

## INMUNOLocalización Y CONTENIDO DE ESTEROIDES SEXUALES EN OVARIOS DE HEMBRAS DE *PEROMYSCUS MELANOTIS* ALLEN & CHAPMAN, 1897 (RODENTIA: MURIDAE) DURANTE LA PRIMERA MITAD DE LA PREÑEZ

Arturo SALAME-MÉNDEZ<sup>1</sup>, Rosa María VIGUERAS-VILLASEÑOR<sup>4</sup>, Joaquín HERRERA-MUÑOZ<sup>3,5</sup>, Enrique MENDIETA-MÁRQUEZ<sup>3</sup>, Isaías H. SALGADO-UGARTE<sup>2,6</sup>, Alondra CASTRO-CAMPILLO<sup>2</sup> y José RAMÍREZ-PULIDO<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Departamentos de Biología de la Reproducción, <sup>2</sup> Biología y <sup>3</sup> Ciencias de la Salud. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana- Unidad Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco No. 186. Col. Vicentina. Iztapalapa, CP 09340. Apdo. Postal 55-535. D. F. MÉXICO

<sup>4</sup> Departamento de Histomorfología, Instituto Nacional de Pediatría, SSA. CP 04530. D. F. MÉXICO

<sup>5</sup> Unidad de Investigación en Medicina Reproductiva, Hospital "Luis Castelazo Ayala" IMSS. CP 01090. D. F. MÉXICO

<sup>6</sup> Biología<sup>6</sup>, FES "Zaragoza", UNAM. CP 09220, D. F. MÉXICO.  
E-mail <sup>1</sup>: asam@xanum.uam.mx

### RESUMEN

Se analizó la histología de los ovarios de hembras de *Peromyscus melanotis* en la primera mitad de la preñez, así como el contenido de esteroides sexuales y su localización en las gónadas. Los ovarios mostraron folículos en diferentes etapas de crecimiento y cuerpos lúteos con actividad secretora. Las concentraciones tisulares de pregnenolona (P<sub>5</sub>), progesterona (P<sub>4</sub>), 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona (17P<sub>4</sub>), androstendiona (A), testosterona (T) y estradiol (E<sub>2</sub>) fueron analizadas por radioinmunoanálisis (RIA). La P<sub>4</sub> fue el esteroide de mayor concentración, seguido por P<sub>5</sub>, T, E<sub>2</sub>, 17P<sub>4</sub>, y A, respectivamente. La inmunohistoquímica reveló que la P<sub>4</sub> se localiza principalmente en los cuerpos lúteos y el E<sub>2</sub> tanto en el estroma como en las células foliculares. Los resultados muestran que durante la primera mitad de la preñez de *P. melanotis* se mantiene la foliculogénesis y que el cuerpo lúteo constituye el principal, aunque no el único, tejido esteroideogénico en el ovario.

**Palabras Clave:** *Peromyscus melanotis*, preñez, ovarios, hormonas esteroides, México.

### ABSTRACT

Ovarian histology, sexual steroids contents and their localization within the gonads were analyzed in females of *Peromyscus melanotis* during the first half of their pregnancy. The ovaries showed follicles in different growth stages and fully secreting corpora lutea. Ovarian concentrations of pregnenolone (P<sub>5</sub>), progesterone (P<sub>4</sub>), 17 $\alpha$ -hydroxy-progesterone (17P<sub>4</sub>), androstenedione (A), testosterone (T), and estradiol (E<sub>2</sub>) were analyzed by radioimmunoassay (RIA). P<sub>4</sub> was the steroid with the highest concentrations, followed by P<sub>5</sub>, T, E<sub>2</sub>, 17P<sub>4</sub>, and A, respectively. Immunohistochemical analyses revealed that P<sub>4</sub> is mainly located in the corpora lutea and that E<sub>2</sub> can be found both in the

estroma and in the follicular cells. Our results suggest that during the first half of the pregnancy, folliculogenesis is maintained in *P. melanotis*, and that the corpus luteum constitutes the main, although not the only, steroidogenic tissue within the ovary.

**Key words:** *Peromyscus melanotis*, pregnancy, ovaries, steroid hormones, Mexico.

## INTRODUCCIÓN

La endocrinología reproductiva de roedores se basa en los modelos clásicos de laboratorio establecidos con cepas de ratón y de rata albinos. En ellos se han demostrado las variaciones que tienen algunas hormonas en diferentes etapas de su ciclo de vida y, en algunos casos, su mecanismo de acción. Si bien la fisiología reproductiva en los modelos descritos podría considerarse semejante en términos generales a la de los roedores de vida silvestre, quedaría la incógnita de si los mecanismos particulares son especie-específicos.

La actividad reproductiva de las hembras está relacionada con la función de los ovarios en cuanto a su producción de ovocitos y de esteroides sexuales (ES). Los ES imprescindibles en la biología reproductiva son las progestinas (progesterona,  $P_4$ ), estrógenos (estrone,  $E_1$ ; estradiol,  $E_2$ ) y andrógenos (androstendiona, A; testosterona, T).

La  $P_4$ , al actuar en el endometrio, permite que se lleve a cabo la implantación y el desarrollo embrionario (O'Grady & Bell 1977, Surani 1977, Madjerek 1972, Wu 1972). El  $E_2$  promueve el desarrollo folicular (Peters *et al.* 1975) y actúa como un factor luteotrópico, luteolítico, o ambos (Gorbman *et al.* 1983, Gibory & Keyes 1978, Damaur & Short 1973).

El  $E_2$  y la  $P_4$ , coordinadamente con las gonadotropinas (hormona estimulante del foliculo, FSH, por sus siglas en inglés; hormona luteinizante, LH, por sus siglas en inglés), regulan el ciclo estral o menstrual (Freeman 1994, Hillier 1994, Bronson 1989, van Tienhoven 1983, Finn & Booth 1977) que consta de foliculogénesis y ovulación. Además, la  $P_4$  y el  $E_2$  facilitan la migración del embrión por el endometrio (Gorbman *et al.* 1983, Surani 1977).

La T es el principal metabolito intermediario para la producción de  $E_2$  y la biotransformación de T en  $E_2$  se debe a la participación de una enzima llamada aromatasas (Chen *et al.* 1993), por lo que a este proceso de síntesis se le denomina aromatización (Akthar *et al.* 1997).

Durante la preñez los ovarios producen y secretan  $P_4$ , T y  $E_2$ , siendo el tejido esteroideogénico primario el cuerpo lúteo (CL). El CL funciona como un órgano endocrino a partir del cual algunas etapas de la preñez se mantienen (Niswender *et al.* 1994). La actividad endocrina del tejido lúteo, es regulada por el sistema nervioso central (Hillier 1994), así como por señales del embrión en desarrollo. En este proceso, llamado reconocimiento materno de la preñez (Wiltbank *et al.* 1992),

las hormonas que actúan difieren entre las especies, así como los mecanismos de acción a partir de los cuales se mantiene la función lútea (Niswender *et al.* 1994). La función endocrina del tejido lúteo durante la preñez ha sido analizada en roedores de laboratorio y se sabe que en roedores de los géneros *Mus* (Pedersen & Peters 1971) y *Rattus* (Nelson *et al.* 1992, Miyauchi & Midgley 1990, Gibori *et al.* 1982, Meyer & Bruce 1979) el CL permanece activo durante la primera mitad de este proceso. Sin embargo, esta información se desconoce en roedores silvestres por lo que hemos iniciado recientemente el estudio de la biología reproductiva de dos especies del género *Peromyscus* y en este trabajo se analiza, de manera preliminar, la función de los ovarios en el ratón de orejas oscuras, *Peromyscus melanotis*, en la primera mitad de la preñez.

## MATERIALES y MÉTODOS

### Material Biológico

Se recolectaron individuos de *P. melanotis* de mayo de 1997 a junio de 1998 en el Parque Nacional Cumbres del Ajusco, Distrito Federal (0.85 Km N, 3.5 Km W Ecuaniil, 3180 m; 19° 13' 37" N, 99° 15' 37" W). Su captura se hizo de manera selectiva con trampas Sherman (8 x 9 x 23 cm) cebadas con hojuelas de avena. El mismo día de la captura los ratones fueron trasladados al laboratorio en donde se les sacrificó por dislocación cervical y se registraron sus medidas convencionales (Kunz *et al.* 1996, Ramírez-Pulido *et al.* 1989). Durante la disección de los aparatos reproductores de las hembras, se constató si estaban preñadas o no. La edad aproximada de la preñez se determinó, de acuerdo con Layne (1968), a partir de la medición del engrosamiento del útero provocado por el embrión en desarrollo, así como por la medida céfalo-caudal de los fetos mayores de 12 días. La edad de la hembra se determinó de acuerdo con el desgaste de la superficie oclusal de los molares *sensu* Hoffmeister (1951).

### Reactivos y Disolventes

Todos los reactivos y disolventes orgánicos fueron de grado analítico y se obtuvieron de diferentes casas comerciales.

### Esteroides de Referencia

Para la nomenclatura de los esteroides se siguió a Kime (1995): 3 $\beta$ -hidroxi-5-pregнено-20-ona (pregnenolona, P<sub>5</sub>); 4-pregнено-3,20-diona (progesterona, P<sub>4</sub>); 17 $\alpha$ -hidroxi-4-pregнено-3,20-diona (17-hidroxiprogestero-na, 17P<sub>4</sub>); 4-androsteno-3,17-diona (androstendiona, A); 17 $\beta$ -hidroxi-4-androsteno-3-ona (testosterona, T) y 1,3,5(10)-estratrieno-3,17 $\beta$ -diol (estradiol, E<sub>2</sub>). Los esteroides se obtuvieron de

Steraloids® (Wilton, New Haven, USA) y se purificaron, previo uso, por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando secuencialmente benceno, benceno-acetato de etilo (7:3, v/v) y benceno-metanol (95:5, v/v).

### **Esteroides Radiactivos**

Se obtuvieron de New England Nuclear® (Boston, MS) P<sub>5</sub> (6,7-<sup>3</sup>H) (actividad específica -ae- 93 Ci/mmol); P<sub>4</sub> (1,2,6,7-<sup>3</sup>H) (ae 109 Ci/mmol); 17P<sub>4</sub> (1,2-<sup>3</sup>H) (ae 44 Ci/mmol); A (1,2,6,7-<sup>3</sup>H) (ae 84 Ci/mmol); T (1,2,6,7,16,17-<sup>3</sup>H) (ae 139 Ci/mmol) y E<sub>2</sub> (2,4,6,7,16,17-<sup>3</sup>H) (ae 140 Ci/mmol). Cada esteroide se purificó, previo uso, por CCF y se utilizaron los mismos sistemas cromatográficos mencionados en el apartado de esteroides de referencia.

### **Análisis Histológicos**

Se estudiaron 5 hembras preñadas: una juvenil (edad I) con una edad gestacional de 7 días; dos subadultas (edad II), una con 10 días y la otra con 11 días de gestación; una adulta joven (edad III), con 13-14 días de gestación y una adulta (edad IV) con una edad gestacional de 12 días. A cada una de estas hembras se les extirparon los ovarios, fijándose el órgano derecho en formol al 10% en solución amortiguadora de fosfatos para este estudio. Los otros ovarios se utilizaron para un análisis no reportado en este trabajo. Las gónadas se procesaron para ser incluidas en parafina. De cada una de ellas se obtuvieron cortes de 5-10 μm de grosor y se tiñeron con hematoxilina-eosina.

### **Inmunohistoquímica**

De los ovarios embebidos en parafina, utilizados para el análisis histológico, se obtuvieron cortes de 3 μm de grosor, los cuales se desparafinaron y clarificaron con xilol. La inmunolocalización de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> se realizó según Kurman *et al.* (1978). A cada corte se le agregó anticuerpo policlonal contra P<sub>4</sub> o contra E<sub>2</sub> (Biogenex®, USA) incubándose 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción cromogénica de inmunolocalización se realizó utilizando fucsina. Además, como parte de la técnica estándar y con el objeto de comprobar la actividad de los anticuerpos usados, así como para constatar que no hubiese reacción inmunohistoquímica inespecífica, se prepararon controles de manera paralela. Estos controles incluyeron secciones de ovarios de *Peromyscus* incubados sin el anticuerpo primario, así como secciones de ovarios de rata (Cepa Wistar) y ratón (Cepa CD1) en diferentes etapas del ciclo estral. Esto nos permitió cotejar la función positiva de los anticuerpos y asegurar que los resultados presentados en este trabajo constituyesen evidencia de inmunolocalización específica de cada hormona en los tejidos de los ovarios analizados.

### **Cuantificación de Esteroides Sexuales**

La extracción de los esteroides sexuales a ser analizados, se llevó a cabo a partir del par de ovarios de cuatro hembras preñadas: una juvenil con una edad gestacional de 8 días; dos subadultas, una con 9 días y la otra con 12 días de gestación, y una adulta con 11 días de gestación. Los ovarios extirpados se colocaron en tubos Eppendorf que contenían solución isotónica de Ringer y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. Cada par de órganos se homogeneizó por ultrasonido (Sonic Dismembrator-50, Fisher®), y se obtuvo una alícuota para determinar la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina de suero de bovino como estándar para la curva patrón. Otra alícuota del homogenizado se transfirió a tubos conteniendo  $\approx 1000$  cpm de cada uno de los esteroides tritizados utilizados como trazadores para valorar el porcentaje de recuperación.

Los esteroides totales se extrajeron dos veces con éter dietílico. La fase orgánica se separó de la acuosa, colocando cada tubo en hielo seco-acetona; al congelarse la fase acuosa, la orgánica se decantó a otro tubo y se evaporó a sequedad.

### **Separación de los Esteroides Sexuales**

A cada tubo con los esteroides totales se le agregó una disolución de éter:metanol (2:1, v/v) y el contenido se transfirió a placas de vidrio cubiertas con 0.25 mm de gel de sílice e indicador para absorción de radiación ultravioleta de 254 nm (Merck®). Se utilizó un par de carriles de cada cromatoplaque para la aplicación de los esteroides de referencia. Los esteroides de cada muestra fueron separados utilizando los sistemas cromatográficos mencionados en el apartado de esteroides de referencia. Las áreas que correspondían al esteroide de referencia, de acuerdo con la distancia de desplazamiento que recorre la muestra desde el punto de aplicación ( $R_f =$  running factor o factor de corrimiento), fueron separadas y resuspendidas en una disolución de éter:metanol (1:1, v/v). Una alícuota de esta disolución se transfirió a un vial para valorar el porcentaje de recuperación. El disolvente restante se evaporó en estufa ( $30^{\circ}\text{C}$ ) con vacío y en cada tubo correspondiente a  $P_5$ ,  $P_4$ ,  $17P_4$ , A, T y  $E_2$  se determinó por duplicado su contenido por medio de técnicas radioinmunoanalíticas (RIA) descritas por Mendieta *et al.* (1991).

### **Radioinmunoanálisis (RIA)**

A cada tubo con el esteroide a evaluar se le agregó solución amortiguadora de fosfatos (0.25 M pH 7.0 con azida de sodio y gelatina 1%) con el correspondiente antisuero generado en conejo, a diluciones previamente calculadas (Bermúdez *et al.* 1975), y el estándar apropiado ( $\approx 5000$  cpm), incubándose la mezcla por 18 hrs

a 4°C. Al término de la incubación, el esteroide libre se separó del unido, agregando a cada tubo 200 µl de una mezcla de carbón-dextrán. Cada tubo se centrifugó a 1500 x g x 15 min a 4°C, decantándose el sobrenadante a un vial al que se le agregó Instagel (Packard®). El contenido de radiactividad se midió en un espectrómetro de centelleo líquido (Beckman®, LS-7000) con una eficiencia máxima para tritio del 53%. El control de calidad de cada RIA fue realizado de acuerdo a especificaciones internacionales de exactitud, precisión y sensibilidad (Cekan 1976). Las concentraciones de los esteroides se expresaron como log (pg/mg de proteína).

### **Análisis Estadísticos**

Dado que los valores de concentración de los ES mostraron heteroscedasticidad, se decidió utilizar una transformación logarítmica que mostró varianzas más homogéneas (Salgado-Ugarte 1992) y todos los análisis estadísticos posteriores se llevaron al cabo con los datos transformados.

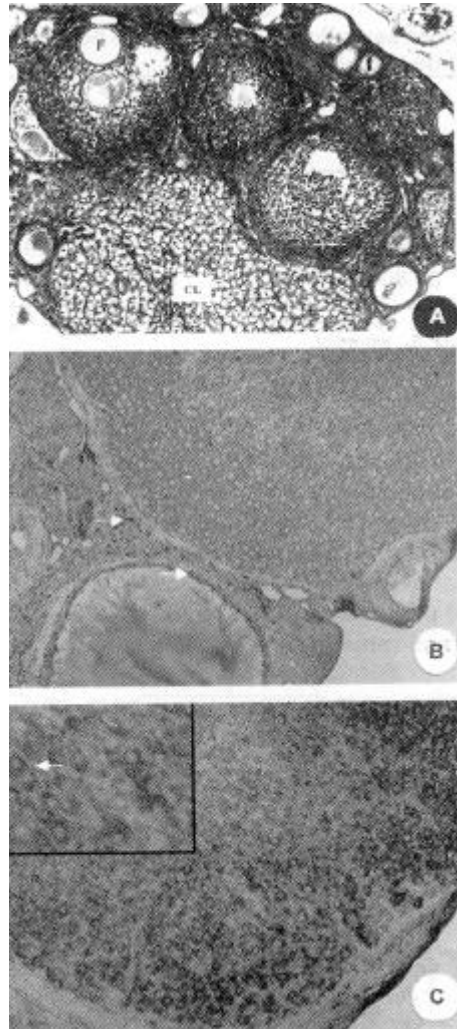
Para analizar la relación entre la edad de gestación y el contenido de ES, se utilizó un análisis de covarianza (ANCOVA), en donde los diferentes ES fueron los tratamientos y la edad de gestación la variable covariada. Posteriormente, para investigar la significancia de las diferencias entre las concentraciones de ES por edad gestacional, se realizaron comparaciones múltiples de Bonferroni. Además, para determinar el patrón de la concentración de cada esteroide con la edad, se hicieron regresiones para cada uno de los ES cuantificados (Winer *et al.* 1991).

Con el objeto de integrar el patrón general de concentración de los ES analizados durante la primera mitad de la preñez, los datos de todas las hembras gestantes fueron agrupados por esteroide. Para facilitar la visualización de la dispersión de los datos, los resultados se presentan por medio de diagramas de caja (Hoaglin *et al.* 1983, Salgado-Ugarte 1992). Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico StataCorp (2001).

## **RESULTADOS**

### **Histología e Inmunohistoquímica**

Se observaron folículos en diferentes etapas de desarrollo en cada uno de los ovarios de las cinco hembras analizadas durante la primera mitad de la gestación. Asimismo, todos los ovarios presentaron cuerpos lúteos con actividad secretora (Fig. 1A) conformados por células granuloso-luteínicas, las cuales constituyen el epitelio glandular (Fig. 1C). La reacción inmune contra E<sub>2</sub> se presentó en el estroma y con mayor intensidad en la región folicular (Fig. 1B), mientras que la reacción inmunológica contra la P<sub>4</sub> fue mayor en el tejido lúteo (Fig. 1C).



**Figura 1**

Microfotografía de un corte de ovario de una hembra adulta joven (edad III) de *Peromyscus melanotis* en la primera mitad de la preñez. En A se aprecian folículos en diferentes etapas de desarrollo: primarios (f) y antrales (F), así como un gran cuerpo lúteo (CL) con actividad secretora (4 x; hematoxilina-eosina). En B se muestra la inmunoreactividad al E2 tanto en el estroma (flecha superior) como en las células foliculares (flecha inferior) (10 x). En C se observa la inmunolocalización de la P<sub>4</sub> sobre todo en el tejido lúteo y en el recuadro (40 x) se muestra la inmunoreactividad a la progesterona sobre células granuloso-lúteínicas (flecha).

Concentración de esteroides sexuales en los ovarios de hembras de *Peromyscus melanotis* durante la primera mitad de la preñez.

edad de la gestación* (días)	ESTEROIDES SEXUALES (pg/mg de proteína)					
	P <sub>5</sub>	P <sub>4</sub>	17P <sub>4</sub>	A	T	E <sub>2</sub>
8	99.00	557.30	6.80	4.03	23.90	14.90
9	96.20	535.25	6.35	3.68	23.10	14.05
11	90.60	491.15	5.45	2.98	21.50	12.35
12	87.80	469.10	5.00	2.63	20.70	11.50

\* Estimada según Layne (1968). P<sub>5</sub>, pregnenolona; P<sub>4</sub>, progesterona; 17P<sub>4</sub>, 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona; A, androstendiona; T, testosterona; E<sub>2</sub>, estradiol.

### RIA

En el cuadro 1 se muestran las concentraciones originales de los seis ES analizados, de acuerdo con la edad de gestación de las hembras y se pueden observar dos claras tendencias generales en la información. La primera es que existe una disminución progresiva de la concentración de cada esteroide conforme avanza la edad de gestación (columnas). La segunda es que la concentración de P<sub>4</sub> supera por mucho la de cualquier otro esteroide en todas las hembras, independientemente de la edad de gestación (filas). Ambas tendencias fueron corroboradas por los resultados de los análisis estadísticos (Figs. 2 y 3).

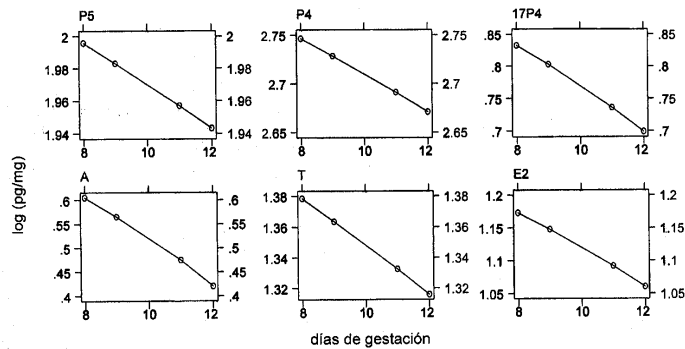


Figura 2

Análisis por regresión lineal de los logaritmos de las concentraciones [log (pg/mg de proteína)] de esteroides sexuales en los ovarios de hembras de *Peromyscus melanotis* en su primera mitad de la preñez. P<sub>5</sub>, pregnenolona; P<sub>4</sub>, progesterona; 17P<sub>4</sub>, 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona; A, androstendiona; T, testosterona; E<sub>2</sub>, estradiol.



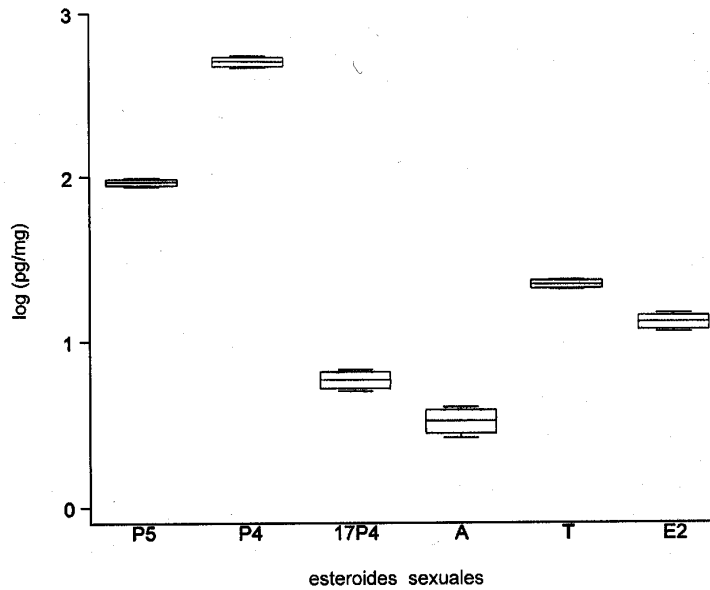


Figura 3

Logaritmos de las concentraciones [log (pg/mg de proteína)] de esteroides sexuales en los ovarios de hembras de *Peromyscus melanotis* en su primera mitad de la preñez, tomadas como un solo grupo. P<sub>5</sub>, pregnenolona; P<sub>4</sub>, progesterona; 17P<sub>4</sub>, 17 $\alpha$ -hidroxi-progesterona; A, androstendiona; T, testosterona; E<sub>2</sub>, estradiol. En los diagramas de caja, de abajo hacia arriba, las líneas verticales indican el valor mínimo y máximo; los límites de las cajas corresponden al percentil 25 y 75; la línea en el interior de la caja es el valor de la mediana.

En el primer caso, el ANCOVA demostró diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de cada esteroide, de acuerdo con la edad de gestación de las hembras ( $F_{5,17} = 5577.00$ ,  $P < 0.001$ ); asimismo, el comportamiento de los datos presentó una relación lineal altamente significativa ( $F_{1,17} = 84.56$ ,  $P < 0.001$ ), en la que conforme la preñez avanza, los ES disminuyen. Además, en las regresiones (Fig. 2) se encontraron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las medias de cada ES por edad de gestación; en estos análisis, todos los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) fueron cercanos a uno y la pendiente fue negativa.

En el segundo caso, dado que las concentraciones relativas entre los diferentes ES presentaron la misma tendencia en las cuatro hembras con diferentes edades de gestación (filas en el Cuadro1), se agruparon los datos para explorar el patrón general en la primera mitad de la preñez de *Peromyscus melanotis*. En la figura 3, como en el cuadro 1, se puede apreciar que la concentración de la P<sub>4</sub> supera cuatro veces más la suma de las concentraciones de todos los ES restantes. A las concentraciones de esta progestina, le siguieron en orden descendente las de P<sub>5</sub>, T, E<sub>2</sub>, 17P<sub>4</sub>, y A, respectivamente. Con base en las pruebas *a posteriori* de Bonferroni, se determinó que la concentración de P<sub>4</sub> superó significativamente la de P<sub>5</sub> (P < 0.001); asimismo, la concentración de T fue mayor que las de 17P<sub>4</sub>, A y de E<sub>2</sub> (P < 0.001).

## DISCUSIÓN

El análisis histológico de los ovarios de las hembras preñadas de *P. melanotis* permitió observar folículos en diferentes etapas de crecimiento, lo cual coincide con lo citado para roedores de laboratorio como *Mus*, género en el que hay un desarrollo folicular no cíclico durante la primera mitad de la preñez (Pedersen & Peters 1971), así como cuerpos lúteos (CL) con características secretoras.

Los CL de los ovarios de las hembras preñadas de *P. melanotis* pudieron formarse a partir de los folículos del último ciclo estral o incluso formarse durante la preñez, como lo demuestran Pedersen y Peters (1971) en el ratón albino. La presencia de actividad secretora de los CL de las hembras preñadas en *P. melanotis* fue evidente y muy similar a lo reportado en los tejidos lúteos de hembras preñadas de ratones de laboratorio (Pedersen & Peters 1971).

En *Mus musculus*, la vida media de un CL es de 12 días, tiempo en el que comienza su luteólisis (Pedersen & Peters 1971). En cambio, en *Rattus rattus* el CL es funcional en la producción de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> (Sridaran 1986) hasta la primera mitad de la preñez (Miyachi & Midgley 1990, Gibori *et al.* 1982, Gibori *et al.* 1977), coincidiendo la luteólisis con el conspicuo decremento de P<sub>4</sub> en el suero de hembras de 18 días de preñez (Morishige *et al.* 1973, Pepe & Rothchild 1972). En función de la edad aproximada de la gestación de las hembras estudiadas de *P. melanotis*, que fue de 7 a 14 días, así como de la comprobación de las características secretoras de los CL y de acuerdo a la inmunolocalización preferente de P<sub>4</sub> en este tejido, nuestros resultados apoyan que los CL de los ovarios de *P. melanotis* son, en efecto, funcionales durante la primera mitad de gestación.

La actividad secretora de los CL durante la primera mitad de la preñez en *P. melanotis* podría deberse a la actividad de una luteotropina secretada por la

decidua y el trofoblasto. Lo anterior se ha demostrado en la rata albina (Niswender & Nett 1988, Gibori *et al.* 1988), si bien no existen datos en otros roedores de laboratorio, y menos todavía en especies silvestres.

La biosíntesis de las hormonas esteroides se lleva a cabo por vías metabólicas bien establecidas (Makin 1975), iniciándose con la biotransformación del colesterol en  $P_5$ , que es el esteroide a partir del cual se lleva a cabo la producción de progestinas, como la  $P_4$ ; y posteriormente la de los andrógenos (A y T) y la de los estrógenos ( $E_1$  y  $E_2$ ). A su vez, la síntesis de T puede seguir dos rutas metabólicas alternas: la vía de los intermediarios  $\Delta 5$  y la vía de los intermediarios  $\Delta 4$ . La prevalencia de una vía sobre la otra varía en cada especie; por ejemplo, en el caso de ratones y ratas de laboratorio la ruta prevaleciente es la  $\Delta 4$ , mientras que en humanos, cerdos, conejos y perros es la  $\Delta 5$  (Henricks 1991). La importancia relativa de los intermediarios  $\Delta 4$  y  $\Delta 5$ , depende de la actividad de la enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD), la cual es considerada como un marcador característico de los tejidos esteroidogénicos (Lippset 1986).

Los resultados de la cuantificación de los ES presentados en este trabajo permitieron constatar que en los ovarios de hembras de *P. melanotis* se encuentran concentraciones detectables de  $P_5$  y de los esteroides intermediarios que conforman la vía  $\Delta 4$  ( $P_4$ ,  $17P_4$  y A), durante la primera mitad de la gestación. De acuerdo con esto, la esteroidogénesis en *P. melanotis* parecería comportarse de manera semejante a la del ratón y la rata de laboratorio. Sin embargo, para confirmar esto, estamos estudiando la biotransformación del precursor colesterol para definir claramente la ruta esteroidogénica preferente.

La producción de  $P_4$  en ratas de laboratorio es muy evidente en la primera mitad de la preñez. Meyer y Bruce (1979) constataron que entre los días 10 a 16 de la preñez, la concentración de  $P_4$  en suero tiene un incremento dramático, al igual que el peso de los CL. Esta información concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, en donde el esteroide de mayor concentración en los ovarios de hembras preñadas de *P. melanotis* fue la  $P_4$ , lo que parece reflejarse en las concentraciones plasmáticas de esta progestina, que alcanzan un valor aproximado de 700 pg/ml (datos no publicados). Estos hechos, aunados a que la inmunolocalización de  $P_4$  fue preferente en los CL, sugieren que, durante la primera mitad de la preñez, la producción de esta hormona esteroide en los ovarios de *P. melanotis* proviene principalmente del tejido lúteo.

Por otra parte, la baja concentración de  $E_2$  con respecto a las de  $P_4$  y T en los ovarios de las hembras preñadas de *P. melanotis*, coincide con lo reportado en *Rattus* (Braden *et al.* 1994 Bogovich & Richards 1982, Richards & Kersey 1979), en donde la actividad de aromatización es baja. Este fenómeno se presenta normalmente en la fase lútea del ciclo estral.

Durante la primera mitad de la preñez, la  $P_4$  actúa tanto en la implantación como en el desarrollo embrionario, por lo que el principal tejido productor de esta hormona es el CL. Sin embargo, conforme avanza la gestación, y por acción del  $E_2$ , la función del CL inicia su involución (Gibori *et al.* 1977 Gibori & Keyes 1978); repercutiendo en la producción de  $P_4$  (Morishige *et al.* 1973). Al haberse determinado que los contenidos de todos los ES, y en particular de la  $P_4$ , disminuyeron con la edad de la gestación, se demuestra que la función endocrina (esteroidogénica) del CL de *P. melanotis* decrece conforme avanza la primera mitad de la preñez. Sería interesante establecer si el estradiol actúa como un factor luteolítico en esta especie.

Los resultados de este trabajo permiten constatar que, durante la primera mitad de la preñez, hay desarrollo folicular en los ovarios de *P. melanotis*, que los CL presentan actividad secretora y que existen concentraciones detectables de  $P_5$ ,  $\Delta 4$  intermediarios ( $P_4$ ,  $17P_4$ , A), T y  $E_2$ , siendo la  $P_4$  la hormona de mayor concentración. Asimismo, la inmunolocalización de  $E_2$  es evidente tanto en el estroma como en el tejido folicular, mientras que la de  $P_4$  es muy evidente en los CL y residual en el estroma. A la luz de estos resultados se concluye que, durante la primera mitad de la preñez, los ovarios de *P. melanotis* mantienen la foliculogénesis y que el CL es el principal, pero no el único, tejido esteroidogénico.

#### AGRADECIMIENTOS

Nuestro reconocimiento a Juan Patiño Rodríguez, por su valiosa colaboración tanto en el trabajo de campo como de gabinete. Al Sr. Pedro Medina Granados por su asistencia en el procesamiento de las muestras para histología e inmunohistoquímica. Al Dr. Héctor F. Serrano y a la Dra. Carolina Valdespino, así como a los dos revisores anónimos, nuestro reconocimiento por sus valiosos comentarios y sugerencias para este trabajo. Al Dr. José Arturo Bermúdez, ex-jefe del Laboratorio de Andrología del Hospital "Luis Castelazo Ayala" del IMSS, quien gentilmente nos facilitó los antisueros por él generados. Este trabajo forma 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." CBS, UAMI No.144.03.07 (ASM) y fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT No. 400200-5R29117N, JRP). Los resultados de este trabajo forman parte del convenio Interinstitucional entre el Departamento de Biología de la Reproducción de la UAMI (ASM) y la Coordinación de Investigación del IMSS (JHM).

#### LITERATURA CITADA

Akthar, M., P. Lee-Robichaud, M. E. Akthar & J. N. Wright. 1997. The impact of aromatase mechanism on other P450s. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 61:127-132.

- Bermúdez, J. A., V. Coronado, A. Mijares, C. León, A. Velazquez, P. Noble & J. L. Mateos.** 1975. Stereochemical approach to increase the specificity of steroid antibodies. *J. Steroid Biochem.* 6:283-290.
- Bogovich, K. & J. S. Richards.** 1982. Androgen biosynthesis in developing ovarian follicles: evidence that luteinizing hormone regulates thecal 17 $\alpha$ -hydroxylase and C17-20 lyase activities. *Endocrinology* 111:1201-1208.
- Braden, S. G. H., C. J. Belfiore & G. D. Niswender.** 1994. Hormonal control of luteal function. Pp 259-287 *In: J. K. Findlay (ed). Molecular Biology of the Female Reproductive System.* Academic Press Inc. San Diego, CA. USA.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Bronson, F. H.** 1989. *Mammalian reproductive biology.* The University of Chicago Press, Chicago, IL USA. . 325 pp.
- Cekan, S. Z.** 1976. Reability of steroid radioimmunoassays. Pp. 1-48 *In: Acta Universitatis Upsaliensis.* No. 14. Swedish Medical Research Council Reproductive Endocrinology Research Unit, Stockholm. Uppsala, Sweden.
- Chen, S., D. Zhou, K. M. Swiderek, N. Kadohama, Y. Osawa & F. P. Hall.** 1993. Structure-function studies of aromatase. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 44:347-356.
- Damaur, R. & R. V. Short.** 1973. Some aspects of luteotropic control of ovine corpus luteum. Pp. 441-446 *In: S. J. Segal, R. Crozier, P. A. Corfman & P. G. Londliffe (eds). The Regulation of Mammalian Reproduction.* Charles C. Thomas Publisher, Springfield, IL.
- Finn, C. A. & J. E. Booth.** 1977. The physiological effects of estrogens and progesterone. Pp. 151-225 *In: Z. & B. J. Weir (eds). Regulation of Oogenesis and Steroidogenesis.* Second edition. Academic Press, New York, NY. USA.
- Freeman, M. E.** 1994. The neuro-endocrine control of the ovarian cycle of the rat. Pp. 613-658 *In: E. Knobil & J. D. Nelly (eds). The Physiology of Reproduction. Second edition.* Raven Press, Ltd., New York, NY. USA.
- Gibori, G., E. Antczak, & I. Rothchild.** 1977. The role of estrogen in the regulation of luteal progesterone secretion in the rat after day 12 of pregnancy. *Endocrinology* 100:1483-1495.
- Gibori, G. & P. L. Keyes.** 1978. Role of intraluteal estrogen in the regulation of the corpus luteum during pregnancy. *Endocrinology* 102:1176-1182.
- Gibori, G., I. Khan, M. L. Warshaw, M. P. Mclean, T. K. Puryer, S. Nelson, T. J. Durkee, S. Azhar, A. Steinschneider & M. C. Rao.** 1988. Placental-derived regulators and the complex control of luteal cell function. *Recent. Prog. Horm. Res.* 44:377-425.
- Gibori, G., R. Sridaran & R. Basuray.** 1982. Control of aromatase activity in luteal and ovarian nonluteal tissue of pregnant rats. *Endocrinology* 111:781-788.
- Gorbman, A., W. W. Dickhoff, S. R. Vigna, N. B. Clark & Ch. L. Ralph (eds).** 1983. Endocrine control of sexual reproduction. Chap 13. Pp. 451-516 *In: Comparative Endocrinology.* Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, Inc. New York, NY. USA.

- Henricks, D. M.** 1991. Biochemistry and physiology of the gonadal hormones. Chp 3. Pp. 81-118 *In: P. T. Cupps (ed.) Reproduction in domestic animals.* Academic Press Inc., San Diego, CA. USA.
- Hillier, S. G.** 1994. Hormonal control of folliculogenesis and luteinization. Pp. 1-37 *In: J. K. Findlay (ed.) Molecular Biology of the Female Reproductive System.* Academic Press Inc. San Diego, CA. USA.
- Hoaglin, D.C., F. Mosteller & J.W. Tukey.** 1983. Understanding Robust and Exploratory Data Analysis. John Willey & Sons, Nueva York, USA 447 pp.
- Hoffmeister, D. F.** 1951. A taxonomic and evolutionary study of the pinon mouse, *Peromyscus truei*. *Illinois Biol. Monogr.* 21:IX+ 1-104.
- Kime, D. E.** 1995. Steroid nomenclature. *Gen. Comp. Endocrinol.* 98: 119-120.
- Kunz, T. H., C. Wemmer & V. Hayssen.** 1996. Sex, Age, and Reproduction. Pp. 279-290 *In: D. E. Wilson, F. R. Cole, J.D. Nichols, R. Pudran & M. S. Foster (eds). Measuring and Monitoring Biological Diversity: Estandar Methods for Mammals.* Smithsonian Institution Press, Washington & London.
- Kurman, R. J., D. Andrade, U. Goebelsmann & C. R. Taylor.** 1978. An immunohistological study of steroid localization in Sertoli-Leydig tumors of the ovary and testis. *Cancer* 42:1772-1783.
- Layne, J. N.** 1968. Ontogeny. Pp. 148-253 *In: J. A. King (ed). Biology of Peromyscus (Rodentia).* Amer. Soc. Mamma., Spec. Publ., 2:XIII+ 593.
- Lipsett, M. B.** 1986. Steroid hormones. Pp. 140-153 *In: S. S. C. Yen and R. Jaffe (eds). Reproductive Endocrinology.* W. B. Saunders, Philadelphia, USA.
- Madjerek, Z. S.** 1972. A new bioassay of progesterone activity. *Acta Morphol., Neerl.-Scand.* 10:259-268.
- Makin, H. L.** 1975. *Biochemistry of steroid hormones.* Blackwell, Oxford, UK. 728 pp.
- Mendieta, E., A. Salame, J. Herrera & F. Anton-Tay.** 1991. Melatonin inhibition of androgen biosynthetic pathway in Leydig cell-enriched cell fractions from normal adult rat. *Mol Androl.* 3:319-329.
- Meyer, G. T. & N. W. Bruce.** 1979. The cellular pattern of corpus luteal growth during pregnancy in the rat. *Anat. Rec.* 193:823-830.
- Miyauchi, F. & A. R. Midgley, Jr.** 1990. Morphologically and functionally distinct subpopulations of steroidogenic cells in corpora lutea during pregnancy in rats. *Endocrinol. Jpn.* 37:649-663.
- Morishige, W. K., G. J. Pepe & I. Rothchild.** 1973. Serum luteinizing hormone, prolactin and progesterone levels during pregnancy in the rat. *Endocrinology* 92:1527-1530.
- Nelson, S. E., M. P. Mclean, P. K. Jayatilak & G. Gibori.** 1992. Isolation, characterization, and culture of cell subpopulations forming the pregnant rat corpus luteum. *Endocrinology* 130:954-966.
- Niswender, G. D., J. L. Juengel, W. J. McGuire & M. C. Wiltbank.** 1994. Luteal function: The estrous cycle and early pregnancy. *Biol. Reprod.* 50:239-247.
- Niswender, G. D. & T. M. Nett.** 1988. The corpus luteum and its control. Pp 489-526 *In: E. Knobil & J. D. Neil (eds). The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York, NY. USA.

- O'Grady, J. E. & S. C. Bell.** 1977. The role of the endometrium in blastocyst implantation. Pp. 165-243 In: M. H. Jonson (ed). *Development in Mammals*. Elsevier/North-Holland Inc., New York, NY. USA.
- Pedersen, T. & H. Peters.** 1971. Follicle growth and cell dynamics in the mouse ovary during pregnancy. *Fertil. Steril.* 22:42-52.
- Pepe, G. & I. Rothchild.** 1972. The effect of hypophysectomy on day 12 of pregnancy on serum progesterone level and time of parturition in the rat. *Endocrinology* 91:1380-1385.
- Peters, H., A. G. Byskov, R. Himelstein-Braw & M. Faber.** 1975. Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J. Reprod. Fertil.* 45:559-566.
- Ramírez-Pulido, J., I. Lira, S. Gaona, C. Müdespacher & A. Castro.** 1989. *Manejo y mantenimiento de colecciones mastozoológicas*. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. 127 pp.
- Richards, J. S. & K. A. Kersey.** 1979. Changes in theca and granulosa cell function in antral follicles developing during pregnancy in the rat: Gonadotropin receptors, cyclic AMP and estradiol-17 $\beta$ . *Biol. Reprod.* 21:1185-1201.
- Salgado-Ugarte, H. I.** 1992. *El análisis exploratorio de datos biológicos: fundamentos y aplicaciones*. FES-Zaragoza, U.N.A.M. Marc Ediciones. México. 223 pp.
- Sridaran, R.** 1986. Ovarian steroid production in rats treated with gonadotropin-releasing hormone during early pregnancy. *J. Steroid. Biochem.* 26:1-7.
- StataCorp.** 2001. *Stata Statistical Software: Release 7*. College Station, TX, USA.
- Surani, M. A. H.** 1977. Cellular and molecular approaches to blastocyst uterine interactions at implantation. Pp. 245-305 In: M. H. Jonson (ed). *Development in Mammals*. Elsevier/North-Holland Inc., New York, NY. USA.
- van Tienhoven, A.** 1983. *Reproductive physiology of vertebrates*. Second edition. Cornell University Press, N.Y. USA. 491 pp.
- Wiltbank, M. C., G. J. Wiepz, J. J., Knickerbocker, T. D., Braden, H. R., Sawyer, M. H., Mayan & G. D. Niswender.** 1992. Cellular regulation of corpus luteum function during maternal recognition of pregnancy. *Reprod. Fert. Dev.* 4:341-347.
- Winer, B.J., D.R. Brown y K.M. Michels.** 1991. *Statistical principles in experimental design*. 3d ed. McGraw-Hill, N.Y. USA. 928 pp.
- Wu, J. T.** 1972. Effect of progesterone on rat blastocyst viability during prolonged delay in implantation. *Endocrinology* 91:1386-1388.

Recibido: 11 de marzo 2001

Aceptado: 31 de julio 2002