



UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA IZTAPALAPA

CBS

225411

ULTRAESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE
EPIDIDIMARIO DEL ZACATUCHE
(Romerolagus diazi)

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA
DE LA REPRODUCCION ANIMAL
P R E S E N T A
M. V. Z. RICARDO RAMIREZ MORALES

TUTOR
M. C. JOSE LUIS CONTRERAS MONTIEL

MEXICO, D. F.,

JUNIO DE 1997

TESTIMONIO DE GRATITUD.

Parece un tópico dar siempre las gracias a alguien en las tesis pero, créanme... hay personas que realmente se lo merecen, y aunque la mención de todos los que ayudaron a preparar esta tesis, por ser tantos, resulta imposible, no obstante, agradezco en primer lugar a mi alma mater la Universidad Autónoma Metropolitana por razones más que obvias.

De manera muy especial, deseo manifestar mi profundo agradecimiento al maestro José Luis Contreras por todo el apoyo, la paciencia y amistad surgidos de este proyecto. Igualmente deseo expresar mi agradecimiento al maestro Hector Serrano por su inapreciable ayuda. Me complace incluir una nota especial de gratitud a mi némesis, el doctor Adolfo Rosado cuyas agudas y punitivas observaciones durante mi estancia en esta universidad enriquecieron en buena medida mi formación profesional.

Asimismo mi reconocimiento al doctor Horacio Merchán por su colaboración y desde luego a mis maestros por compartir sus conocimientos.

Hago extensivo mi reconocimiento a mi familia por su sempiterno apoyo, al doctor Rodolfo Morales por ser constante ejemplo de trabajo y honestidad, también agradezco a mis muy valiosos amigos por compartir tantos años de su vida conmigo, sobre todo a Luis Fernando por que me ha demostrado que no se necesita tener la misma sangre para saber que se tiene un hermano y finalmente a Valentina... porque el amor es eterno, independientemente de lo que dure y porque todo lo hizo significativo.

Att.

RICARDO

INDICE	Página.
I. INTRODUCCIÓN.	1
1.1 Generalidades sobre el zacatuche.	4
1.2 Morfología del aparato reproductor del macho en mamíferos.	7
1.2.1 Testículo.	7
1.2.2 Epididimo.	13
1.2.3 Glándulas accesorias.	13
1.2.4 Pene.	17
1.3 Espermatozoide.	17
1.3.1 Cabeza.	17
1.3.2 Flagelo.	19
1.4 Maduración epididimaria del espermatozoide.	22
1.5 Capacitación del espermatozoide.	23
1.6 Importancia de la morfología del espermatozoide	24
II. HIPÓTESIS.	26
III. OBJETIVOS.	26
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.	27
V. RESULTADOS.	30
VI. DISCUSIÓN.	45
VII. BIBLIOGRAFÍA.	48

Este trabajo se llevo a cabo con el apoyo de CONACyT a través del convenio específico No. 4002000-5-3211N y la beca No. 88110 otorgada al autor de la tesis.

También se contó con el permiso de captura expedido por el Instituto Nacional de Ecología No. DOO 750.- 2618/97.

1. INTRODUCCIÓN.

Una de las preocupaciones actuales de la sociedad es la conservación de la biodiversidad, ya que ella representa el resultado de millones de años de evolución y en ella están contenidas las variaciones exitosas de este proceso y de las cuales puede depender en gran medida el futuro de la humanidad.

México, es considerado a nivel mundial como uno de los países con mayor diversidad biológica, en virtud de que se han reportado más de 20 000 especies de plantas vasculares, 280 especies de anfibios, 700 especies de reptiles, 500 especies de mamíferos y 1000 especies de aves (Galindo-Leal 1993). De todas estas especies el porcentaje de endemismo es sumamente alto por lo que la responsabilidad de nuestro país en su conservación es enorme. Sin embargo, en el territorio nacional se han identificado varias actividades de la sociedad que van en detrimento de la conservación de los recursos naturales como lo son: 1) Actividad ganadera fuera de control. 2) Crecimiento incontrolado de la actividad agrícola. 3) Intensa deforestación. 4) Explotación desmesurada de los recursos naturales y 5) Los efectos de la lluvia ácida generada por los grandes centros urbanos. (Toledo 1988, Myers 1988). Lo que incide directamente en la conservación de especies nativas de plantas y animales y su diversidad.

Entre las especies endémicas, los conejos y liebres silvestres de México tienen gran importancia ecológica porque forman parte de las redes alimentarias de los ecosistemas mexicanos. Ya que además de los roedores, se constituyen como el alimento de la mayor parte de las poblaciones de depredadores del tipo serpientes, aves rapaces diurnas y nocturnas y mamíferos carnívoros como cánidos, prociénidos, mustélidos y felidos en cualquier tipo de hábitat. Por otro lado, la dieta de los lagomorfos incluye grandes cantidades de partes vegetativas y reproductivas de pastos, hierbas, arbustos y hasta árboles lo cual trae como consecuencia un proceso de regulación de poblaciones de especies vegetales, tanto en el aspecto florístico como estructural. (Velázquez, y cols. 1996)

Algunas de estas especies mexicanas de lagomorfos tienen asignado el status de especies comunes regionalmente (Angermann 1990); sin embargo aún así, varias de estas especies están siendo mermadas de manera considerable. Las principales amenazas contra las poblaciones de los lagomorfos mexicanos son la desaparición de su hábitat y la cacería furtiva. La falta de planeación y el abuso en el manejo de los ecosistemas han propiciado que la tala inmoderada, los incendios, el pastoreo y la apertura continua de más áreas de cultivo hayan eliminado o cambiado directa o indirectamente las características de los hábitats adecuados para el ciclo de vida de los conejos y liebres.

En la conservación y manejo de lagomorfos se considera fundamental la preservación del hábitat, programas de introducción y regulación de poblaciones, y medidas de protección (Chapman y Flux 1990). En foros internacionales se ha coincidido en que cinco géneros de lagomorfos en el mundo tienen poblaciones tan pequeñas o hábitats tan restringidos, que se recomienda su protección completa. Para México se incluyen en este grupo al conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*), al conejo de las islas Marias (*Sylvilagus graysoni*), al conejo Omiltemi (*Sylvilagus insomus*) y a la liebre tropical (*Lepus flavigularis*). La conservación de estas especies, requiere el establecimiento de reservas naturales que protejan a sus poblaciones y a sus hábitats. Desafortunadamente, en México son escasos los esfuerzos de investigación y protección sobre los conejos y liebres silvestres (Velázquez y cols. 1996).

En nuestro país se encuentran 14 especies de leporídeos, que representan el 54% de las existentes en el continente americano y el 27 % de todas las que habitan el planeta, lo que convierte a México en el país con el mayor número en especies de leporídeos en América y el segundo a nivel mundial; sólo China tiene mayor número de especies de lagomorfos, según datos de la asociación mexicana para la conservación y el estudio de los lagomorfos (AMCELA 1996).

En el territorio nacional se encuentran nueve especies de conejo, ocho del género *Sylvilagus* y una sola del género *Romerolagus*; cinco especies de liebres representantes del género *Lepus*, constituyéndose los lagomorfos como el quinto orden de mamíferos con mayor número de especies en México. (Tabla 1)

De las nueve especies de conejo que habitan en el país, ocho son exclusivas de México, por lo que representa el orden con mayor porcentaje de endemismo (57%) que cualquier otro grupo de mamíferos mexicanos. Además seis de estas especies se localizan en áreas restringidas debido a la expansión de la mancha urbana, la tala inmoderada, construcción de autopistas, etc. (Fig 1).

En la actualidad diferentes entidades públicas y privadas realizan actividades tendientes a proteger al *Romerolagus diazi*. Algunas de ellas están orientadas principalmente a proteger su hábitat en forma de reserva. Otras a crear espacios cercados en donde propiciar su reproducción natural y constituir colonias que, además de facilitar su estudio, lleguen a producir ejemplares que se utilicen para su introducción en lugares destinados a su permanencia silvestre. Pero ninguna, a excepción de nuestro grupo en la Universidad Autónoma Metropolitana se ocupa de la utilización de las técnicas de manejo reproductivo como una opción que auxilie en su preservación.

El propósito de esta tesis es contribuir al conocimiento de aspectos biológicos de la reproducción del *Romerolagus diazi* o zacatuche, particularmente sobre las características ultraestructurales de su espermatozoide.

Consideramos que un aspecto complementario en la conservación de las especies de mamíferos silvestres y particularmente del zacatuche, es la aplicación de la metodología que actualmente se utiliza en el manejo reproductivo de las especies domésticas; sin embargo, para ello se requiere el conocimiento de los aspectos biológicos de su reproducción, particularmente de las características de sus gametas, incluyendo las características ultraestructurales del espermatozoide que son indicativas de su integridad funcional después de ser sometido a procesos de manejo para la inseminación artificial y la crioconservación.

El enfoque particular sobre el espermatozoide se debe a que al ser éste un elemento determinante de la reproducción de los mamíferos que en el manejo reproductivo actual de las especies domésticas es susceptible de ser conservado por medio de técnicas de criogenia para usarse posteriormente en la inseminación artificial, ha hecho concebir la idea sobre la posibilidad de que la información que derive de este trabajo ampliará las posibilidades de que, en el futuro, se puedan aplicar dichas técnicas de manejo reproductivo en provecho de la conservación de esta especie considerada en peligro de extinción.

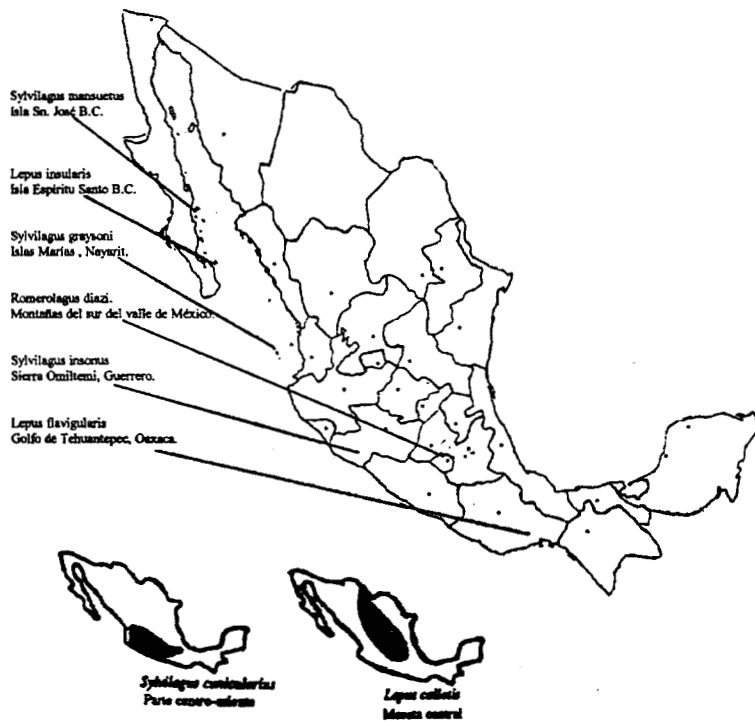


Fig. 1 DISTRIBUCIÓN DE LAS ESPECIES DE CONEJOS Y LIEBRES EN MÉXICO.

Fig. 1 Distribución de las especies de conejos y liebres de México.

1.1 GENERALIDADES SOBRE EL ZACATUCHE.

El *Romerolagus diazi* es una especie endémica de México, exclusiva del Eje o Cordillera Volcánica Transversal, parte de esta cordillera volcánica rodea al Valle de México, los principales volcanes donde se localiza esta especie son el Popocatepetl, Iztaccihuatl, Chichinautzin, Tlaloc y Ajusco en altitudes que van desde los 2650 hasta 4240 msnm. (Romero., Velázquez. 1994) (Fig 2).

El conejo *Romerolagus diazi* es una especie asignada a un género monotípico y considerada primitiva. Por sus características óseas (tiene articulados la clavícula y el esternón), se la ha considerada cercana a los pikas (Ochotona). Su apariencia física lo identifica con cualquier otro conejo, sin embargo, sus atributos cromosómicos (48 cromosomas) y reproductivos lo relacionan más con el género *Lepus* que con el género *Sylvilagus* (Cervantes y cols. 1990, Velázquez y cols 1993). Es el lagomorfo de menor talla de nuestro país y se caracteriza por su color pardo oscuro homogéneo, sus pequeñas orejas redondas, patas cortas y cola no visible. Habita exclusivamente en las altas montañas del sur y sureste del valle de México, en bosques abiertos de pino con densas coberturas de gramíneas amacolladas.

El zacatuche, cuya identificación científica es *Romerolagus diazi*, Ferrari Pérez 1893, también es conocido popularmente como zacatuche, teporingo, conejo de los volcanes, tepolito o burrito. Originalmente el ingeniero Ferrari Pérez describió al zacatuche como *Lepus diazi* con especímenes de la localidad tipo, cerca de San Martín Texmelucan, pendiente noreste del volcán Iztaccihuatl, Puebla, México. Después el género *Romerolagus* fue descrito por Merriam en 1896 con ejemplares procedentes de la localidad tipo montaña Popocatepetl, México, a 3350 metros de altitud. Al mismo tiempo, Merriam nombro al zacatuche *Romerolagus nelsoni*. Este taxón es monotípico (Honaki y cols.1982) y pertenece a la subfamilia Palaeolaginae, familia Leporidae, orden Lagomorpha. Sin embargo se ha considerado (Corbet 1893) que el zacatuche es un lepórido de la subfamilia Leporinae de acuerdo con las características de su tercer premolar inferior. Posteriormente Herrera en 1897 considero que no era justificable biológicamente nombrar un nuevo género para incluir al zacatuche. Por lo tanto, basado en comparaciones osteológicas entre *Romerolagus*, pikas del género *Lagomys* (Ochotona) y liebres del género *Lepus*, Herrera decidió incluir al zacatuche en el género *Lagomys*. Finalmente en 1911 Miller propuso la combinación *Romerolagus diazi*. En la actualidad *Romerolagus diazi* sigue siendo considerada especie monotípica.

Aunque no existen registros fósiles del zacatuche que permitan establecer con precisión su antigüedad, como se menciona anteriormente, este es considerado como un lepórido primitivo por sus características craneales, dentales y cromosómicas; por sus relaciones con sus huéspedes sifonápteros, ácaros y cestodos que son todos específicos y por su distribución actual. Todos estos aspectos lo relacionan estrechamente con *Pronolagus* y *Pentalagus*, especies con las cuales había sido considerado tradicionalmente como parte de la antigua subfamilia Palaeolaginae (Velázquez y Cols. 1996).

El zacatuche pudo haber derivado evolutivamente del género *Alilepus* (Hibbard 1963), fósil del Mioceno tardío o Plioceno temprano de Norteamérica. Dawson (1967) considera que la fauna de los lepóridos recientes consta de formas dominantes distribuidas centralmente que tienen el patrón de esmalte de *Lepus* en el premolar inferior tres. Como complemento, existe un número de géneros periféricos, los paleolaginos, los cuales parecen ser relictos que exhiben mayor o menor desarrollo en el patrón dental característico del Plioceno tardío o de principios del Pleistoceno, y que retuvieron el patrón del premolar inferior tres de *Alilepus*. Los géneros *Romerolagus*, *Pronolagus* y *Pentalagus*, el primer molar inferior esta dividido en una porción anterior y una posterior por dos ángulos reentrantes: uno que se extiende desde la parte labial externa y otro desde la cara lingual posterior interna hasta el centro del diente, a diferencia de los otros lepóridos, que tan sólo presentan un ángulo



Fig. 2 Eje Volcánico transversal 2650 a 4240 msnm.

reentrante. La distribución geográfica de los palaeolaginos parece haber sido restringida en el Pleistoceno por los más vigorosos *Sylvilagus*, *Caprolagus*, *Oryctolagus* y *Lepus* (Hibbard 1963).

Como ya se ha señalado, el zacatuche es la única especie entre los lepóridos que presenta la característica primitiva de mantener articulados el estemón y la clavícula; y, a su vez comparte con el conejo de las Islas Amani (*Pentalagus*) del Japón, la reducción extrema de la cola vertebral y el color ocre oscuro de la parte ventral del cuerpo. Además comparte con el conejo de la India (*Nesolagus*) y con el de Norteamérica (*Brachylagus*) la ausencia de muesca anterior en el premolar inferior tres (Corbet 1983), por lo demás no existe ninguna otra característica obvia que lo relacione estrechamente con cualquier otro lepórido. El zacatuche se diferenciò probablemente en la meseta desértica americana y permaneció como relicto una vez terminadas las glaciaciones, se estableció en las altas montañas del sur del Valle de México, hábitat que no pudo abandonar y en donde se ha conservado sin cambio evolutivo aparente (Rojas 1951).

Como lo marca la bibliografía, el zacatuche es el conejo de menor tamaño de nuestro país, su tamaño al nacimiento es de 83 a 100 mm con un peso de 22.6 a 25 gr. (Cervantes et al 1990), se ha reportado que en cautiverio las hembras nacen con un peso de 25 a 27 gr. y los machos con un peso de 32 gr. (Matsuzaki, et al 1982). Ya en la edad adulta su tamaño no rebasa los 30 cm. de longitud y 600 gr. de peso (Cervantes A. et al 1990). La cola es muy pequeña, difícil de apreciar a simple vista, los miembros posteriores son cortos; las orejas pequeñas y redondas. El cuerpo es de color pardo oscuro, las costillas constan de seis pares, son relativamente angostas y no presentan la expansión distal observada en el género *Lepus*; la parte más ancha de las costillas se ubica detrás de la porción de la espina de la cabeza. Presentan también cinco vértebras cervicales y nueve caudales.

Cervantes (1982) ha establecido que en el zacatuche, los machos en general son más grandes que las hembras, sin embargo, los valores promedio y rangos de las medidas del cuerpo para los machos ($n=31$) y hembras ($n=26$) de *Romerolagus diazi* adulto son respectivamente: Longitud total 268.3 mm (234-292) y 285.1 (240-321); peso, 417.4 gr. (386-479.1) y 535.9 (462.1-602.5). A pesar de algunas diferencias entre sexos, las hembras no son significativamente más grandes que los machos.

Los machos que están sexualmente activos presentan los testículos escrotados y el glande del pene extrusible (Cervantes 1982); alcanzan la madurez sexual entre los cinco y seis y medio meses de edad, cuando los testículos descienden a la bolsa escrotal y permanecen ahí todo el año, característica sugerente de que los machos tienen la capacidad permanente de reproducción (Hoth 1989), aunque la temporada de reproducción en cautiverio se reporta entre los meses de Marzo a Julio (De Poorter, et al 1981, López-Forment 1981). Los testículos son estructuras ovoideas que en el zacatuche miden aproximadamente 17.6 mm de longitud y 9.7 mm de ancho (Cervantes 1982).

Por su parte, las hembras no presentan un ciclo estral definido, por el contrario, se mantienen en constante aceptación sexual toda vez que llegan a la pubertad; aparentemente la ovulación es inducida. En condiciones de laboratorio el periodo de gestación calculado a partir de las fechas de parto registradas en laboratorio es 39.8 ± 0.7 días (Matsuzaki y cols. 1985).

En virtud de que desde hace más de tres décadas el zacatuche se encuentra en la lista de especies en peligro de extinción, actualmente se realizan esfuerzos en pro de su conservación como especie, abarcando tres objetivos principales: 1) La reproducción del zacatuche en condiciones de cautiverio. 2) Reintroducción del zacatuche en su hábitat natural. 3) Aumentar el conocimiento sobre la biología reproductiva de la especie. En relación con el último objetivo, es en donde se ubica este trabajo determinando la morfología del espermatozoide de dicho lagomorfo así como la localización de sus estructuras.

Un aspecto relevante del sustento teórico, es el conocimiento que se tiene sobre la existencia de una amplia variación en la conformación de la gameta masculina de los mamíferos, pues existen diferencias interespecies en la longitud y amplitud del espermatozoide, en las formas de su cabeza (Fig 3), y a nivel ultraestructural las características morfológicas de los organelos intracelulares también presentan variaciones, siendo aspectos que se desconocen en el zacatuche.

Considerando lo antes expuesto, es necesario conocer las características del espermatozoide para ampliar la información sobre la biología reproductiva de los lagomorfos para de este modo coadyuvar a la reproducción exitosa de este léporido.

<i>Sylvilagus bachmani</i>	Conejo matorralero.
<i>Sylvilagus audubonii</i>	Conejo del desierto.
<i>Sylvilagus florindanus</i>	Conejo castellano.
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	Conejo Tropical.
<i>Sylvilagus cunicularis</i> *	Conejo Mexicano o montes.
<i>Sylvilagus insonus</i> *	Conejo Omiltemi.
<i>Sylvilagus graysoni</i> *	Conejo de las Islas Marias.
<i>Sylvilagus mansuelus</i> *	Conejo de la Isla San José.
<i>Romerolagus diazi</i> *	Conejo Zacatuche.
<i>Lepus alleni</i>	Liebre antilope.
<i>Lepus californicus</i>	Liebre de cola negra.
<i>Lepus insularis</i> *	Liebre negra.
<i>Lepus callotis</i> *	Liebre torda.
<i>Lepus flavigularis</i> *	Liebre tropical.

*especie en peligro de extinción.

Tabla 1. Conejos y Liebres de México. (Tomado de AMCELA 1996).

1.2 MORFOLOGÍA DEL APARATO REPRODUCTOR DEL MACHO EN

MAMÍFEROS.

1.2.1 TESTÍCULO.

El sistema reproductor masculino consta de testículos, conductos excretorios, glándulas accesorias y pene (Fig 4). Los testículos son órganos pares de forma, por lo general, ovoidea, en su descenso desde la región lumbar, arrastran algunos elementos desde la pared abdominal formando con ellos las bolsas escrotales que los recubren. Estas tienen las siguientes capas: 1) El *escroto o piel*; 2) El *Dartos* o capa de fibras musculares lisas bajo la piel; es responsable de la variación en la posición de los testículos de acuerdo a la temperatura; 3) La *capa celulosa*, formada por tejido conjuntivo laxo; 4) La *túnica muscular o Eritroides* correspondiente a los músculos de la pared abdominal; 5) La *túnica fibrosa* representante de la fascia transversalis; 6) La *túnica vaginalis*, vestigio del peritoneo con sus capas visceral y parietal. (Pérez 1995).

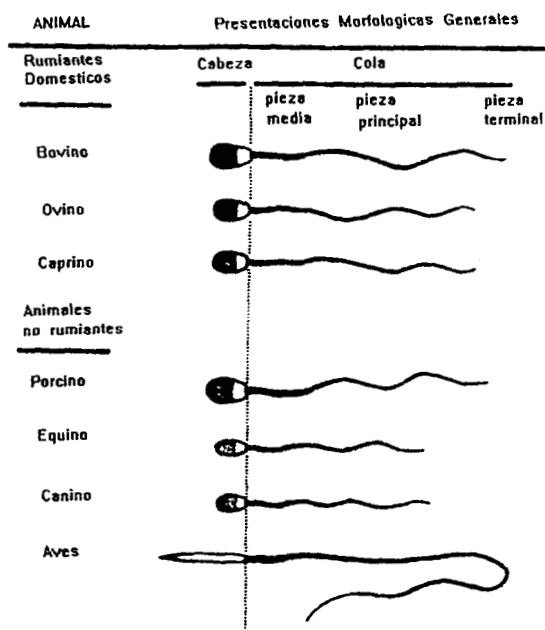


Fig. 3 Presentaciones morfológicas del espermatozoide de diferentes especies.
Tomado de Cupps 1987.

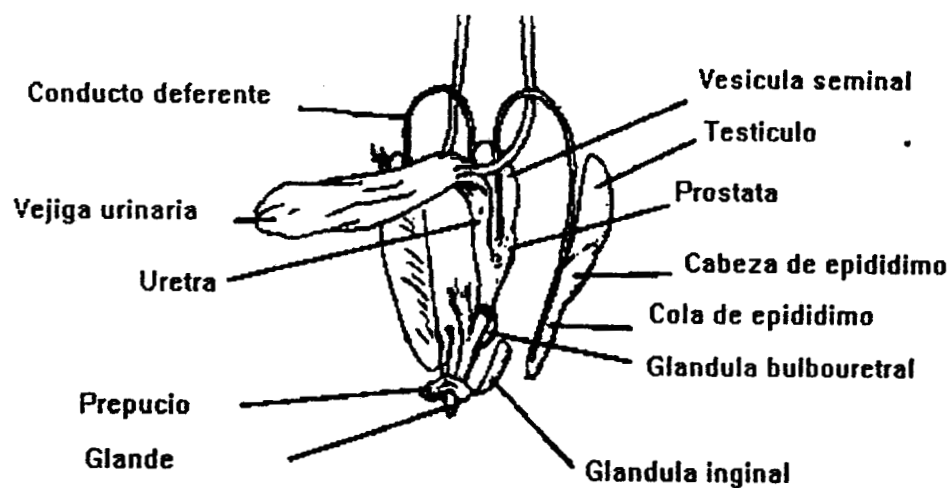


Fig. 4 Organos genitales del macho. Tomado de Cups 1987.

Los testículos están suspendidos en las bolsas escrotales por los cordones espermáticos, compuestos a su vez por los vasos deferentes, nervios, vasos sanguíneos y fibras de músculo cremastérico. Las bolsas contribuyen al mantenimiento de una temperatura adecuada para la espermatogénesis y sirven de cubierta protectora de los testículos. (Fig 5).

La mayoría del parenquima testicular se compone de varios espacios o lóbulos. Hay una gran cantidad de lóbulos en cada testículo y cada lóbulo contiene tres o cuatro túbulos seminíferos, el epitelio de los túbulos es de tipo estratificado plano, presentando dos tipos celulares: las células nutrientes o de Sertoli y las células germinales o espermatogonias que originan los espermatozoides. Es entre los túbulos seminíferos en el tejido conjuntivo laxo, el espacio donde aparecen después de la pubertad las células intersticiales o de Leydig que se encargan de la producción de testosterona.

Cuando se concluye la estructuración de los espermatozoides, estos abandonan el testículo y pasan al epididimo por los túbulos seminíferos. Estos túbulos ocupan los lobulillos o compartimientos dentro del testículo que están limitados por los tabiques de tejido conjuntivo que se extiende dentro de la túnica albugínea. Los diferentes túbulos de cada lobulillo forman asas retorcidas, cuyos extremos convergen hacia la región posterior, constituida por tejido conjuntivo muy vascularizado, que recibe el nombre de mediastino testicular. Dentro de esta estructura, existe un plexo laberíntico de canales revestidos de epitelio que se denomina *Rete Testis* (Fawcett 1991) (Fig 6). Los conductos eferentes varían en número de 4 a 20 según la especie (Robaire 1988). La rete testis desemboca en los tubos eferentes o conductos eferentes, estos penetran en la región cefálica del epididimo para, finalmente, desembocar en un conducto único llamado conducto epididimario.

Como los testículos descienden desde su punto de procedencia hasta el escroto, su arteria no cambia su origen sino que se elonga con la migración del testículo, además en su viaje por el canal inguinal se convoluciona a pesar de llegar a medir varios metros, sin embargo se enrolla y termina siendo una estructura de unos cuantos centímetros.

La irrigación e inervación del testículo llega a través del cordón espermático. En éste hay tres arterias: 1) La espermática, rama de la aorta que se divide en las epididimarias anterior y posterior; 2) La deferente, rama de la vesical anterior, y 3) La funicular, rama de la epigástrica.

El drenaje venoso corre en su mayoría por la superficie del testículo y cuando estas venas llegan al polo dorsal del mismo se dividen nuevamente para formar el plexo de pequeñas venas llamado plexo pampiniforme el cual rodea la arteria enrollada para formar el cordón espermático.

Las venas provenientes de los testículos y epididimo constituyen las venas espermáticas que forman el grupo anterior o espermático que se anastomosa entre sí con las venas escrotales, formando el plexo pampiniforme en la cavidad pélvica antes de formar un sólo tronco con la vena espermática. La cual termina, a la derecha, en la cava inferior y a la izquierda en la vena renal. Otro grupo venoso, posterior o deferente, desemboca en la vena epigástrica. Los linfáticos salen de la porción escrotal, a través de las regiones inguinal y fosa iliaca externa, para desembocar en la región lumbar, principalmente en los ganglios preaórticos. La inervación procede del simpático, formando los plexos deferencial y espermático; el primero, derivado del plexo hipogástrico y el segundo, de los plexos renal y lumbosacral (Pérez 1995).

Los testículos tienen dos funciones principales: la Espermatogénesis o producción de espermatozoides y la Hormonogénesis o síntesis de esteroides sexuales. Ambas funciones son reguladas por el hipotálamo al través de la hipófisis.

La espermatogénesis es el proceso de desarrollo de las células germinales dentro de los túbulos seminíferos. A diferencia de la ovogénesis, que se realiza durante la vida fetal y que para la pubertad ya tiene una población de células germinales casi madura, en el macho el proceso de

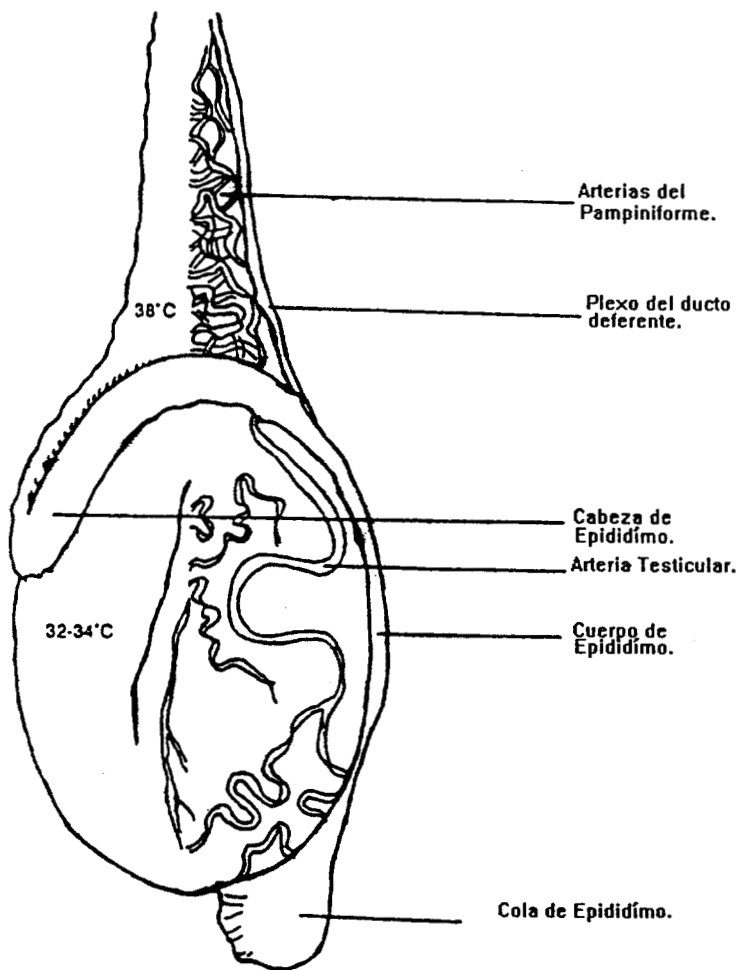


Fig5. Temperaturas dentro del testículo.
Tomado de Setchell 1977.

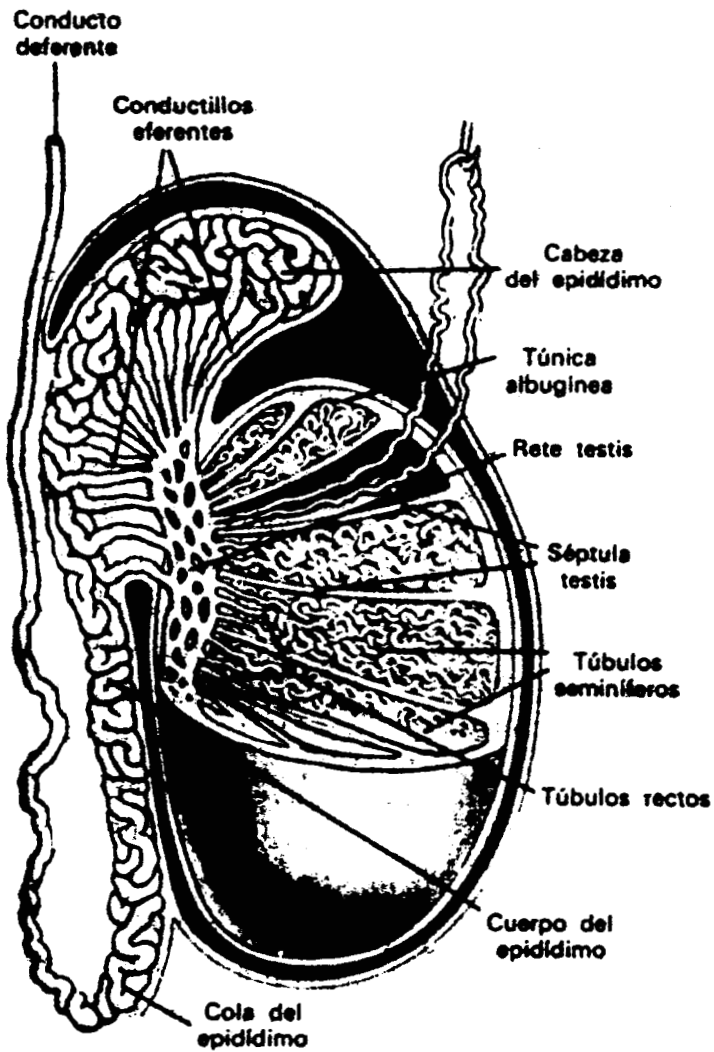


Fig. 6 Organización estructural del testículo. Tomado de Fawcett 1970.

espermatogénesis se efectúa sólo durante la vida adulta, debido a lo cual se requiere de una renovación constante de las células germinales madres, para siempre tener disponibles espermatogonias, las cuales, al pasar por las diferentes etapas de maduración se transformaran en espermatozoides (Orgebin-Crist 1981). La espermatogénesis puede ser dividida en tres fases: *espermatocitogénesis (mitosis)*, *meiosis* y *espermiogénesis*. Durante el proceso de maduración espermática las espermatogonias indiferenciadas, o células madres, se dividen por mitosis y producen dos tipos de células; espermatogonias indiferenciadas, que seguirán sirviendo de madres, y espermatogonias de tipo A, las cuales, mediante divisiones mitóticas, se transforman en espermatogonias tipo B, las cuales continúan el proceso de desarrollo mediante una mitosis para, transformarse en espermatoцитos primarios. Estos realizan la primera división de la meiosis, reduciéndose el número de cromosomas (en el caso del zacatuche pasa de 48 a 24 cromosomas). De cada espermatoцитo primario se originan dos espermatoцитos secundarios. Cada uno de estos se divide, sin reducir el número de cromosomas, dando lugar a dos espermátides. Estos no sufren nuevas divisiones, sino una diferenciación de espermátides esféricas a espermátides maduras las cuales son liberadas en la superficie luminal como espermatozoides, proceso al que se le conoce como espermiogénesis (Fig 7).

1.2.2. EPIDIDIMO

Cuando los espermatozoides dejan los testículos, pasan desde la Rete Testis a través de los ductos deferentes hasta el epidídimo. Este, es una estructura tubular alargada, continuación de los tubos rectos, con múltiples flexiones que se adosa al testículo en su borde externo posterosuperior.

Las funciones del epidídimo son varias: 1) Actuar como reservorio de espermatozoides; 2) Producción de plasma epididimal (medio de suspensión para los espermatozoides); 3) Promueve la maduración de los espermatozoides; 4) Participa en el mecanismo de eliminación de espermatozoides adultos o células muertas (Court 1983).

Anatómicamente se ha dividido al epidídimo en cabeza, cuerpo y cola, esta última desemboca en el conducto deferente y su longitud varia entre las especies. Se sabe que los espermatozoides (SPZ) maduran a través de su paso por el epidídimo adquiriendo su habilidad fertilizante (Yanagimachi 1995) y que la cola de éste es un sitio importante de almacenamiento de espermatozoides (Dacheaux 1980). (Fig 8).

El conducto deferente se extiende desde la cola del epidídimo y como continuación de este hasta su unión con el conducto de la vesícula seminal. Es cilíndrico y se ensancha en su extremo distal para formar el ámpula del deferente, entra en la cavidad pélvica por el conducto inguinal, rodea el cayado de la epigástrica y se dirige hacia la línea media, rodeando la cara lateral de la vejiga hasta llegar a su cara posterior; pasa por el borde interno de la vesícula seminal y, antes de terminar, forma el ámpula, el cual se une muy cerca de la línea media con el conducto de la vesícula seminal para formar el conducto eyaculador.

1.2.3 GLÁNDULAS ACCESORIAS.

Las glándulas accesorias del macho lagomorfo son el ampulla, la próstata, uretra, las glándulas vesiculares y las glándulas bulbouretrales o de Cowper. (Fig 9) Todas ellas producen secreciones que contribuyen para formar el semen. Los líquidos viscosos que secretan estas glándulas, proporcionan protección a los espermatozoides y les sirven de medio para mantenerlos vivos, favoreciendo, además, su desplazamiento por la uretra y por el conducto genital femenino. Por

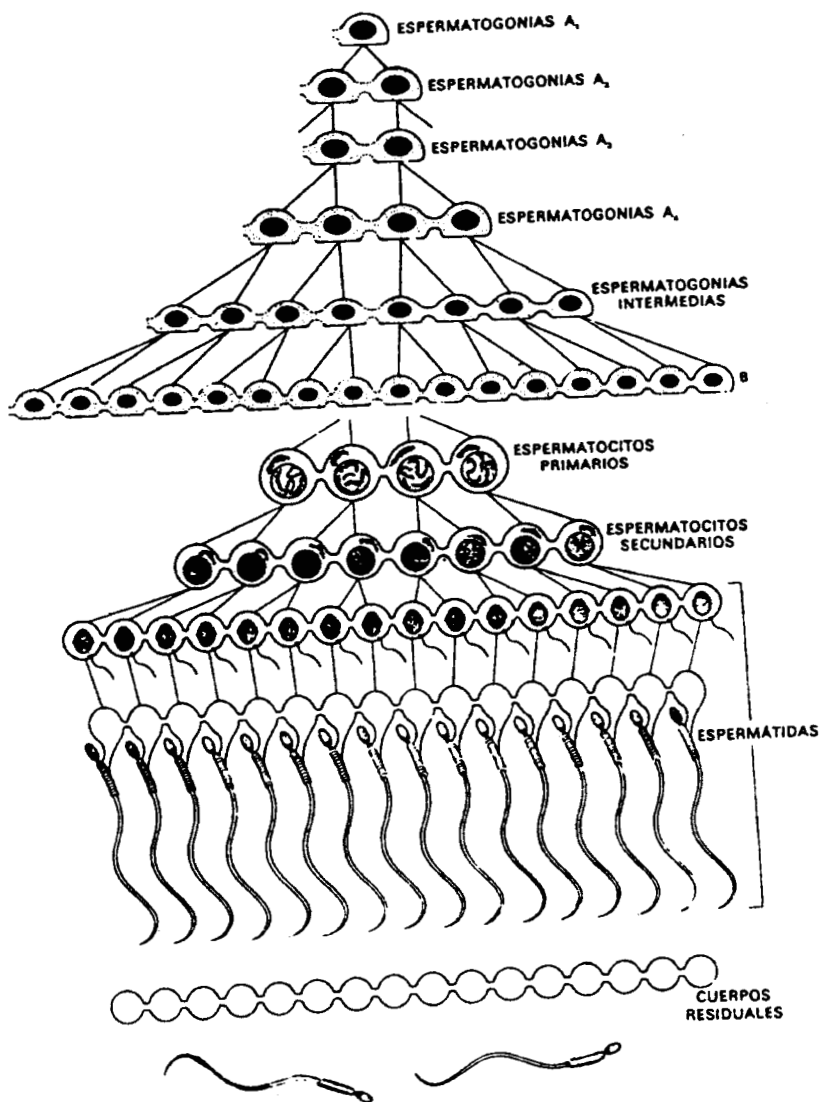


Fig. 7 Espermatogénesis. Tomado de Fawcett 1970.

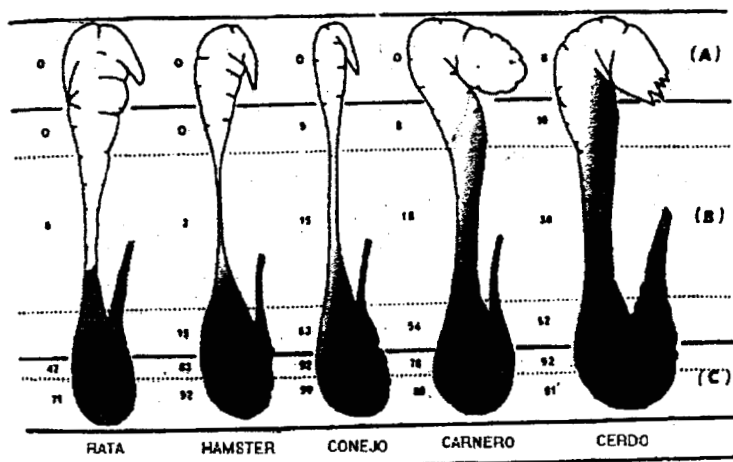
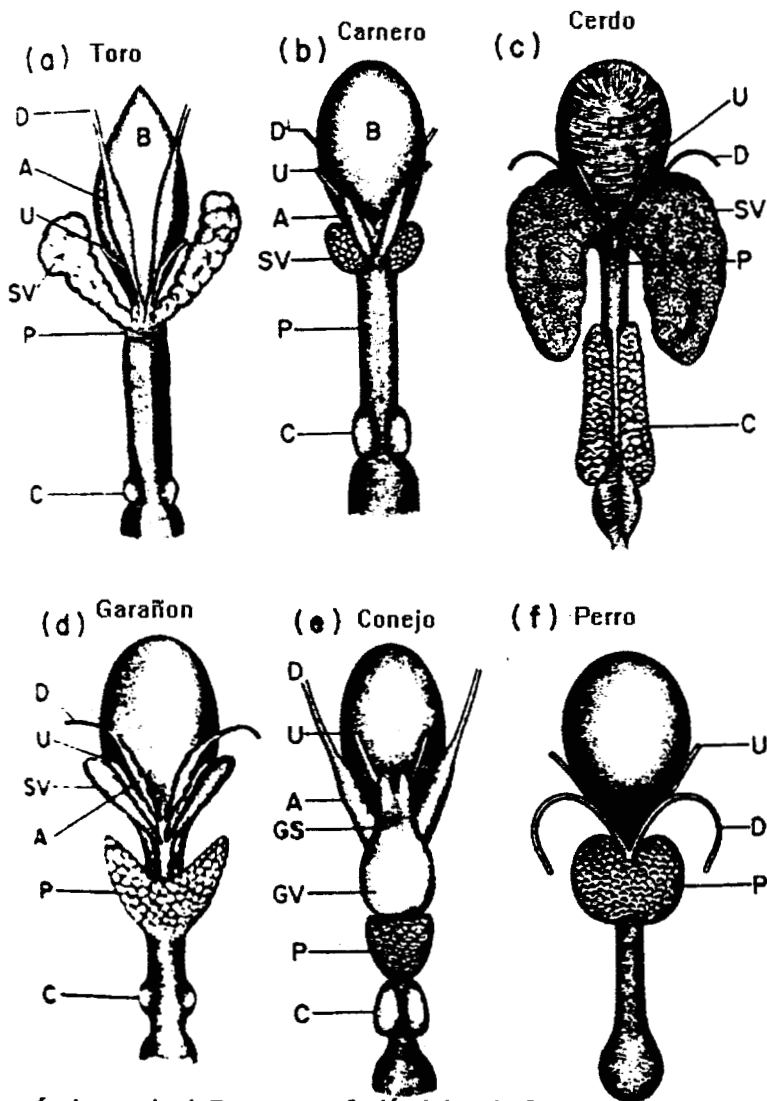


Fig. 8 Sitios de maduración de los espermatozoides en el epididimo.



V vesícula seminal, P prostata, C glándulas de Cowper, A ampulla del d. deferente, D ducto deferente, U uretra, B vejiga, SV glándula seminal, GV glándula vesicular.

Fig. 9 Glándulas accesorias del aparato reproductor. Tomado de Cupps 1987.

su parte la uretra es la continuación de los conductos genitales y presenta tres porciones: la prostática, la membranosa, y la cavernosa o peneana.

1.2.4 PENE

Es el órgano copulador del macho; esta compuesto por tejido eréctil y músculos que le permiten variar su tamaño y proyección mediante el aumento del flujo sanguíneo. El pene está dividido en tres partes: raíz, cuerpo y extremidad libre.

Los músculos del pene son: 1) Isquiocavernoso, se origina en el lado medio de la tuberosidad isquiática. El músculo se inserta en el cuerpo cavernoso y se comprime durante la copulación. 2) Bulboesponjoso, rodea la primera porción del cuerpo esponjoso de la uretra. Se extiende desde las glándulas bulbouretrales a las cuales cubre, hasta el arco isquiático. 3) Bulbouretral, se extiende desde la próstata hasta las glándulas bulbouretrales. Sus fibras corren en dirección transversal. 4) Retractor del pene, es un músculo largo liso que se origina en las primeras dos o tres vértebras caudales y en la pared rectal y se inserta en la parte ventral del pene.

El pene se extiende desde la sínfisis isquiática hasta la región umbilical en dirección de atrás hacia delante. Se encuentra cubierto por una piel bastante fina y desplazable cuya porción apical presenta un pliegue llamado prepucio, rico en glándulas sebáceas. La capa cutánea se convierte en mucosa en la cara interna del prepucio cubriendo también al glande el cual es un abultamiento de forma variable según las especies y que se constituye como el extremo del pene. El glande está circundado por la denominada corona del glande, provista de una fosa por donde sale la uretra al exterior. (Rodríguez 1980).

1.3 ESPERMATOZOIDE

El espermatozoide de los lagomorfos, como el de todos los mamíferos, es el resultado final del proceso de gametogénesis llamado espermatogénesis en el macho, este proceso tiene lugar dentro de los túbulos seminíferos del testículo.

El espermatozoide se compone de dos partes principales, *la cabeza y el flagelo o cola* los cuales se encuentran unidos por *el cuello o pieza de conexión* (Fig 10).

La cabeza del espermatozoide de los lagomorfos varía en tamaño y forma dependiendo de la especie como se puede ver en los datos aportados por Cummins y Wodall (1985).

1.3.1 CABEZA

La cabeza del espermatozoide contiene el núcleo y al acrosoma, rodeados por cantidades moderadas de componentes citoesqueléticos y citoplasma (Edy 1994).

El acrosoma se deriva del aparato de Golgi durante la espermatogénesis (Yanagimachi 1995) y está integrado de dos partes: *el segmento anterior y el segmento ecuatorial*; se compone de un saco invertido de membrana que en el segmento anterior contiene un complejo lipoproteínico específico, incluyendo un número de enzimas tales como la hialuronidasa y la acrosina, necesarias para el proceso de fecundación. Es en esta zona donde la estructura envolvente se forma en base a la

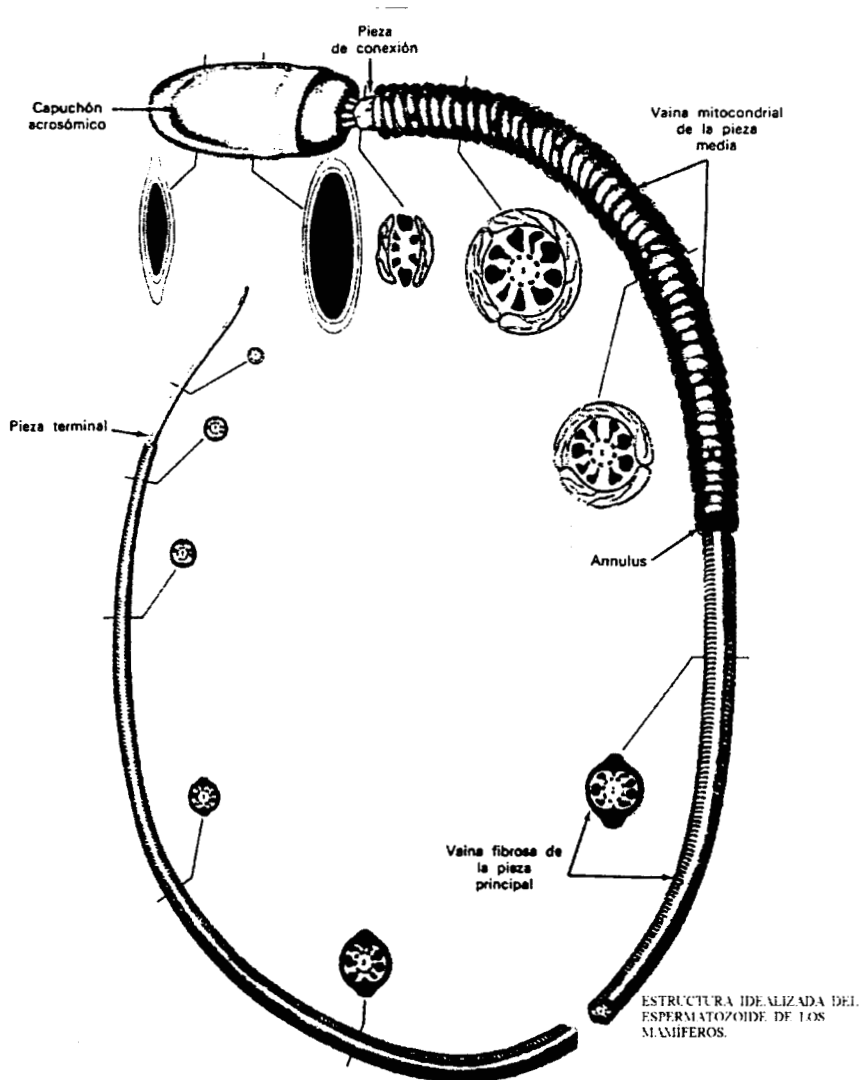


Fig. 10 Estructura ideal del espermatozoide de mamíferos. Tomado de Fawcett 1970.

membrana plasmática, las membranas acrosomales externas e internas y la membrana nuclear, es también en esta región donde se lleva a cabo la fusión de las membranas plasmática y acrosomal externa (Chavarria et al 1992).

El núcleo contiene la cromatina altamente condensada por lo que su volumen es considerablemente menor que el de una célula somática (Ward 1991, Edy 1994). Las principales proteínas asociadas al núcleo son las protaminas (27-65 aminoácidos) ricas en arginina y cisteína. El RNA mensajero que codifica para la síntesis de las protaminas, lo hace en las espermátides (Kretser 1994). En cuanto a la envoltura nuclear, se sabe que carece de poros y la distancia entre las dos capas de la membrana nuclear es de 7 a 10 nm (Edy 1994).

En relación a la forma y tamaño del acrosoma se sabe que ambas características varían ampliamente entre las especies (Fig. 11) (Fawcett 1970). Se puede considerar que hay dos tipos de formas de la cabeza: Forma simétrica como en el conejo o el toro y forma asimétrica como en la rata o ratón (Phillips y Dryden 1991). Fuoquet (1991) demostró que la sustancia perinuclear que une el acrosoma al núcleo es rica en actina. Esta proteína del citoesqueleto, que está fijada en la superficie del núcleo contribuye a los cambios de forma de la cabeza de la espermátida en el transcurso de la espermiogénesis.

1.3.2 FLAGELO

Proporciona la fuerza motriz que ayuda al traslado del espermatozoide hasta el sitio de fecundación, asegura una orientación apropiada para penetrar las cubiertas del ovocito y se compone de cuatro segmentos: 1) *Pieza de conexión*; 2) *Pieza media*; 3) *Pieza principal*; 4) *Pieza terminal*.

Los principales componentes estructurales del flagelo son, el *axonema*, la *vaina mitocondrial*, las *fibras densas externas* y la *vaina fibrosa*. El *axonema* se compone de un complejo "9 + 2" de microtúbulos que se extienden desde la pieza de conexión donde se implantan hasta el centriolo proximal situado exactamente abajo de la cabeza. Las *fibras densas externas* se localizan adyacentes al axonema y se extienden desde la pieza de conexión hasta la parte posterior de la pieza principal. Por otra parte la pieza media contiene a la *vaina mitocondrial*, la cual se cree que es la generadora de la energía para la locomoción del espermatozoide además de que su situación topográfica sugiere que también es fuente de energía para las fibras densas externas y que se acomoda de manera helicoidal alrededor de estas, en tanto, la pieza principal contiene a la *vaina fibrosa*. La base del flagelo se apoya en el núcleo para posibilitar la unión entre la pieza de conexión y la cabeza (Fawcett 1970, Oura, et al 1971, Zamboni 1973).

La *pieza de conexión* se compone del *capitulum* y de las *columnas segmentadas*, del capitulum se deriva una estructura de fibra densa de la que se forma la *fosa de implantación* (Fawcett 1975).

Como se menciona anteriormente, el flagelo contiene una estructura central que forma el eje conocido como *axonema*, este posee una organización microtubular de nueve parejas de microtúbulos (dobletes) arreglados en forma circular alrededor de dos microtúbulos situados en el centro del sistema, formando el patrón 9 + 2. Cada doblete periférico consiste de una subunidad A (un microtúbulo completo) y una subunidad B (un microtúbulo incompleto) en forma de C, que se une a la pared de la subunidad A. La subunidad A de cada doblete está provista de dos brazos (interno y externo) de dineína que tienen actividad de ATPasa y que se extienden con cursos divergentes hacia la subunidad B del siguiente doblete en dirección de las manecillas del reloj (Fig 12).

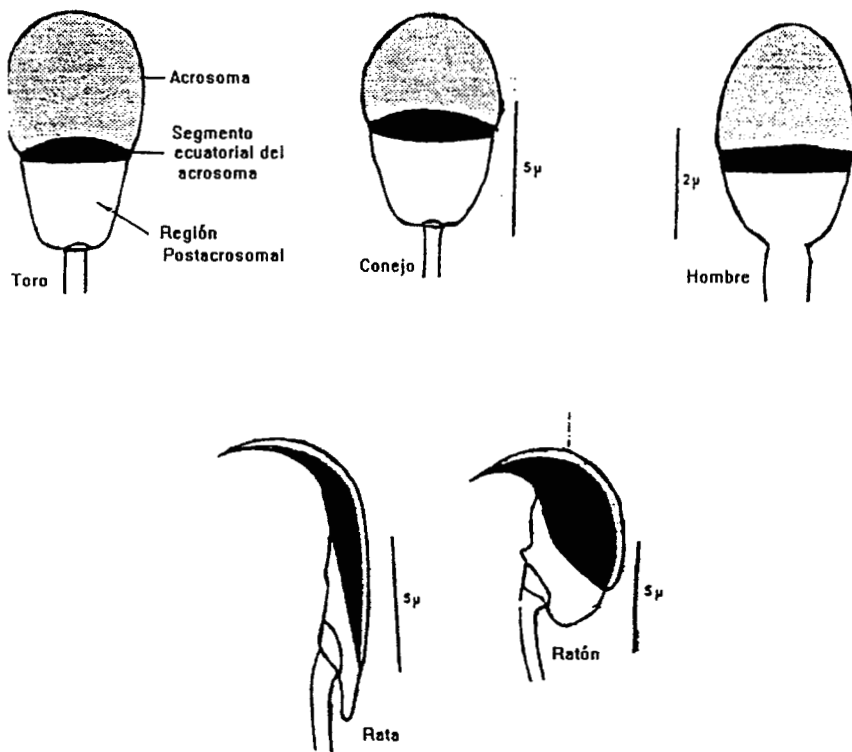


Fig. 11 Formas y tamaños del acrosoma en diferentes especies. Tomado de Cupps 1987.

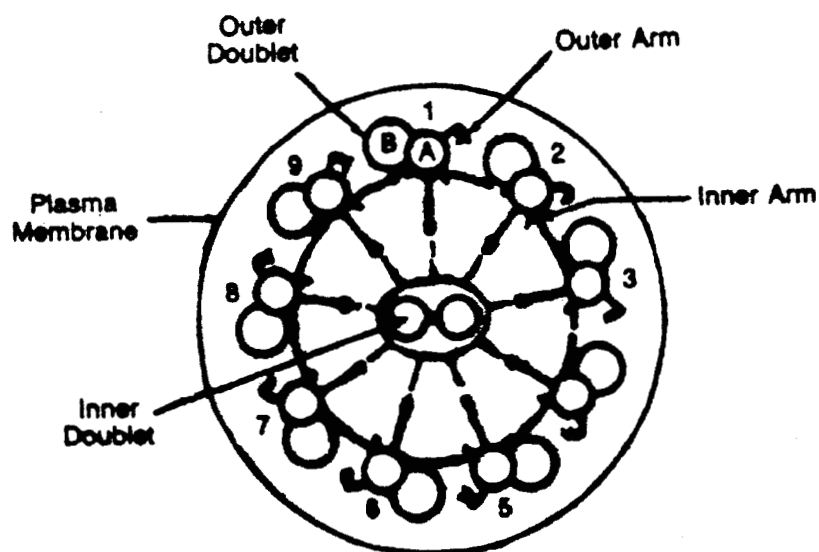


Fig. 12 Estructura del axonema. Tomado de Cupps 1987.

Durante el movimiento de la cola, los brazos de dineína tienen un ciclo de extensión, una transducción mecanoquímica seguida por un estado de rigor regresando luego a su forma plana. La interacción entre los brazos y el doblete vecino puede producir un movimiento "corredizo" el cual es probablemente la base para el movimiento de la cola (Gibbons 1981).

La pieza media se constituye por una parte flagelar central, rodeada por las nueve fibras densas externas, cada una de ellas asociada con un doblete de microtúbulos rodeado por una densa espiral que conforma el aparato mitocondrial, el cual aporta la energía necesaria para el movimiento del espermatozoide a través de procesos de fosforilación oxidativa (Chavarria 1995).

En la pieza principal se identifica la presencia de la vaina fibrosa que envuelve al axonema, esta formada por dos columnas longitudinales asociadas a los dobletes 3 y 8, y se unen entre ellas por piezas laterales (Zamboni 1992, Kretser 1994).

La pieza final es de longitud variable, es una prolongación de la estructura microtubular del flagelo y está desprovista de los constituyentes del citoesqueleto que forman las fibras densas y la vaina fibrosa.

1.4 MADURACIÓN EPIDIDIMARIA DEL ESPERMATOZOIDE

Los espermatozoides se encuentran inmóviles e infértiles mientras permanecen en el testículo y sólo después de entrar en el ducto epididimario experimentan una serie de cambios que les permite adquirir la capacidad de movilidad progresiva, estabilidad estructural y habilidad fertilizante.

Se define la maduración como "un proceso complejo que se inicia durante el tránsito de espermatozoides (spz) por el epidídimo, que continúa después de la eyaculación y finalmente confiere al spz su capacidad funcional, movilidad y capacidad fertilizante, sin la cual no es capaz de fecundar al ovocito" (Rosado y Hernandez 1988).

Hay cinco cambios descritos en el spz en su paso a través del epidídimo que son:

- 1) Se agregan glicoproteínas específicas, sustancias orgánicas, glicerilfosforilcolina y camitina (Edy, et al 1985, Yanagimachi 1988).
- 2) Formación de una capa membranal compuesta por la adsorción de proteínas de plasma seminal (Yanagimachi 1988).
- 3) Migración de la gota citoplasmática (Rosado y Hernandez 1988). La presencia de gota citoplasmática en un número significativo de spz refleja problemas en su maduración.
- 4) Maduración de acrosoma, núcleo y flagelo (Rosado y Hernandez 1988).
- 5) Aumento de puentes disulfuro, dando una estructura rígida al flagelo (Bedford y Calvin 1974).

Uno de los cambios más prominentes del espermatozoide durante la maduración epididimaria es la adquisición de movimiento progresivo, sirviéndose de su cola para tal fin. El espermatozoide testicular no tiene movilidad y si la tiene esta es muy pobre, esto se debe en parte a la inmadurez de la membrana plasmática.

Durante la maduración epididimaria, los lípidos de membrana del espermatozoide sufren distintas alteraciones tanto físicas como químicas (Schlegel y cols. 1986). Los cambios en el patrón de distribución de partículas de proteínas intramembranas (glicoproteínas) en la membrana plasmática del espermatozoide durante su maduración refleja las alteraciones de los lípidos y proteínas de membrana. El hecho de que el epidídimo muestre una alta tasa de síntesis de colesterol (Hamilton 1971) y que el colesterol sea transferido dentro de la membrana del espermatozoide

maduro (Seki y cols 1992. Suzuki 1988) sugiere que el colesterol es una de las moléculas claves que alteran las características del espermatozoide durante su maduración (Parks 1985). La estabilización de la membrana por el colesterol puede ser benéfica para el espermatozoide, ya que debe viajar al través de varios microambientes, algunos de estos hostiles, dentro del tracto femenino antes de llegar al ovocito.

En ciertos casos de disfunción epididimal la incidencia de anomalías espermáticas como cola enroscada o pieza media defectuosa coinciden con la composición anormal del plasma epididimal, principalmente en los constituyentes iónicos y en la presión osmótica.

La localización anatómica donde los espermatozoides empiezan a adquirir la habilidad fertilizante varía de acuerdo a las especies. En algunas especies como el cerdo, los primeros espermatozoides fértiles aparecen en la cabeza del epidídimo, mientras que en la rata esto ocurre en el segmento distal del cuerpo del epidídimo (Dacheaux y cols. 1980). Aparentemente el espermatozoide no adquiere la capacidad fertilizante simultáneamente en alguna región. Algunos espermatozoides son capaces de fertilizar más pronto (o en una región más proximal del epidídimo) que otros. De cualquier modo, en general, este proceso se da hasta llegar a la cola del epidídimo, sitio donde la mayoría de los espermatozoides adquieren su total potencial fertilizante.

1.6 CAPACITACIÓN DEL ESPERMATOZOIDE.

Los espermatozoides que maduran en el epidídimo son capaces de moverse activamente, sin embargo, todavía no tienen la capacidad para fertilizar. Adquieren esta capacidad después de residir en el tracto femenino por algún tiempo. Los cambios fisiológicos que le dan al espermatozoide la capacidad de fertilizar se conocen colectivamente como capacitación.

En algunos mamíferos (vaca, coneja, oveja y primates) el semen es depositado en el segmento anterior de la vagina durante el coito. En otros (cerda, yegua, perro y muchos roedores) la mayoría del semen es depositado directamente en el útero o es forzado al través del canal cervical durante el coito (Hunter 1988). Quizás esto ocurre en parte porque, debido al estímulo copulatorio se dan una relajación del cervix y contracciones vaginales. Sin importar el sitio de depósito del semen, la gran mayoría de este es eliminado del tracto tarde o temprano (Dobrinz 1992) y sólo una pequeña fracción de espermatozoides migran exitosamente hasta el sitio de fertilización.

En especies en las cuales los espermatozoides son depositados en el útero durante el coito, la unión útero-tubal es la principal barrera para el ascenso del esperma al ampulla. Numerosos grumos de mucosa y la estrechez del lumen de la unión útero-tubal permiten la migración de sólo una pequeña fracción de espermatozoides del útero hacia el oviducto.

Por otra parte, en especies en las que el semen es depositado en la vagina durante el coito, el espermatozoide debe de sortear diversos obstáculos como un cervix lleno de mucosa antes de entrar al útero. Durante el periodo periovulatorio el moco tiene varias funciones: a) Protege al espermatozoide de ambientes hostiles en la vagina y de la fagocitosis por leucocitos vaginales. b) Evita la entrada de plasma seminal al útero. c) Excluye espermatozoides morfológicamente anormales. d) Retiene y conserva espermatozoides para una posterior migración hacia el tracto superior. (Katz y cols. 1989, Overstreet 1983). El ascenso del esperma al través del útero parece estar acompañado de una actividad contráctil de la pared uterina. La movilidad del esperma puede sólo servir para el mantenimiento de las células en suspensión dentro del fluido uterino (White 1990). En la vaca y en la oveja, los espermatozoides pasan al través de la unión útero-tubal y son aislados en el segmento bajo del istmo hasta el inicio de la ovulación (Hunter 1988) y aunque no está plenamente confirmado este fenómeno, parece ser universal en los mamíferos (Dunbar 1991, Hunter 1988).

En vivo, el sitio donde el espermatozoide fértil comienza y termina su capacitación puede variar de acuerdo a las diferentes especies. En las especies donde el semen es depositado en el útero, el espermatozoide puede completar la capacitación o la mayor parte de ella, en el segmento bajo del istmo donde el espermatozoide se almacena. En especies en las cuales el esperma es depositado en la vagina, la capacitación comienza al pasar al través del moco cervical.

El espermatozoide de los lagomorfos puede capacitarse con eficiencia en su paso secuencial en el útero y el oviducto (Bedford 1967). Aunque de cualquier modo el espermatozoide puede capacitarse en el útero sin ascender hacia el oviducto como lo muestran las evidencias obtenidas por Brackett 1970.

1.7 IMPORTANCIA DE LA MORFOLOGÍA DEL ESPERMATOZOIDE.

La importancia de conocer como esta estructurado el espermatozoide estriba en que de su construcción depende su funcionamiento y por tanto su aptitud para la fecundación ,ya que la existencia de una *gran variedad de defectos del espermatozoide y anomalías en su desarrollo* son causantes de infertilidad, por ejemplo , humanos con baja fertilidad tienden a tener bajas concentraciones espermáticas, una alta proporción de anomalías morfológicas, baja movilidad y mínimas habilidades de penetración en el moco cervical y de unión a la zona pelúcida así como de penetrar al ovocito (Aitken et al 1992, Liu y Baker 1992, Kaskar et al 1994).

La morfología es uno de los tres parámetros principales para evaluar el potencial fertilizante del espermatozoide, los otros dos son la concentración y la movilidad. El análisis de la morfología del espermatozoide generalmente es media sólo un cuanto a los defectos "gruesos" de la cabeza y el flagelo, es decir, aberraciones en la forma de la cabeza, presencia de dos o más cabezas o flagelos o defectos flagelares, las anomalías finas que son regularmente origen de la infertilidad no son determinadas en un examen general.

Para expresar su potencial de fertilidad el espermatozoide debe poseer los siguientes atributos:

- 1) Un aparato locomotor eficiente para cubrir la distancia que separa la vagina del oviducto y que pueda sortear los obstáculos (moco cervical, la estructura de la unión uterotubal, etc.) y penetración al del ovocito.
- 2) Un acrosoma intacto para adquirir la capacidad fertilizante por medio de la capacitación y realizar así la reacción acrosomal.
- 3) Un núcleo intacto para establecer un patrimonio genómico. (Zamboni 1987).

Ninguna de estas características puede ser evaluada con precisión en el curso de una evaluación convencional de semen debido a uno o ambos de los siguientes aspectos: a) los bruscos métodos utilizados para preparar el fluido seminal para el análisis microscopico, b) las dimensiones extremadamente pequeñas de la mayoría de los organelos del espermatozoide que van más allá de los límites de resolución del microscopio óptico.

Por lo que la mayoría de las anomalías "finas" en general tienden a pasar desapercibidas. Si la evaluación de la morfología funcional del espermatozoide se hace con la intención de determinar la integridad estructural de la célula, entonces se deben utilizar métodos de investigación más refinados, ya que la organización de los elementos celulares es un importante componente de la evaluación global, siendo lógico que el estudio debe ser realizado utilizando métodos ultraestructurales de análisis morfológicos.

La patología ultraestructural del espermatozoide como causa de infertilidad ha sido reportado en la literatura sólo en casos aislados y pocas revisiones han sido publicadas por lo que no se cuenta con una clasificación sistemática de anomalías del espermatozoide, y, menos aún del espermatozoide de *Romerolagus diazi* por lo que se hace necesario conocer la ubicación y organización de las estructuras de su espermatozoide para poder establecer criterios de normalidad de la célula y de este modo establecer su habilidad fertilizante.

II. HIPÓTESIS.

La ultraestructura del espermatozoide de *Romerolagus diazi* proveniente de la región de la cola del epididimo no tendrá diferencias significativas en relación a la ultraestructura del espermatozoide del conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) obtenidos de la misma región del epididimo.

III. OBJETIVOS.

- Establecer las características ultraestructurales del espermatozoide de *Romerolagus diazi* provenientes de la región correspondiente a la cola del epididimo.
- Comparar la ultraestructura del espermatozoide de *Romerolagus diazi* con la del conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para el estudio de los espermatozoides se han utilizado una variedad de métodos para su obtención; por ejemplo, la electroeyaculación, vagina artificial o bien directamente del epididimo; y en el procesamiento también se han utilizado varios métodos como la congelación, secado por punto crítico o por aire, etc.

Para nuestro estudio se optó por obtener espermatozoides de la cola del epididimo de los cuales se capturaron varias fotografías de imágenes del microscopio de luz y electrónico de transmisión.

Los detalles de la preparación de las muestras son importantes para una apropiada interpretación de la fotografías ya que la presentación de diversas estructuras en la superficie de la muestra depende de la preparación de esta. El procedimiento de fijación, deshidratación e inclusión que se utilizó para el presente trabajo fue el recomendado por el laboratorio de Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM dando resultados excelentes que se reflejaron en la obtención de material fotográfico de buena calidad. Se llevaron a cabo varias inclusiones de la cola del epididimo e igualmente se realizaron un número considerable de cortes en el microtomo, y se analizaron en el microscopio electrónico; tomándose alrededor de cuarenta fotos de las cuales se seleccionaron diez para presentarlas en los resultados finales.

Se utilizó 1 ejemplar de *Romerolagus diazi*, macho, sexualmente maduro, recolectado en la zona del volcán Pelón, Parres D.F. (permiso número DOO 750.- 2618/97 del Instituto Nacional de Ecología) y se traslado vivo hasta el laboratorio de la UAM-I, también se utilizaron 2 ejemplares de conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) procediéndose a anestesiarse a cada ejemplar utilizado por medio de una dosis de 2.5 ml de pentobarbital sódico por kilogramo de peso. El testículo izquierdo fue retirado para el estudio de los espermatozoides en fresco.

Para el estudio del testículo derecho, el ejemplar fue perfundido por hemicuerpo según la técnica de Baker y cols. (1981), con solución de Kamovsky modificada (Glutaraldehído y paraformaldehído) La fijación de una muestra es el paso más importante en la preparación de material para microscopio electrónico. Si pasan más de 15 minutos desde la extracción quirúrgica del tejido hasta que se pone en el fijador, puede presentarse una autólisis que de una imagen errónea del tejido. En este caso, se utilizó fijador de Kamovsky modificado (paraformaldehído- glutaraldehído), ya que esta solución penetra rápidamente con poco daño al tejido.

El fijador de Kamovsky modificado se prepara utilizando Paraformaldehído... 1%
y Glutaraldehído..... 2.5% siguiendo el siguiente método:

- 1.- Agregar poco a poco al paraformaldehído 25 ml de agua bidestilada a 60-70 °C.
- 2.-Enfriar con agua corriente, si no se disuelve, agregar una o dos gotas de NaOH 1N.
- 3.- Agregar: 50.0 ml de cacodilato de Sodio. (0.2M)
10.0 ml de glutaraldehído 2.5%
15.0 ml de agua bidestilada.

4.- Ajustar el pH a 7.3 con HCL o Na OH.

Posteriormente la muestra se enjuaga con amortiguador de cacodilato de sodio y se post-fijo con tetróxido de Osmio al 1%.

El amortiguador de cacodilato se prepara del siguiente modo:

21.402 g. en un litro de agua destilada (0.1 M).

42.804 g. en un litro de agua destilada (0.2 M).

ajustar pH a 7.3- 7.4

El segundo paso comprendió delimitar las zonas anatómicas correspondientes al epididimo (cabeza, cuerpo y cola), y una vez separadas, cada zona se post-fijo con tetróxido de Osmio durante 60 minutos.

El tetroxido de Osmio se prepara del siguiente modo.

- 1.- Se lava con abundante jabón y agua la ampula de 1 gm. de tetroxido de osmio (OsO_4) y se enjuaga con agua destilada.
- 2.- El ampula se hierve durante 15 minutos en agua destilada para que el OsO_4 se disuelva .
- 3.- Posteriormente se rompe el ampula y el contenido se mezcla con 50 ml de agua destilada caliente (es recomendable lavar con la misma agua el interior del ampula para extraer los restos de OsO_4).
- 4.- Se coloca la solución en una botella oscura , se sella y se coloca en el refrigerador.

Toda esta operación debe llevarse a cabo dentro de la campana de extracción.

Para, acto seguido llevar a cabo una serie de deshidrataciones con alcohol en distintos gradientes (desde 70% a absoluto), y, finalmente con Oxido de Propileno.

- 1.- Dos cambios de 15 minutos cada uno en alcohol al 70%.
- 2.- Dos cambios de 15 minutos cada uno en alcohol al 80%.
- 3.- Dos cambios de 15 minutos cada uno en alcohol al 90%.
- 4.- Dos cambios de 15 minutos cada uno en alcohol al 95%.
- 5.- Dos cambios de 20 minutos cada uno en alcohol absoluto.
- 6.- Un cambio de 20 minutos en Oxido de Propileno.

Y finalizar con la impregnación e inclusión en resina EPON de las muestras.

Antes de embeber la muestra, se procede a impregnar la misma:

- 1.- Primero con una solución de oxido de propileno y epon en relación 1 a 1 durante una hora en movimiento continuo.
- 2.- Posteriormente se pasa a otra solución de los mismos componentes aunque en esta ocasión en relación 1 a 2 durante una hora en constante movimiento.
- 3.- Como paso final se embeben las muestras siendo las resinas epóxicas la elección natural para el microscopio electrónico, en este caso se ha utilizado resina EPON, la cual se prepara de la siguiente manera:

DDSA (anhídrido succínico dodecenil)	43 ml.
Epon 812	43 ml.
NMA (anhídrido nadico metil)	14 ml.
DMP-30 (2,4,6-tri (dimetil, aminometil fenol)	1.5 ml.

Todos los ingredientes deben ser bien mezclados.

4.-Después se embeben en cápsulas BEEM , llenándolas suavemente y colocándolas en una estufa a 60 grados centígrados durante 24 horas.

Posteriormente se realizaron cortes de 50 nm de espesor en un ultramicrotomo RMC MT-7000 en el cual se utilizaron cuchillas de vidrio a una velocidad de 70 μm por segundo, los cortes se montaron en rejillas de cobre de 400 mesh, contrastándose durante 15 minutos con acetato de uranilo al 2.5% en agua destilada y 15 minutos con citrato de plomo alcalino. Las rejillas fueron observadas en el microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM- 910. El análisis de los resultados fue sobre el material electromicrográfico obtenido. Las muestras fueron trabajadas tanto en el laboratorio de microscopia electrónica de la UAM-I como en el laboratorio de Biología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Por otra parte, del otro testículo se obtuvieron espermatozoides de cola de epididimo para tomar dimensiones y forma de la cabeza y flagelo así como parámetros de movilidad.

V. RESULTADOS.

Los resultados se presentan en dos apartados ya que es posible separarlos de acuerdo a la técnica empleada: por un lado están los de microscopia de luz - ya que este fue el instrumento utilizado para su estudio - y por otro los de microscopia electrónica que corresponden a dicha metodología

MICROSCOPIA DE LUZ.

Se realizaron frotis de espermatozoides obtenidos de cola de epidídimo; que fueron obtenidos tanto de zacatuche como de conejo doméstico, dichos cortes fueron teñidos con nigrosina-eosina. La figura muestra fotos representativas de los frotis observados con un fotomicroscopio ZEISS Axiophot y se usaron tanto para realizar mediciones como para establecer porcentajes de presencia de gota citoplásmica.

Foto 1. Microscopia de luz 100X espermatozoides de zacatuche teñidos con nigrosina.

Se observan algunos espermatozoides en los que se distingue la zona acrosomal y gota citoplásmica. Los espermatozoides tienen una cabeza ovalada y más ancha que la del conejo doméstico, la zona acrosomal tiene forma de media luna, la cola es alargada, la pieza media tiñe mejor que su contraparte de conejo doméstico y además es más ancha.

Foto 2. Microscopia de luz 100X espermatozoides de conejo doméstico teñidos con nigrosina.

En esta fotografía, obtenida de espermatozoides de la cola de epidídimo se observan una mayor cantidad de espermatozoides en comparación con la foto 1, un alto porcentaje presentan gota citoplásmica en relación con los espermatozoides de zacatuche. La transición de la pieza media a la principal y de esta a la terminal no puede ser claramente distinguida en fotos de contraste de fase.

Figura 13. Fotos comparativas Microscopia de luz 100X de espermatozoides de zacatuche y de conejo doméstico donde se observa la diferencia en la forma de la cabeza, las cabezas de los espermatozoides de zacatuche son más grandes y menos ovaladas que sus contrapartes de conejo y la variabilidad en la presentación de la gota citoplásmica, además de la zona que abarca el acrosoma. Ver medidas de la cabeza en la tabla 2.

En cuanto a las medidas del espermatozoide de zacatuche tanto de la cabeza como del flagelo las observaciones arrojaron los siguientes resultados:

	Zacatuche	Conejo Doméstico
Largo de la Cabeza.	$7.68 \pm 0.48\mu\text{m}$	$7.0 \pm 0.2\mu\text{m}$
Ancho de la Cabeza.	$6.0 \pm 0\mu\text{m}$	$3.9 \pm 0.5\mu\text{m}$
Región Acrosomal.	$2.92 \pm 0.28\mu\text{m}$	$2.68 \pm 0.47\mu\text{m}$
Región Postacrosomal.	$4.76 \pm 0.43\mu\text{m}$	$4.36 \pm 0.49\mu\text{m}$
Largo Cuello Pieza Principal.	$10.88 \pm 1.33\mu\text{m}$	$9.6 \pm 0.76\mu\text{m}$
Ancho cuello Pieza Principal.	$1.0 \pm 0\mu\text{m}$	$1.0 \pm 0\mu\text{m}$
Largo de la Cola*	$44.12 \pm 1.96\mu\text{m}$	$47.68 \pm 2.92\mu\text{m}$

*Considerando la pieza principal.

Tabla 2. Medidas del espermatozoide de zacatuche y de Conejo doméstico.

El largo del espermatozoide de zacatuche es de $51.8\mu\text{m}$ en comparación con el del conejo doméstico que es de $54.68\mu\text{m}$.

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Se obtuvieron alrededor de cuarenta fotografías de diferentes cortes del microscopio electrónico de transmisión (MET) de las cuales se presentan en este trabajo ocho fotografías que se consideran son lo más representativo de lo observado, así mismo se incluyen imágenes (foto 11) tomadas de otro autor (Hafez 1975) de espermatozoides de conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*).

Foto 3. Mismo corte. Campo y aumento diferentes (2500X).

Se observan cortes transversales con presencia de gota citoplásmica, la posición de la gota citoplásmica es variable, de tal manera que pueden observarse en la zona del cuello o bien en la terminación de la pieza media. Las gotas presentan abundantes membranas parecidas al complejo de Golgi. La base citoplásmica de las gotas usualmente contiene un material de baja densidad electrónica. También se aprecian cortes parciales de la cabeza del espermatozoide donde se distingue la fosa de implantación y pieza media y donde se pueden observar las mitocondrias.

Foto 4. Micrografía de otro corte a un mayor aumento (6000X).

Aquí la que se observan cortes transversales y longitudinales de espermatozoides donde se distingue la pieza media caracterizada por una vaina de mitocondrias orientadas circularmente, dispuestas extremo con extremo formando una espiral cerrada; también se distingue la pieza media en la que se ve tenuemente la vaina fibrosa, igualmente se ubica la fosa de implantación, también se distinguen el núcleo y el acrosoma con unas membranas plasmáticas flojas.

Foto 5. Micrografía (8000X)

Se observan cortes transversales que interesan a distintos planos de la pieza media donde se distingue claramente el complejo típico del flagelo de los espermatozoides "9 + 2", el par central rodeado de nueve pares periféricos tanto en la pieza media como en la pieza principal e igualmente se observan cortes de la pieza terminal. La transición de la pieza principal a la pieza terminal no se observa claramente, la diferencia es que en la pieza terminal se distinguen los microtúbulos sencillos, en una organización bastante básica, ya que se pueden observar un grupo de aproximadamente 20 a 25 microtúbulos arreglados en forma desordenada y en otra parte ya se puede ver el arreglo 9 + 2 en forma primigenia la cual contrasta con el arreglo organizado de las piezas media y principal.

Foto 6. Cortes longitudinales (12000X)

Donde se observan los núcleos, acrosomas y las membranas plasmáticas flojas.

Foto 8. (8000X).

Corte longitudinal donde se distingue claramente el núcleo y membrana de los espermatozoides.

Foto 9,10.

Se muestran las distintas partes del flagelo, desde la pieza media y la pieza terminal, donde el centriolo distal se continua con las nueve dobles externos de microtúbulos del axonema el cual tiene además el característico doblete central de microtúbulos. Las nueve fibras densas paralelas al axonema se extienden en diferentes longitudes de la pieza principal. En la pieza terminal, los

dobletes del axonema se toman desorganizados separándose finalmente en veinte microtúbulos sencillos pero todavía encerrados en la membrana plasmática.

Foto 11. (Hafez 1975). Espermatozoide de conejo proveniente del epididimo (26000X), fijado con glutaraldehído, montado en epon y teñido con acetato de uranilo y citrato de plomo.

a) Cortes transversos y oblicuos de la cabeza y cortes transversos de las piezas media y principal (PM) (PP) en el lumen lleno de material floculento. No hay un núcleo denso en el aumento marginal (AM) del segmento anterior del acrosoma (A) el cual es plano y elongado. El segmento ecuatorial (SE). Presencia de una substancia subacrosomal entre el núcleo (N) y el acrosoma, particularmente visible el perforatorio (P) y las protuberancias (PR). b) Aumento marginal en la cabeza del epididimo. Desde el exterior hacia el interior: Membrana plasmática (MP), membrana acrosomal. Bajo el acrosoma, la substancia subacrosomal (SS) comprime al perforatium (P), la envoltura nuclear (flecha) y al núcleo (N). Foto tomada de Scanning Electron Microscopic Atlas of Mammalian Reproduction. Editor E.S.E. HAFEZ.

FOTO 1

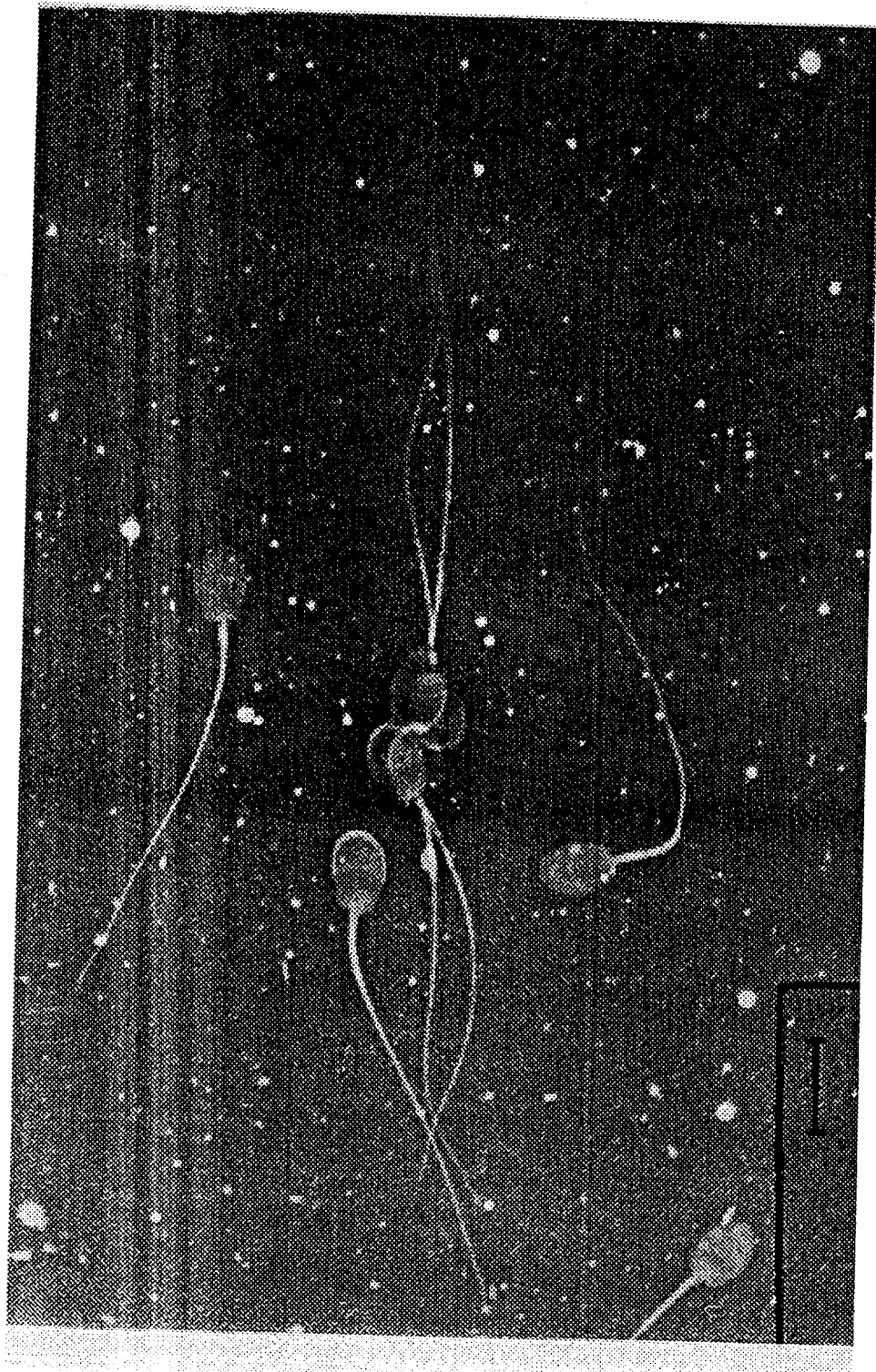


FOTO 2

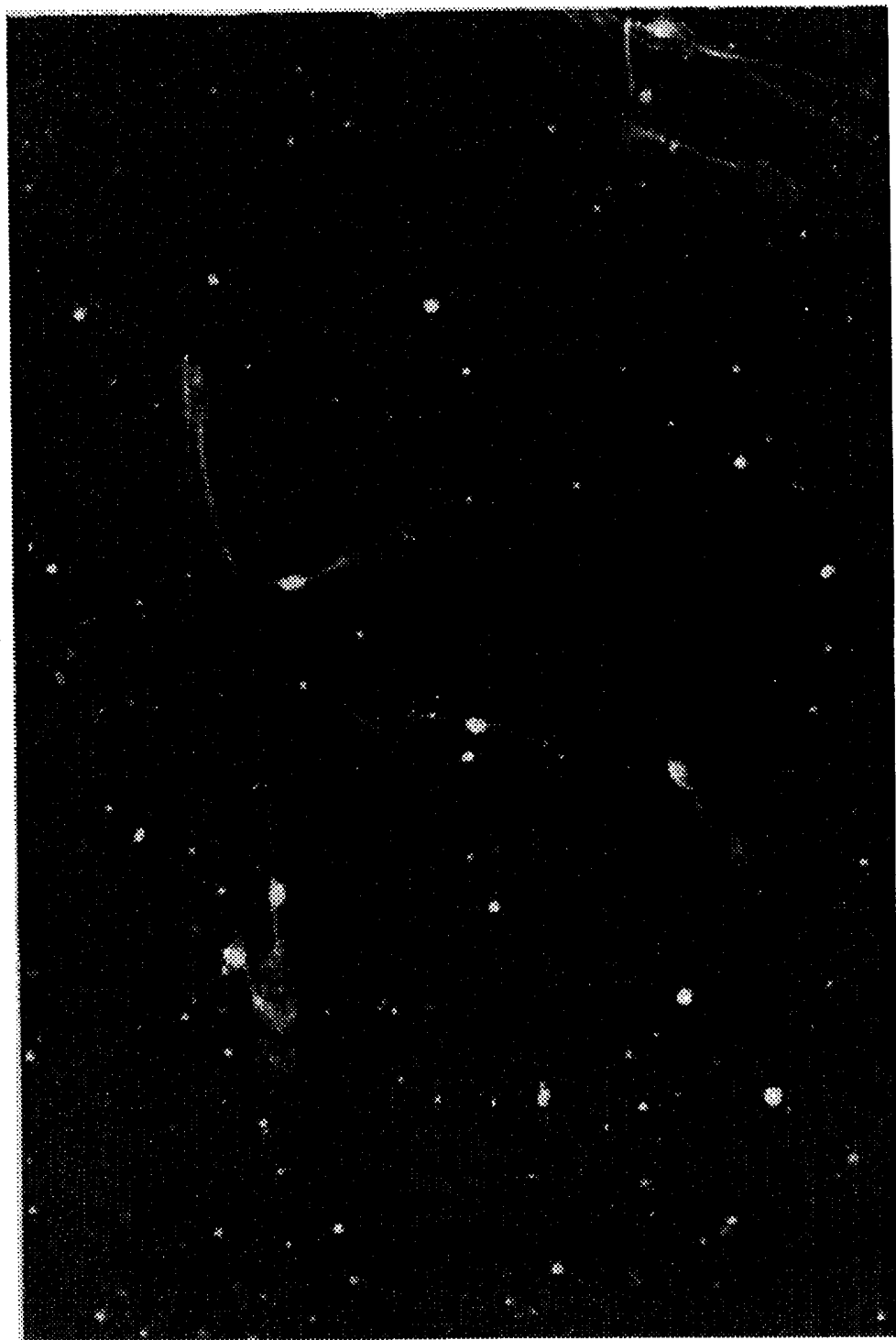




FOTO 3



FOTO 4



W. A. M. I. T. P. A. P. A. R. E. N. T. I. S.

FOTO 5



FOTO 6

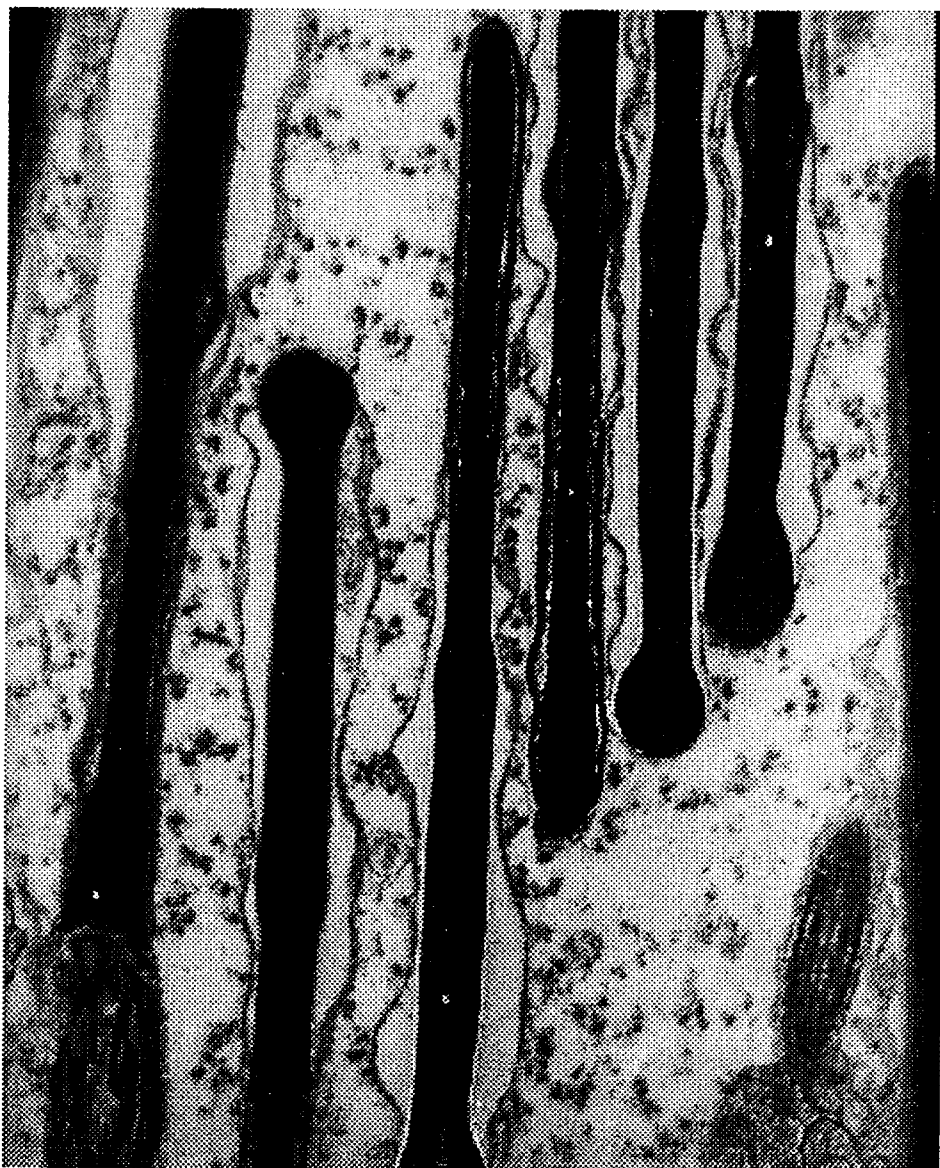


FOTO 8



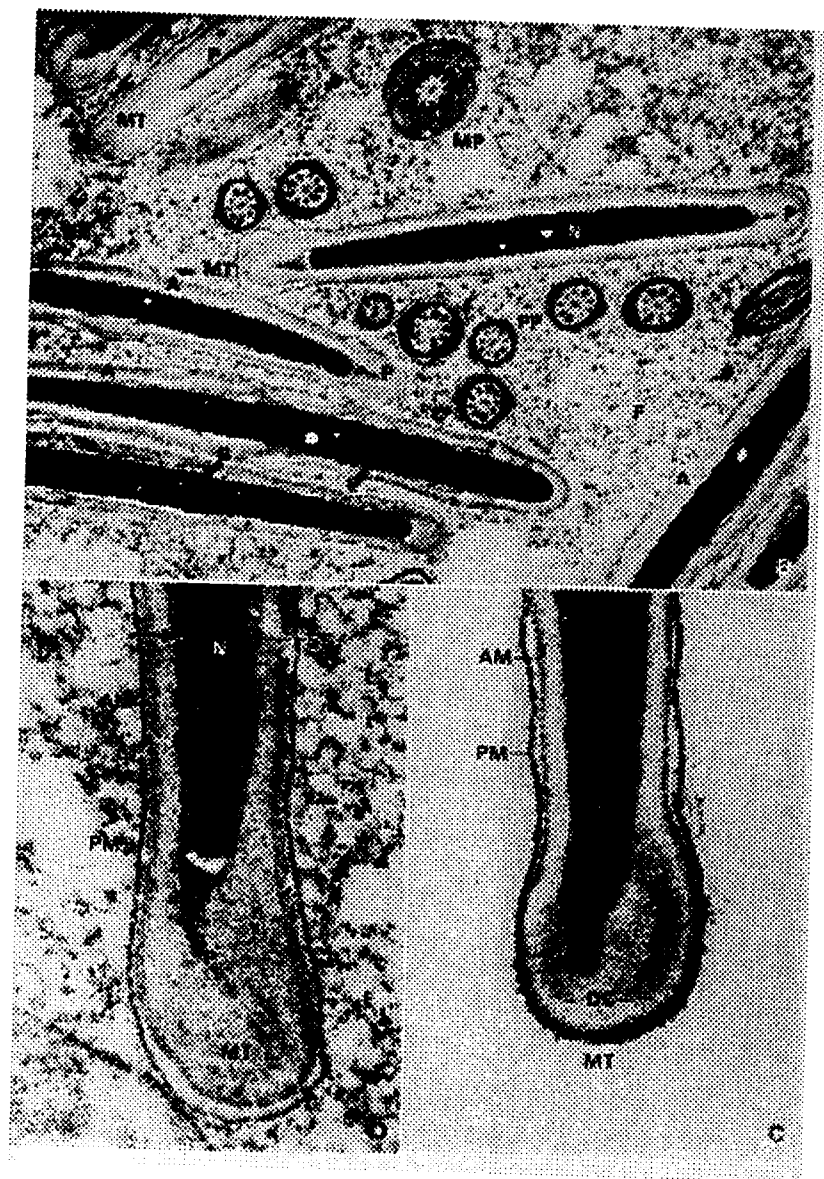
FOTO 9



FOTO 10



FOTO 11



VI. DISCUSIÓN.

Recapitulando la información recopilada sobre el espermatozoide, se considera importante para la discusión resaltar las siguientes consideraciones:

1.- Aunque la ultraestructura del espermatozoide ha sido descrita en una gran variedad de especies de mamíferos, las investigaciones han demostrado considerables variaciones entre las especies particularmente en cuanto a la estructura de la cabeza del espermatozoide, tales diferencias generalmente se debe a la forma y volumen del acrosoma (Fawcett y Phillips 1970). El grado de la variación morfológica del espermatozoide entre diferentes grupos de mamíferos es tan grande que varios investigadores han utilizado la morfología del espermatozoide como característica filogenética. (Harding 1981, Feito 1982, Vitullo 1988, Breed 1985, 1995).

2.- Hafez y colaboradores (1975) hicieron un intento por examinar la morfología del espermatozoide desde el punto de vista taxonómico y establecer o confirmar relaciones filogenéticas basados en las características anatómicas de este; Aunque debido a que pocas especies de todas las existentes han sido estudiadas de este modo, es difícil establecer que existan dichas relaciones filogenéticas. No obstante, para una fácil presentación de las diferencias entre varias especies, crearon cuatro grupos basándose en las características morfológicas del espermatozoide: El grupo 1 comprende los espermatozoides del hombre, gorila y chimpancé, cuya cabeza tiene forma de paleta es plana y su porción posterior es más gruesa que su porción anterior y tiene una depresión en el tercio anterior de la cabeza. El grupo 2 comprende a los monos macaco, ardilla y capuchino cuya cabeza del espermatozoide es de forma similar a la del grupo 1 pero es mas delgada. El grupo 3 se compone del toro, borrego, caballo, cerdo, perro, gato y conejo. La cabeza es ovalada o rectangular relativamente uniforme en su grosor anterior y posterior. El grupo 4 integra a los roedores y tiene el tamaño más grande de espermatozoide en tres o cuatro veces más en relación a los grupos 1, 2 y 3, la cabeza tiene forma de gancho y el núcleo tiene forma de disco.

3.- La cabeza, del espermatozoide contiene al núcleo, cuyo DNA representa el material genético del macho y el acrosoma el cual contiene las enzimas hidrolíticas necesarias para la penetración al ovocito durante la fertilización, la cola o flagelo incluye el cuello donde se unen la fosa de implantación y la cabeza, la pieza media, en la que se ubica la vaina mitocondrial, la pieza principal que contiene a la vaina fibrosa y la pieza terminal. Se han obtenido una gran cantidad de evidencias experimentales que establecen que los espermatozoides en el epididimo sufren una serie de cambios y particularmente estos cambios culminan en la cola del epididimo con la adquisición de una serie de características funcionales y estructurales que le dan al espermatozoide la capacidad de fertilizar al ovocito después de capacitarse en el tracto femenino (Gamer y Hafez 1980); tales características funcionales se asocian con la presencia de la gota citoplasmica, la cual, se piensa, que identifica al espermatozoide inmaduro, no apto para fertilizar.

4.- Por su parte Zaneveld y cols. (1971), Pedersen (1970), MacLeod (1970) demostraron que entre el acrosoma y el núcleo hay material subacrosomal el cual es variable en cantidad y rigidez de su estructura. A este material se le da el nombre de "perforatorio" en vista del papel que desempeña en la mecánica de penetración en el ovocito, aunque también (Fawcett 1970) proporciona evidencia de que sirve para favorecer la unión del acrosoma y el núcleo. **foto 11.**

En base a esto, comparando los espermatozoides del zacatuche con los del conejo doméstico se notan algunas diferencias, empezando por el tamaño de ambas células, ya que si bien el espermatozoide del conejo es más grande en total; el espermatozoide del zacatuche presenta una cabeza de mayor tamaño presentando un menor grado de elongación. El espermatozoide de

zacatuche es similar al del conejo doméstico en cuanto al largo se refiere. Sin embargo, en cuanto al ancho de la cabeza supera a todos los lagomorfos anteriormente descritos.

Como se puede apreciar en la **foto 3**, en el caso del zacatuche el ancho de la cabeza es de $6.0\mu\text{m}$ en comparación con el del conejo que es de $3.9\mu\text{m}$, siendo esta una diferencia significativa. En cuanto al largo de la cabeza la diferencia no es pronunciada ya que en tanto en el zacatuche es de $7.68\mu\text{m}$ en el conejo es de $7.0\mu\text{m}$ y en el largo de la cola las dimensiones son de $44.12\mu\text{m}$ para el zacatuche y de $47.68\mu\text{m}$ para el conejo. **tabla 2**.

Igualmente se puede apreciar la presencia de una región acrosomal con sus regiones, que sin embargo a pesar de ser la misma técnica aplicada en ambos casos, en los espermatozoides de zacatuche destacan con mayor claridad que en los del conejo doméstico. **fotos 1,2,3**.

5.- Por otro lado en las preparaciones de ambas especies es posible apreciar la presencia de la gota citoplasmática que según varios investigadores (Dacheaux 1980, Cupps 1987, Hinting 1990, Katz 1980, 1991) indica un estadio de inmadurez sin embargo a pesar, de que no se puede establecer con certeza una relación de concentración de espermatozoides, si parece importante señalar que esta gota citoplasmática la presentan -de acuerdo a nuestras observaciones- en el caso del conejo doméstico el 44.76% de espermatozoides observados en nuestras muestras y en contraposición en las muestras de zacatuche solamente el 4.47% de los espermatozoides la presentan; con las reservas del caso ello nos hace pensar que en el zacatuche existe un proceso de maduración más acelerado que en el conejo doméstico de forma tal que la mayoría de espermatozoides de zacatuche al abandonar la cola del epididimo están lo suficientemente maduros como para realizar la fertilización del ovocito después de un proceso de capacitación como se señala para todos los mamíferos (Bedford 1967, Brackett 1970, Hunter 1988, White 1990, Dunbar 1991) y ello posiblemente estaría relacionado con la situación o con el hecho de que el zacatuche es una especie silvestre que según observaciones de campo presenta periodos anuales restringidos para su reproducción (DePoorter 1981, López-Formet 1981, Cervantes 1982, Hoth 1989) lo cual obliga a la especie a ser más eficiente para esta etapa de la reproducción restringida por sus condiciones ambientales. **fotos 2,3**.

6.- Tomando la descripción del espermatozoide hecha por Fawcett (1970) (**figura 10**) como modelo típico del espermatozoide de los mamíferos, las características que hemos establecido en el espermatozoide del zacatuche no varía ampliamente del patrón usual.

7.- El espermatozoide de zacatuche tanto en su estructura general como en su ultraestructura presenta en general las mismas características del espermatozoide de casi todos los mamíferos, es decir, en relación a la forma de la cabeza, esta tiene una forma simétrica correspondiendo así a lo reportado para el espermatozoide de los lagomorfos (Phillips y Kalay 1984), presenta acrosoma (con sus segmentos anterior y ecuatorial) de forma simétrica con sus membranas plasmática y acrosomal, y el flagelo compuesto por la pieza de conexión, las piezas media, principal y terminal (**fotos 1,4,6,8**).

8.- En cuanto a las estructuras de dichas células encontramos la presencia de las membranas acrosomales interna y externa y de la membrana nuclear pero se da la existencia de una diferencia significativa, ya que en tanto los espermatozoides de conejo presentan una estructura reportada en la literatura (Baccetti 1980) llamada "perforatorio" que se localiza en el extremo anterior del núcleo; concretamente entre este y el acrosoma, en los espermatozoides de zacatuche no se puede determinar dicha estructura como se observa en las **fotos 7,8**.

9.- Por nuestras observaciones de la ultraestructura del espermatozoide de la cola del epididimo de zacatuche al compararlas con las referidas para la misma especie por otros investigadores (Hafez 1975), podemos establecer la existencia de una similitud cercana ya que en ambos casos se pueden observar las mismas estructuras ordenadas de igual forma, se puede observar en el cuello la presencia de la fosa de implantación, la zona de las columnas segmentadas, el capitulum, las fibras densas externas, el axonema con su típico arreglo $9 + 2$ de microtúbulos y la vaina mitocondrial, esta coincidiendo con lo reportado en la literatura acerca del alto grado de uniformidad en la organización forma y tamaño de las mitocondrias (Fawcett 1965, Phillips 1970, 1977). fotos 4,5,6,8,9,10 y 11.

10.- Por lo tanto después de lo antes referido se concluye que al igual que en otros grupos, la similitud del espermatozoide del zacatuche sigue en el sentido estricto la misma organización del conejo doméstico y de otros mamíferos, es decir, el espermatozoide obtenido de la cola del epididimo tiene todas las propiedades morfológicas del espermatozoide maduro, por lo que se puede utilizar la tecnología de la reproducción animal asistida como auxiliar en el aumento de la diversidad genética de los animales en cautiverio asegurando la permanencia de la especie.

11.- Las principales razones por la que solo se utilizó un espécimen de Romerolagus diazi fueron en primer lugar, que debido a que se estudiaron parámetros de los cuales no se espera una variación importante en individuos de la misma especie tal como se aprecia en la literatura (Cummins y Wodall 1985) no se consideró necesario ampliar el número de ejemplares utilizados, sobre todo cuando otra de las razones fue que por ser una especie en peligro de extinción se prefirió no incidir negativamente sobre la población existente en su reducido hábitat.

BIBLIOGRAFIA

- Aitken R.J., Buckingham D., West K., Wu F.C., Zikopoulos K., Richardson D.W. 1992 Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to a generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. *Journal of Reproduction and Fertility* 94: 451-462.
- Angermann, R.J., Flux, E.C., Chapman, J.A., Smith, A.T. 1990 Lagomorpha classification en Rabbits, hares and pikas. Status survey and conservation action plan. IUCN- The World Conservation Union and World Wide Fund for Nature, Gland, Suiza.
- Baccetti B., Afzelius B.A. 1976 The biology of the sperm cell. Karger, Basel.
- Baccetti B., Biglardi E., Burrini A. 1980 The morphogenesis of vertebrate perforatum. *J Ultrastruc. Res.* 71: 272 - 287.
- Baccetti B., Selmi M.G., Salami P. 1984 Morphogenesis of "decapitated" spermatozoa in a man. *Journal of Reproduction and Fertility* 70: 395 - 397.
- Baker H.W.G., Murray F.T., Jefferson L.S., Li J., Bardin C.W. 1980 Perfusion of accessory sex organs and testes. en *Male Accessory Sex Glands*. Spring-Mills y E.S.E. Hafez editores. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. E.U.
- Bedford J.M. 1967 Effects of duct ligation on the fertilizing ability of spermatozoa from different regions of the rabbit epididymis. *J. Exp. Zool.* 166: 271- 282.
- Bedford J.M., Rodger J.C., Breed W.G. 1984 Why so many mammalian spermatozoa - a clue from marsupials. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 221: 221 - 233
- Boyers S.P., Davis R.O., Katz D.F. 1989 Automated semen analysis. In current problems in obstetrics and gynecology and fertility. R.L. Barbieri, De. 12: 167 - 200 Year Book Medical Publishers, Inc. New York, E.U.
- Breed W.G., Innis R.W. 1985 Variations in sperm morphology of Australian Vespertilionidae and its possible phylogenetic significance. *Mammalia* 49: 105 - 108.
- Brackett B.G., Server J.B. 1970 Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus. *Fertility and Sterility* 21: 687- 695.
- Cervantes F.A. 1982 Observaciones sobre la reproducción del zacatuche o teporingo *Romerolagus diazi* (Mammalia Lagomorpha). *Doñana Acta Vertebrata* 9: 416-420.
- Cervantes F.A., Lorenzo C., Hofmann R.S. 1990 *Romerolagus diazi*. *Mammalogy Species*, 369: 1-7.
- Corbet, G.B. 1983 A review of classification in the family Leporidae. *Acta Zoológica Fennica* 174: 11-15.

- **Chapman, J.A., Flux, E.C.** 1990 Introduction and Overview of the Lagomorphs. En Rabbits, hares and pikas. Status survey and conservation action plan. IUCN- The World Conservation Union and World Wide Fund for Nature, Gland, Suiza.
- **Chavarría M.E.** 1995 Bases bioestructurales del espermatozoide humano fértil. CINVESTAV México.
- **Chavarría M.E., Reyes A.H., Rosado A.** 1992 Capacitation and acrosome reaction of human spermatozoa an assisted reproduction approach. Arch. Med. Res. 23 - 83.
- **Cooper T.** 1990 In defense of human epididymis. Fert. Steril. 54 965 - 975.
- **Court M.** 1983 The male in farm animal reproduction. Institut National de la Recherche Agronomique FRANCE.
- **Cummins J.M.** 1983 Sperm size, body mass and reproduction in mammals. En The Sperm Cell J. Andre Editor Martinus Nijhoff, The Hague.
- **Cummins J.M., Woodall P.T.** 1985 On mammalian sperm dimensions. Journal of Reproduction and Fertility 75; 153 - 175.
- **Cups T. Perry Ed..** 1987 Reproduction in domestic animals 4a. ed. Academic Press E.U.
- **Dacheaux J.L., Paquignon M.M.** 1980 Relations between the fertilizing ability, motility and metabolism of epididymal spermatozoa. Reprod. Nutr. Dev. 20; 1085 - 1094.
- **Dawson, M.R.** 1958 Later tertiary Leporidae of North America. Vertebrata 6: 1-75. University of Kansas Paleontological Contributions.
- **De Poorter M., Van der Loo W.** 1981 Report on the breeding and behaviour of the volcano rabbit at the antwerp Zoo. Poroc. World Lagomorph. University Guelph, Ontario, Canada 1979 956-972.
- **Dobrinz E.Z., Overstreet J.W.** 1992 Natural history of mammalian spermatozoa in the female reproductive tract. En Milligan SR, de. Oxford Review of Reproductive Biology. Vol 14. New York: Oxford University Press 1- 45.
- **Edy E.M., O'brien D.A.** 1994 The Spermatozoon. in The Phisiology of Reproduction. Cap 2 Raven Press New York, E.U.
- **Fawcett D.W.** 1965 The fine structure of bat spermatozoa. Am. J. Anat. 116: 567 - 610.
- **Fawcett D.W.** 1970 A comparative view of sperm ultrastructure. Biology of Reproduction Sup 2: 90-127.
- **Fawcett D.W.** 1975 The Mammalian Spermatozoon. Dev. Biol. 44; 394-398.
- **Fawcett D.W.** 1992 Tratado de Histología 11a. Ed. ed. Interamericana.
- **Feito R., Gallardo M.** 1982 Sperm morphology of Chilean species of Ctenomys (Octodontidae). J. Mamm. 63: 658 - 661.

- **Fondo de Cultura Económica.** 1996 Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat. Alejandro Velázquez, Francisco J. Romero, Jorge López-Paniagua. Compiladores. México D.F.
- **Fouquet J.P.** 1991 La construcción del espermatozoide. *Mundo Científico* vol. 10 número 106 994-996.
- **Galindo-Leal, G.** 1993 Estrategia general para el manejo de los parques nacionales en México. Dirección de Áreas Protegidas, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH) México.
- **Garner R., Hafez E.S.E.** 1980 Reproduction in farm animals E.S.E. Hafez editor. 4ª. Edición Lea Fabiger Philadelphia E.U.
- **Gould K.G., Martin D.E., Hafez E.S.E.** 1975 Mammalian Spermatozoa. en *Scanning electron microscopic atlas of Mammalian Spermatozoa*. Editor E.S.E. Hafez Tokio, Japon.
- **Green A.J., Dryden G.L.** 1976 Ultrastructure of epididymal spermatozoa of the Asiatic Musk Shrew, *Suncus murinus*. *Biology of Reproduction* 14: 327 - 331.
- **Guraya S.S.** 1987 *Biology of Spermatogenesis and Spermatozoa in Mammals*. Springer Verlag Berlin - Heidelberg.
- **Hamilton D.W.** 1980 UDP- galactose: N-acetylglucosamine galactosyltransferase in fluids from rat testis and epididymis. *Biology of Reproduction* 23: 377-385.
- **Harding H.R., Carrick F.N., Shorey D.C.** 1981 Marsupial phylogeny: New indications from sperm ultrastructure and development in *Tarsipes spenserae*. *Search* 12: 45 - 47.
- **Herrera, A.** 1987 Notas críticas acerca del *Romerolagus nelsoni*. *Naturaleza*, 2 (3) : 34-37.
- **Hibbard, C.W.** 1963 The origin of the P3 pattern of *Sylvilagus*, *Oryctolagus* and *Lepus*. *Journal of Mammalogy* 44: 1-15.
- **Hinting, et al.** 1990. Value of sperm characteristics and their result of in vitro fertilization for predicting the outcome of assisted reproduction. *Int. J. Androl* 13; 59 - 66.
- **Honaky, J.H., Kinman, K.E., Koepl, J.W.** 1982 *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Allen Press y The Association of Systematic Collections, Lawrence Kansas.
- **Hoskins D.D., Brand T., Acott T.S.** 1978 Initiation of sperm motility in the mammalian epididymis. *Fed. Proc.* 37; 2534.
- **Hoth J., Granados H.** 1987 A preliminary report on the breeding of the volcano rabbit or teporingo.

- Hunter R.H.F. 1980 Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals. New York: Academic Press.
- Karnovsky. 1971 11th. Annual meeting of the American Society for Cell Biology. American Society for Cell Biology New York E.U.
- Katz D.F. 1991 Characteristics of sperm motility. in The male germ cell. spermatogonium to fertilization. Editor Bernard Robaire. Annals of the New York academy of Sciences. Volumen 637 New York E.U.
- Katz D.F., Cherr G.N., Lambert H. 1986 The evolution of hamster sperm motility during capacitation and interaction with the ovum vestments in vitro. Gamete Research 14: 333-346.
- Katz D.F., Drobins E.Z., Overstreet J.W. 1989 Factors regulating mammalian sperm without outer dynein arms. Journal of submicroscopic cytology 15: 67 - 71.
- Katz D.F., Overstreet J.W. 1980 Mammalian sperm movement in the secretions of the male and female genital tracts. En Testis Development, Structure and Function A. Steinberg Editor. Raven Press. New York E.U.
- Kretser D.M., Kerr J.B. 1994 The cytology of the testis . in The Physiology of Reproduction. Cap. Raven Press New York E.U.
- Liu D.W., Baker H.W.G. 1990 Relationships between human sperm acrosin, acrosome, morphology and in vitro fertilization. Human Reproduction 5: 298 - 303.
- López-Forment C.W., Cervantes F. 1981 Preliminary observations on the ecology of *Romerolagus diazi* in México. Proc. World Lagomorph Conf. University Guelph Ontario, Canada 1979 949-955.
- MacLeod J. 1970 The significance of deviations in human sperm morphology. En The human testis. E Rosenberg De. Plenum press. New York E.U.
- Matsuzaki T., Saito N., Kamiya M. 1982 Breeding and rearing of the volcano rabbit (*Romerolagus diazi*) in captivity. Exp. Anim., 31: 185-188.
- Miller. G.S. 1911 The Volcano rabbit of Mt. Iztaccihuatl. Proceedings of the biological society of Washington 24: 228-229.
- Monroy A., Rosati F. 1983 A comparative analisis of sperm - egg interaction. Gamete Research 7: 85 - 102.
- Morton E.B., Sagadraca R., Fraser C. 1978 Sperm motility within the mammalian epididymys: Species variation and correlation with free calcium levels in epidymal plasma. Fert. Steril. 29 695 - 698.
- Myers, N. 1988 Threatened biotas: hot spots in tropical forest. The Enviromentalist 8(3): 187-208.

- Nagai T., Niwa K., Iritani A. 1984 Effect of sperm concentration during preincubation in a defined medium of fertilization in vitro of follicular oocytes. *Journal of Rep. and Fertility* 70; 271-275.
- O'rand M.G.J., Emery J., Welch J.E., Fisher S.J. 1984 Zona binding proteins of mammalian spermatozon. *J. Cell Biol.* 99 395a.
- Orgebin-Crist. 1981 Epididymal physiology and sperm maturation. *Prog. Reprod. Biol.* 8; 80 - 89.
- Oura C. 1971 The ultrastructure and development of the neck region of the golden hamster spermatozoon. *Monitore Zool. Italia* 5; 253-264.
- Overstreet J.W. 1983 Transport of gametes in the reproductive tract of the female mammal. En: Hartmann JF, de. Mechanism controlling animal fertilization. New York Academic Press. 499- 543.
- Parks J.E., Hammerstedt R.H. 1985 Developmental changes occurring in the lipid of ram epididymal sperm plasma membranes. *Biology of Reproduction*. 32: 653- 668.
- Pedersen H. 1970 Ultrastructure of the ejaculated human sperm. En *Comparative spermatology*. Baccetti B. De. Academic press. New York E.U.
- Pérez Peña E. 1995 Infertilidad, Esterilidad y Endocrinología de la Reproducción. 2a. edición. Salvat. México.
- Phillips D.M. 1970 Ultrastructure of spermatozoa of the wooly oposum *Caluromys philander*. *J. Ultrastruct. Res.* 33: 381 - 397.
- Phillips D.M. 1977 Mitochondrial disposition in mammalian spermatozoa. *J. Ultrastruct. Res.* 58: 144 - 154.
- Phillips D.M., Dryden L.G. 1991 Comparative Morphology of Mammalian Gametes en *A comparative overview of mammalian fertilization* Eds. Dunbar B.S. O'Rand M.G. Plenum Press N.Y. E.U.
- Phillips A., Kalay A. 1984. Observations on mechanisms of flagellar motility deduced from backwards swimming bull sperm. *J. Exp. Zool.* 231: 109 - 116.
- Pillsbury N. Electron Microscopy Cap. 19 en *Theory and practice of Histotechnology*. Ed. Sheehan C. Deza C.V. Moseby Company. St. Louis Missouri E.U.
- Robaire H. 1988 Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. en: *The physiology of reproduction Vol. 2* De. Raven Press, New York, E.U.
- Rodríguez A.J., Rico M.A. 1980 *Apuntes de Morfología y Fisiología Animal*. Universidad Politécnica de Madrid. España.
- Rojas, P.M. 1951 Estudio biológico del conejo de los volcanes (género *Romerolagus*) (Mammalia: Lagomorpha), Tesis de licenciatura , Facultad de Ciencias , UNAM, México.

- **Romero F.J., Velázquez A.** 1994 El conejo zacatuche, Tan lejos de Dios y tan cerca de la Cd. de México. Consejo Nacional de la Fauna.
- **Rosado A., Hernández O.** 1988 Biología Molecular del Espermatozoide Humano. Ciencia 39: 249 - 260.
- **Schlegel R.A., Hammerstedt R., Cofer G.P., Kozarsky K.** 1986 Changes in the organization of the lipid bilayer of the plasma membrane during spermatogenesis and epididymal maturation. Biology of Reproduction 34: 379- 391.
- **Seki N., Tomaya Y., Nagano T.** 1992 Changes in the distribution of filipin-sterol complexes in the boar sperm head plasma membrane during epididymal maturation and in the uterus. Anat. Rec. 232. 221- 230.
- **Setchell B.P.** 1977 Male reproductive organs and semen. en Cole, H.H. y Cupps P.T. editores. Reproducción de los animales domésticos . Acad. Press, Nueva York E.U. 229-256.
- **Shalgi R., Kaplan R., Nebel L., Kraicer P.F.** 1981 The male factor in fertilization of rat eggs in vitro. J. Exp. Zool: 217; 399 - 402.
- **Suzuki F.** 1988 Changes in the distribution of intramembranous particles and Filipin-sterol complexes during epididymal maturation of golden hamster spermatozoa. J. Ultrast. Mol. Struct. Res. 100: 39- 54.
- **Toledo, V.M.** 1988 La diversidad biológica en México. Ciencia y Desarrollo, CONACYT México 81 vol. XIV 17-30.
- **Turner T.T. Reich G.W.** 1985 Cauda epididymal sperm motility: A comparison among five species. Biology of Reproduction 32 ; 120 - 128.
- **Turner T.T.** 1991 Spermatozoa are exposed to a complex microenvironment as they traverse the epididymis. en The male germ cell: spermatogonium to fertilization. De. Robaire B. New York academy of sciences, Nueva York, E.U.
- **Velázquez A., Cervantes, F.A., Galindo-Leal C.** 1993 The volcano rabbit *Romerolagus diazi* a peculiar lagomorph. Lutra Vol. 36; 62-70.
- **Vitullo A.D., Roldan E., Marani M.** 1988 On the morphology of spermatozoa of tuco-tucos *Ctenomys* (Rodentia: Ctenomyidae): New data and its implications for the evolution of the genus . J. Zool. Lond. 215: 675 - 683.
- **Ward W.S., Coffey D.S.** 1991 DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. Biology of Reproduction. 44; 569 - 574.
- **White I.G., Kar A.** 1973 Aspects of the physiology of sperm in the female genital tract. Contraception : 183- 194.
- **Yanagimachi R.** 1995 Mammalian Fertilization. in The Physiology of Reproduction. Cap. 5 Vol. 1 Raven Press New York, E.U.

- **Zamboni L.** 1987 The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: The role of electron microscopy in the evaluation of semen quality. *Fertility and Sterility* 48 5; 711 - 734.
- **Zamboni L.** 1992 Sperm structure and its relevance to infertility. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116; 325.
- **Zamboni L., Stefanini M.** 1973 The fine structure of the neck of mammalian spermatozoa. *J. of Cell Biology*. 58: 662-675.
- **Zaneveld L., Gould K., Humphreys W., Williams W.** 1971 Scanning electron microscopy of mammalian spermatozoa *J. Reprod. Med* 6:147.