntuales o de manera general pero con un enfoque ecológico; más no desde otros puntos de vista, por ejemplo, el endocrinológico.

El periodo promedio de vida de los roedores silvestres es relativamente corto, de 1-2 años (Hartenberg, 1985) comparado con el de *M. musculus*, que es de 3 a 5 años (Maser *et.*

al., 1981). En roedores silvestres como en otros mamíferos, la actividad reproductora empieza en la pubertad, se mantiene en la edad madura y disminuye parcialmente o totalmente en el envejecimiento (Sálame-Méndez *et. al.*, en preparación). Se reproducen todo el año o, como en algunas especies de *Peromyscus*, son estacionales. Su reproducción se puede dar desde los 2 a 4 meses de edad y probablemente continúan reproduciéndose hasta aproximadamente los 18 meses de edad. El número de crías depende de la especie y varía según las condiciones climáticas y alimenticias del lugar (Davis y Schmidly, 1994). Entre los ratones silvestres, el género *Peromyscus* ha sido uno de los más estudiados debido a las características intrínsecas de sus especies, la facilidad con que se pueden recolectar sin incidir en la densidad poblacional y porque son excelentes indicadores de las condiciones de un ecosistema (Fa, 1989; Ramírez-Pulido y Castro Campillo, 1992; Ferrusquía, 1993), así como por ser sospechosos de llegar a ser plaga y por que pueden portar hantavirus (González, 1994; Schmaljohm y Hjelle, 1997).

Testosterona y la Fisiología Reproductiva

Las dos funciones principales de los testículos durante períodos bien definidos del ciclo de vida de los mamíferos son la producción de espermatozoides (espermatogénesis) y la biosíntesis de hormonas esteroides sexuales (v. gr., andrógenos) (Bronson, 1989). La espermatogénesis requiere de la coparticipación de gonadotropinas (FSH y LH) y andrógenos (v. gr., testosterona). Tanto al iniciarse la pubertad, como en la reiniciación de la espermatogénesis después que por causas naturales (v. gr., cambios en el fotoperíodo) o patológicas se detuvo, se requiere de la acción de la FSH (Forsberg, 1996). Durante la espermatogénesis, las células germinales o espermatogonias, mantienen una estrecha relación con las células de Sertoli, relación que favorece la progresión de las diversas fases estructurales, bioquímicas y moleculares necesarias para el desarrollo del espermatozoide, de tal manera que, cuando se altera la relación de las células de Sertoli, disminuye o cesa la

formación de espermatozoides. La población celular clave en la iniciación de la espermatogénesis es la progenie espermatogonial, ya que es la línea celular precursora de los espermatozoides. Las espermatogonias se dividen por mitosis hasta que algunas inician la meiosis, produciendo los espermatocitos primarios y secundarios. De estas últimas células se conformarán las espermatidas, que son células haploides que eventualmente se diferenciarán en espermatozoides, a partir del proceso de la espermiogénesis o espermioteliosis (Kierszenbaum, 1997).

Durante la espermatogénesis se requieren concentraciones altas de andrógenos, los cuales se producen en las células intersticiales o de Leydig localizadas en los espacios entre los túbulos seminíferos (Fawcett, 1999). La síntesis de andrógenos en las células de Leydig se produce a partir de la acción de la LH. El inicio de la síntesis se da a partir de la movilización del colesterol, que se encuentra en forma de gotas lipídicas al interior de las células de Leydig. Una vez en el citoplasma, el colesterol se va acumulando en la membrana mitocondrial, en donde por acción de hidroxilasas y liasas se biotransforma en pregnenolona; este proceso es el paso limitante en la biosíntesis de hormonas esteroides (Hall, 1989). La pregnenolona sale de la mitocondria hacia el compartimiento microsomal y es catalizada por el sistema enzimático $\Delta 5-3\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa/ $\Delta 4$ - $\Delta 5$ -isomerasa, resultando la síntesis de progesterona. Esta es una hormona clave, ya que puede ser biosintetizada como producto terminal o bien servir como precursor de andrógenos, así como de estrógenos y corticosteroides (Heuze de Icaza, 1992).

Los tejidos endocrinos que biosintetizan andrógenos (testículos, ovarios, glándulas adrenales y tejido no glandular como los fibroblastos) utilizan tanto a la pregnenolona como a la progesterona como precursores para la síntesis de androstendiona y testosterona, andrógenos importantes debido a su actividad biológica. La biosíntesis de andrógenos se puede iniciar a partir de pregnenolona, por lo que esta vía de síntesis se denomina vía de los $\Delta 5$, pero si la síntesis se lleva a cabo a partir de la progesterona se denomina vía de los $\Delta 4$,

destacando que la utilización de la pregnenolona o de la progesterona como precursores opera simultáneamente, y el predominio de una vía sobre la otra depende de la especie (Yen y Jaffe, 1986; Hall, 1989; Stedman, 1993). Por otra parte, los andrógenos son los precursores a partir de los cuales se sintetizan los estrógenos (Loza *et al.* 1998; Katzung, 1998; Stedman, 1993).

La testosterona participa en el inicio y mantenimiento de la espermatogénesis, mientras que derivados de esta hormona, como la 5 α -dihidrotestosterona (5-DHT) o el 5 α -androstan-3 α -17 β -diol, son las hormonas responsables en la maduración de los espermatozoides (Kelce *et al.* 1990; Heuze de Icaza, 1992). La síntesis de ambas hormonas se da a partir de la acción sobre la testosterona de la 5 α -reductasa (5 α -HSD) o de la 3 α -hidroxiesteroide-deshidrogenasa (3 α -HSD), respectivamente (Ogebin-Cist, 1981; Kelce *et al.* 1990).

Durante el desarrollo ontogenético de los machos, la testosterona es responsable de diversos procesos. Durante la diferenciación sexual, junto con la 5-DHT, regula la virilización de los conductos de Wolff a partir de los cuales se desarrollan los genitales internos y externos (Kelce *et al.*, 1990; Salame-Méndez y Villalpando-Fierro, 1998). Por su parte, durante la vida posnatal, la testosterona regula el desarrollo de varias características corporales y funcionales. Por ejemplo, tiene efecto miotrófico (o anabólico), que involucra el incremento en la masa muscular por retención de nitrógeno y regula patrones en la distribución del pelo, muda y calcificación, por ejemplo, de la cornamenta en cérvidos. En roedores induce la proliferación celular y la síntesis *de novo* de ADN en el tejido eréctil del pene (Shabsigh *et al.* 1998). Regula cambios en diversos patrones conductuales, como el de la micción, que comprende el levantar uno de los miembros traseros como preludeo a la urinación, además de la asertividad o agresividad. También regula la producción de sustancias tales como las feromonas producidas, por ejemplo, en el riñón del gato macho,

utilizadas como marcador de territorios o las feromonas sexuales que influyen en la hembra durante el apareamiento (v. gr., cópula).

La espermatogénesis, a diferencia de la foliculogénesis, persiste en los machos hasta edades avanzadas de su vida, por lo que el envejecimiento no se acompaña de un descenso brusco o detención tanto de la espermatogénesis como de la síntesis de andrógenos (Steven y Gambert, 1995; Tenover, 1997; Salame-Méndez *et al.*, en preparación). Para integrar todos aquellos patrones característicos del envejecimiento en los machos, que en las hembras abarca los síntomas del hipogonadismo (inexistente en los machos), se acuñó un término equivalente masculino de la menopausia, la viro o andropausia.

En la vejez, tanto la función testicular endocrina (secreción de andrógenos), como la exocrina (espermatogénesis), disminuyen lenta y progresivamente con la edad; sin embargo, hay una amplia variabilidad interindividual (Gooren, 1996; Tenover, 1997; Tscrotas y Merino, 1998); además, la actividad sexual puede o no reducirse. Por ejemplo, en hombres de más de 60 años, más del 15% no refieren disminución de la libido ni de su actividad sexual (Steven y Gambert, 1985). Pese a la inequívoca importancia de la testosterona en el comportamiento sexual masculino, la interrelación entre las concentraciones circulantes del andrógeno, la libido y la actividad sexual continúa sin esclarecerse. En la actualidad está completamente establecido que es la edad por sí misma, más que la disminución de los andrógenos, la variable que más influye en el comportamiento sexual durante la vejez (Magoña, 1997). Una respuesta alternativa sería probablemente que en el envejecimiento exista una disminución del efecto de los andrógenos circulantes atribuible a variaciones en la sensibilidad de los órganos blanco. Sin embargo, son escasos los datos en la bibliografía referentes a cambios relacionados con la edad y el número o afinidad de los receptores androgénicos, así como con los mecanismos moleculares posreceptor (Gooren, 1996).

Aunque la alteración de la función gonadal en la vejez se debe predominantemente a cambios en el testículo, también se produce una disminución en la secreción de hormona

liberadora de gonadotropinas (GnRH) lo que explica el aumento de FSH y LH; sin embargo, la concentración de testosterona circulante es moderadamente baja. Restituyéndose la concentración de testosterona en hombres de edad avanzada, así como la frecuencia y amplitud de los pulsos de LH a partir de la administración pulsátil de GnRH (Steven y Gambert, 1995).

Peromyscus melanotis

Es una especie de ratón monotípica (Ramírez-Pulido *et. al.*, 1995) de tamaño pequeño entre los miembros del género y debe su nombre a la característica distintiva de presentar un mechón de pelo oscuro en la base de la oreja ((Fig. 1).



Fig. 1 *Peromyscus melanotis*

Al ser una especie endémica de México tiene una distribución muy amplia pero discontinua en el territorio nacional. Abarca una franja en la Sierra Madre Occidental en los estados de Chihuahua y Durango, y una posición media inferior del Altiplano Mexicano, la Sierra Madre Oriental y el Eje Volcánico Transversal (Ramírez-Pulido *et. al.*, 1995). Sin embargo, algunos autores han identificado como pertenecientes a esta especie ciertas poblaciones al sur de Arizona en los Estados Unidos (Browers, 1974; Carleton, 1989).

Esta especie de *Peromyscus* se distribuye entre los 1097 msnm (Allen y Chapman, 1897) y los 4300 msnm (Ramírez-Pulido *et. al.*, 1995) por lo que es un habitante de zonas templadas y semifrías en altitudes que varían entre los 2000 a los 4500 msnm (Davis, 1944). En esta amplitud de distribución altitudinal la mayoría de los registros publicados la ubican

por arriba de los 2000 msnm, por lo que su hábitat está en bosques de coníferas con zacatonales y praderas de alta montaña, pudiéndose encontrar en los camellones con vegetación nativa que bordean los terrenos de cultivo cercanos a los bosques, así como en bosque húmedo subalpino y en áreas adyacentes a la Sierra Madre Oriental con vegetación métrica de montaña. Esta especie, junto con otras del género, habita entre zacatonales y troncos huecos del bosque de coníferas (Martínez-Coronel *et al.*, 1991); inclusive se le ha recolectado en áreas lacustres y rocosas (Davis, 1944).

Sus hábitos son crepusculares, alimentándose de semillas de las plantas herbáceas estacionales y de los pastos donde vive y reproduciéndose todo el año teniendo un pico en el verano (Castro-Campillo *et al.*, en preparación; Salame-Méndez *et al.*, en preparación). Las hembras son de mayor tamaño con respecto a los machos, tienen varias camadas al año y en cada parto nacen de 1 a 5 crías (Davis, 1944; Clark, 1966; Bowers, 1974) o 2 a 4 crías (Castro-Campillo *et al.* en preparación) siendo su promedio de 3.7.

JUSTIFICACIÓN

En México es muy escaso el conocimiento de la biología reproductiva de vertebrados silvestres. En el caso de los mamíferos terrestres y en particular de roedores, los estudios que abordan los procesos reproductivos son muy generales, los cuales se describen como historias de vida. Sin embargo, no abordan procesos de la fisiología o endocrinología reproductiva. Al conocer parámetros particulares de la biología reproductiva de especies silvestres, se contribuye a su conocimiento en general, además de tener estimados más precisos sobre su reproducción a partir de los cuales, por ejemplo, se pueda controlar biológicamente una especie que pudiese ser plaga. Ante esta premisa, en este trabajo de tesis se estudió la biología reproductiva de un ratón endémico de México, el ratón de orejas oscuras *Peromyscus melanotis* desde un enfoque endocrinológico, para lo cual se consideraron localidades del Eje Volcánico Transversal (EVT) que es una de las provincias bióticas más ricas de especies endémicas de México (Álvarez del Castillo, 1989; Ceballos y

Rodríguez, 1993;Chávez y Gallardo, 1993;Castro-Campillo *et. al.*, 2000). Además, el EVT presenta características geográficas e históricas muy particulares que la hacen una de las áreas prioritarias para el conocimiento de su biodiversidad. Este estudio se llevó a cabo en *P. melanotis* para obtener información sobre su comportamiento reproductivo-poblacional en dos localidades del EVT periurbanos a la Ciudad de México, los Parques Nacionales Cumbres del Ajusco y Desierto de los Leones. Por otra parte, al ser escasa la información sobre la biología reproductiva de esta especie, al igual que de muchos roedores en el país, el conocer parámetros generales y particulares de su biología servirá para tener un excelente indicador de las condiciones de un ecosistema.

HIPÓTESIS

Si el contenido de testosterona de los testículos de *Peromyscus melanotis* varia de acuerdo a la edad de los individuos, entonces la concentración del andrógeno de una determinada edad variará con la estación del año.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la biología reproductiva de una especie de roedor endémico (*Peromyscus melanotis*) procedente del Eje volcánico Transversal (EVT).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Estimar la edad de machos de *Peromyscus melanotis* capturados mensualmente durante un cuatrienio en los Parques Nacionales Cumbres del Ajusco y Desierto de los Leones.
- Determinar el patrón mensual del contenido de testosterona en testículos de *P. melanotis* de distinta edad.
- Determinar el patrón estacional del contenido de testosterona en testículos de *P. melanotis* de distinta edad.
- Estimar el patrón reproductivo anual en machos de *Peromyscus melanotis*.

MATERIALES y MÉTODOS

Áreas de Estudio

El Parque Nacional Cumbres del Ajusco (decretado el 23 de septiembre de 1936; Vargas, 1984) se localiza al suroeste del Valle de México dentro de la Sierra del Ajusco y se continúa al sur con la Sierra de Chichinautzin ($19^{\circ} 12'$ y $19^{\circ} 12' 50''$ latitud norte y $99^{\circ} 14' 35''$ y $99^{\circ} 16' 20''$ longitud oeste), siendo su superficie de 920 hectáreas (Fig. 2).



Figura 2 Áreas de Estudio.

El clima del Parque es templado subhúmedo del tipo C(w 1/2) (w) (b) i/L (Chávez y Gallardo, 1993). El período de temperatura alta es de abril a septiembre con un promedio de $15\pm 2^{\circ}\text{C}$ y el de temperatura baja de $11\pm 1^{\circ}\text{C}$ de noviembre a febrero (García; 1981; cifras de Milpa Alta). El período de lluvias se presenta de mayo a octubre (precipitación 152 ± 22 mm) y

el periodo de sequía (estío) de noviembre a abril (precipitación 16 ± 11 mm), tomados de la carta topográfica de Milpa Alta censada por la SPP de 1980/cifra de García, 1981).

La vegetación es de bosque templado con plantas estacionales y pastos amacollados. El estrato arbóreo está constituido principalmente por bosque de coníferas que incluye oyamel (*Abies religiosa*) con una altura máxima de 35-40 m; por algunas especies de Quercus (encino) (*Pinus montezumae*; introducido *Pinus radiata*) con una altura máxima de 8-10 m, así como por bosque mixto de pino-encino (*Pinus-quercus*). El estrato arbustivo es indefinido e inconspicuo, por ejemplo, se encuentra *Solanum*; *Salix* (tepozán), Huejote y *Solanum*. El sotobosque (estrato herbáceo) está conformado por gramíneas amacolladas (zacatonal: *Muhlenberg macroura* y *Stipa ichu*), leguminosas (*Salvia lupinus*) y compuestas (*Baccharis glutinosa* y *Gnaphalium americana*; *Senecio*, *Stevia*) y abundantes arbustos conformados principalmente de *Senecio* y *Salix*, así como por plantas estacionales que incluyen compuestas, rosáceas y solanáceas, entre otras. Su estrato rasante está conformado por hongos, musgos, hepáticas y líquenes.

La fauna silvestre está constituida por ardillas, conejos, halcones y pequeños roedores, incluyendo especies endémicas, tales como *Neotomodon alstoni* y *Romerolagus diazi* (Vargas, 1984; Suárez e Ibarra, 1996; Aranda *et al.*, 1980; Salame-Méndez *et al.*, en preparación).

El Parque Nacional Desierto de los Leones (decretado el 27 de noviembre de 1917; Alcérreca *et al.* 1988) forma parte de la Sierra de las Cruces, localizado al oriente del Valle de México, y pertenece a las Delegaciones Álvaro Obregón y Cuajimalpa, D. F.; siendo esta serranía una continuación de la Sierra del Ajusco. El clima es templado subhúmedo del tipo C (w2) (w')(b') ig (García, 1981). La temperatura alta se registra de abril a julio, teniendo un promedio de $12.6\pm 6^{\circ}\text{C}$ y la temperatura baja de diciembre a febrero con un promedio de $8.1\pm 2^{\circ}\text{C}$. El periodo de lluvia es de mayo a agosto con una precipitación promedio de 235 ± 30 mm y el periodo de estío de diciembre a febrero con una precipitación de 2 ± 4 mm. En el

parque se presentan diferencias altitudinales de más de 1,000 msnm permitiéndose la presencia de distintas comunidades vegetales, predominando el bosque de coníferas representado por comunidades de *Abies religiosa* puras o mezcladas y de *Pinus hartwegii*. La primera comunidad se establece desde los 2,600 msnm y se caracteriza por tener suelos profundos y húmedos. En los estratos medio y bajo están bien representadas las especies *Garrya laurifolia*, *Alnus firmifolia*, *Salix spp.*, *Senecio angulifolius* y *S. barba-johannis* en el primero; en el segundo principalmente: *Acaena alongata*, *Siegesbeckia jorullensis*, *Alchemilla procumbens*, *Salvia spp.* y *Symphoricarpos microphyllus*. La comunidad de *Pinus hartwegii* se establece a partir de los 3,600 msnm sobre suelos menos húmedos y pedregosos caracterizados por exhibir masas arbóreas prácticamente puras de esta especie y por presentar un estrato bajo muy bien representado: *Muhlenbergia spp.*, *Festuca spp.*, *Calamagrostis tolucensis*, *Lupinus spp.* y *Penstemon gentianoides*, frecuentemente se observan arbustos como *Senecio cinerarioides* y *S. salignus*. También en las partes altas, entre los 3,700 msnm y el techo altitudinal, son distinguibles pequeños manchones de pastizal, dominados por *Muhlenbergia macorura* y *Festuca tolucensis*; hacia la parte Sur del parque son distinguibles pequeños manchones de *Quercus spp.* (Vargas, 1984; Alcérreca et al. 1988).

A partir de rastros u observaciones directas, se ha demostrado la presencia de venado cola blanca, así como *Sciurus aureogaster*, *Odocoiles virginianus* y *Bassariscus astutus*. También se han reportado tlacuache (*Dideplphis marsupialis*), conejo (*Sylvilagus floridans*), tuza (*Papogeomis merriami*), mapache (*Procyon lotor*), coyote (*Canis latrans*) y zorra gris (*Urocyon cineroargentesus*). En relación a las aves, *Cyanocitta stellari* y *Tardus migratirtus* constituyeron las especies mayormente representadas (Suárez e Ibarra, 1996).

Por las características particulares que ofrece el Parque Desierto de los Leones, como una cubierta de sotobosque muy densa, la cual proporciona alimento, resguardo y

protección, cuerpos de agua disponibles durante todo el año, un relativo amparo contra la caza furtiva, por mencionar algunos factores, éste ha sido uno de los últimos recintos naturales donde se conserva una población importante del venado cola blanca en el Valle de México, que es la población más numerosa que resta en la Sierra del Ajusco. En el Desierto de los Leones se han hecho estimaciones sobre la densidad de esta especie.

Recolecta de Roedores. Los ratones de *Peromyscus melanotis* fueron recolectados a partir del mes de junio del 1996 hasta febrero del 2000 una o dos veces por mes en las siguientes localidades. En el Parque Nacional Cumbres del Ajusco (PNCA), D. F. (0.85 Km N, 3.5 Km W Ecuamil, 3180 m; 19° 13' 37" N, 99° 15' 37" W) a partir de los 19-23 Km de la carretera panorámica del Ajusco; siendo la altura de 2800±300 msnm. Por otra parte, la localidad en el Parque Nacional Desierto de los Leones (PNDL) se localiza a los 19° 18' 17" N, 99° 19' 14" W, abarcando de la entrada al parque por la antigua carretera al Desierto de los Leones (Delegación Álvaro Obregón) hasta el Km 19 (Delegación de Cuajimalpa); entre los 2180 a 3200 msnm.

Los roedores fueron capturados de manera selectiva con trampas Sherman (8x9x23 cm), utilizando como cebo hojuelas de avena (Figs. 3 y 4). Se hicieron transectos lineales de 500-800 m, colocando 90 a 150 trampas cada 5 m. En cada salida para la recolecta se registraron cualitativamente los datos del tiempo (nubosidad, claridad, humedad relativa, precipitaciones, temperatura, etc.) y la fenología de la vegetación herbácea (plantas en floración o fructificación, si las plantas presentaban semillas, estaban secas, etc.), así como los de la altitud, humedad y coordenadas geográficas mediante un geoposicionador electrónico (GPS-Blazer12. Magellan Systems Co., Overland, Ca.).

El mismo día en que se recolectaron, los ratones fueron trasladados al laboratorio de Mamíferos de la UAM-Iztapalapa (UAMI) y se mataron por dislocación cervical. De cada ratón se registraron el sexo, las medidas mastozoológicas convencionales y el peso (Hall, 1981; Ramírez-Pulido *et al.*, 1989; Kuns *et al.*, 1996). siendo preparados como ejemplares de

referencia (Ramírez-Pulido *et al.*, 1989), los cuales se encuentran depositados en la colección de Mastozoología de la UAMI como cráneo y esqueleto, aunque de algunos también se preparó la piel.

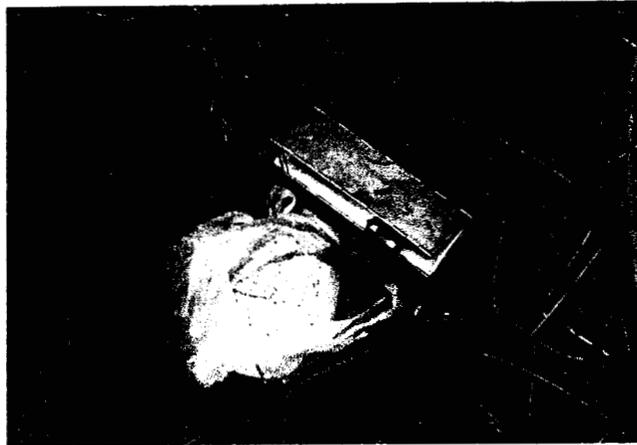


Fig. 3. Trampa Sherman plegada y hojuelas de avena.



Fig. 4 Trampa Sherman abierta y hojuelas de avena.

Determinación de la Edad. La edad de los roedores se estimó a partir de considerar el desgaste de la superficie oclusal de los molares, según Hoffmeister (1951). Esto se realizó con la ayuda de la Dra. Alondra Castro Campillo responsable del Laboratorio de Mamíferos de la UAM-Iztapalapa (Anexo 1, Descripción de las Edades).

Cuantificación de Testosterona. Previamente a la cuantificación del esteroide se realizó una comparación entre la técnica para determinar si había diferencia en cuantificar

previa separación cromatográfica del extracto total de esteroides (ETE) contra la determinación directa sobre el ETE (Anexo2). La determinación del contenido de 17β -hidroxi-4-androsteno-3-ona (testosterona, T) (Kime, 1995) se hizo por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA).

Se extirparon los testículos de 291 machos y se colocaron en tubos Eppendorf conteniendo solución de Ringer isotónica, almacenándose a -70°C , previo a determinación de Testosterona por RIA.

Para determinar el porcentaje de eficiencia en la extracción y la cuantificación del esteroide sexual se utilizó como trazador, previa purificación, T tritiada ($1,2,6,7,16,17\text{-}^3\text{H-T}$) (actividad específica 139 Ci/mmol) (New England Nuclear, Boston, Ma.).

El Antisuero fue obtenido a partir de un hapteno-19-hemisuccinato unido a albúmina sérica de bovina y generado en conejo a partir de la técnica descrita por Bermúdez *et al.* (1975), siendo su especificidad la siguiente (en %): colesterol <0.01 ; pregnenolona <0.01 ; 17α -hidroxi-pregnenolona <0.01 ; dehidroepiandrosterona <0.01 ; progesterona <0.01 ; androstendiona 3.25; 5α -dihidro-testosterona <0.01 ; T =100.

El antisuero fue provisto por el M. en B. E. Joaquín Herrera Muñoz investigador titular de la Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva del Hospital "Luis Castelazo Ayala" del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Obtención de los Homogenados para la Cuantificación de Testosterona. Al par de testículos de cada roedor se le eliminó la túnica albugínea y las gónadas se homogenizaron en un homogenizador Pirex 15 ml. Cada homogenado se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml del cual se extrajeron dos alícuotas de $100\ \mu\text{l}$, una para determinar la concentración de proteínas por el método de Groves *et al.* (1968) empleando para la curva patrón albúmina sérica de bovino (ASB), y la otra alícuota se utilizó para determinar la eficiencia de la extracción de esteroides totales.

Extracción de Esteroides Totales. De cada homogenado se transfirieron 50 μ l, por separado, a un tubo cónico al cual se le agregó 100 μ l de agua destilada, a esta disolución se le agregaron 5 ml de éter dietílico por duplicado y se agitó en vortex. Para separar la fase orgánica de la acuosa, cada tubo se colocó en un baño de hielo seco-acetona; al congelarse la fase acuosa, la orgánica que contenía el extracto total de esteroides (ETE) se decantó a un tubo de ensayo y se evaporó a sequedad.

Cuantificación de Testosterona. El RIA se hizo bajo la asesoría del M. en B. E. Joaquín Herrera Muñoz en la Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva del Hospital "Luis Castelazo Ayala" del IMSS. El procedimiento se llevó a cabo con algunas modificaciones (Anexo 2) según Mendieta *et al.* (1991). A cada tubo conteniendo su respectivo ETE se le agregaron 500 μ l de una disolución amortiguadora de fosfatos (0.25 M, pH 7, azida de sodio-gelatina 1%) conteniendo la dilución del antisuero contra T, así como T-³H como trazador (\approx 5000 cpm). Los tubos se incubaron por 18 hrs a 4°C, separándose el esteroide libre del unido al anticuerpo por medio de la adición a cada tubo 200 μ l de carbón-dextrán (625 mg-% de carbón activado Norit A y 62.5 mg-% dextrán T 70), los tubos se centrifugaron a 3000 x g x 15 min a 4°C, y el sobrenadante se decantó a un vial, al que se le agregaron 5 ml de Instagel (Packard); los viales se colocaron en un espectrómetro de centelleo líquido Beckman modelo LS-700, con una eficiencia máxima para tritio del 56%. El control de calidad del RIA fue realizado de acuerdo a especificaciones internacionales de exactitud, precisión y sensibilidad (Cekan, 1976).

RESULTADOS

La distribución estacional de los 291 machos recolectados durante el cuatrienio fue muy similar de primavera a otoño (65 ± 4); siendo el invierno la estación de mayor recolecta (103)(Fig.1).

Los ratones se agruparon en cinco categorías de edad: edad I, juveniles; edad II, subadultos; edad III, adultos jóvenes; edad IV, adultos, y edad V, viejos. Las características de cada una de las edades asignadas se describen en el Anexo 2.

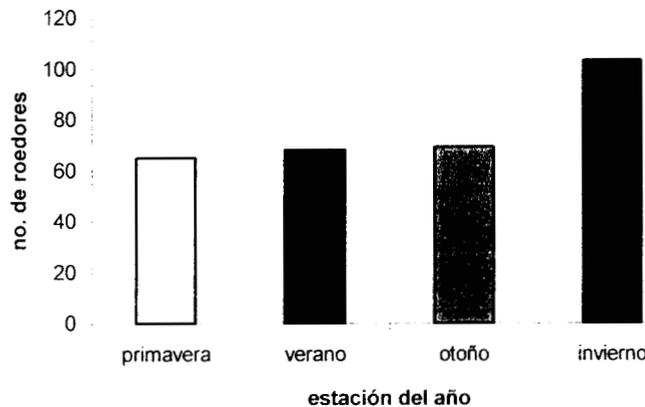


Figura 1. Distribución estacional de los machos recolectados de *Peromyscus melanotis* durante el cuatrienio de estudio.

La distribución estacional de los roedores por edad mostró que los juveniles durante primavera y verano son iguales, disminuyendo en el otoño e incrementándose en el invierno. En los subadultos, en el otoño es mayor su número descendiendo, a partir del invierno. Los adultos jóvenes a partir del verano comienzan a aumentar significativamente, siendo su máximo en el invierno, mientras que en los adultos comienza a descender su número a partir del verano e incrementándose en el invierno, siendo su máximo en la primavera. Finalmente, el número de los ratones viejos se mantuvo muy similar durante cada estación (Fig. 2).

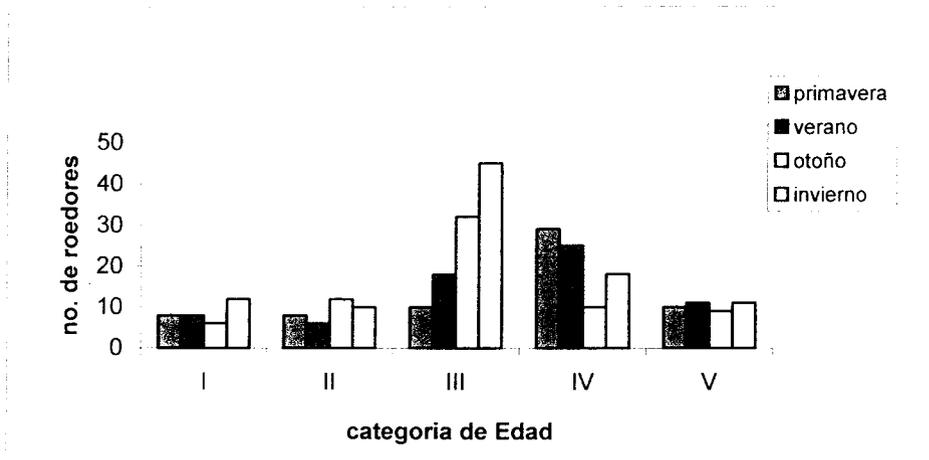


Figura 2. Distribución estacional de los machos de *Peromyscus melanotis* por edad durante el cuatrienio de estudio.

Contenido Mensual de Testosterona.

Durante el estudio el periodo en el cual se recolectaron ratones de manera más constante por mes fue el correspondiente al de 1996-1997, el cual abarcó de mayo a febrero, respectivamente; este patrón se describe en el Anexo 3. Con la finalidad de tener un patrón general de manera mensual del contenido de testosterona en los testículos de los roedores en el cuatrienio de estudio, se agruparon los roedores por edad-mes de las edades más recolectadas, que fueron la III, la IV y la V. Al no haber diferencia significativa ($p \leq 0.05$) entre edad-mes-año de cada una de las edades, se pudo describir el patrón mensual del contenido de testosterona testicular de los adultos jóvenes, adultos y viejos.

En los adultos jóvenes (edad III) el andrógeno fue mayor en los meses de junio y julio, siendo menor el contenido en diciembre y enero. Constatándose que a partir de enero el andrógeno comienza a incrementarse y a descender a partir de agosto, con su mínimo en diciembre. El patrón descrito se ajustó bastante bien ($R^2 = 0.87$) a una curva polinomial de segundo grado; lo cual permite dilucidar muy bien la tendencia de ascenso y descenso del

patrón mensual del contenido de testosterona en los testículos de ratones adultos jóvenes de *P. melanotis* (Fig. 3).

Por su parte, el patrón de T en los testículos de los roedores adultos (edad IV)(Fig. 4) y viejos (edad V)(Fig. 5) fue bastante similar al descrito para los adultos jóvenes.

Patrón Mensual del Contenido de T.

Con el objetivo de constatar el patrón mensual del contenido de T en los testículos de *P. melanotis* los contenidos del andrógeno se analizaron por edad-mes-año, demostrándose no haber diferencia significativa ($p \leq 0.05$) lo cual permitió agrupar las tres edades (III, IV y V) y así describir el patrón mensual del roedor.

Las concentraciones más altas del andrógeno fueron en junio y julio y las bajas en los meses de diciembre y enero; incrementándose a partir de febrero y descendiendo a partir de agosto. Este patrón de ascenso y descenso se ajustó muy bien ($R^2 = 0.91$) a una curva polinomial de segundo grado, hecho que permitió demostrar muy bien la tendencia del patrón mensual del contenido de T en los testículos de *P. melanotis* (Fig. 6).

Contenido estacional de Testosterona.

Para determinar el patrón estacional del contenido de T en los testículos de *Peromyscus melanotis* por edad, se dividió el año de recolecta en 4 trimestres con el objetivo de conformar las cuatro estaciones: primavera (marzo, abril y mayo); verano (junio, julio y agosto); otoño (septiembre, octubre y noviembre) e invierno (diciembre, enero y febrero).

De igual manera que para lo descrito en el apartado de *Contenido de T Mensual*, durante el estudio el periodo en el cual se recolectaron ratones de manera más constante por mes fue el correspondiente al de 1996-1997, periodo con el cual se hizo un ensayo del patrón estacional y que se describe en el Anexo 3. Sin embargo, a pesar de que no se recolectaron de manera muy constante en los diversos meses del estudio ratones de la edad I (juvenil) y II (subadulto), el agruparlos por estación permitió contar con las cinco edades estimadas y así llevar a cabo los análisis respectivos. Al no haber diferencia significativa

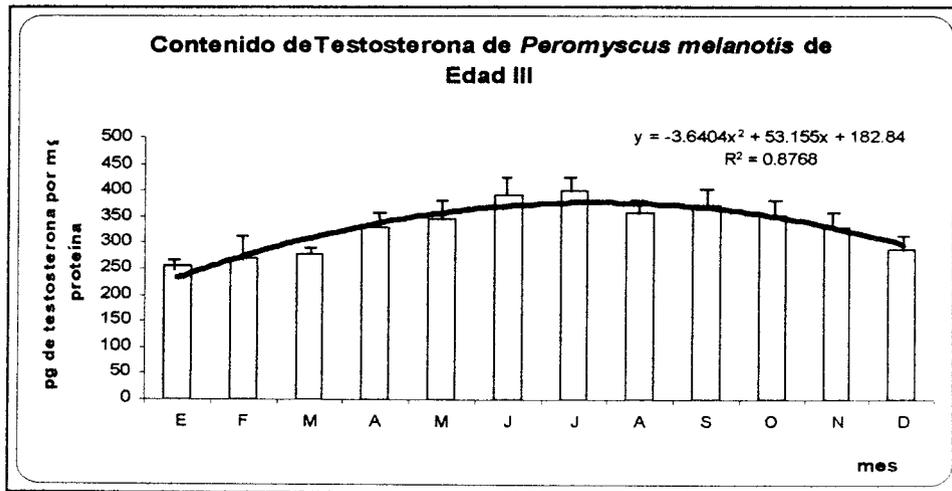


figura3

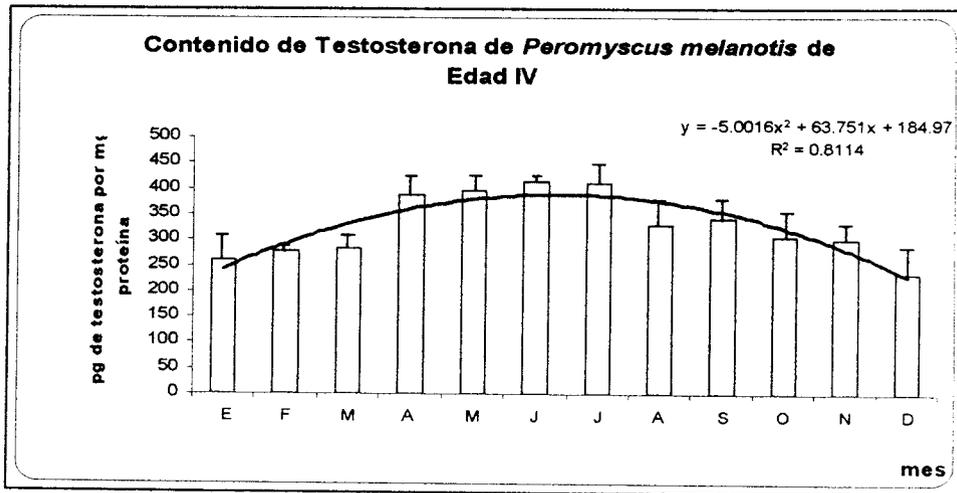


Figura 4

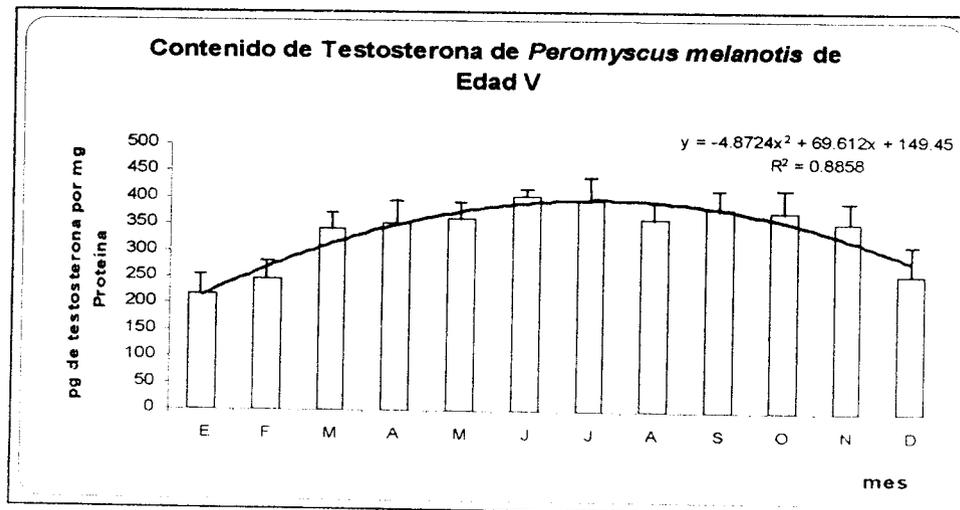


figura 5

($p \leq 0.05$) durante el cuatrienio entre edad-estación-año de cada una de las edades estimadas, se pudo describir el patrón general de manera estacional del contenido de T testicular de *P. melanotis*.

En los juveniles (edad I) en el verano es mayor el contenido de T descendiendo este a partir del otoño e incrementándose a partir de la primavera (Fig. 7). El patrón descrito se ajustó muy bien ($R^2 = 0.90$) a una curva polinomial de segundo grado, hecho que permitió dilucidar muy bien la tendencia de mínimos y máximos del patrón estacional del contenido de T en los testículos de ratones juveniles de *P. melanotis* (Fig. 3).

En los subadultos (edad II) el patrón estacional es muy similar al de los juveniles, resaltando que la concentración del andrógeno aumentó considerablemente de primavera a otoño con respecto a los juveniles (Fig. 8). Por otra parte, la regresión parabólica que describe el patrón de T estacional fue muy bueno ($R^2 = 0.99$).

Finalmente, el patrón de los ratones adultos jóvenes (edad III)(Fig. 9), adultos (edad IV)(Fig. 10) y viejos (edad V)(Fig. 11) es muy similar tanto para el descrito de los juveniles como para los subadultos, y con respecto a concentración, al de los subadultos, resaltando que el patrón descrito para estas tres edades se ajustó muy bien ($R^2 = 1.00$; 0.95 y 0.99, respectivamente) a una curva polinomial de segundo grado.

Patrón Estacional del Contenido de T.

Con el objetivo de constatar el patrón estacional del contenido de T en los testículos de *P. melanotis* se analizaron por edad-estación-año los contenidos del andrógeno, demostrándose no haber diferencia significativa ($p \leq 0.05$) lo cual permitió agrupar las cinco edades (I, II, III, IV y V) y así describir el patrón estacional en el roedor.

La concentración más alta del andrógeno fue en verano, descendiendo de otoño a invierno e incrementándose a partir de la primavera (Fig. 12). Este patrón de ascenso y descenso se ajustó muy bien ($R^2 = 0.97$) a una curva polinomial de segundo grado, resultado

que permitió demostrar muy bien la tendencia del patrón estacional del contenido de T en los testículos de *P. melanotis* (Fig. 12).

Patrón Ontogenético del Contenido de T.

Con el objetivo de describir el patrón del contenido de T en los testículos de *P. melanotis* por edad, se analizaron los contenidos del andrógeno en los testículos de los ratones de las cinco edades recolectados durante el estudio, pero sin considerar el mes y la estación. Lo anterior dio por resultado el siguiente patrón (Fig.13): En los juveniles (edad I), el contenido de T es el más bajo de las cinco edades, incrementándose en los subadultos, siendo mayor en los adultos jóvenes, descendiendo en los adultos y manteniéndose de manera similar en los viejos. Este patrón también se ajustó bastante bien ($R^2= 0.87$) a una curva polinomial de segundo grado, de tal manera que este patrón de ascenso y descenso en la concentración testicular de T por edad sería el patrón fisiológico normal durante la ontogenia de *P. melanotis* sin importar la estación del año.

DISCUSIÓN

Los trabajos publicados sobre la biología reproductiva de *Peromyscus melanotis* son muy escasos, de tal manera que los conocimientos que se tienen son referentes a algunas otras especies del género. Por ejemplo, algunas especies tienen cuidados parentales para con sus crías (Davis y Schmidly, 1994). Este patrón podría darse en *Peromyscus melanotis*, ya que durante el invierno se recolectaron mayor número de machos, siendo los adultos jóvenes (edad III) los más abundantes a lo largo del año y sobre todo en esta estación. Lo anterior podría deberse a que salen de sus madrigueras en busca de alimento para proporcionarlo a sus crías y a los miembros más jóvenes de la población, que serían los juveniles y subadultos (edad I y II, respectivamente), así como a los viejos (edad V).

Patrón Mensual de T en Testículos de *Peromyscus melanotis*.

Se ha reportado para *Peromyscus maniculatus* un período de reproducción anual (Maser, *et. al.* 1981). Por otra parte, Nowak y Paradiso (1983) reportan que el período de

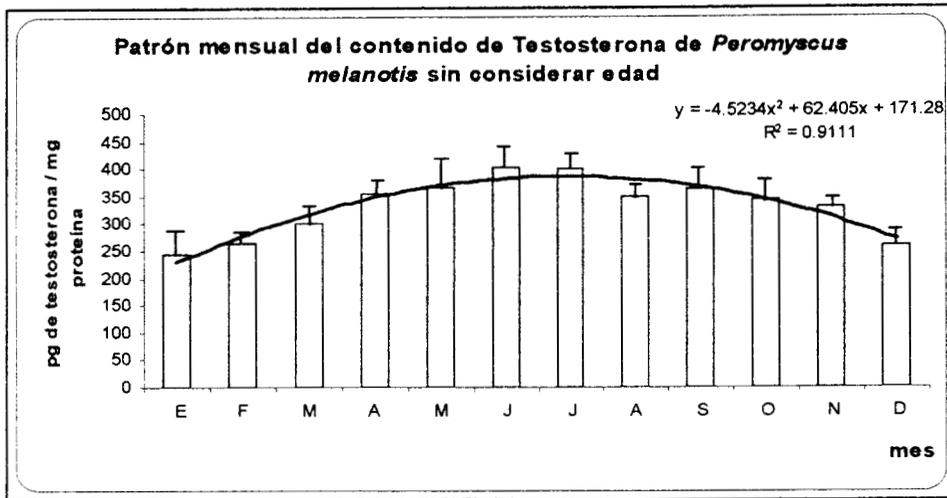


figura 6

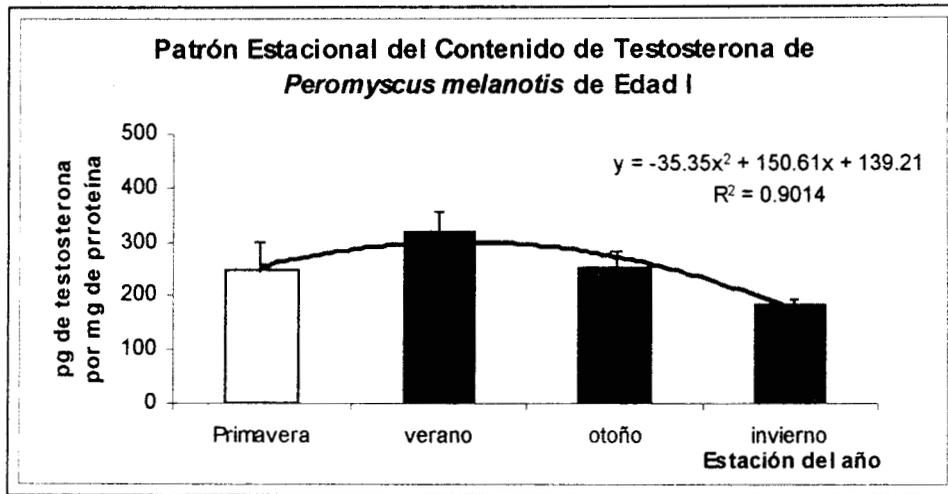


figura 7

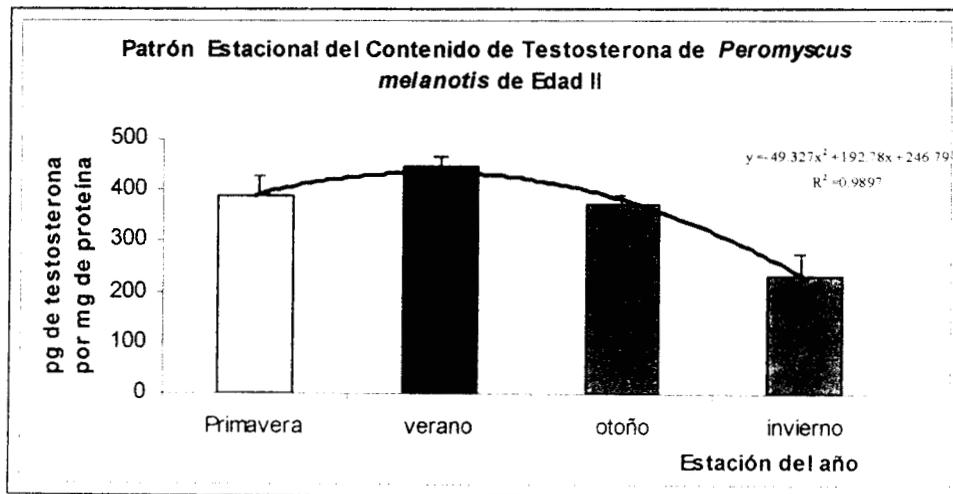


figura 8

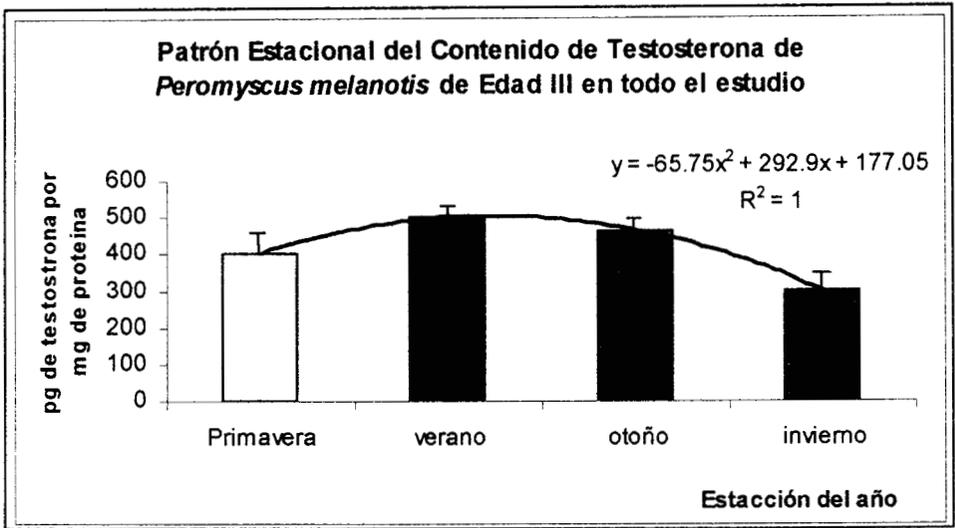


figura 9

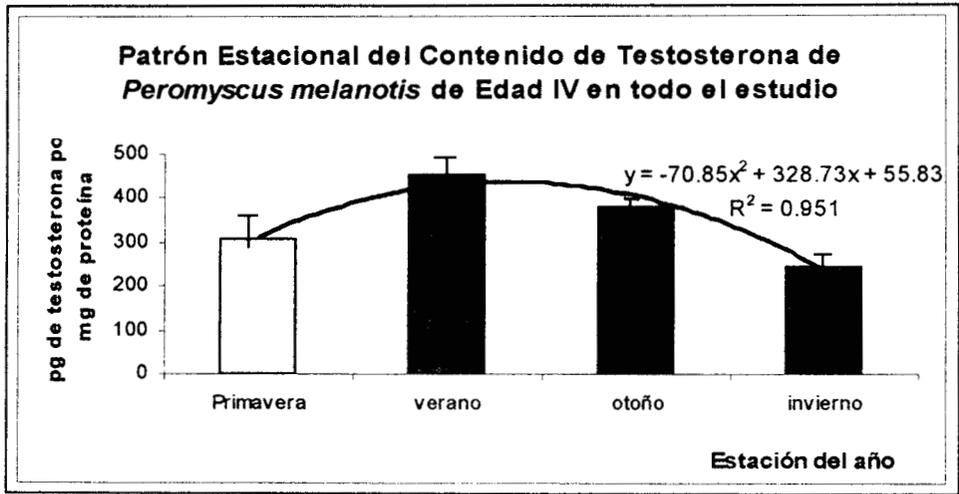


figura 10

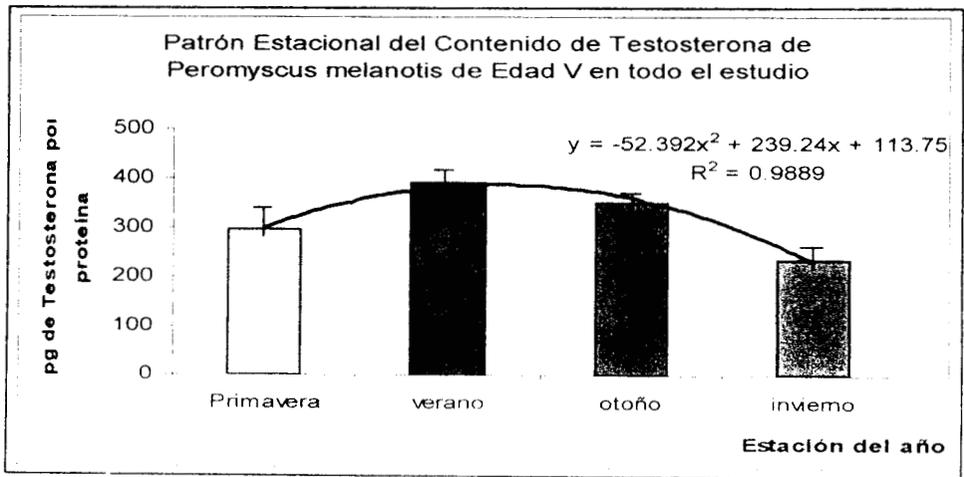


figura 11

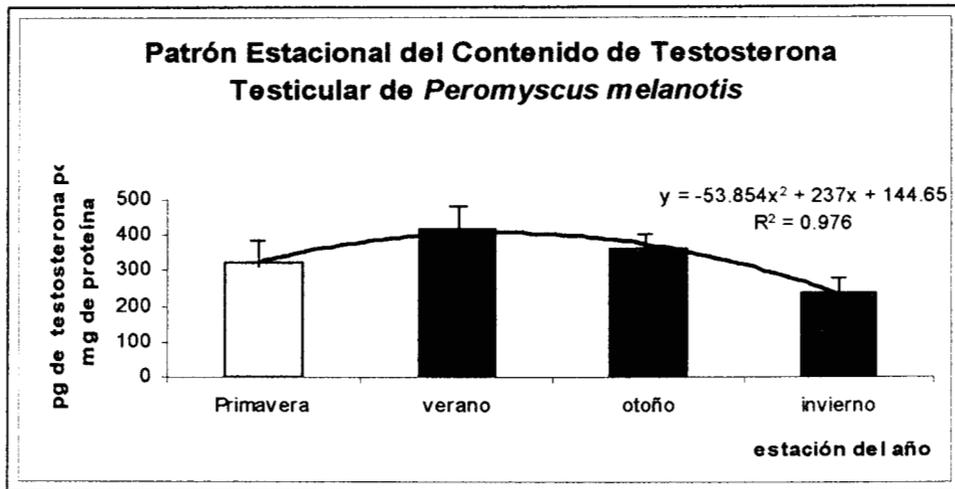


figura 12

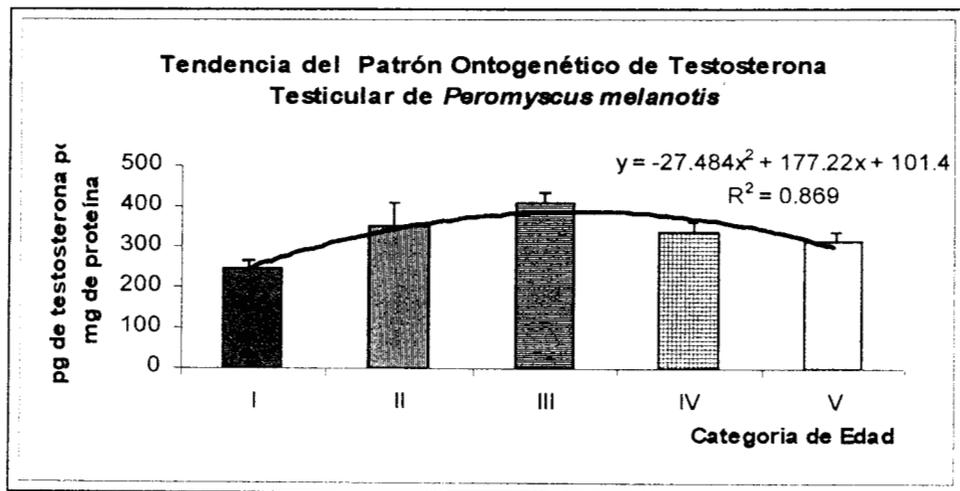


figura 13

reproducción de esta especie es de marzo a octubre, pero disminuye su actividad reproductiva durante la época de lluvias y el invierno, concluyendo que la reproducción del ratón ciervo esta determinada más por la disponibilidad de alimento que por la estación del año, de tal manera que se infiere que la reproducción de *P. maniculatus* es estacional. Brown y Zeng (1989), para la misma especie, demostraron que su actividad reproductiva depende del lugar. Por ejemplo, mientras que en Arizona durante el invierno hay gran cantidad de hembras gestantes, en Virginia del Norte los picos de reproducción se encontraron de abril a junio y de septiembre a octubre (Wolf, 1994).

Lo anterior demuestra claramente que en una especie emparentada a *P. melanotis* su actividad reproductiva es muy variable. En efecto, para *P. melanotis* se ha descrito que se reproduce todo el año (Ramírez-Pulido, 1995), pero Torres-Villaseñor (1991) con base en índices gonadosomáticos del aparato reproductor masculino, demostró que la estación reproductiva era de enero a julio para una población y de abril a julio para otra; este autor concluye que desde el punto de vista histológico existen animales maduros durante todo el año en ambas poblaciones. Lo anterior ratifica lo descrito por Davis (1944); Clark (1996); Bowers (1974) y Ceballos y Galindo (1984) quienes describen que su reproducción va de junio (finales de primavera) a noviembre (mediados del otoño), así como por Castro-Campillo y col. (en preparación) quienes han demostrado que durante todo el año se encuentran hembras preñadas y lactantes.

La evidencia endocrina encontrada en esta tesis explicaría el patrón no estacional, mono o biestacional en la reproducción de *P. melanotis*. Por una parte, en los meses cálidos como son los de junio y julio, independientemente de la edad, la concentración de T fue mayor, lo que coincide con la descripción del patrón reproductivo estacional (mono o bi). Por otra parte, el haber constatado que las mayores concentraciones del andrógeno fueron en junio-julio sugeriría que esta especie se reproduce más favorablemente en los meses cálidos en los que se hacen presentes las lluvias de verano, así como por la mayor abundancia de

alimento. La anterior premisa se apoya en datos de Castro-Campillo y col. (en preparación), que han demostrado en *P. melanotis* en estos meses, así como en los de julio-agosto, mayor número de hembras preñadas y lactantes. Pero también los resultados de la concentración mensual de T explicarían porque esta especie se reproduce todo el año. Nunca se encontró un descenso dramático, y mucho menos concentraciones tan bajas que no pudiesen ser detectadas, durante algún mes, hechos que apoyarían que este roedor endémico se reproduce todo el año, ya que siempre hay suficiente T, la cual inicia y mantiene la espermatogénesis en los ratones de las cinco edades.

Es importante destacar que en los ratones viejos (edad V) el contenido del andrógeno nunca descendió conspicuamente, lo que concuerda con datos reportados en roedores y humanos, en donde la concentración de T unida a su proteína transportadora (globulina transportadora de hormonas sexuales o SHBG) desciende un 30% y la libre un 50% entre los 25 y 75 años de edad (Gray *et al.*, 1990), debiéndose el mayor decremento del andrógeno libre, al aumento con la edad de la SHBG (Korenman *et al.*, 1990). Por otra parte, el descenso en las concentraciones de T en la vejez está determinado por factores genéticos (lo que justifican hasta el 63% de la variabilidad de la T y hasta un 30% de la SHBG); metabólicos (índice de masa corporal y resistencia a la insulina); hormonales (hormona de crecimiento y hormonas tiroideas); dietéticos y por estrés; por la presencia de enfermedades crónicas concomitantes, y por el consumo de compuestos químicos (v. gr., glucocorticoides o neurolépticos).

En roedores de laboratorio se ha demostrado que la concentración de T plasmática se reduce significativamente en ratones maduros (8-11 meses) y viejos (29-31 meses) (Nelson y Lathamark, 1975), pero la espermatogénesis, la fertilidad y la conducta sexual no cesan (Wolf, 1994; Gooren, 1996; Tenover, 1997; Tscrota y Merino, 1998; Rocha *et al.*, 1999; Salame-Méndez *et al.*, en preparación) Por ejemplo, en *P. melanotis*, en los ratones

viejos (edad V) la concentración testicular, así como en el plasma, desciende pero no cesa su producción.

De todo lo anterior, el contenido de T mensual en los testículos de *Peromyscus melanotis* permitió saber desde un punto de vista endocrino como se comporta la población a lo largo del año con respecto a su biología reproductiva, lo cual contribuye al conocimiento general de la biología de esta especie endémica muy poco conocida, por ejemplo, dentro de las especies del género.

Patrón Estacional del Contenido de T en Testículos de *Peromyscus melanotis*.

El contenido estacional de T demuestra que durante la ontogenia de este roedor endémico hay un efecto de la estación sobre su contenido. Tanto en invierno como durante la primavera el contenido es bajo; mientras que éste es mayor en el verano y el otoño, lo cual explicaría por qué esta especie se reproduce todo el año; favoreciéndose en el verano como lo han demostrado Davis (1944), Clark (1996), Bowers (1974), Ceballos y Galindo (1984) y Castro-Campillo y col. (en preparación), así como durante la primavera y el verano como lo describe Torres-Villaseñor (1991). También los resultados permiten explicar porqué las diferentes especies del género *Peromyscus* se reproducen durante todas las estaciones, por ejemplo, *P. boylii* se reproduce durante todo el año, pero su pico reproductivo se encuentra en primavera y principios del verano; *P. gossypinus* se reproduce a lo largo de todo el año, pero la actividad reproductiva declina durante el verano reactivándose durante el mes de agosto con un pico en los meses de noviembre, diciembre y enero (Davis y Schmidly, 1994), y *P. maniculatus* se puede reproducir durante el otoño y el invierno también. Esta gama en el patrón reproductivo del género *Peromyscus* se explicaría al considerar el dato obtenido en esta tesis de que el contenido de T también es alto en el otoño y que no disminuye dramáticamente en el invierno, encontrando hembras preñadas tanto de *P. maniculatus* (Brown, 1989; Wolf, 1994) como de *P. melanotis* (Castro-Campillo *et al.*, en preparación) en ambas estaciones.

Otro aspecto a considerar referente a la actividad reproductiva de *P. melanotis*, así como de otras especies del género, es la espermatogénesis. Este proceso y la fertilidad se mantienen durante la vida reproductiva de los roedores, así como en otras especies de mamíferos y de vertebrados en general, incluyendo al hombre, ya sea que presenten reproducción estacional o no. En el envejecimiento, tanto la función testicular endocrina (producción-secreción de andrógenos) como la exocrina (espermatogénesis) disminuyen lenta y de manera progresiva pero no cesan (Gooren, 1996; Tenover, 1997; Tscrotas y Merino, 1998; Salame-Méndez *et al.*, en preparación). Sin embargo, aunque los ratones viejos (edad V) de *P. melanotis* tuvieron un contenido de T similar al de los subadultos y adultos jóvenes durante las cuatro estaciones, esto no implica necesariamente que sean capaces de participar en el mantenimiento de la población, es decir de reproducirse. La premisa anterior se apoya en cierta manera a partir de la evidencia histológica encontrada en los testículos de algunos ratones viejos, tanto de *P. melanotis* como de *P. difficilis*, en los que se aprecian alteraciones de la espermatogénesis (Salame-Méndez *et al.*, en preparación).

Además, es importante considerar que la espermatogénesis podría cesar fisiológicamente ya sea por fotoperiodos desfavorables, procesos patológicos (Forsberg, 1996) o por estrés (Harman y Tsiuoras, 1980; Steven y Gambert 1995). A este respecto, Almeida y col. (1998) demostraron que la tensión crónica (estrés) en ratas macho Wistar interfirió con las funciones testiculares, es decir, en la androgénesis y espermatogénesis. La LH y la T del plasma disminuyeron significativamente en un 29% y 37%, respectivamente. Por otra parte, se redujo hasta un 16% la cantidad de espermátidas maduras en los testículos y un 32% la concentración de espermatozoides en la cauda del epidídimo, así como disminuyó el volumen de ADN en la vesícula seminal. Por lo anteriormente expuesto, es difícil explicar las razones fisiológicas y/o endocrinas por las cuales se evidencian diversos esquemas en la biología reproductiva de mamíferos pequeños silvestres, por lo que

contrastan con los obtenidos de especies mantenidas en condiciones controladas en un laboratorio o bioterio.

Los resultados del contenido de T en los testículos de *Peromyscus melanotis* evaluados tanto mensual como estacionalmente permitieron obtener patrones por edad, así como generales sin considerar a ésta. Lo que permitió establecer un patrón ontogenético. Este patrón permite apreciar claramente, cómo durante cada una de las estaciones del año, la función endocrina del testículo, producción-secreción de T, se va dando conforme este roedor va creciendo a la vez que va madurando y envejeciendo sexualmente.

Ahora bien, en el humano se ha categorizado la ontogenia de su madurez sexual en adolescentes, adultos y ancianos; para otras especies de mamíferos ésta es difícil de establecer con los mismos términos. La adolescencia es la etapa en la cual el joven se prepara para su actividad reproductiva, por ejemplo, en los individuos del sexo masculino se inicia la espermatogénesis. Esta etapa podría abarcar a roedores juveniles (edad I) y subadultos (edad II), es decir serían prepúberes y púberes, respectivamente. Los adultos están en una etapa en la que su actividad reproductiva es plena, por ejemplo, se mantiene la espermatogénesis. En esta categoría se podría agrupar a ratones adultos jóvenes (edad III) y adultos (edad IV), y durante la ancianidad o vejez van disminuyendo los procesos de gametogénesis y endocrinos, tanto que puede cesar como en las mujeres, o no (como sucede en los individuos masculinos), de tal manera que esta etapa sería la misma para los ratones de la edad V considerados como viejos.

Si consideramos la clasificación arriba mencionada, entonces podemos categorizar en los machos de *Peromyscus melanotis* la existencia de tres edades en vez de las cinco determinadas a partir del desgaste oclusal de los molares. Por lo tanto, la edad reproductiva en este roedor endémico se podría designar en ratones juveniles, adultos y viejos. Esta premisa permitió constatar el patrón del contenido de T estacional considerando las tres edades, para lo cual se agruparon los contenidos de T de los ratones de la edad I y II

(juveniles y subadultos, respectivamente), los cuales fueron similares, para conformar el grupo de ratones juveniles. Lo mismo se hizo con los datos de los ratones de las edades III y IV (adultos jóvenes y adultos), siendo también similares sus contenidos, y se estableció el grupo de los adultos, y el grupo de los viejos se conformó con los datos de estos ratones. Como se puede apreciar en la Figura 14 hubo un claro patrón para cada una de las tres edades durante cada una de las estaciones, siendo su tendencia similar en las tres edades, con ajustes a una curva polinomial de segundo grado muy buenos (juvenil, $R^2 = 0.98$; adulto, $R^2 = 0.99$; viejo, $R^2 = 0.96$); siendo baja la concentración de T en primavera e invierno y alta en verano y otoño. El patrón del contenido de T es mayor en los adultos, bajo en los juveniles e intermedio en los viejos (Fig. 14). Lo anterior indica que no importa la estación en la que encontremos a los machos de *P. melanotis* su ontogenia del individuo, llámese edad I, II, III IV, V o juvenil, adulto o viejo, a través del año siempre seguirá el mismo patrón.

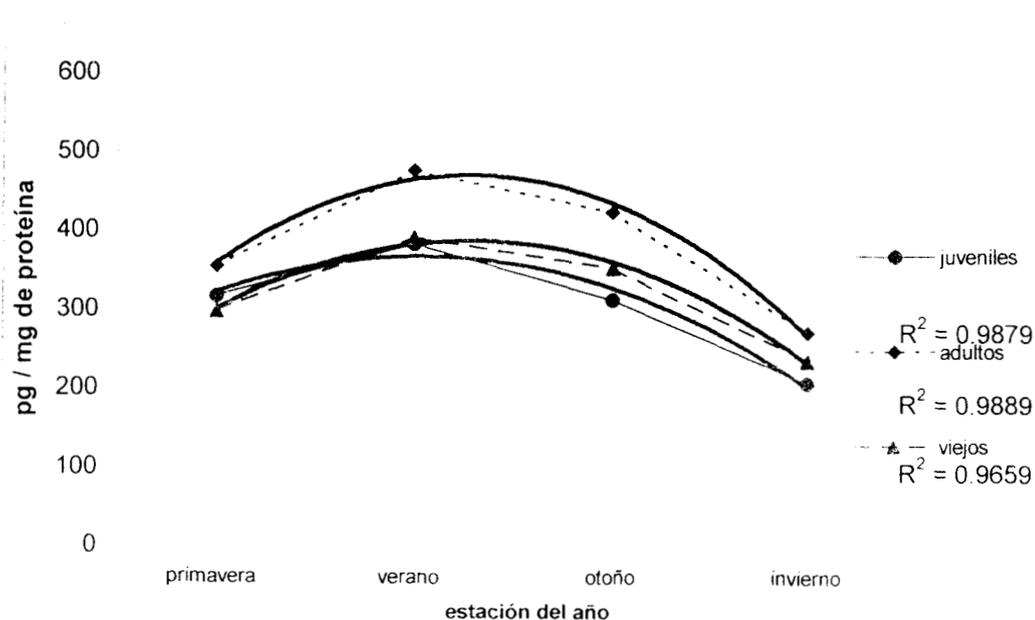


Fig. 14. Patrón estacional del contenido de testosterona en testículos de *Peromyscus melanotis*; juveniles (edad I-II), adultos (edad III-IV) y viejos (edad V).

CONCLUSIONES

◆ Los machos del ratón de orejas oscuras (*Peromyscus melanotis*) juveniles y subadultos, adultos jóvenes y adultos, así como los viejos sus testículos contienen testosterona todo el año, siendo su mayor concentración en el verano.

◆ En los testículos de *Peromyscus melanotis* la concentración de testosterona independiente del mes o de la estación del año tiene el siguiente patrón ontogenético: baja en los juveniles y aumenta en los subadultos, siendo mayor su contenido en los adultos jóvenes y adultos, disminuyendo en los viejos.

◆ Endocrinamente, los machos de *Peromyscus melanotis* se pueden agrupar en tres categorías de edad: juveniles (edad I y II), adultos (edad III y IV) y viejos (edad V).

BIBLIOGRAFÍA

- Alcérreca-Aguirre, C., Consejo-Dueñas, J., Flores-Villela, O., Gutiérrez-Cabonel, D., Hentschel-Ariza, E., Herzig-Zuercher, M., Pérez-Gil Salcido, R., Reyes-Gómez, J. y Sánchez-Cordero Dávila, V. 1988.** Fauna Silvestre y Áreas Naturales Protegidas. Fundación Universo Veintiuno, A.C. México, D.F. México. Pp 193.
- Allen, J.A. y FM. Chapman, 1897.** On a collection of mammals from Jalapa and Las Vigas, State of Veracruz, México. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., 9:197-208.
- Almeida, A., Petenuscci, S., O. Anselm, Franci-Rosa-e-Silva. 1998.** Decreased Spermatogenic And Androgenic Testicular Functions In Adult Rats Submitted To Immobilization-Induced Stress From Prepuberity. Braz J Med. Biol. Res, 31(11):1443-8.
- Álvarez del Castillo, C. 1989.** La vegetación en la Sierra del Ajusco. Cuaderno de Trabajo número 33. Departamento de Prehistoria, Instituto Nacional de Antropología e Historia. México, D. F., 74 pp.
- Aranda-Sánchez, J. M., Martínez del Río Méndez, C., Colmenero-Rolón, L. C. y Magallón-Solórzano, V. M. 1980.** Los Mamíferos de la Sierra del Ajusco. Comisión Coordinadora para el Desarrollo Agropecuario del Distrito Federal. México D.F., México. Pp. 146
- Bellcoq, M. I., Smith, S. M. 1992;** Management of Small Mammals for the Biological Control of Whitw Pinw Weevil. 54th Midwest Fish and Wildlife Conference 54:352-354.
- Bermúdez, J. A., V. Coronado, A. Mijares, C., León, A., Velásquez, and J. L. Mateos. 1975.**
Stereochemical Approach to Increase the Specificity of Steroids Antibodies. J. Steroid Biochem. 6:283-290.

- Bronson, F. H. 1989.** Mammalian Reproductive Biology. Univ. Chicago Press, Chicago, USA, 325 pp.
- Brown, J. H., Zeng, Z. 1989.** Comparative Population Ecology of Eleven Species of Rodents in the Chihuahuan Desert. *Ecology* 70 (5):1507-1525.
- Bowles, J. B. 1972.** Notes on Reproduction in Four Species of Bats From Yucatan, México. *Trans. Kansas Acad. Sci.* 75:271-272.
- Browers, J. H. 1974.** Genetic Compatibility of *Peromyscus maniculatus* and *Peromyscus melanotis*, as Indicate by Breeding Studies and Morphometrics. *J. Mamm.* 55(4): 720-737.
- Carleton, 1989.** Systematics and Evolution. Pp. 7-141, in *Advances in the Study of Peromyscus (Rodentia)* (G. L. Kirkland, Jr., and J.N. Layne, eds).Texas Tech University Press, University Press, Lubbock, pp. 366.
- Castro-Campillo, A., Salame-Méndez, A., Moreno-Ramos, O., González-Robles, O. y Ramírez-Pulido, J. 2000.** Reproducción e Historia de la Vida en el Ratón de Orejas Negras, *Peromyscus melanotis* en el Parque Cumbres del Ajusco, D. F. México. V Congreso Nacional de Mastozoología. Mérida, Yucatán, México. Nov. 2000.
- Ceballos, G. y D. Navarro, L. 1991.** Diversity and Conservation of Mexican Mammals. *In* Topics in Latin American Mammalogy: History, Biodiversity, and Conservation (M. A. Mares y D. J. Schmidly, eds.) Univ. Oklahoma Press, Oklahoma. EUA. Pp. 167-198
- Ceballos, G. y P. Rodríguez. 1993.** Diversidad y Conservación de los Mamíferos de México: II. Patrones de Endemicidad. *In* *Avances en el Estudio de los Mamíferos de México* (R. A. Medellín y G. Ceballos, eds.). Publ. esp., vol I AMMAC. México. Pp. 87-108.
- Cekan, S. Z. 1976 .**Reability of Steroid Radioimmunoassays. *Acta Universitatis Upsaliensis.* No. 14 pp.148.Swedish Medical Research Council Reproductive Endocrinology Research Unit, Stockholm. Uppsala, Sweden.
- Clark, D. L. 1996.** Fertility of a *P. Maniculatus* and *P. Melanotis*. *J. Mamm.* 47:340-345.

- Cushing, B. A. 1985.** A Comparison of Activity Patterns of Estrous and Diestrous Prairie Deer Mice, *Peromyscus maniculatus bairdii*. J. Mamm. 66:136-138.
- Chávez-Tapia, C. y R. Gallardo-Villegas. 1993.** Demografía y Reproducción de *Neotomodon alstoni* en la Sierra del Ajusco. In Avances en el Estudio de los Mamíferos de México (R. A. Medellín y G. Ceballos, eds.). Publ. esp., vol I AMMAC. México. Pp. 317-331.
- Danzo, B., Pavlos S. and Anthony, H. 1990.** Hormonal Regulation of Androgen-Binding Protein in the Rat. Endocrinol., 127:2829-2838.
- Davis, W. B. 1944.** Notes on Mexican Mammals. J. Mamm. 25;4: 370-403.
- Davis, W. B. and Schimdlly D. J. 1994.** The Mammals of Texas; Texas Parks and Wildlife, Nongame and Urban Program; Texas Tech University (On line)
(<http://www.nsr.ttu.edu/tmot1/copyrigh.htm>)
- Eleftherious, B. E. 1968.** Chpt. 8. In Biology of *Peromyscus* (Rodentia) (J. A. King, ed.). Spec. Publ., Amer. Soc. Mamm. USA. Pp. 312-339.
- Fa, J. E. 1989.** Conservation-Motivated Analisis of Mammalian Biogeography in the Trans-Mexican Neovolcanic Belt. Nat. Geogr. Research 5: 296-316.
- Fawcett, D. 1999.** Tratado de Histología. 11^a edic. Edit. Interamericana, México. Pp .840–850.
- Forsberg, M. 1996.** Hormonal Control of the Reproductive Function of Male. Nordic Research Course in Diagnostic and Experimental Animal Andrology; Dept. of Clinical Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala. Pp. 20
- García, E. 1981.** Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Coppen. Offset Larios. Tercera edición. México D.F., México. Pp. 252.
- González, L. R. 1994.** Los Roedores y la Salud Pública. Simposio Internacional. Control Epidemiológico de Vectores. Argentina. Pp.1-7

- Gooren, J. L. G. 1996.** The Age Related Decline in Androgen Levels in Men: Clinically Significant?. *Br Med J.*, 336: 186-195.
- Gray, A., Feldman A., Mckinlay J. B. and Longeope, C. 1991.** Age, Disease, and Changing Sex Hormone Levels in Middle Aged Men: Results of the Massachusetts Male Aging Study. *J. Clin Endocrinol Metab.*, 73: 1016-1025.
- Groves, W. E., Davis, F. C. Jr., and Sells, B. H. 1968.** Spectrophotometric Determination of Microgram Quantities of Protein Without Nucleic Acid Interference. *Anal. Biochem.* 22:195-210.
- Gustafson, A. W., and B. J. Weir (eds.). 1979.** Comparative Aspects of Reproduction in Chiroptera. Symposium Report No. 14. *Journal of Reproduction and Fertility.* 439 pp.
- Hafez, E. S. E. (Ed.). 1970.** Reproduction and Breeding Techniques for Laboratory Animals. Lea and Febiger, Philadelphia, USA.
- Hall, E. R. 1981.** The Mammals of North America. John Wiley and Sons, Vol. 2:VI+601+1180+1-90.
- Hall, P. 1989.** Testicular Steroid Synthesis. In: *The Physiology of Reproduction.*, vol I, chapter 22. Edit Raven Press, New York. Pp.
- Harman, S. M. and Tsituoras, P. D. 1980.** Reproductive Hormones in Aging Men. I. Measurement of Sex Steroids, Basal LH, and Leydig Cell Response to hCG. *J. Clin Endocrinol Metab.* 51: 35-40.
- Hartenberg, J. L. 1985.** El orden Rodentia: Las Preguntas Mayores, En: *El Origen Evolutivo.* Ed. Lockett, P.W., Nueva York, N.Y., Press. Pp.1-34.
- Heideman, P. D., and K. S. Powell. 1998.** Age-specific Reproductive Strategies and Delayed Embryonic Development in an Old World Fruit Bat, *Ptenochirus jagori.* *J. Mamm.* 79:295-311.
- Helm, J. D. III. 1975.** Reproductive Biology of *Otodylomys* (Cricetidae). *J. Mamm.* 56:575-590.

- Heuze de Icaza, M. 1992.** Efecto Diferencial de la Administración Crónica de 17β -Estradiol Sobre la Fisiología y Estructura de las Distintas Regiones Anatómicas del Epidídimo. Tesis Maestría, UAM-Iztapalapa. Pp.81.
- Hilton, B. L. 1992.** Reproduction in the Mexican vole *Microtus mexicanus*. *J. Mamm.* 73:586-590.
- Hodischek, B., and T. L. Best, 1983.** Reproductive Biology of Ord's Kangaroo Rat (*Dipodomys ordii*) in Oklahoma. *J. Mamm.* 64:121-127.
- Hoffmeister, D. F. 1951.** A Taxonomic and Evolutionary Study of the Pinon Mouse, *Peromyscus truei*. Illinois Biol. Monogr. 1:IX+1-104.
- Jeniolo, B. 1983.** Ovulation and Fertilization in the Vole, *Microtus subterraneus*. *Biol. Reprod.* 8:53-57.
- Kelce, R. W., Lubis, A., Braun, W., Youngquist and Ganjam. 1990.** Influence of Rete Testis Fluid Deprivation on the Kinetic Parameters of Goat Epididymal 5α -reductase. *Steroids* 55:27-31.
- Kierzenbaum, A. L. 1997.** El Transplante de Células Espermatogénicas; departamento de Biología Celular y Ciencias Anatómicas, Escuela de Medicina , Universidad de la Ciudad de New York, E.E. U.U. En la Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Andrología. Vol. 6 (1).
- Kime, D. E. 1995.** Steroid Nomenclature. *Gen. Com. Endocrinol.* 98:119-120.
- Korenman, S. G., Morley, J. F., Mooridian, A. D., Davis, S. S., Kaiser, F. E., Silver, A. J. 1990.** Secondary Hypogonadism in Older Men: Its Relationship to Impotence. *J Clin Endocrinol Metab.* 71:963-969.
- Kunz, T. H., Wemmer, and V. Hayssen. 1996.** Sex, Age and Reproduction. Pp. 279-290, in: *Measuring and Monitoring Biological Diversity: Estandar Methods for Mammals*. Eds. Don E. Wilson *et al.*, Smithsonian Institution Press, Washington and London

- Lombardi, J. R. and J. M. Whitsett. 1980.** Effects of Urine From Conspecifics on Sexual Maturation in Female Prairie Deer-mice *Peromyscus maniculatus bairdii*. *J. Mamm.* 61:766-768.
- Loza, A., Lemus, A. y Pérez, P. 1998.** Bioquímica de Esteroides. Capítulo 5: Metabolismo de Hormonas Esteroides Pp. 53-92.
- Magoha, G.A. 1997.** Effect of Ageing on androgen levels in elderly males. *East Afr Med J*; 74:642-644.
- Martín, F. E. y Álvarez, S. T. 1982.** Crecimiento y Desarrollo en el Laboratorio de *Neotomodon alstoni* (Rodentia: Cricetidae). *Ans. Esc. Nac. Cien. Biol. Méx.* 26:55-84.
- Maser, Ch., Mate, B. R., Franklin, J. F. and Dyrness, C. T. 1981.** Natural History of Oregon Coast Mammals. Gen. Tech. Rep. PNW-133. Portland, OR: US Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Forest and Range Experiment Station. Pp.496
- Mendieta, E., A. Salame, J. Herrera, and F. Antón-Tay. 1991.** Melatonin Inhibition Androgen Biosynthetic Pathway in Leydig Cell-Enriched Cell Fractions From Normal Adult Rat. *Mol. Androl.* 3:319-329.
- Miller, K. V., R. L. Marchinton, K. J. Fornand, and K. L. Johansen. 1987.** Dominance, Testosterone Levels and Scraping Activity Herd of White-Tailed Deer. *J. Mamm.* 68:81-817.
- Motelica-Heino, C. and Corbier, P. 1988.** The testosterone Evens in the Plasm and Testicles of mice of the neonatal. *J. Biochem Steroid.* 31(3):283-86.
- Myers, P. and L. L. Master. 1983.** Reproduction by *Peromyscus maniculatus* Size and Compromise. *J. Mamm.* 64:1-18.

- Nelson J. F. and Lathamark, P. 1975.** Testosterone of the Plasm Evens in C57BL/6J the Male Mice, the Effects Bigger than Age and illness. *Acta Endocrinol.* 80(4):744-52.
- Nowak, R. M. and Paradiso, J. L. 1983.** Walker's Mammals of the World. 4 th edition. The John Hopkins University Press. Baltimore MD, USA. Pp.568
- Orgebin-Cris't, M. C. 1981;**Epididymal Physiology and Sperm Maturation. *Prog. Reprod. Biol.* 8:80-89.
- Olivera, J., Ramírez-Pulido y Williams, S. L. 1986.** Reproducción de *Peromyscus (Neotomodon) alstoni* (Mammalia: Muridae) en Condiciones de Laboratorio. *Act. Zool. Mex. (n. s.)* 16:1-27
- Ramírez-Pulido, J. y C. Müdespacher. 1987.** Estado Actual y Perspectivas del Conocimiento de los Mamíferos de México. *Ciencia* 38:49-67.
- Ramírez-Pulido, J., Lira, I., Gaona, S., Müdespacher, C. y Castro, A. 1989.** Manejo y Mantenimiento de Colecciones Mastozoológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. México. Pp. 127. 1ª edición.
- Ramírez-Pulido, J. y A. Castro-Campillo. 1993.** Diversidad Mastozoológica en México. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat., vol. Espec.* Pp. (XLIV) 413-427.
- Ramirez-Pulido, J., A. Castro-Campillo, M. Martínez-Coronel y U. Aguilera. 1995.** *Peromyscus melanotis* J. A. Allen y Chapman, 1897. Atlas mastozoológico de México. (Aceptado).
- Rocha, D. C., Debelj K. L. and Franca, L. R. 1999.** Exposure to Constant Light During Testis Development Increases Daily Sperm Production in Adult Wistar Rats. *Tissue Cell.* 31:372-379.
- Salame-Méndez, A. Y Villalpando-Fierro, I. 1998.** La Diferenciación Sexual en Vertebrados: Hipótesis y Teorías. *Acta Zool. Méx. (n.s.)* 73:89-110.
- Sánchez-Cordero, V. 1993.** Estudio Poblacional de la Rata Espinosa (*Heteromys desmarestianus*) en una Selva Húmeda de Veracruz, México. *In Avances en el*

- Estudio de los Mamíferos de México (R. A. Medellín y G. Ceballos, eds.). Publ. esp., vol I AMMAC. México. Pp. 301-316.
- Suárez B.A. e Ibarra J. C. 1996.** Proyecto Piloto de Turismo Rural En el Ejido de San Nicolás Totolapan. (Parque Nacional Cumbres del Ajusco). Unidad Coordinadora de Áreas Naturales. Instituto de Ecología SEMARNAP Pp.1-16
- Shabsigh, R., Raymond, J. F., Olsson, C. A., O' Toole K., and Buttyan, R. 1998.** Androgen Induction of DNA synthesis in the rat penis. *Urology* 52 (4):723-8.
- Stedman. 1993.** Diccionario de Ciencias Médicas. Editorial Médica-Panamericana S. A., España-México. Pp.1528.
- Schmaljohm C. y Hjelle B. 1997.** Hantavirus: Problema Mundial de Salud. Instituto de Enfermedades Infecciosas de la Armada de los Estados Unidos Fort Detrick Maryland y Universidad de Nuevo México. *Emerging Infectious Diseases* vol 3 No. 2 abril-junio Pp. 4-8.
- Steven, R. and Gambert, M. D. 1995.** The Aging Male Reproductive System. *Endocrinol Metab Clin.* 24:297-295.
- Smolen, M. J., Genoways, H.H. and Baker R. J. 1980.** Demographic and Reproductive Parameters of the Yellow-Cheeked Pocket Gopher (*Pappogeomys castanops*). *J. Mamm.* 61:224-236.
- Tenover, J. I. 1997.** Testosterone and the Aging Male. *J Androl.* 18(2):103-106.
- Terman, C. R. 1968.** Biology of *Peromyscus* (Rodentia) (J. A. King, ed.). Spec. Publ. No. , Amer. Soc. Mamm. USA, Chapt. 11, pp. 412-450.
- Torres-Villaseñor, C. K. 1991.** Estudio Sobre la Madurez Sexual de Machos de *Peromyscus melanotis* en una Población Silvestre del Ajusco. Universidad Simón Bolívar. Tesis Licenciatura. Pp.132
- Tscrotas, K. and Merino, G. 1998;** Andropause and Aging Male. *Andrology* 10(2):87-93.

- Vargas, M. F. 1984.** Parques Nacionales de México y Reservas Equivalentes. Pasado, Presente y Futuro. Colección: Grandes Problemas de Investigaciones Económicas. UNAM. México, D. F. 266 pp.
- Villa, B. y D. Whisson. 1995.** Los Roedores Plaga. Instituto de Biología Departamento de Zoología UNAM. Ciencia y Desarrollo No. 124 Pp. 62-69.
- Wolf, J. O. 1994.** Reproductive Success of Solitarily and Communally Nesting White-Footed Mice and Deer Mice. Behavioral Ecology 5;2:206-209.
- Yen, B. and Jaffe, R. 1986.** Endocrine Regulation of the Reproductive System. vol I. Edit. Saunders. USA. pp 177-199.

ANEXO 1

Descripción de las Edades

Descripción de las características a partir de las cuales se determinaron las categorías de edad de los 291 machos de *Peromyscus melanotis* a partir del desgaste oclusal de los molares según Hoffmaister (1951). Esta determinación de edades se llevó a cabo bajo la asesoría de la Dra. Alondra Castro Campillo responsable del Laboratorio de Mamíferos de la UAM-Iztapalapa.

Edad 1 (jóvenes).- Cúspides sin desgaste a desgaste que inicia en la cara lingual; las cúspides en vista lateral son más pequeñas entre si y tienden a presentar una orientación en diagonal de adelante hacia atrás; en vista ventral son redondeadas.



Edad 2 (subadultos).- Cúspides con desgaste ligero en la cara lingual, pero ya notorio, que empieza en la cara externa. Las cúspides a medida que el desgaste es mayor tienden a pasar de redondeadas a triangulares (en punta más acusada).



Edad 3 (adultos jóvenes).- El desgaste de la cúspide es muy distinto en ambas caras. Se observan comunicaciones entre ambas caras por el desgaste. En general, se observa mayor desgaste a lo largo de la cara lingual que es más baja que la externa.



Edad 4 (adultos maduros adultos).- El desgaste es todavía mayor que en la edad anterior, sólo se observan cúspides desgastadas y afiladas en la cara externa. La superficie oclusal tiende a ser cóncava, apreciándose bien el dibujo de los dientes (entradas y salidas) que ocasiona el esmalte.



Edad 5 (viejos).- Superficie oclusal cóncava, apreciándose los patrones del desgaste de los dientes porque el esmalte todavía es evidente en la periferia y en el interior de los dientes las caras son planas en vista lateral.



ANEXO 2

Comparación entre la Cuantificación de T con y sin Separación Cromatográfica.

El objetivo de llevar a cabo este análisis fue el de corroborar si había una diferencia en cuantificar T previa separación cromatográfica del extracto total de esteroides (ETE) contra su determinación directa sobre el ETE, para lo cual se siguió la técnica descrita por Mendieta y col. (1991) utilizando testículos de *Peromyscus difficilis* de diferente edad.

La obtención de los Homogenados para la Cuantificación de T. y la extracción de esteroides totales se realizó de la misma manera descrita en el apartado materiales y métodos de esta tesis (pag. 24 y 25).

Separación Cromatográfica de T. A cada tubo conteniendo su correspondiente ETE para este análisis se les agregó una disolución de éter dietílico:metanol (2:1, v/v); llevándose a cabo la separación del andrógeno por cromatografía en placa fina (CCF). La disolución se transfirió a placas de vidrio (20 x 20 cm) recubiertas con gel de sílice e indicador de radiación UV (Merck), a las cuales se les agregó en los extremos una alícuota de T como referencia previamente purificada. La separación cromatografía se hizo utilizando como fase móvil los siguientes sistemas cromatograficos: i) benceno; ii) benceno:acetato de etilo (7:3, v/v) y iii) benceno:metanol (95:5 v/v). La zona correspondiente a la T de referencia se visualizo con una lámpara de UV (254 y 366 nm). Una vez identificada el área de la T a ser cuantificada, coincidente con la distancia relativa de separación (Rf) de la T de referencia, éste se raspó. Posteriormente la T adsorbida al sílice se separó con una solución de éter dietílico:metanol (1:1, v/v) recolectándose su eluido en tubo de ensayo, a partir del cual se determinó la concentración del andrógeno.

Cuantificación de T. La determinación de la concentración de T se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA). El RIA se hizo bajo la asesoría del M. en B.E. Joaquín Herrera Muñoz en la Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva del Hospital "Luis Castelazo Ayala" del IMSS.

A cada tubo conteniendo su respectivo contenido de T separada por CCF y a los que contenían su ETE se les agregaron 500 μ l de una disolución amortiguadora de fosfatos (0.25 M, pH 7, azida de sodio-gelatina 1%) conteniendo la dilución del antisuero contra T, así como T-³H como trazador (\approx 5000 cpm). Los tubos se incubaron por 18 hrs a 4°C separándose el esteroide libre del unido al anticuerpo por adición a cada tubo de 200 μ l de carbón-dextrán (625 mg% de carbón activado Norit A y 62.5 mg % dextrán T 70); centrifugándose los tubos a 3000 x g x 15 min a 4°C. El sobrenadante se decantó a un vial al que se le agregó 5 ml de Instagel (Packard); los viales se colocaron en un espectrómetro de centelleo líquido Beckman modelo LS-700, con una eficiencia máxima para tritio del 56%. El control de calidad del RIA fue realizado de acuerdo a especificaciones internacionales de exactitud, precisión y sensibilidad (Cekan, 1976); la exactitud del RIA se da en estos resultados.

El método del RIA se validó por medio de una curva estándar, siendo los coeficientes de variación interensayo menores del 4%. El control de calidad del RIA se hizo de acuerdo a las especificaciones internacionales de exactitud, precisión y sensibilidad (Cekan, 1976).

Resultados.

La exactitud del método de extracción a partir de concentraciones de testosterona conocidas fue del 100%. Por su parte, la variación que hubo de la curva de calibración fue muy buena, menos del 1%. Al analizar la variación intraensayo del RIA utilizado en muestras de suero fue menor del 2% (Tabla 1).

Concentración de T. Las diferencias porcentuales (variación) entre la cuantificación de T de los testículos de *P. difficilis* previa separación cromatográfica contra el que se hizo directamente sobre el ETE no hubo diferencias significativas (Fig. 1). Escogiendo muestras al azar, se constató que la diferencia mayor fue del 2.99% y la menor del 0.83% de variación entre las dos técnicas utilizadas sobre las mismas muestras (Tabla 2).

	ESTEROIDE
PARÁMETRO	Testosterona
recuperación de masa 5 pg	5.00±0.08
50 pg	50.4±0.22
500pg	501±1.26
variación máxima de la curva (c.v.)	0.95%
variación intraensayo de una muestra de suero (c.v.) (n=10)	1.32%

Tabla 1. Exactitud de la metodología de extracción, así como la variación de la curva utilizada como patrón y la variación intraensayo del RIA.

Validación de la Técnica			
No. de muestra	Directa (pg de testosterona)	Indirecta (pg de testosterona)	%diferencia
4	467	475	1.71
13	358	361	0.83
18	564	579	2.65
22	535	551	2.99
26	685	701	2.33
Media	476.85	490.95	2.49
Desv. Est.	174.15	179.18	2.25
Varianza	30328.62	30577.29	4.84

Tabla 2. Diferencias entre muestras escogidas al azar de testículos de *P. difficilis* a las que se les cuantificó por RIA T previa separación cromatográfica (indirecta) y sin separación cromatográfica (directa).

227615

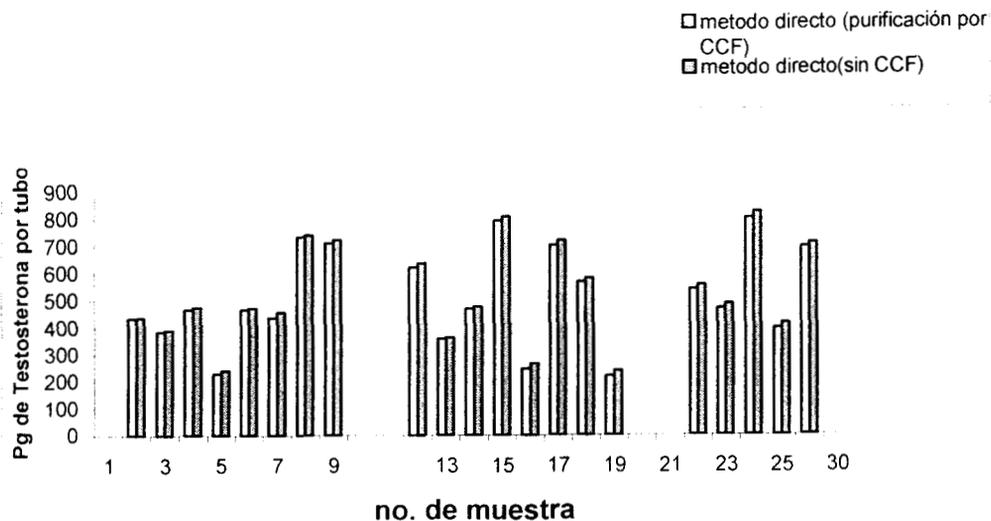


Figura 1. Comparación entre el contenido de T realizado por RIA con muestras que se les hizo separación del andrógeno por cromatografía en capa fina y sus homólogas que no se les hizo la separación cromatográfica.

Discusión y Conclusión. Al no haber diferencias significativas en la cuantificación de T por RIA en muestras de testículos de *P. difficilis* previa separación cromatográfica con aquéllas en las que se hizo sobre el extracto total de esteroides, indicó la alta especificidad del antisuero utilizado; la variación intraensayos fue mínima. Al cuantificar por RIA esteroides sexuales previa separación cromatográfica o directamente sobre el extracto total no hay interferencia alguna. Por último, al no realizar una previa separación cromatográfica reditúa tanto en el ahorro de materiales y equipo (optimizaron recursos económicos), así como ahorrar tiempo el cual es importante considerar cuando se van a realizar análisis sobre una cantidad considerable de muestras. Por lo antes mencionado, en el trabajo de tesis se optó el realizar la cuantificación de T por el método directo es decir, sin separar el andrógeno por cromatografía.

ANEXO 3

Contenido Mensual de T Correspondiente al Periodo 1996-1997.

En este periodo se recolectó mayor número de ratones de las edades III, IV y V, no así de las edades I y II.

El contenido de testosterona en los testículos de los ratones de la edad III fue mayor en el mes de julio y menor en diciembre (Fig. 1). La tendencia mensual del contenido del andrógeno para estos ratones se ajustó bien ($R^2= 0.85$) a una curva polinomial de segundo grado. Lo anterior permitió dilucidar su patrón que consistió en Incrementarse a partir de enero; manteniéndose este incremento hasta los meses de junio y julio, y comenzar a descender a partir de agosto (Fig. 1).

El patrón descrito para los ratones adultos jóvenes fue similar para los adultos (edad IV)(Fig. 2) y viejos (edad V)(Fig. 3).

Patrón Mensual del Contenido de T Correspondiente al Periodo 1996-1997.

Para determinar el patrón general mensual del contenido de testosterona en los testículos de *Peromyscus melanotis*; se agruparon las edades III, IV y V por mes, resultando no haber diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Además se ajustó bastante bien ($R^2= 0.85$) a una curva polinomial de segundo grado. Esta curva permitió dilucidar la tendencia del contenido de la testosterona por mes sin importar la edad del ratón (Fig. 4). Comienza a incrementarse a partir de enero; manteniéndose este incremento hasta los meses de junio y julio, y empieza a descender a partir de agosto (Fig. 4).

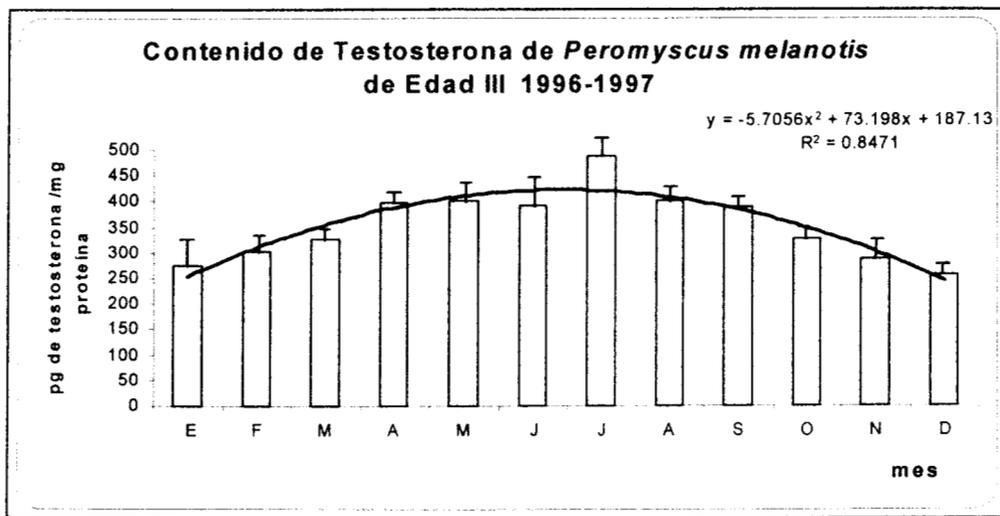


figura 1

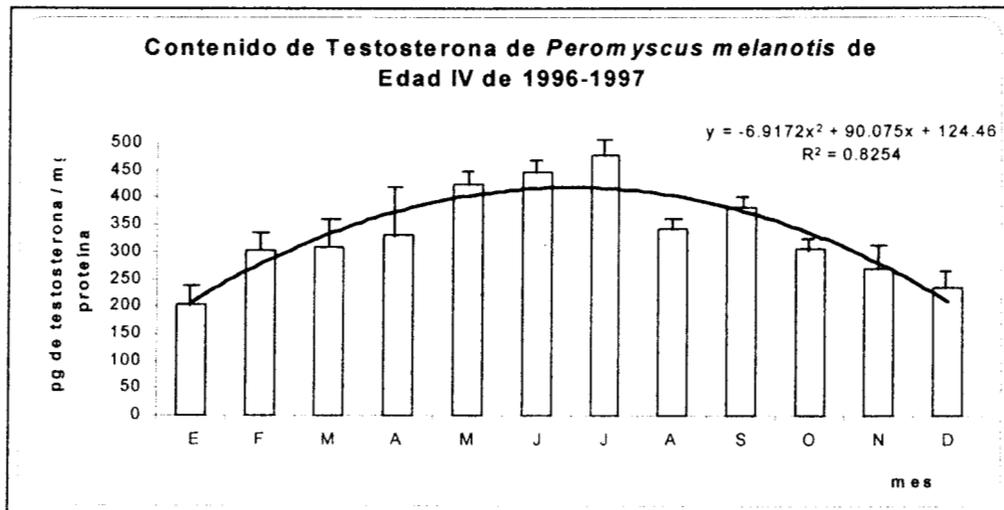


figura 2

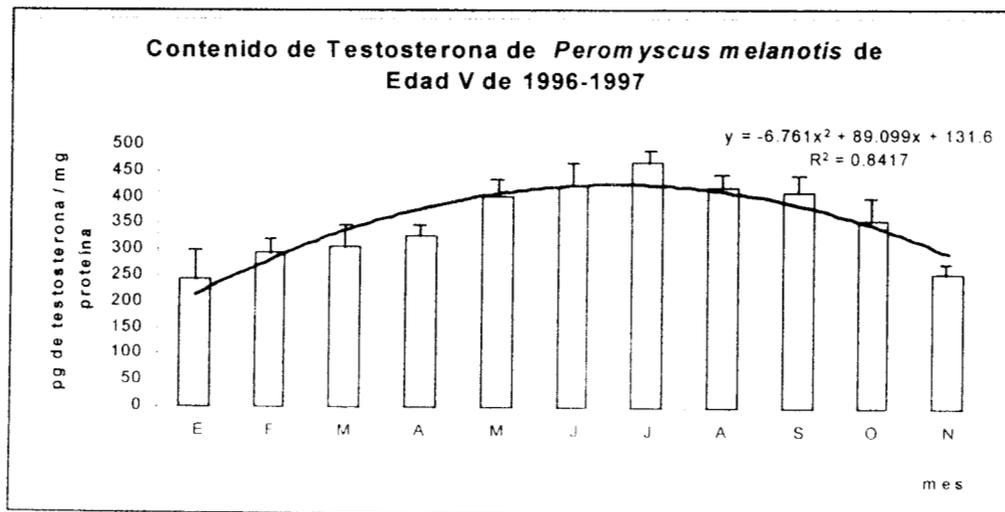


figura 3

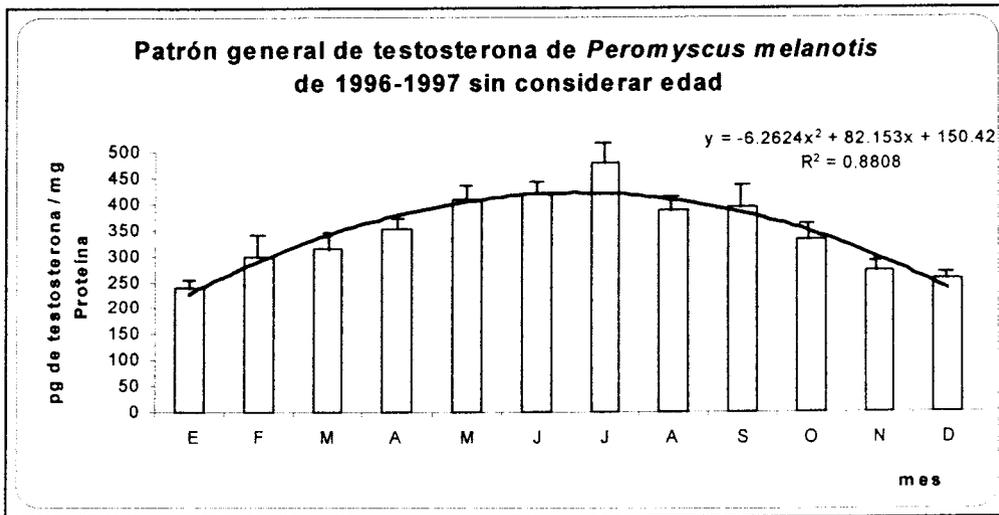


figura 4

ANEXO 4

Contenido Estacional de T Correspondiente al Periodo 1996-1997.

Una vez conocido el patrón mensual por edad y general del contenido de testosterona en los testículos de *P. melanotis* durante el periodo 1996-1997 se analizó por estación del año. Para lo cual el año se dividió en cuatro trimestres para conformar las respectivas estaciones del año. Marzo, abril y mayo, primavera; junio, julio y agosto, verano; septiembre, octubre y noviembre, otoño, y diciembre, enero y febrero, invierno.

Los ratones juveniles (edad I) en el verano fue mayor su contenido, disminuyendo en otoño y conspicuamente en el invierno, incrementándose durante la primavera (Fig. 5). Ajustándose muy bien ($R^2= 0.99$) su tendencia a una curva polinomial de segundo grado. En los subadultos (edad II)(Fig. 6), adultos jóvenes (edad III)(Fig. 7), adultos (edad IV)(Fig. 8) y viejos (edad V)(Fig. 9) el patrón de ascenso y descenso del contenido de testosterona estacional fue similar al descrito para los juveniles, ajustándose además sus tendencias a una curva polinomial de segundo grado ($R^2= 0.97; 0.91; 0.75; 0.69$, respectivamente).

Patrón Estacional del Contenido de T Correspondiente al Periodo 1996-1997.

Una vez demostrado el patrón estacional del contenido de testosterona en los testículos de *P. melanotis* en las cinco edades se hizo un análisis por edad-estación lo que demostró no haber una diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Este resultado permitió agrupar las cinco edades para describir el patrón estacional, resultando una tendencia que se ajustó muy bien ($R^2= 0.97$) a una curva polinomial de segundo grado (Fig. 10). Lo que permitió dilucidar el siguiente patrón estacional. El contenido de testosterona fue mayor durante el verano, descendiendo de otoño a invierno, e incrementarse a partir de la primavera (Fig. 10).

Por último, una vez que se determinó el patrón mensual y estacional tanto por edad como general de testosterona en los testículos de *P. melanotis* se quiso dilucidar un patrón

ontogenético es decir, el patrón del andrógeno durante el ciclo de vida reproductivo del ratón sin importar el mes o la estación del año.

En los ratones juveniles (edad I) el contenido de testosterona fue el más bajo de las cinco edades. Incrementándose el contenido del andrógeno en los subadultos (edad II), siendo mayor en los adultos jóvenes (edad III) y descender en los adultos (edad IV), mientras que en los ratones viejos (edad V) el contenido se mantuvo similar al de los subadultos y adultos, respectivamente (Fig. 13). Este patrón se ajustó bastante bien ($R^2= 0.85$) a una curva polinomial de segundo grado (Fig. 13). Por lo que este patrón por edad del contenido de testosterona de ascenso y descenso en los testículos de *P. melanotis* sería el patrón fisiológico normal durante su ontogenia sin importar la estación del año.

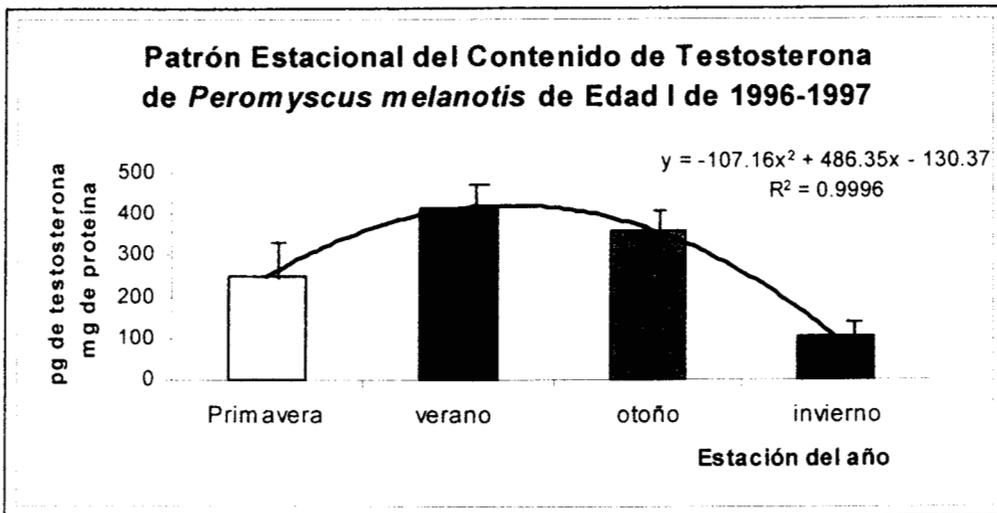


figura 5

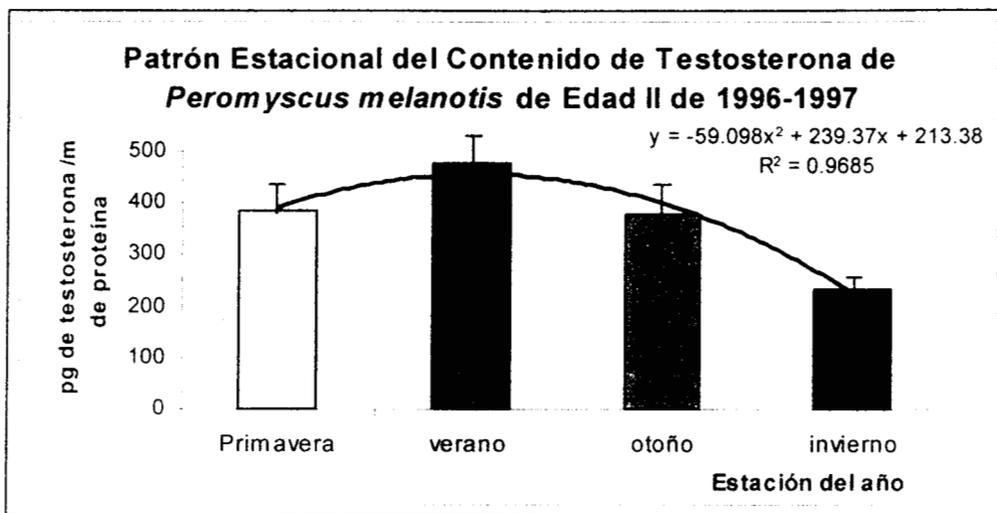


figura 6

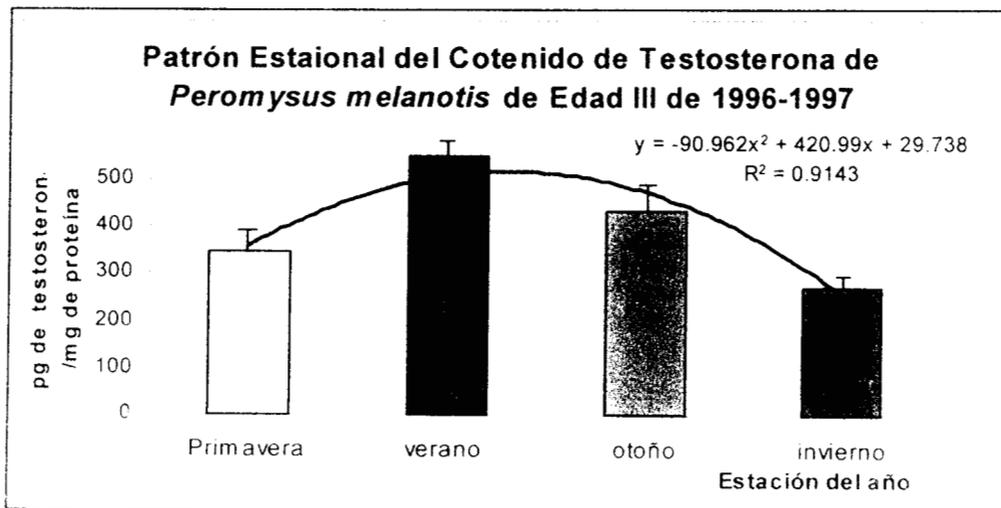


figura 7

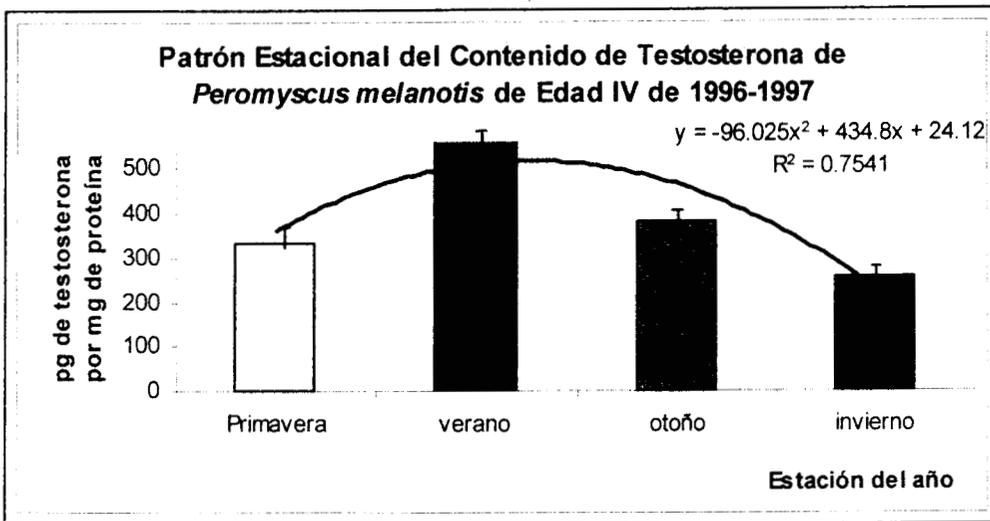


figura 8

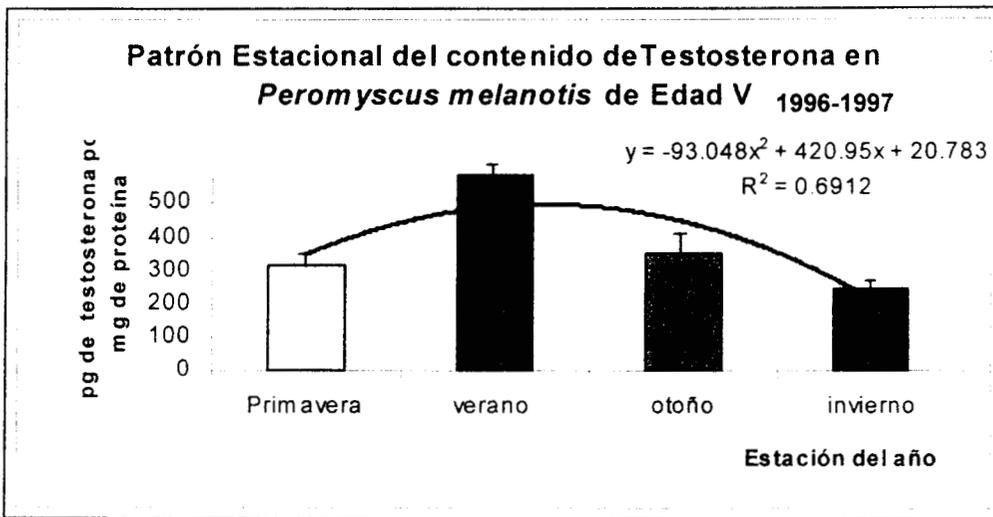


figura 9

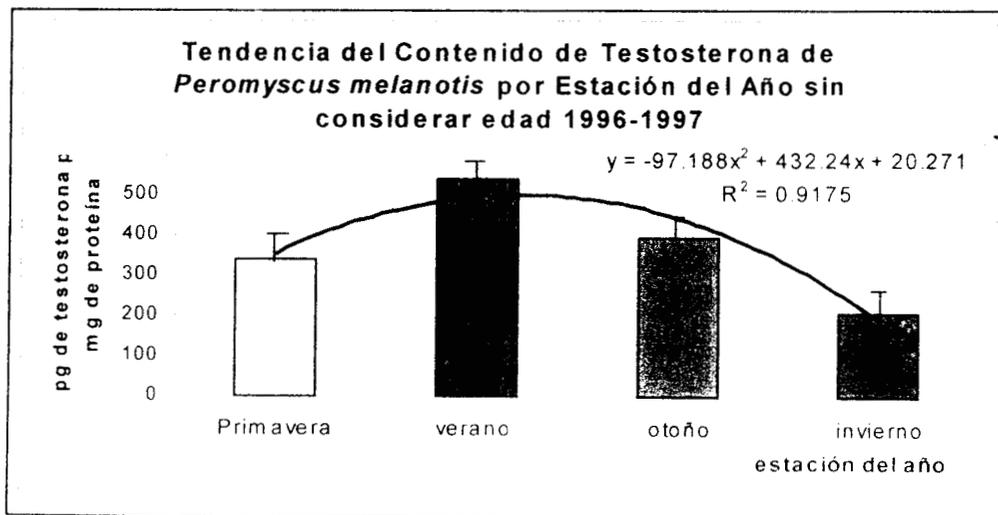


figura 10

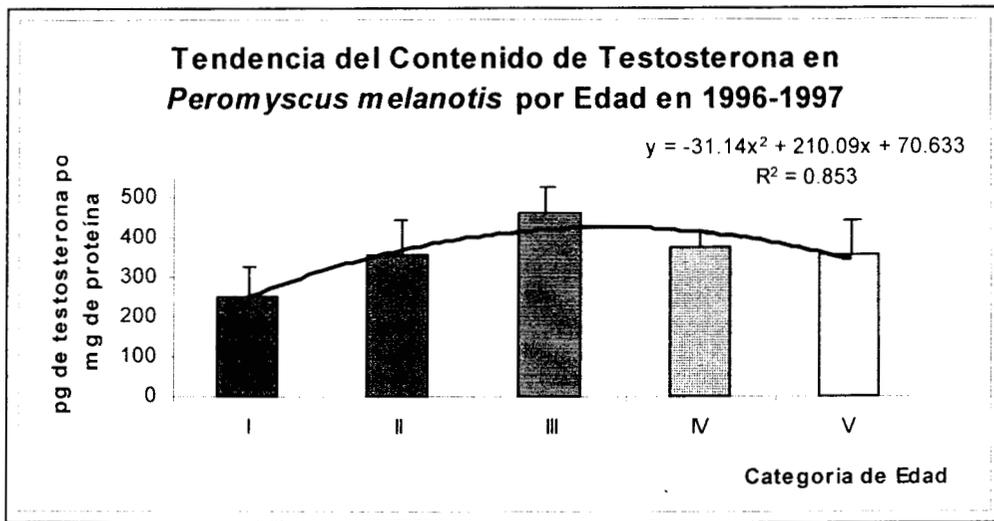


figura 11