

T
5 11

90879

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Casa Abierta al Tiempo

MORFOLOGÍA Y MORFOMETRÍA ULTRAESTRUCTURAL DEL
ESPERMATOZOIDE EPIDIDIMARIO DE ZACATUCHE (*Romerolagus diazi*).

T E S I S

Que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Presenta

JOSÉ LUIS CONTRERAS MONTIEL

DIRECTORA DE TESIS

DRA. REYNA CARMEN FIERRO PASTRANA

ASESORES:

DR. MIGUEL BETANCOURT RULE

DR. CARLOS BEYER FLORES

México, D. F.

Diciembre de 2004.

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT, y cuenta con el apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93.

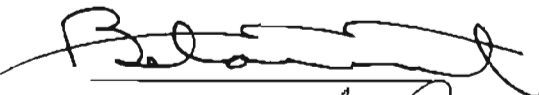
El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
de las Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presentó

JOSÉ LUIS CONTRERAS MONTIEL

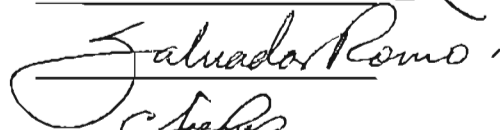
El día 16 de diciembre de 2004

Sinodales:

Dr. Miguel Betancourt Rule (Presidente)



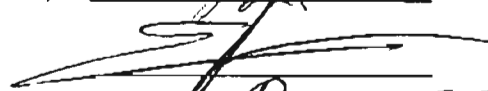
Dr. Salvador Romo García (Secretario)




Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana (Vocal)



Dr. Elia Roldán Reyes (Vocal)



Dr. Rubén Román Ramos (Vocal)



COMITÉ TUTORIAL

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana

Profesor Titular C, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I.

ASESORES:

Dr. Miguel Betancourt Rule

Profesor Titular C, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel II.

Dr. Carlos Beyer Flores

Director del CIRA, CINVESTAV-Universidad Autónoma de Tlaxcala

Investigador Emérito del Sistema Nacional de Investigadores

SINODALES:

Dra. Elia Roldán Reyes

Profesor Titular A, FES-Zaragoza

Universidad Nacional Autónoma de México

Dr. Salvador Romo García

Profesor Titular B, FES-Cuauhtitlán

Universidad Nacional Autónoma de México

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Reyna Carmen Fierro Pastrana y a los demás miembros del jurado: Dr. Miguel Betancourt Rule, Dr. Carlos Beyer Flores, Dra. Elia Roldán Reyes, Dr. Salvador Romo García y Dr. Rubén Román Ramos.

A los doctores Humberto González Márquez, Jorge Lodigiani y José Sepúlveda.

A todos los que directa o indirectamente me apoyaron para la realización de este trabajo, especialmente a María de Lourdes Ferrat Palacios, Odille Contreras Ferrat, Luis Gabriel Contreras Ferrat, José Luis Contreras Ferrat y Laura Barreiro.

Resumen

Existen pocas referencias de las características del espermatozoide de *Romerolagus diazi* o zacatuche, conejo mexicano, considerado primitivo y en peligro de extinción. El objetivo del presente estudio fue realizar la morfometría ultraestructural de sus espermatozoides de cola de epidídimo para ampliar el conocimiento sobre su biología reproductiva y la de los lagomorfos en general para establecer un patrón de referencia. Se capturaron dos ejemplares de zacatuche y de ellos se obtuvieron muestras de la cola del epidídimo. Las muestras se procesaron para ser analizadas por microscopía electrónica. Se midieron los elementos de la cabeza y el diámetro del flagelo de los espermatozoides. Los promedios de algunas de las mediciones son: longitud de la cabeza 7.441 μm , grosor de la base de la cabeza 0.632 μm , longitud del núcleo 6.250 μm , grosor de la base nuclear 0.540 μm , gota citoplasmática (eje mayor) 2.597 μm , gota citoplasmática (eje menor) 1.442 μm , diámetro pieza media 0.704 μm , diámetro pieza principal 0.423 μm , diámetro pieza terminal 0.372 μm . En este trabajo se estableció una caracterización fina del espermatozoide de zacatuche, como una aportación original. Los resultados muestran que la morfometría puede ser usada para caracterizar la morfología del espermatozoide y que estos datos podrían ser usados como un patrón para trabajos futuros de comparación.

Palabras clave: microscopía electrónica, conejo, espermatozoides, epidídimo, morfología, morfometría.

Abstract

Sperm characteristics of *Romerolagus diazi*, an endemic endangered rabbit from Mexico's Highlands are poorly known. Knowledge of gamete characteristics are urged for any conservation-oriented strategy and morphometry-based taxonomical database. Sperm lagomorph comparisons have been made at light microscopy resolution. Our goal was to analyze the ultrastructure of the *R. diazi* male gamete. Two wild animals were kept in captivity and the epididymus were obtained. Fixed gametes show a characteristic spatula-like morphology with a dilated forefront. The nucleus has an arrow head morphology lightly thicker at the base. Tail ultrastructure is similar to that of laboratory rabbits with an end piece thicker than that of human sperm. Morphometry data could be used for construction of a male gamete data base for further studies.

Key words: electron microscopy, rabbit, epididymal sperm, morphology, morphometry.

Índice

Introducción.....	9
Antecedentes.....	14
Justificación.....	22
Objetivo General.....	23
Objetivos Particulares.....	23
Material y Método.....	24
Resultados.....	30
Discusión.....	43
Conclusiones.....	48
Referencias Bibliográficas.....	49



Introducción

El proceso de la fertilización inicia con la unión del óvulo con el espermatozoide, continúa con la aproximación de los núcleos o pronúcleos del espermatozoide y del ovocito en el citoplasma del ovocito, para terminar constituyendo su unión e iniciar así la embriogénesis (Austin, 1976; Schatten, 1988). La importancia del espermatozoide se destaca al considerar su participación en la fertilización de los óvulos, ya que durante ésta el espermatozoide aportará el juego complementario de cromosomas para que, al iniciarse la embriogénesis, los blastómeros cuenten con el estado diploide de la fórmula cromosómica de la especie; por lo que en este proceso sólo podrá entrar al citoplasma del ovocito un núcleo espermático, iniciándose con ello la activación del ovocito (Schatten, 1988).

Los espermatozoides son producto del proceso evolutivo, de tal modo que en los mamíferos, los espermatozoides reúnen las características estructurales celulares que les van a permitir cumplir con la función de la fertilización, para la cual el espermatozoide debe cubrir distancias de gran magnitud. Debe orientarse en su desplazamiento en dirección del ovocito. Al alcanzarlo debe pasar a través de las barreras que lo rodean, que en los mamíferos las constituyen las células de la corona radiada y la zona pelúcida, para finalmente unir sus membranas con las del ovocito e incorporarse al citoplasma de éste (Schatten 1988).

Aceptando que la vida se origina en el mar y que de él proceden las formas de animales que llegan a poblar la tierra firme, entonces es ahí de donde se puede partir para bosquejar las principales características, sus transformaciones y adaptaciones,

que se dan en el proceso de evolución del espermatozoide animal, las cuales básicamente se orientan a disponer de algunos de los componentes constantes en las células, para que éstos participen en la introducción de su núcleo en otra célula; ello en circunstancias que representan las cuatro formas actuales de fertilización: externa en medio acuático; interna, indirecta o directa, en un ambiente acuático; interna indirecta en un ambiente terrestre por medio de espermatóforos y, por último, la interna directa terrestre, llevada a cabo a través de la cópula (Baccetti, 1986).

La fertilización externa que presentan los invertebrados marinos, que es considerada como la forma más primitiva, es llevada a cabo por un espermatozoide que presenta las características constantes en casi todos los espermatozoides: un cuerpo celular que contiene al núcleo; una cola o flagelo vibrátil que lo impulsa y desplaza en el líquido que rodea al organismo y que es su hábitat natural; una especie de capuchón que rodea en un extremo al núcleo y que constituye al acrosoma o, al menos están presentes unas vesículas como ocurre en los metazoarios más primitivos, en los poríferos y algunos cnidarios (Baccetti, 1986). También presentan la estructura filamentosa llamada *perforatium* que en el momento de la penetración del ovocito, se proyecta hacia adelante perforando la membrana del acrosoma. Además, presenta algunas mitocondrias, dos centriolos rodeados por un aparato de soporte y el respectivo axonema, derivado éste del centriolo distal y que constituye el alma en el flagelo propulsor (Fawcett, 1975).

Con las características citadas del espermatozoide de los invertebrados marinos, se integra un prototipo que guarda enorme semejanza con los espermatozoides de otros grupos taxonómicos, particularmente en la disposición de

los elementos y variando, principalmente, en aspectos de forma y dimensiones (Austin, 1976).

La excepción al prototipo mencionado son los espermatozoides de algunos grupos, en los cuales hay modificaciones bastante más importantes tales como, por ejemplo, la sustitución del desplazamiento flagelar por el ameboideo, como se presenta en los nemátodos, algunos platelmintos, en teleósteos, poliquetos y muchos crustáceos; el estado de enquistamiento como ocurre con los espermatozoides en los espermatóforos de muchos artrópodos o la ausencia de *perforatium* en ácaros y algunos insectos y, particularmente, en el grupo passerine de las aves y casi todos los mamíferos donde presentan algo similar a un *perforatium* (Baccetti, 1986).

Se puede afirmar que los espermatozoides de los diferentes grupos animales siguen, en su organización, un patrón general común, y que las diferencias entre ellos van a estar dadas por ligeras variaciones en la forma de su cuerpo celular y en la disposición de algunas de sus estructuras (Figura 1) (Hafez, 2002).

Los interesados en la conservación y preservación de la biodiversidad perciben como principal preocupación a las especies amenazadas o en peligro de extinción. Tal preocupación nace, entre otras razones, de la dificultad que se tiene para regular el uso de los recursos naturales y, además, por el desconocimiento existente con respecto a las especies que constituyen la biodiversidad, particularmente en cuanto a sus aspectos biológicos y las relaciones morfofisiológicas y evolutivas que puedan existir entre ellos. Esto constituye una gran limitante pues restringe las decisiones acertadas para su conservación y posible aprovechamiento sustentable.

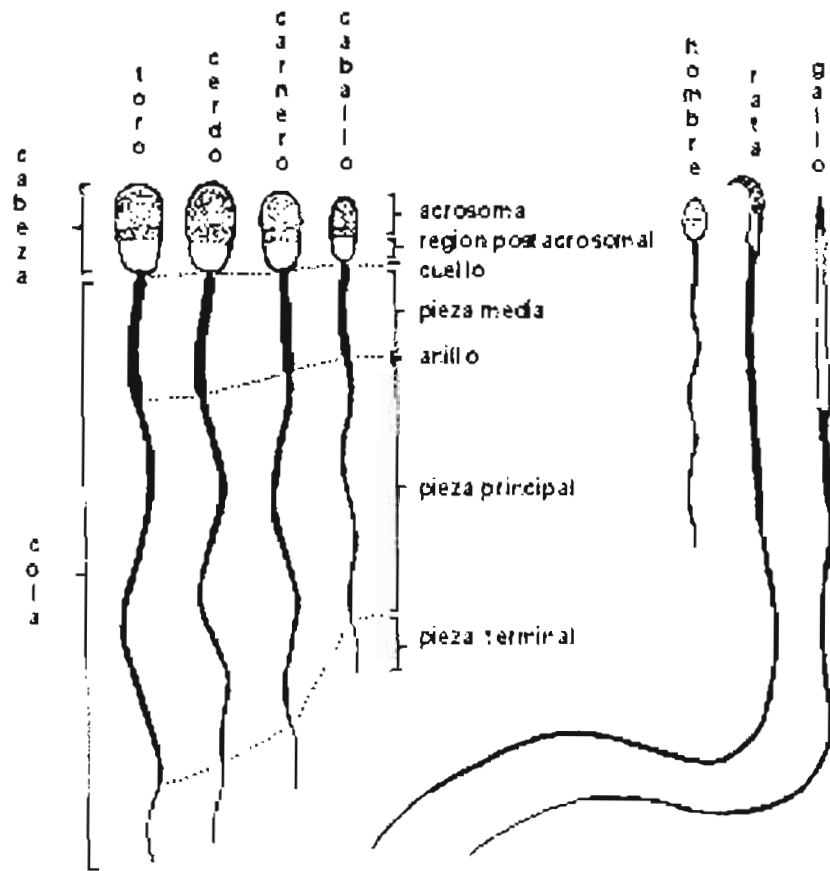


Figura 1.- Arriba, esquema de la forma y dimensión relativa de los espermatozoides de varias especies. Todos presentan las mismas estructuras con variaciones en la forma, tal es el caso, por ejemplo, del acrosoma y la región postacrosomal en la cabeza; en el flagelo, la pieza media, pieza principal y pieza final (Hafez, 2002).

La posibilidad de establecer similitudes y diferencias entre espermatozoides pertenecientes a diferentes taxa está dada, principalmente por las características más sobresalientes y constantes de forma y dimensión. Con ellas se han constituido clasificaciones que agrupan a los espermatozoides de primates y roedores (Austin, 1976; Cummins y Woodall, 1985; Gould *et al.*, 1975), de lagomorfos (Flechon, 1975) y de eucéstodos (Jean-Lou, 1998).

Para realizar comparaciones interespecíficas o intraespecíficas es necesario recurrir a aspectos de los espermatozoides como la forma y dimensiones de sus componentes. Se han realizado estudios sobre morfología de la membrana plasmática y del acrosoma (Bearer y Friend, 1990; Barthelemy *et al.*, 1990; Bayard, 1991), cabeza y núcleo (Pogany y Linder, 1993), y del axonema (Zavos *et al.*, 1998).

En cuanto a los lagomorfos mexicanos, son escasas las referencias que se tienen respecto a las características de sus espermatozoides y sólo se cuenta con las de algunas especies obtenidas a través de microscopía de luz (Cummins y Woodall, 1985, Ambriz *et al.*, 2003); esto impide establecer algún tipo de comparación sistematizada en cuanto a las características de sus espermatozoides, sobretodo en el caso particular del zacatucho, del cual hay escasez de información.

Antecedentes

El *Romerolagus diazi* es reportado por primera vez en el año de 1893 (Díaz, 1893), al ser capturados unos ejemplares en las faldas del Volcán Iztaccihuatl, en las inmediaciones de San Martín Texmelucan, Puebla.

Este conejo mexicano, es conocido también con los nombres comunes de conejo de los volcanes, volcano rabbit, teporingo, tepolito, conejo enano, chincolo, y el nombre ancestral de zacatucho (del náhuatl: zacatl, zacate (hierba gramínea macollada) y tochtli, conejo (conejo del zacatonal) (Figura 2).



Foto: José Luis Contreras Montiel

Figura 2.- Ejemplar de zacatucho (*R. diazi*) en semicautiverio en la reserva de San Cayetano de la Dirección de Fauna Silvestre, en el Estado de México.

El zacatucho o *R. diazi*, es una especie endémica del Eje Volcánico Transversal de México donde se le encuentra en estado silvestre en parte de la misma cadena volcánica, por encima de los 3000 metros sobre el nivel del mar, en bosques de zacatón-pino con piso de roca volcánica (Cervantes, 1980; Velázquez et al., 1996) (Figura 3).

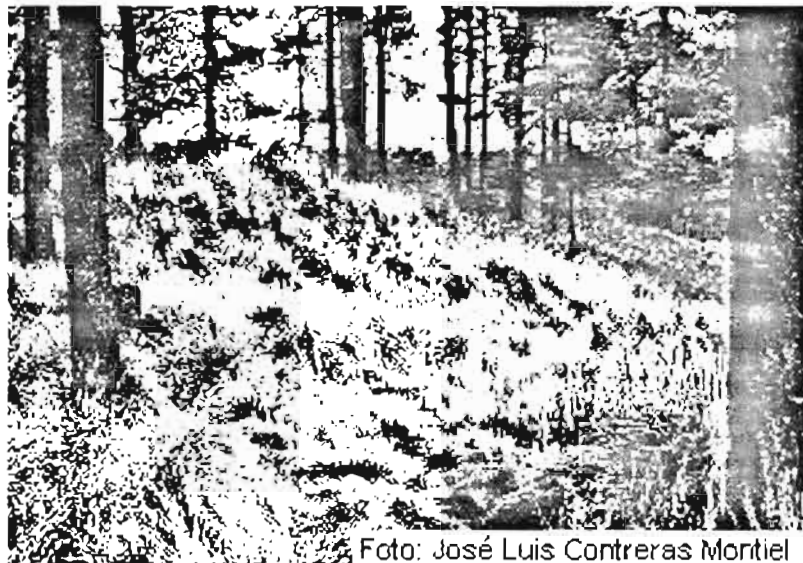


Figura 3.- Hábitat del zacatucho: asociación de pino, zacatón y suelo de origen volcánico.

Es considerado un conejo primitivo con características que lo relacionan con las especies *Pronolagus* y *Pentalagus*, y más cercano filogenéticamente al género *Lepus* (liebres) que al de *Sylvilagus* (conejos americanos). De él se conocen aspectos ecológicos y algunos de su biología reproductiva (Cervantes, 1980;

Velázquez *et al.*, 1996) pero hay muy pocas referencias en cuanto a sus gametos (Cummins y Woodall, 1985, Ambriz *et al.*, 2003).

Durrell y Mallinson (1968), al igual que Leopold (1985), menciona que los zacatuches viven en galerías que tienen varias salidas de escape. Cervantes (1979) reporta haberlos encontrado en madrigueras de tuzas, entre rocas, resumideros, peñas y raíces, pero también menciona haberlos encontrado en madrigueras propias.

Existen dos lugares en donde se han tenido colonias de zacatuche en semicautiverio; uno en la Estación de San Cayetano de la Dirección de Fauna Silvestre, en el Estado de México, y otro en el Zoológico de Zacango donde se intentó establecer una colonia. En ambos casos no se encontraron rastros de que cavaran madrigueras en forma de galerías. En el Zoológico de Zacango se observaron excavaciones de nidos como los que describe Cervantes (1979), en forma de media naranja de 15 cm de diámetro y 11 cm de profundidad.

En esta especie no se observa dimorfismo sexual, pero la hembra suele ser de mayor talla y peso (hembra: 285 mm y 535 g; macho: 268 mm y 417 g, en promedio). Su pelo es amarillo antimonio mezclado con negro y una de sus características es que la cola es vestigial, dando la impresión de que no la tiene (Cervantes *et al.*, 1990)

Su distribución se restringe actualmente a la Sierras Chichinautzin y Ajusco (volcanes Pelado y Tláloc) y la Sierra Nevada (volcanes Papayo, Popocatepetl e Iztaccihuatl) (Velázquez *et al.*, 1996). También se han observado en el Parque del Nevado de Toluca y el volcán Pelado.

Dentro del esquema general que se tiene de los espermatozoides (cabeza y flagelo), el acrosoma es el componente estructural del espermatozoide que morfológicamente presenta características específicas. Es por ello que Zanaveld (1975) propone esta estructura como elemento de caracterización taxonómica en roedores y primates (Austin, 1976; Gould *et al.*, 1975) y conejos (Flechon, 1975).

El espermatozoide de conejo se describe con la cabeza aplanada, semejante a la pala de remo; el acrosma no se extiende más allá del núcleo, presentando forma de ribete protuberante en la parte anterior y que va adelgazándose hacia el segmento ecuatorial (Flechon, 1975)..

Para distinguir entre espermatozoides de especies cercanas o subespecies de un mismo grupo, deben establecerse diferencias o similitudes usando las dimensiones de las diversas partes del espermatozoide o de sus elementos constitutivos (Gould *et al.*, 1975; Cummins y Woodall, 1985; Pogany y Linder, 1993; Ambriz *et al.*, 2003). Con ellas es también posible apreciar los cambios debidos al desarrollo o a manipulaciones experimentales (Barthelemy *et al.*, 1990; Bearer y Friend, 1990; Zavos *et al.*, 1998) o tratar de interpretar tendencias evolutivas (Austin, 1976; Cummins y Woodall, 1985; Gage, 1998; Cetica *et al.*, 1998; Craig y Ward, 1999).

En el caso particular de los lagomorfos, es posible apreciar las diferencias que existen en las dimensiones del largo de la cabeza o del flagelo de diferentes géneros o especies (Cummins y Woodall, 1985). Otras diferencias más sutiles son las mediciones de otros parámetros, como es el caso del ancho de la cabeza que distingue entre especies mexicanas y el conejo europeo (Ambriz *et al.*, 2003).

Barrera (1966) en un estudio de sifonápteros, parásitos de lagomorfos, afirma que los que parasitan al zacatuche son “fósiles vivientes”, parásitos de un hospedero que también puede ser calificado como tal y explica: “*R. diazi* no sólo representa una forma arcaica y generalizada de lepórido, sino que además, pertenece a la subfamilia *Paleolaginae*, que ocupó una extensa área antes de la aparición de los lepóridos modernos en el Plioceno”. Menciona que se conocen por lo menos diez géneros de paleoláginos fósiles del Eoceno Superior y cuatro vivientes, y que estos últimos viven aislados en México (*Romerolagus*), en las islas Riu Kiu del Japón (*Pentalagus*), en Africa del Sur (*Pronolagus*) y en Sumatra (*Nesolagus*).

Por otro lado Cervantes y Martínez (1996), quienes han realizado una revisión amplia sobre el aspecto de la antigüedad del zacatuche, menciona que es considerado como un lepórido primitivo con base en sus características craneales, dentales, cromosómicas y por sus parásitos sifonápteros, ácaros y céstodos. Que está estrechamente relacionado con los géneros *Pronolagus* y *Pentalagus* de la familia *Paleolaginae*. Que pudo haber derivado evolutivamente del género *Alilepus*, del Mioceno tardío o Plioceno temprano en Norteamérica o del *Nekrolagus*, fósil del Plioceno tardío, también de Norteamérica. Además considera que el zacatuche es la única especie de lepórido que conserva la característica primitiva de tener articulados el esternón con la clavícula y que al igual que *Pentalagus*, de las islas Amami del Japón, presenta una reducción casi total de la cola.

El zacatuche fue reportado con fines naturalistas por Díaz (1893), y transcurrió más de medio siglo para señalarse en México la necesidad de protegerlo por considerar que puede llegar a extinguirse como especie en su hábitat natural. Rojas

(1951), es el primero en hacer una llamada de alarma señalando la posibilidad de que desaparezca la especie si no se toman medidas para protegerlo. El indica que para protegerlo hay que hacer efectivo "el respeto por los parques nacionales" ya que el zacatuche habita principalmente en bosques que son considerados parques nacionales.

Posteriormente Villa (1952) se refiere a la afición de algunos cazadores por cobrar piezas de esta especie en forma injustificada, pero no hace mención específica sobre el riesgo de su desaparición.

Dos investigadores mencionan que para la conservación del volcano rabbit, como es conocido el zacatuche en el extranjero, se le incluya en zoológicos donde se lleve a cabo su reproducción (Durrell, 1968; Durrell y Mallinson, 1968). Refieren también, al igual que Velásquez *et al.* (1993), la clasificación de Lyon publicada en 1904, en la que por su cráneo, particularmente por su proceso postorbital y su paladar, se asemeja al cráneo del *Pronolagus*; por la estructura del primer premolar inferior recuerda tanto al *Pronolagus* como al *Pentalagus* y, por lo corto de sus patas traseras y el esternón, se asemeja al género *Ochotona* (Pikas). Durrell (1968) señala que el *Pentalagus* o conejo hikiu es también una especie con una distribución muy restringida, endémico de dos islas japonesas al sur de Kyushu y en peligro de extinción.

Hoth y Granados (1987), en un reporte sobre la reproducción del zacatuche en el Zoológico de Chapultepec, citan a Simon (1966) como el primero en considerar al zacatuche en peligro de extinción, y en sugerir el desarrollo de una colonia de esta especie en el Zoológico de Chapultepec.

Granados (1980, 1981) retoma la preocupación por la posible desaparición del *R. diazi* y en la Conferencia Mundial sobre Lagomorfos y en dos artículos especializados, señala que en varios lugares donde se conocía la existencia del zacatuche, éste ha desaparecido e indica la amenaza de su desaparición.

Cervantes (1980), después de una exhaustiva revisión, manifiesta su preocupación por la ausencia de programas para el estudio de esta especie por parte de las instituciones científicas, y hace un llamado a todas aquellas personas, biólogos, naturalistas y sector público, para que contribuyan a la perpetuación de una especie seriamente amenazada y típicamente mexicana.

Hoth *et al* (1987) presentan el primer trabajo realizado sistemáticamente, en el que se establece la distribución de la especie basándose en la documentación existente. De sus resultados cabe destacar que:

a.- En las partes Este y Oeste del Eje Volcánico Transversal (EVT) existen áreas con características ecológicas similares al hábitat del zacatuche, sin embargo no se le encuentra en esta área.

b.- Las poblaciones de esta especie se localizan dentro de la parte central del EVT, en las laderas de los volcanes Popocatepetl-Iztaccihuatl (Sierra Nevada), el Volcán Pelado (al sur de la Sierra del Ajusco) y el Tláloc (en la Sierra del Chichinautzin).

c.- La especie ha desaparecido de grandes áreas del EVT donde antes había sido reportado, particularmente de la ladera oriental del Iztaccihuatl y del Nevado de Toluca.

d.- Menciona que entre las posibles causas a las que se puede atribuir la desaparición de la especie en otros lugares, están la degradación del hábitat debido a los incendios forestales, sobrepastoreo del zacatón por el ganado bovino y caprino, sobre explotación de los bosques y cambios de uso de la tierra, de bosque a campos agrícolas.

Justificación

La importancia del zacatuche radica en dos principales aspectos a considerar: uno es su carácter de lagomorfo primitivo y resultado intermedio del proceso de evolución entre los lagomorfos y, dos, como representante exclusivo de la biodiversidad mexicana que se encuentra en peligro de extinción. Debido a esto, se considera relevante contribuir a dilucidar el mayor número de aspectos de su biología para explicar su lugar evolutivo entre los lagomorfos y a tratar de evitar su extinción que parece cada vez más cercana.

El presente trabajo se origina por el interés en contribuir al conocimiento de la biología reproductiva del zacatuche o *R. diazi* describiendo las características estructurales de su espermatozoide. Esto con el fin de conformar un patrón de referencia que sustente las comparaciones con otros géneros de la misma familia y de otras familias.

Objetivo General

Realizar la morfometría ultraestructural de los espermatozoides de epidídimo de zacatuche, para establecer una referencia de comparación con otras especies.

Objetivos Particulares

Obtención de muestras de segmentos de cola de epidídimo de ejemplares de *R. diazi*.

A partir de las muestras procesadas convenientemente, obtener imágenes de espermatozoides con microscopía electrónica de transmisión.

Realizar el análisis y medición de diferentes regiones y estructuras de los espermatozoides.

Establecer la descripción de las características de los principales componentes estructurales de los espermatozoides para integrar una referencia en el estudio de los espermatozoides de los lagomorfos mexicanos.

Material y Método

Para este estudio se usaron ejemplares vivos. Al no existir lugares donde pudieran proporcionar ejemplares vivos de la especie se capturaron directamente de poblaciones silvestres. Debido a que el zacatuche es una especie en peligro de extinción, se solicitó un permiso de colecta en la Dirección de Fauna Silvestre el cual fue otorgado con la clave DOO 750-26/8/97.

Después de ubicar los lugares donde existían poblaciones de zacatuche se procedió a la captura. De todos los ejemplares capturados sólo dos fueron útiles para nuestro estudio en particular. Los ejemplares capturados y que no se usaron en el este estudio se destinaron, ya sea para otros estudios o para el Zoológico de Chapultepec, en la Ciudad de México D.F. o para el Zoológico de Zacango, del Edo. de México. Los cadáveres se llevaron a la Colección de Mamíferos de la UAM-Iztapalapa.

Los ejemplares de *R. diazi*, usados en este estudio, provinieron de la región de Parres, delegación de Tlalpan, Distrito Federal. Tuvieron un peso entre los 400 y 500 gramos, ubicándose entre los pesos que son considerados como correspondientes a ejemplares sexualmente maduros (Rojas, 1951; Cervantes, 1980; Velásquez *et al.*, 1996).

Se obtuvieron muestras de cola de epidídimo por medio quirúrgico, con los animales bajo condiciones de anestesia profunda, según procedimiento establecido,

producto de ensayos llevados a cabo con antelación a las capturas, como se cita a continuación.

Usando como modelo el conejo doméstico Nueva Zelanda variedad blanca, proporcionado por el bioterio de la UAM-I, se ensayaron dos formas de administrar el primer fijador del tejido (Karnovsky) para preparar las muestras para microscopía electrónica de transmisión (MET).

Ensayo *in situ*, de perfusión de hemicuerpo, perfundiendo a través del sistema sanguíneo. Para ello se administró el anestésico, por vía intraperitoneal ("Anestesal", pentobarbital sódico), según la dosis de 1 ml por cada 2.5 kilogramos de peso, recomendada en las instrucciones de uso de la etiqueta del producto para inducir anestesia quirúrgica ("Anestesal", Smith Kline, Norden de México, uso veterinario).

A continuación se procedió a abrir la cavidad abdominal, haciendo una incisión en la piel, cortando a continuación el músculo de la pared abdominal sobre la línea media, abarcando desde la parte rostral del hueso púbico hasta el extremo caudal del esternón. Luego se seccionó y se retiró el paquete gastro-intestinal después de ligarlo en las regiones del recto y la esofágica, con el fin de despejar el espacio para la realización de una perfusión de hemicuerpo con el fijador.

Para realizar la perfusión de hemicuerpo primero se localizó la arteria aorta y la vena cava caudal, en sus segmentos abdominales, y se disecaron para exponerlos limpios de tejido adiposo. La aorta se ligó inmediatamente por la parte caudal a las ramas renales, procurando que las ramas testiculares quedaran en el segmento intermedio a las ligaduras, para que, sólo a través de ellas circulara el flujo y así

hacer llegar las sustancias de perfusión al epidídimo y al testículo (Barone *et al.*, 1973; Baker *et al.*, 1986).

Para canular la aorta se hizo una pequeña incisión en la parte caudal al nacimiento de las ramas testiculares, se introdujo la punta recortada y roma de una aguja hipodérmica del número 18 y se ancló. A continuación se expuso el testículo y se seccionó la vena cava para drenar el perfundido, impulsado por una jeringa de 100 ml que se conectó a la cánula de la aorta con ese fin. El primer líquido perfundido fue solución de Hartmann Abbott (Abbott Laboratories de México, S. A. de C. V., México), posteriormente con fijador de Karnovsky (Karnovsky's Fixative, Kit; Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, USA) (Nunn, 1976; Sheehan y Hrapchak, 1980; Bozzola y Russell, 1992).

La segunda forma que se ensayó fue la de perfundir directamente el epidídimo. Para ello se procedió a anestésiar al conejo como ya se describió. Una vez alcanzado el nivel quirúrgico se abrió la bolsa del escroto y se expusieron los testículos. Se retiró quirúrgicamente el paquete testículo-epidídimo; se preparó y disecó el epidídimo y se les perfundió directamente con Karnovsky.

Al comparar los resultados de ambas formas de administrar el fijador en cortes histológicos para microscopía de luz y MET y no encontrar diferencias, se optó por la segunda forma, que resultó la más sencilla y práctica.

Las muestras de cola de epidídimo se dejaron reposar en el fijador durante una hora y de ellas, se seccionaron muestras de 2 milímetros cúbicos para procesarlas para MET. Para la postfijación, las muestras se colocaron en tetróxido de osmio (Ted Pella, Inc. Pelco Grids & Electron Microscopy Supplies; Redding, CA.

USA). Posteriormente se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcoholes (Alcohol Etílico Absoluto, Baker Analyzed Reactive; JT. Baker, S. A. de C. V. México), se impregnaron con óxido de propileno (Ted Pella, Inc. Pelco Grids & Electron Microscopy Supplies; Redding, CA. USA) y se incluyeron en Epon (EM bed-812 –Epon 812 substitute- Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, USA).

El procedimiento detallado de fijación, deshidratación, impregnación e inclusión se presenta a continuación:

Fijación

Fijación con Karnovsky	1 hora
Tres cambios con buffer 0.1 M de cacodilato de sodio	15 minutos
Postfijación con tetróxido de osmio	1 hora

Deshidratación

Dos cambios con alcohol al 70% y se deja en el tercero 10 minutos.

Se repite lo anterior con alcohol de 80 %, 90 % y 95 %.

Dos cambios con alcohol al 100% de 20 minutos cada uno.

Impregnación

Óxido de propileno dos cambios de 20 minutos cada uno.

Epón más óxido de propileno 1:1 durante 1 hora

Epón más óxido de propileno 2:1 durante 1 hora

Inclusión

Epón puro, en moldes, en una estufa a 60 °C durante 24 horas

De las inclusiones se hicieron cortes ultrafinos con un ultramicrotomo Reichert-Jung y se contrastaron con acetato de uranilo (Acetato de Uranilo, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, USA).

Se obtuvieron microfotografías (6,000-28,000 X) con un MET CM12 Philips, y en ellas se identificaron los principales componentes de la ultraestructura de la cabeza y flagelo de los espermatozoides.

A las estructuras escogidas en cada microfotografía se les asignó una clave para identificarlas individualmente y posteriormente fueron medidas. Para identificar las estructuras se elaboró un plano de coordenadas y se imprimió sobre una mica para su uso; éste se sobreponía sobre la microfotografía y la estructura se ubicaba como se hace en los planos cartográficos, se le asignó la clave y se anotó su medida.

Para la medición, realizada a través de la mica de coordenadas para no maltratar la microfotografía, se colocaron las puntas de un vernier en los límites de la estructura a medir. Posteriormente la dimensión en milímetros de las estructuras, se dividió entre el aumento dado por el microscopio electrónico, el resultado se dividió a

su vez entre el factor de amplificación de la microfotografía y por último, todo entre mil para su conversión a micrómetros.

El análisis estadístico de los datos se hizo mediante la prueba de t de Student con el programa STATISTICA™ software (Statsoft, Tulsa, OK).

Resultados

Se obtuvieron microfotografías de las muestras a diferentes aumentos (Figura 4) (entre 6,000 y 28,000 X) para realizar el análisis morfológico y morfométrico.

Se escogieron las micrografías con base en los siguientes criterios:

- a) Que la estructura apareciera completa en la fotografía.
- b) Que en el corte se apreciara la estructura en el plano adecuado.
- c) Que se observaran claramente los límites de la región a medir.

Se seleccionaron imágenes de cortes de los espermatozoides en los siguientes planos y regiones.

I.- Cortes longitudinales en el plano sagital medio de la región de la cabeza (Figura 4a, b y d).

II.- Cortes en plano transversal en las diferentes regiones del flagelo (Figura 4c).

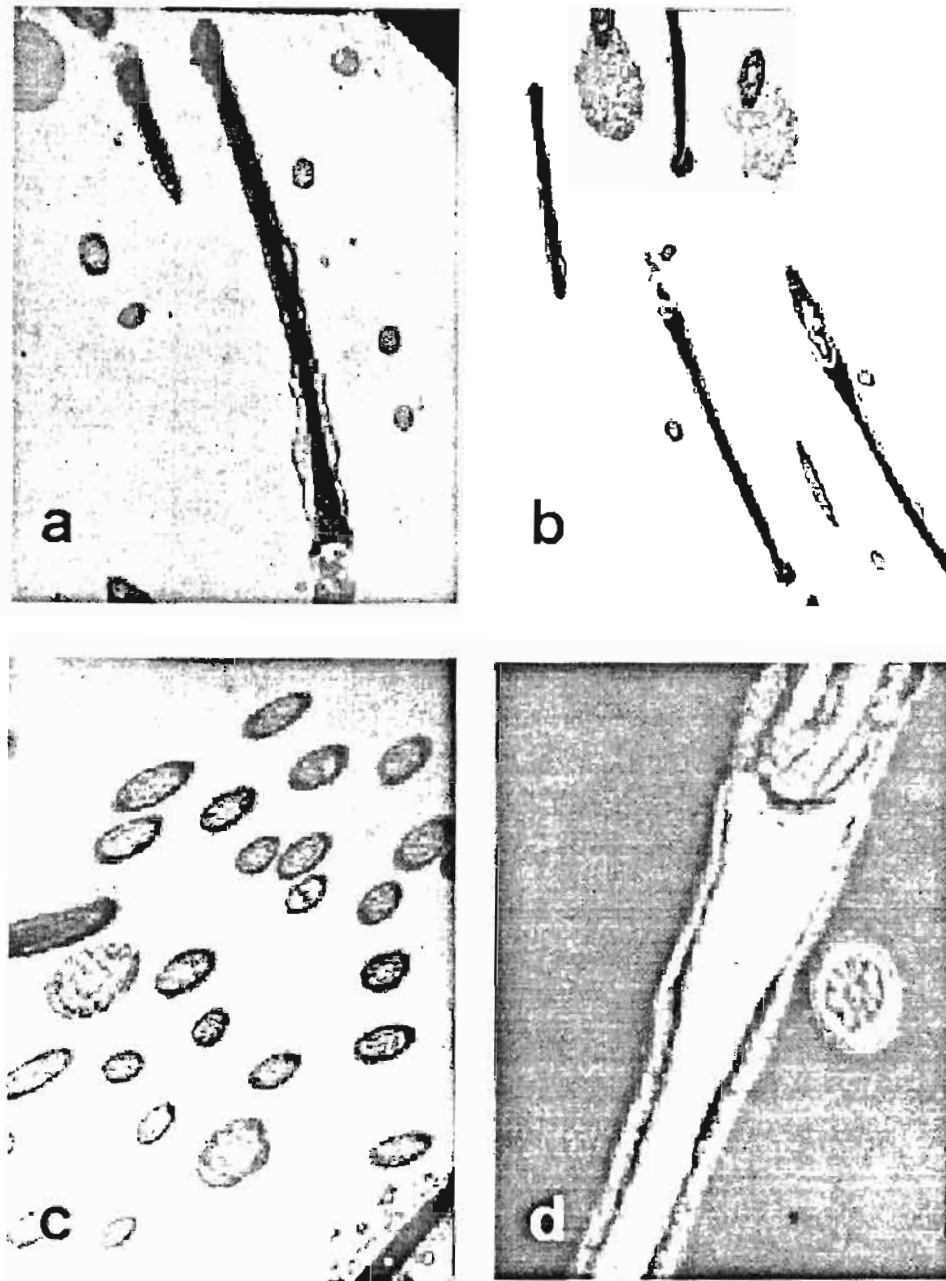


Figura 4.- Imágenes obtenidas con el MET. a y b) Cortes sagitales de la cabeza del espermatozoide de zacatuche, 10,000X y 6,000X respectivamente. c) Cortes transversales de las diferentes regiones del flagelo, 13,000X. d) Base de la cabeza y fosa de implantación, 28,000X.

Descripción:

I.- Cortes longitudinales en el plano sagital medio de la región de la cabeza.

Se establecieron los parámetros que se señalan en la Figura 5, la cual corresponde a un corte en plano medio sagital que comprende íntegramente la cabeza del espermatozoide de zacatuche, desde el rodete marginal hasta la base de la misma. Se señalan los parámetros correspondientes a la parte externa o periférica de la cabeza (5a-5h), los correspondientes al núcleo (5i-5n) y los del segmento apical o espacio entre el extremo del núcleo y la periferia (1o). Las dimensiones de ambos grupos de parámetros se presentan en los Cuadros 1 y 2.

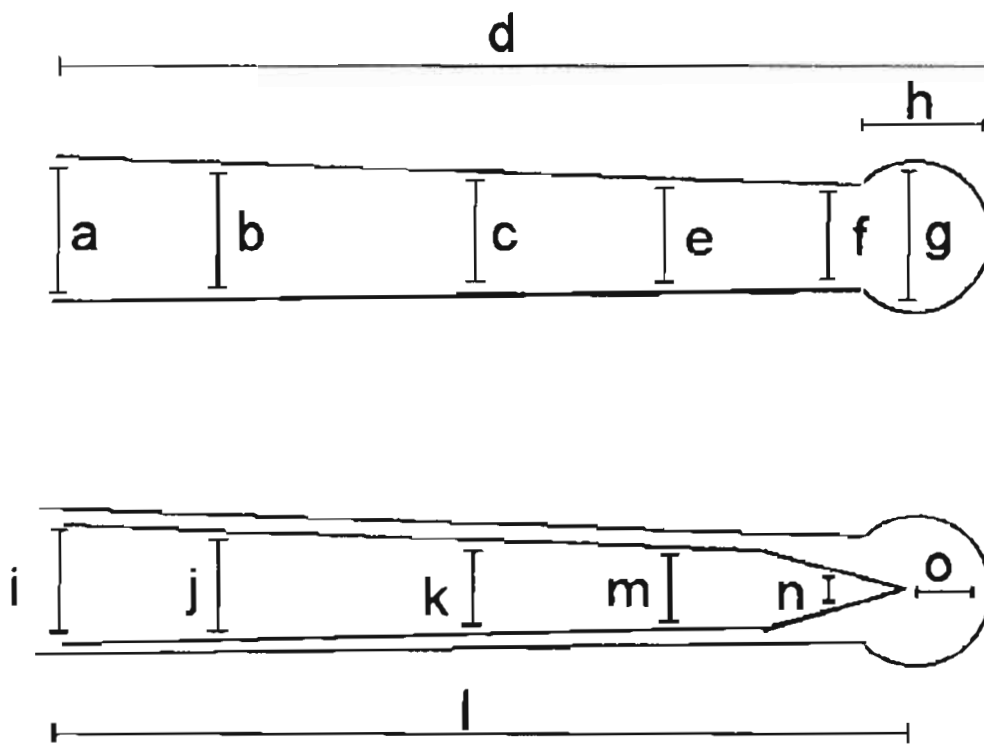


Figura 5.- Representación esquemática de cortes longitudinales, en el plano sagital medio de la cabeza del espermatozoide de zacatuche: a.- Grosor de la Base de la Cabeza, b.- Grosor del Segmento Post-Ecuatorial, c.- Grosor de la Mediana Post-Acrosomal, d.- Longitud de la Cabeza, e.- Grosor de la Mediana Acrosomal, f.- Grosor Post-Rodete, g.- Grosor del Rodete Marginal, h.- Longitud del Rodete Marginal, i.- Grosor de la Base Nuclear, j.- Grosor Proximal Nuclear, k.- Grosor de la Mediana Nuclear, l.- Longitud del Núcleo, m.- Grosor Nuclear Distal, n.- Grosor Nuclear Apical, o.- Longitud del Segmento Apical.

El perfil del corte sagital del espermatozoide de zacatuche es similar al referido para el conejo europeo. En él se distingue que los extremos son más gruesos que la región central. El extremo proximal corresponde a la región de inserción del flagelo, a la que se le asignó el nombre de base de la cabeza (Figura 5a). El extremo distal, presenta el engrosamiento correspondiente al borde en forma de herradura del acrosoma, que caracteriza al espermatozoide del conejo y que identificamos como rodete marginal (Figura 5g y 5h).

Por otro lado, al observar las tonalidades de grises se puede apreciar en los cortes sagitales una parte muy oscura, prácticamente negra, que ocupa su parte central. Esta parte corresponde al núcleo (Figura 5i-5n) que inicia desde la unión de la cabeza con el flagelo (Base del Núcleo: 5-i) y es su parte más gruesa. El núcleo se extiende hacia la parte distal, adelgazándose en forma de punta en el extremo.

La base del núcleo forma parte del proceso de implantación del flagelo (con la pieza de conexión). En la base, se observa una depresión que constituye la fosa de implantación. Sus bordes forman la parte más ancha de la base del núcleo (Figura 5-i).

Frente al extremo distal del núcleo se observa una área casi circular (gris claro) que corresponde al perfil del rodete marginal, parte del acrosoma. Esta área del rodete comprende el espacio entre el extremo distal del núcleo y el extremo de la cabeza, y que en este estudio se identifica como el segmento apical (Figura 5o). El rodete junto con la base de la cabeza son las partes de la cabeza más gruesas. Comparando las medidas de ambos extremos, la que corresponde al grosor de la

base de la cabeza, 0.632 μm (Figura 5a) es significativamente mayor que la del grosor del rodete, la cual es de 0.598 μm (Figura 5g) ($p < 0.05$).

La longitud del rodete se midió sobre su eje longitudinal, a partir del nivel del inicio de su curvatura, hasta el borde exterior de la misma estructura y mide 0.744 μm (Figura 5h). La longitud del rodete es mayor que el grosor del mismo en aproximadamente un 20 % ($p < 0.5$).

Las medidas de las partes intermedias, tales como el grosor de la región post-rodete, 0.336 μm (Figura 5f); grosor de la mediana-acrosomal, 0.374 μm (Figura 5e); grosor del segmento post-ecuatorial, 0.372 μm (Figura 5c); y el grosor de la mediana post-acrosomal, 0.435 μm (Figura 5b); son todas ellas menores que las de los extremos de la base de la cabeza (0.632 μm) y el grosor del rodete (0.598 μm).

El grosor de la región post-rodete es menor que el grosor de la mediana del acrosoma. La mediana post-acrosomal es, a su vez, más gruesa que el segmento post-ecuatorial. No hay diferencia significativa entre el grosor del segmento post-ecuatorial y el de la mediana acrosomal.

Lo anterior indica que existe una diferencia de hasta más del 22 % entre las regiones de la parte intermedia de la cabeza y que va desde la de mayor dimensión (grosor de la mediana post-acrosomal de 0.435 μm) y la de menor dimensión (región post-rodete de 0.336 μm).

En cuanto al núcleo, se observó que su extremo correspondiente al grosor de la base nuclear mide 0.540 μm (Figura 5i). En el extremo contrario, el grosor de la región nuclear apical mide 0.134 μm (Figura 5n), y es la parte de menor dimensión.

Las partes del núcleo intermedias entre sus dos extremos son: el grosor de la región nuclear distal y mide 0.210 μm (Figura 5m); el grosor de la mediana nuclear que mide 0.243 μm (Figura 5k); y el grosor de la región proximal nuclear, mide 0.233 μm (Figura 5j). Entre ellas no se presentan diferencias estadísticamente significativas, pero sí hay diferencias cuando estas tres se compararon con el grosor de la región nuclear apical. El grosor de esta región es menor que el grosor de la región nuclear distal en más del 36 %.

Se encontró que entre el grosor de la base nuclear y el grosor de la base de la cabeza, existe una diferencia del 15 %; entre el grosor nuclear apical y el grosor post-rodete existe una diferencia del 60 %. Así mismo, se observó que entre la longitud del núcleo y la longitud de la cabeza, la diferencia es del 16 %.

II.- Cortes en plano transversal en las diferentes regiones del flagelo (Figura 6).

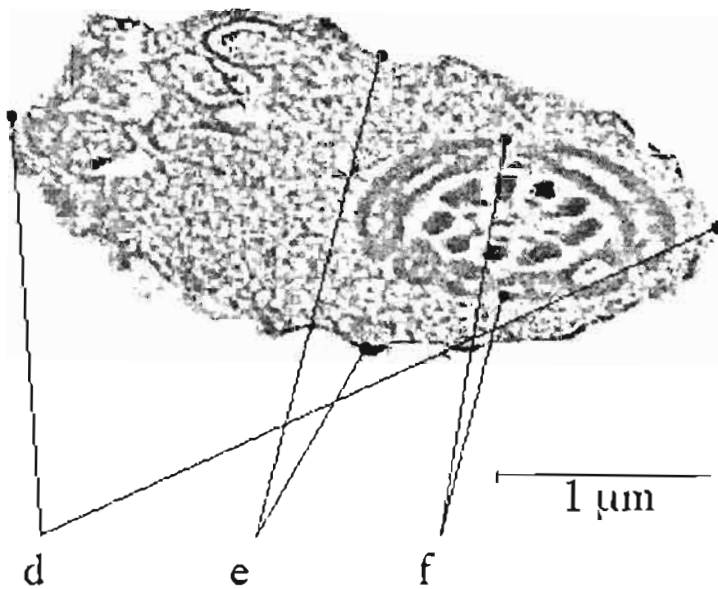
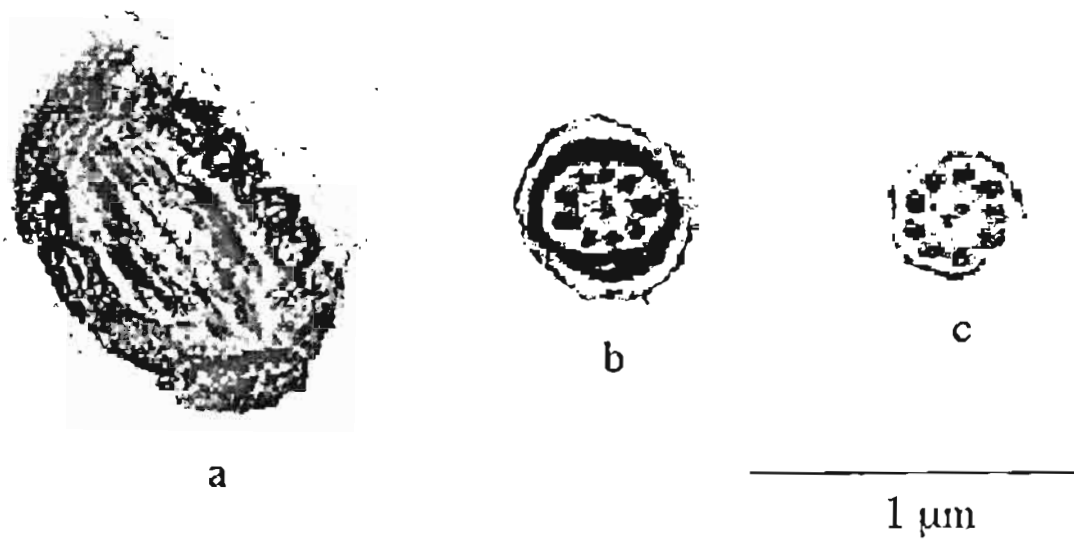


Figura 6.- Parámetros de las regiones del flagelo. a.- Corte transversal de la pieza media; b.- Corte transversal de la pieza principal; c.- Corte transversal de la pieza terminal. d.- Corte transversal de la gota citoplasmática, eje mayor; e.- Eje menor; f.- Región correspondiente a la pieza media. 8,000X.

Las dimensiones promedio de los diámetros de las diferentes regiones del flagelo se muestran en la Cuadro 3 y se describen a continuación.

a.- Corte transversal de la pieza media.

Estos cortes se identificaron por la presencia de mitocondrias rodeando a las fibras densas y al axonema (Figura 6a y 6f). El diámetro es de 0.704 μm .

En esta región del flagelo, en los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo, frecuentemente se observa la presencia de la gota citoplasmática. El eje mayor de esta estructura midió 2.597 μm y el eje menor 1.442 μm (Figura 6d y 6e).

b.- Corte transversal de la pieza principal.

Para la selección de los cortes correspondientes a la pieza principal se consideró la ausencia de mitocondrias pero la persistencia de las fibras densas rodeando al axonema. Se encontró que su diámetro es de 0.423 μm (Figura 6b).

c.- Corte transversal de la pieza terminal.

Se seleccionaron los cortes que no presentaban mitocondrias ni las fibras densas y en los que sólo se observaba el axonema, rodeado de la membrana plasmática. Su diámetro fue de 0.372 μm (Figura 6c).

Al comparar los diámetros de estas estructuras, se observó que el diámetro del eje mayor de la gota citoplasmática es 55 % más grande que el diámetro del eje menor, y éste a su vez, resultó más grande en un 51 % que el diámetro de la pieza media.

Los promedios del diámetro de las tres regiones del flagelo, señalan que la pieza media es 40 % mayor que la pieza principal y 47 % mayor que la pieza terminal, señalando un decremento del diámetro del flagelo que va de la pieza media a la pieza terminal. En relación con la cabeza del espermatozoide, el diámetro de la pieza media resulta más del 13 % mayor que el grosor de la base de la cabeza.

Cuadro 1.- Promedios y desviación estándar de las dimensiones en micrómetros de los parámetros de la cabeza; n = 20.

Región	Dimensión (μm)
Longitud del rodete marginal	0.744 ± 0.107
Grosor del rodete marginal	0.598 ± 0.082
Grosor post-rodete	0.336 ± 0.023
Grosor de la mediana acrosomal	0.374 ± 0.021
Longitud de la cabeza	7.441 ± 0.010
Grosor del segmento post-ecuatorial	0.372 ± 0.009
Grosor de la mediana post-acrosomal	0.435 ± 0.033
Grosor de la base de la cabeza	0.632 ± 0.079

Cuadro 2.- Promedios y desviación estándar de las dimensiones, en micrómetros, de los parámetros del núcleo; n = 20.

Región	Dimensión (μm)
Longitud del segmento apical	0.469 ± 0.073
Grosor nuclear apical	0.134 ± 0.025
Grosor nuclear distal	0.210 ± 0.012
Longitud del núcleo	6.250 ± 1.653
Grosor de la mediana nuclear	0.243 ± 0.050
Grosor proximal nuclear	0.233 ± 0.021
Grosor de la base nuclear	0.540 ± 0.061

Cuadro 3.- Promedios y desviación estándar de las dimensiones, en micrómetros, de los parámetros de la gota citoplasmática; n = 20.

Región	Dimensión (μm)
Gota citoplasmática (eje mayor)	2.597 ± 0.267
Gota citoplasmática (eje menor)	1.442 ± 0.340
Diámetro pieza media	0.704 ± 0.095
Diámetro pieza principal	0.423 ± 0.095
Diámetro pieza terminal	0.372 ± 0.054

Discusión

La caracterización de los espermatozoides de conejo, realizada por otros investigadores fue por medio de microscopia de luz (Overstreet y Bedford, 1976; Cummins y Woodall, 1985; Ambriz *et al.*, 2003), y en este trabajo se realizó por MET.

Los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de conejo europeo ya han adquirido las características de forma y función de los espermatozoides eyaculados (Flechon, 1975; Overstreet y Bedford, 1976; Bayard, 1991) es por ello que para este estudio se trabajó con espermatozoides de epidídimo. Además, debido a la dificultad de usar los métodos convencionales para la obtención de semen como el uso de la vagina artificial y la electroeyaculación en especies silvestres, se optó por la obtención de espermatozoides epididimarios.

Se afirma que los espermatozoides de conejo, junto con los de roedores y del hombre, han sido de los más estudiados, de tal forma que sus características morfológicas y funcionales más destacadas ya han sido establecidas (Flechon, 1975; World Health Organization, 1992; Eddy y O'Brien, 1994; Millette, 1998). La mayoría de los estudios de espermatozoides de conejo se refieren a los de la especie *Oryctolagus cuniculus* (conejo europeo o conejo doméstico), se sabe poco sobre los espermatozoides de otras especies de lagomorfos.

En este trabajo se presenta, como una aportación original, una caracterización ultraestructural de espermatozoides de *R. diazi*, obtenidos de la cola de epidídimo y observados mediante MET.

Para este trabajo se tomó en consideración que, aunque los espermatozoides de grupos taxonómicos pertenecientes a un mismo orden, mantienen similitudes muy cercanas entre sí (Gould y Martin, 1975; Fawcett, 1975; Austin, 1976), se pueden observar detalles particulares como las dimensiones de las regiones del flagelo, forma y dimensión del acrosoma y longitud de la cabeza, que han sido propiciados por los procesos de especiación (Gould y Martin, 1975; Gage, 1998; Cetica *et al.*, 1998; Craig y Ward, 1998; Craig y Ward, 1999).

En un estudio de microscopía de luz, se reporta que las cabezas de los espermatozoides del conejo europeo y del zacatuche, difieren ligeramente en la base, resultando más ancha la cabeza del espermatozoide de zacatuche (5.88 μm) que la del conejo europeo (4.82 μm). Al hacer la medición de la longitud de la cabeza del espermatozoide de zacatuche por microscopía de luz, reportan 8.63 μm (Ambriz *et al.*, 2003). En el presente estudio se obtuvo, mediante microscopía electrónica, una longitud total de la cabeza de 7.4 μm . La medición reportada por microscopía de luz es más próxima a la reportada para el conejo europeo, como se puede observar en la revisión de Cummins y Woodall (1985), la cual se encuentra comprendida entre 8.06 μm y 8.51 μm .

La diferencia que existe entre los resultados obtenidos por Ambriz *et al.* (2003) para el espermatozoide de zacatuche, y los del presente estudio puede deberse al tipo de metodología empleada. El estudio en microscopía electrónica permite realizar

mediciones más precisas debido a los aumentos que se logran, que son mucho mayores a los que se pueden obtener con el microscopio de luz.

Las dimensiones de la cabeza de espermatozoides de conejo europeo (8.06-8.51 μm) y de la liebre (*Lepus sp.* 6.4-6.8 μm) (Cummins y Woodall, 1985), ya han sido reportadas. En este trabajo se encontró que la longitud total de la cabeza es de 7.4 μm .

La medida de la longitud de la cabeza del espermatozoide de zacatuche encontrada en este estudio, es un número intermedio entre las reportadas para conejo europeo y liebre. Esto coincide con afirmaciones basadas en análisis óseos y aspectos cromosómicos y reproductivos en donde se señala que el zacatuche se asemeja a los conejos por su apariencia física pero que está más próximo filogenéticamente a las pikas y a las liebres que a los conejos; que podría tratarse de una especie intermedia entre conejos y liebres (Velázquez *et al.*, 1996; Cervantes *et al.*, 1990; Robinson *et al.*, 1981).

Buscando contrastar nuestros resultados con otros trabajos, se procedió a compararlos con los de otras especies cuyos espermatozoides son de cabeza aplanada como los del conejo, y como es el caso de los bovinos y del humano.

La cabeza de espermatozoides de bovino tiene una longitud de 9.2 μm (Mann y Lutwak-Mann, 1981) y específicamente para el toro (*Bos taurus*) está entre 6.77 y 9.71 μm . En el caso de las cabras (*Capra hircus*) es de 8.27 μm (Cummins y Woodall, 1985) y la del humano mide entre 4 y 7 μm (Monesi, 1978; Mann y Lutwak-Mann, 1981; Baccetti, 1984; Joshi *et al.*, 2001); con un grosor de 1 μm en el caso de los bovinos y de 1.5 μm para la cabeza del espermatozoide humano. Al contrastar

dichos parámetros con los dos de mayor dimensión obtenidos en este estudio, que son los del grosor del rodete marginal ($0.59 \mu\text{m}$) y la base de la cabeza ($0.63 \mu\text{m}$), se encontró que aquéllos son más gruesos (más del 40 %) que los de zacatuche. Además, esto no tiene correspondencia con la longitud de la cabeza espermática ya que la del humano es menor y la del bovino algo mayor, quedando intermedia entre ellas dos la del zacatuche.

En cuanto al flagelo, la morfología y arreglo estructural observada en el espermatozoide de zacatuche es igual a la reportada para los mamíferos en general, encontrando en ellos la pieza media, pieza principal y pieza terminal, con un axonema que se extiende a todo lo largo del flagelo. Este también está constituido por dos microtúbulos centrales rodeados por nueve dobletes. Consta de fibras densas externas que rodean al axonema en la pieza media y la pieza principal, y la vaina fibrosa que junto con las mitocondrias, distingue a la pieza media (Fawcett, 1975; Gibbons, 1981; Serres *et al.*, 1983; Bearer y Friend, 1990; Eddy y O'Brien, 1994; Oko y Clermont, 1998).

Respecto a la longitud del flagelo en el conejo europeo, cabe señalar que existen diferencias en las dimensiones reportadas en estudios realizados con microscopía óptica: Cummins y Woodall (1985) encuentran que la longitud de la pieza media mide entre 8 y $8.81 \mu\text{m}$ y la pieza principal entre 38 y $40.7 \mu\text{m}$, y Ambriz *et al* (2003) reportan $9.22 \mu\text{m}$ para la pieza media y $47 \mu\text{m}$ de longitud total del flagelo. En cuanto al zacatuche, Ambriz *et al* (2003) reportan $8.85 \mu\text{m}$ de longitud para la pieza media, y $46.07 \mu\text{m}$ de longitud total del flagelo. Estos autores no reportan medidas de otras regiones del flagelo.

En cuanto al diámetro que tiene el flagelo en sus tres regiones, también se encontró muy escasa información; se menciona que la pieza media del flagelo del espermatozoide de cabra tiene 0.74 μm , la del conejo europeo 0.73 μm (Cummins y Woodall, 1985) y la del humano tiene 0.88 μm (Serres *et al.*, 1983) y 1 μm en su base (Baccetti, 1984). En el presente estudio, se encontró que el diámetro de la pieza media es de 0.7 μm , quedando así como el menor diámetro de los datos antes mencionados.

El diámetro de la pieza principal del espermatozoide humano es de 0.53 μm y de la pieza terminal de 0.24 μm (Serres *et al.*, 1983); en el zacatuche se encontró 0.42 μm para la pieza principal, y 0.37 μm para la pieza terminal. Resultando así que en esta última región es mayor la del zacatuche que la del humano en un poco más del 50 %, pero es más pequeña la pieza principal. Hasta el momento, no hay reportes de las dimensiones de estas regiones del flagelo en el conejo y especies cercanas; en este estudio se reportan por primera vez las dimensiones del diámetro de las diferentes regiones del flagelo de espermatozoides de zacatuche. Esto refuerza la originalidad y el aporte de este estudio para el conocimiento de dicha especie.

Conclusiones

La diferencia que existe entre el resultado de nuestra medición y la reportada para el zacatuche en el estudio con microscopía de luz puede deberse a la precisión de las medidas logradas por los aumentos totales que se obtienen en microscopía electrónica.

El grosor de la cabeza del espermatozoide no varía de manera directamente proporcional a su longitud.

La morfología y arreglo estructural observada en el flagelo del espermatozoide de zacatuche es igual a la considerada para los mamíferos en general.

No hay reportes de las dimensiones del diámetro de las regiones del flagelo en el conejo y especies cercanas; los datos aquí presentados son un aporte original para el zacatuche.

La morfometría ultraestructural puede ser usada para el estudio del espermatozoide y las medidas reportadas en este trabajo son de gran utilidad para el conocimiento de la biología reproductiva del zacatuche.

Referencias Bibliográficas

Ambriz D., Contreras J. L., Hernández O., Mercado E., Cervantes F. y Rosado A. Estudio Comparativo de los Testículos, Epidídimos, Glándulas Sexuales Accesorias y Espermatozoides en Tres Especies de Lagomorfos (*Romerolagus diazi*, *Lepus californicus* y *Oryctolagus cuniculus*). Acta Zool. Mex. (ns) 88: 257-269. 2003.

Austin C. R. Specialization of Gametes. En: Reproduction Mammals Series, book 6 The Evolution of Reproduction, edited by Austin, C. R. and Short, R. V., Cambridge University Press. London: 149-182, 1976.

Baccetti B. The Human Spermatozoa. En: Electron Microscopy in Biology and Medicine. Current Topic in Ultrastructural Research. Edited by Jonathan Van Blerkomm and Pietro M. Motta. Martinus Nijhoff Publishers. Boston:110. 1984.

Baccetti B. Mini Review Evolutionary Trends in Sperm Structure. Comp. Biochem. Physiol. Vol. 85 A. N° 1: 29-36. 1986.

Baker, G., Murray F.T., Jefferson L., Li, J. y Bardin, C. Perfusion of accessory organs and testes. En: Male accessory sex glands; Cap. 12. Ed. Spring-Mills & Hafez. Elsevier. North Holland Biomedical Press: 215-222. 1986.

Barrera A. Redefinición de *Cediopsylla* Jordan y *Hoplopsyllus*. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, XXVII: 67-102. 1966.

Barthelemy C., Royene D., Hammahah S, Lebos C., Tharame M-J y Lansac J. Ultrastructural Changes in Membranes and Acrosome of Human Sperm During Cryopreservation. Archives of Andrology 25: 29-40. 1990.

Barone R., Pavaux C., Blin P. C. y Cuq P. Atlas D'Anatomie du Lapin. Masson & Cie. Editeurs: 219. 1973.

Bayard T. S. Sperm Capacitation and the Acrosome Reaction. En: Annals of the New York Academy of Sciences vol 637. Ed. Bernard Robaine. The New York Academy of Sciences New York: 459-460. 1991.

Bearer E. L. y Friend D. S. Morphology of Mammalian Sperm Membranes during Differentiation, Maturation, and Capacitation. Journal of Electron Microscopy Technique 16: 281-297. 1990.

Bozzola, J.J. y Russell, L.D. Electron Microscopy. Ed. Jones and Bartlett E.U. 1992.

Cervantes R. F. A. El Conejo de los Volcanes, *Romerolagus diazi* (Mammalia: Lagomorpha), Especie Mexicana Seriamente Amenazada. II Reunión Iberoamer., Cons. Zool. Vert.: 359-368. 1979.

Cervantes R. F. A. Principales Características Biológicas del Conejo de los Volcanes *Romerolagus diazi*, Ferrari Pérez, 1893 (Mammalia: Lagomorpha). Tesis de Biólogo, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México: 1-137. 1980.

Cervantes R. F. A., Lorenzo, C. y Hoffmann RS. *Romerolagus diazi*. Mammalian Species No. 360: 1-7. 1990.

Cervantes R. F. A. y Martínez, V. J. III Morfología, Taxonomía y Sistemática del Conejo Zacatuche. En: Ecología y Conservación del Conejo Zacatuche y su Hábitat. Compiladores: Velázquez, A., Romero, F.J., López Paniagua, J. UNAM. Fondo de Cultura Económica. México. 41-50. 1996.

Cetica P. D., Solari A. J., Merian M. S., De Rosas J. C. y Burgos M. H. Evolutionary Sperm Morphology and Morphometry. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 30 (2). 309-314. 1998.

Craig W. La Munyon y Ward S. Larger Sperm Outcompete Smaller Sperm in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. R. soc. London. B.* 265: 1997-2002.1998.

Craig W. La Munyon y Ward S. Evolution of Sperm Size in Nematodes: Sperm Competition Favours Larger Sperm. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 266: 263-267. 1999.

Cummins, J.M. y Woodall, P,F. On Mammalian Sperm Dimensions. *J. Reprod. Fert.* 75, 153-175. 1985.

Díaz A. Catálogo de los Objetos que Componen el Contingente de la Comisión, Precedido de Algunas Notas Sobre su Organización y Trabajos. Exposición Internacional Colombina en Chicago. Comisión Geográfico Exploradora, República Mexicana, México D. F. 1893.

Durrell G. Mexican Expedition". Fifth Annual Report 1968. The Jersey Wildlife Preservation Trust. 6-9. 1968.

Durrell G. y Mallinson J. " Special Report: The Volcano Rabbit or Teporingo (*Romerolagus diazi*). Fifth Annual Report 1968. The Jersey Wildlife Preservation Trust. 27-36. 1968.

Eddy, E.M. y O'Brien, D. A. The Spermatozoon. En: *The Physiology of Reproduction*, Chapter 2, Second Edition. Ed. E. Knobil y J.D. Neill. Raven Press. New York: 29-79. 1994.

Fawcett, DW. Review Article the Mammalian Spermatozoon. *Developmental Biology*. 44: 394-436. 1975.

Flechon J. E. The Head of Epididymal and Ejaculated Spermatozoa (rabbit). En: *Scanning Electron Microscopic Atlas of Mammalian Reproduction*, Publishing Hafez, E. S. E., Igaku Shoin Ltd. Tokyo. 70-81, 1975.

Gage M. J. G. Mammalian Sperm Morphometry. *Proc. R. Soc. Lon. B*. 265, 97-103. 1998.

Garner, D.L. y Hafez, E.S.E. Espermatozoides y plasma seminal. En *Reproduction in farm animals*. Ed. E.S.E. Hafez. Lea & Febiger. pp. 98-112. 2003.

Gibbons I.R. Cilia and Flagella of Eukaryotes. *The Journal of Cell Biology*. Vol. 91: 107-124. 1981.

Gould K. G., Martin D. E., y Hafez E. S. E. Mammalian Spermatozoa. En: *Scanning Electron, Microscopic Atlas of Mammalian Reproduction*, Publishing Hafez, E. S. E., Igaku Shoin Ltd. Tokyo: 42-57. 1975.

Granados H. El Conejo de los Volcanes (*Romerolagus diazi*). Resumen del trabajo presentado en la Conferencia Mundial Sobre Lagomorfos en agosto de 1979. *Naturaleza* N° 3 (74): 161-170. 1980.

Granados H. Basic Information on the Volcano Rabbit. *Proc. World Lagomorph Conf.*; K. Myers and CD.MacInnes. Eds. University of Guelph, Ontario, Canada. 940-948. 1981.

Hoth, J. y Granados H. A Preliminary Report on the Breeding of the Volcano Rabbit *Romerolagus diazi* at the Chapultepec Zoo, Mexico City. *Int. Zoo Yb*. 26: 261-265. 1987.

Hoth J., Velázquez A., Romero F. L., León L., Aranda M., y Bell D. J. The Volcano Rabbit: a Shrinking Distribution and a Threatened Habitat. *Oryx*. 21: 85-91. 1987.

Jean - Lou J. Spermatozoa as Phylogenetic Characters for the Eucestoda. *J. Parasitol.* 84 (2): 385 - 408. 1998.

Joshi N., Medina H, Crœz I., y Osuna J. Determination of Ultrastructural Pathology of Human Sperm by Atomic Force Microscopy. *Fertility and Sterility*. 75: 961-965. 2001.

Leopold, A. S. Fauna Silvestre de México: Aves y Mamíferos de Caza. Pax-México, Librería Carlos Césarman conjuntamente con el I.M.R.N.R.:400-410. 1985.

Mann T. y Lutwak-Mann C. Male Reproductive Function and Semen: Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg New York: 64-67. 1981.

Millette C. F. Spermatozoa. En: *Encyclopedia of Reproduction*, vol. 4 Pro-Z. Editors in chief Knobil & Jimmy D. Neill. Academic Press. New York: 586-596. 1998.

Monesi V. Spermatogenesis and the Spermatozoa. En: *Germ Cells and Fertilization; Reproduction Mammals Series 1*. Ed. CR. Austin and RV. Short Cambridge University Press: 68-73. 1978.

Nunn R. E. *Microscopia Electrónica: Microtomía, Tinción y Técnicas Especializadas*. Editorial El Manual Moderno, México. 1976.

Overstreet J. W. y Bedford J. M. Embryonic Mortality in the Rabbit is not Increased After Fertilization by Young Epididymal Spermatozoa. *Biology of Reproduction* 15: 54 - 57. 1976.

Oko, R., y Clermont Y. Spermogenesis. Ed. Ernest Knobil & Jimmy D. Neill. Encyclopedia of Reproduction. Vol 4 Pro-Z. Academic Press. San Diego: 602-614. 1998.

Pogany, G.C., y Linder, K.A. Morphometric Analysis of Intact Sperm Heads and of Sperm Nuclei in the Mouse. The Anatomical Record, 235: 539-546. 1993.

Robinson, T. J., Elder F. F. B., y Lopez-Forment, W. Banding Studies in the Volcano Rabbit *Romerolagus diazi* and Crawshay's Hare *Lepus crawshayi*. Evidence of the Leporid Ancestral Karyotype. Canadian J. Genetic & Cytology. 22:469-474. 1981.

Rojas, M.P. Estudio Biológico del Conejo de los Volcanes (Género *Romerolagus*) (Mammalia, Lagomorpha). Tesis profesional para obtener el título de Biólogo; Facultad de Ciencias, UNAM, México: 1-71. 1951.

Schatten Gerald. Fertilization. En: Encyclopedia of Reproduction. Ed. Knobil Ernst & Neill Jimmy D. Vol 2 Ep-L. Academic Press, San Diego: 256-264. 1988.

Serres C., Escalier D. y David G. Ultrastructural Morphometry of Human Sperm Flagellum with a Stereological Analysis of the Lengths of Dense Fibres. Biol. Cell. 49: 153-162. 1983.

Sheehan, D. y Hrapchak B.B. Theory and practice of Histology. Ed. C.V. Mosby Company. U. S. A. 1980.

Simon, N. Red Data Book 1 Mammalia. Morges: IUCN. 1966.

Velázquez, A., Cervantes, F.A. y Galindo-Leal, C. The Volcano Rabbit *Romerolagus diazi* a Peculiar Lagomorph. Lutra. 36: 62-70. 1993.

Velázquez, A., Romero, F.J., López Paniagua, J. Compiladores: Ecología y Conservación del Conejo Zacatuche y su Hábitat. UNAM. Fondo de Cultura Económica, México: 203 pp. 1996.

Villa, B.R. Mamíferos del Valle de México. An. Inst. Biol. Méx., XXIII: 352-359. 1952.

World Health Organization. Who Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press. 1992.

Zanaveld, L.J.D. The Acrosome of Mammalian Spermatozoa. En: Scanning Electron Microscopic Atlas of Mammalian Reproduction, Publishing Hafez, E. S. E., Igaku Shoin Ltd. Tokyo: 70-81. 1975.

15 Zavos P. M., Correa J. R., Karagounis Ch. S., Ahparaki A., Phoroglous Ch., Hicks C. L. y Zarmakoupis-Zavos P. N. An Electron Microscope Study of the axonemal Ultrastructure in Human Spermatozoa from Male Smokers and Nonsmokers. Fertility and Sterility. 69: 430-434. 1998.

ULTRASTRUCTURAL MORPHOLOGY AND MORPHOMETRY OF EPIDIDYMAL SPERM IN THE VOLCANO RABBIT (*ROMEROLAGUS DIAZI*)

J. L. CONTRERAS¹ and R. FIERRO²

¹*Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico, and Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico*

²*Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico*

Sperm characteristics of *Romerolagus diazi*, an endemic endangered rabbit from Mexico's Highlands, are poorly known. Knowledge of gamete characteristics are urged for any conservation-oriented strategy and morphometry-based taxonomical database. Sperm lagomorph comparisons have been made at light microscopy resolution. Our goal was to analyze the ultrastructure of the *R. diazi* male gamete. Two wild animals were kept in captivity and the epididymus were obtained. Fixed gametes show a characteristic spatula-like morphology with a dilated forefront. The nucleus has an arrow head morphology lightly thicker at the base. Tail ultrastructure is similar to that of laboratory rabbits with an end piece thicker than that of human sperm. Morphometry data could be used for construction of a male gamete data base for further studies.

Keywords electron microscopy, epididymal sperm, morphology, morphometry, rabbit

INTRODUCTION

Metric and morphological characteristics have been used for sperm comparison between taxa. These two parameters were used to distinguish between human, rodent, or rabbit sperm at light microscopy level [2, 6, 9, 12]. However, intra- and inter-specific comparisons have to use more subtle differences that can only be obtained by ultrastructural and detailed morphometry. Sometimes these subtle changes are only seen when the sperm are exposed to specific experimental or developmental conditions [19].

The authors thank Jorge Lodigiani for his help in preparation of the photographs. We thank Dr. Hector Serrano for critical reading and suggestion in the preparation of this manuscript. This project was partially funded by grant 98-35-27 from FOMES awarded to J. L. Contreras. Thanks are due to the authorities of the National Secretariat for Natural Resources and Fisheries for permitting the capture of wild animals.

Address correspondence to Jose_Luis Contreras Montiel, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Depto. Biología de la Reproducción, Apdo. Postal 55-535, México, D. F., MEXICO. E-mail: jlem@xanum.uam.mx, reyna@xanum.uam.mx

Detailed studies of Mexican endemic lagomorphs sperm are scarce and restricted to the light microscopy resolution [1, 6]. This is the case of the studies of *Romerolagus diazi*, known as teporingo, zacatuche, or volcano rabbit, an endemic lagomorph inhabiting the Transversal Volcanic Axis hills of Mexico, well above the 3000 meters above sea level [22].

Even when extensive ecological studies have been done, very little is known about their basic reproductive characteristics and related only to the gross comparison of the male gamete. Comparison between sperm from several species have shown a wide variety in size and dimensions even in form, but also showing the conservation of the main characteristics (head, neck, tail, etc). Variations in shape and dimensions of the sperm have also been taken as pivotal taxonomical criteria [2, 9, 12]. Here we report additional structural and ultrastructural comparative characteristics of the *R. diazi* epididymal sperm that can be used to more accurately assess this endemic lagomorph.

MATERIAL AND METHODS

Two wild *R. diazi* mature males were captured at the Parras Town, near Mexico City in the Ajusco Hills (collector number: DOO 750) and taken to our animal facility. For comparison, laboratory rabbits were kept in our animal facility under standard conditions with water and food ad libitum. Animals were treated and sacrificed according to the guidelines suggested by the National Institute of Health and all National and International parameters for treatment of endangered species were observed. Epididymus were excised after gonadal removal and maintained in isotonic salt solution until use. All chemicals were from the highest quality available.

For electron microscopy, samples were fixed in a Karnovsky fixative and postfixed in 1% osmium tetroxide. The specimen were dehydrated by increasing ethanol series and embedded in Epon. Ultrathin sections were cut with a Reichert-Jung Ultracut, stained with uranyl acetate and lead citrate, and analyzed using a CM12 PHILIPS transmission electron microscope. Measurements and identification of the main ultrastructural components of the head and tail were done on the micrographs and compared to those described for the common rabbit *Oryctolagus cuniculus* [9, 12]. Statistical analysis was performed by using the ANOVA, Student's *t* test, and Kruskal-Wallis capabilities of the Sigma Stat statistical package.

RESULTS

Morphometric and morphological analyses were done on micrographs taken at 2,500 to 100,000 X by using the most informative segments and orientations [19], as described diagrammatically in Figure 1. Longitudinal structures along the medial plane of the head show that this structure is more like a spatula measuring $7.4 \pm 0.01 \mu\text{m}$ (Figure 1*d*) with broader borders than the central portion of the head. Proximal ends correspond to the base head thick where the tail inserts, whereas the distal rim shows the characteristic horseshoe appearance of the rabbit sperm (Figure 1*g-h*).

The nucleus of the sperm occupies almost all the volume of the sperm head from the base nucleus to the tiny tip of the anterior border of the head (Figure 1*i-n*). In the base

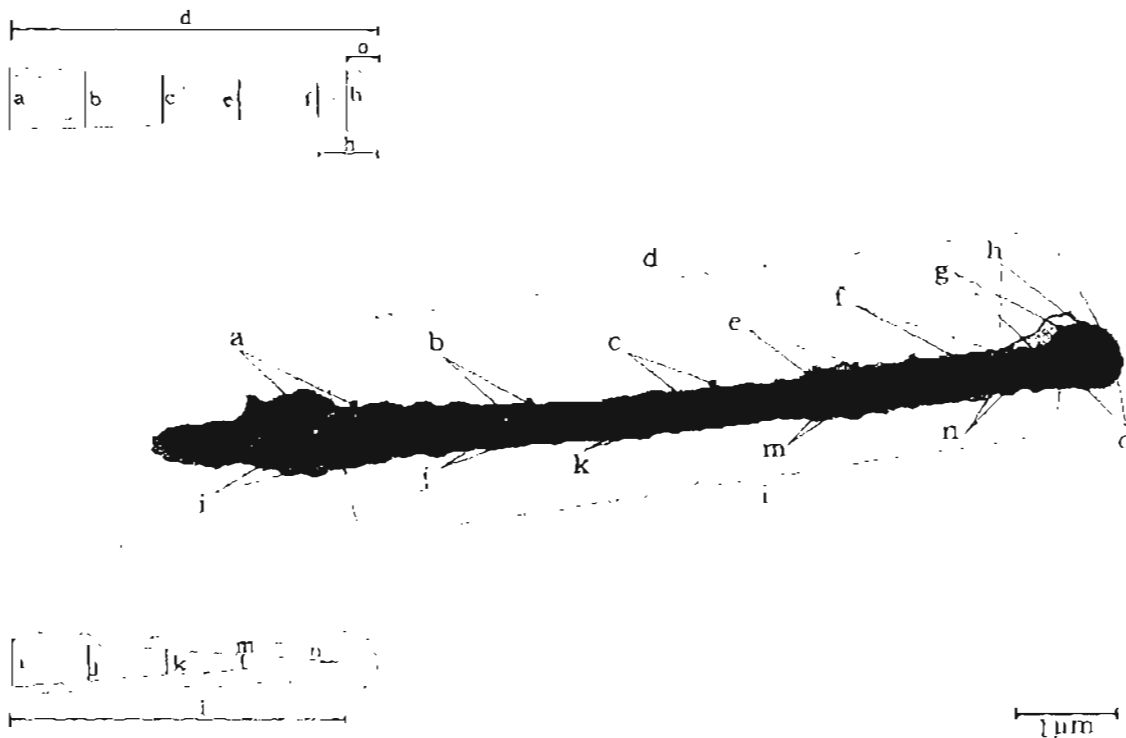


Figure 1. Transmission electron micrograph of a sagittal section of the head sperm of *R. diazi*. (X 8,000). Upper insert indicates dimensions of the periphery whereas lower insert shows nuclear characteristics. Bars = 1 μm . (a) Base head thick, (b) middle post-acrosome thick, (c) post equatorial segment thick, (d) head length, (e) middle acrosome thick, (f) post-rim thick, (g) peripheral rim thick, (h) peripheral rim length, (i) base nucleus thick, (j) proximal nucleus thick, (k) middle nucleus thick, (l) nucleus length, (m) distal nucleus thick, (n) apical nucleus thick, (o) apical segment length.

nucleus, a conspicuous depression can be observed constituting the implantation foci for the tail acting as a connection piece. This region constitutes the broader zone of the base nucleus thick (Figure 1*i*).

On the other extreme, a clear zone can be distinguished that has been denominated as the head rim corresponding to the acrosome, as is the apical segment length (Figure 1*o*). The equatorial segment is the lower depression of the valley between the broad head tip and the posterior base head. Measurements of this region thickness include the post-rim, the middle acrosome, post equatorial segment, and middle post-acrosome and are less than 0.5 μm wide (Table 1) (Figures 1*f*, 1*e*, 1*c*, and 1*b*, respectively). The base head thick (0.63 \pm 0.08 μm) (Figure 1*a*) is comparatively thicker than the peripheral rim 0.60 \pm 0.08 μm (Figure 1*g*). Measurement of the peripheral rim shows that is an oblong structure of 0.60 \pm 0.08 μm wide and 0.74 \pm 0.11 μm long (Figure 1*h*).

As has been reported, the gross morphology of the nucleus determines the global sperm head morphology [5, 10]. The *R. diazi* sperm nucleus (6.25 \pm 1.65 μm length) (Figure 1*l*) is an arrowhead nucleus slightly thicker at the base (0.23 \pm 0.02 μm) (Figure 1*i*) than at the apical anterior tip (0.13 \pm 0.02 μm) (Figure 1*m*) that initially increases up to the middle (0.24 \pm 0.05 μm) (Figure 1*k*) but remains practically constant since those differences are not statistically different (Table 2). Besides this highly aerodynamical structure, there are

Table 1. Dimensions of the head sperm of *R. diazi*. Mean \pm SD

Region	Dimensions μm
Peripheral Rim Length	0.74 \pm 0.11
Peripheral Rim Thick	0.60 \pm 0.08
Post-Rim Thick	0.34 \pm 0.02
Middle Acrosome Thick	0.37 \pm 0.02
Head Length	7.44 \pm 0.01
Post Equatorial Segment Thick	0.37 \pm 0.01
Middle Post-Acrosome Thick	0.43 \pm 0.03
Base Head Thick	0.63 \pm 0.08

two slightly thicker parts around the distal ($0.21 \pm 0.01 \mu\text{m}$) (Figure 1m) and proximal ($0.23 \pm 0.02 \mu\text{m}$) (Figure 1j) sides of the middle part of the nucleus.

The space occupied by cytoplasm is scarce but significant since differences between the measurements of the nucleus and the border of the space delimited by the sperm head varies from 15% at the base to up to a 60% at the post-rim region. When all measurements were taken in account, the estimated cytoplasm volume is less than 10% of the total head volume taking out that of the acrosome (Tables 1 and 2).

The presence of mitochondria around dense fibers and the axoneme were taken as indicative of the middle piece of the tail. Its diameter was $0.70 \pm 0.1 \mu\text{m}$ (Figures 2c and 3a). The principal piece, where there was no mitochondria, the dense fiber core was $0.42 \pm 0.1 \mu\text{m}$ around (Figure 3b), whereas the axoneme of the end piece diameter was $0.37 \pm 0.05 \mu\text{m}$ (Figure 3c). A concurrent observation of epididymal tail sperm was the presence of a cytoplasm drop at the middle piece of the tail. The nearly egg-shaped cytoplasmic structure is $2.6 \pm 0.27 \mu\text{m}$ in the long axis and $1.44 \pm 0.34 \mu\text{m}$ wide (Figure 2a b). This data could be taken for further reference in studies where maturation changes could be made.

DISCUSSION

Along with rodent and human sperm, rabbit sperm have been highly used in different types of studies in such a way that they are both morphological and functionally known [7, 9, 16, 23], but most anatomical studies on rabbit sperm have been on cells recovered

Table 2. Dimensions of nucleus sperm of *R. diazi*. Mean \pm SD

Region	Dimensions μm
Apical Segment Length	0.47 \pm 0.07
Apical Nucleus Thick	0.13 \pm 0.02
Distal Nucleus Thick	0.21 \pm 0.01
Nucleus Length	6.25 \pm 1.65
Middle Nucleus Thick	0.24 \pm 0.05
Proximal Nucleus Thick	0.23 \pm 0.02
Base Nucleus Thick	0.23 \pm 0.02

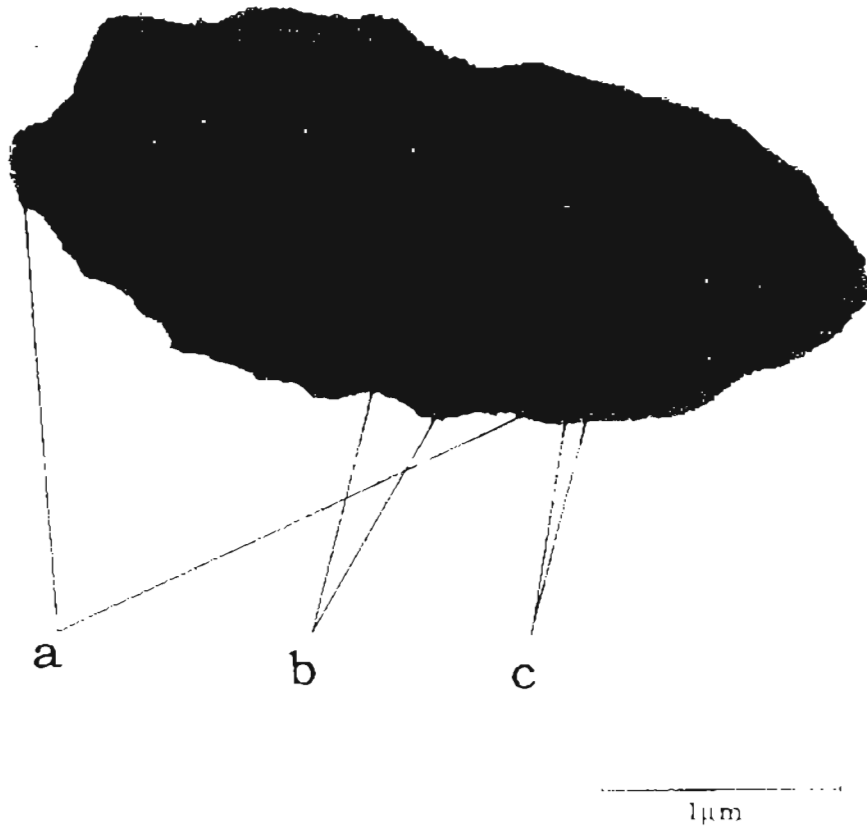


Figure 2. Electron micrograph of a cross section of a *R. diazi* sperm cytoplasm drop at the middle piece of the tail (X 8,000). (a) Long axis, (b) wide, (c) middle piece

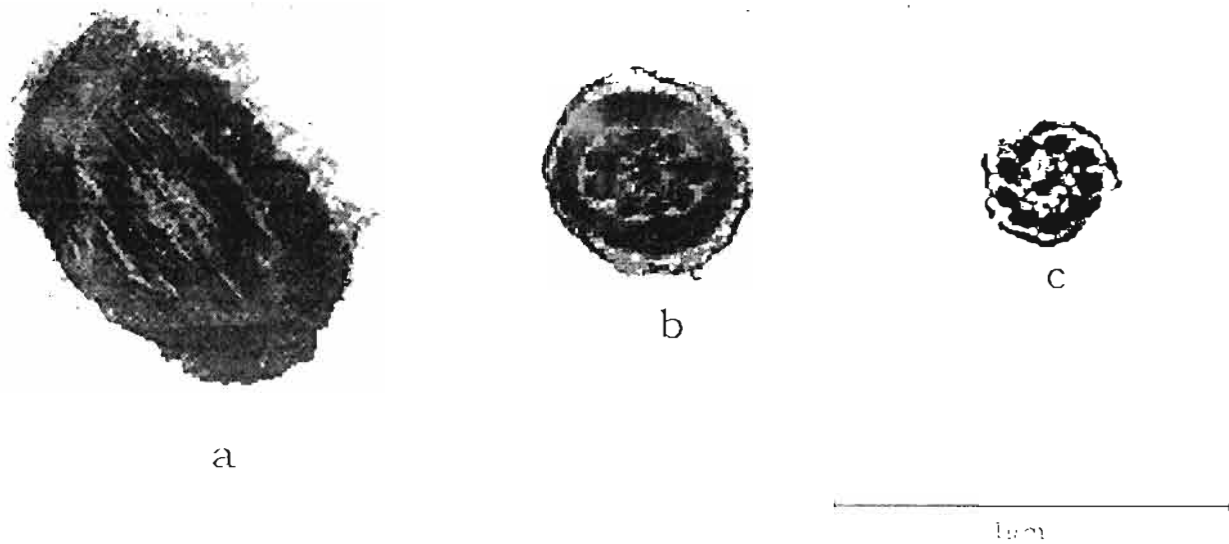


Figure 3. Electron micrograph of a cross section of a *R. diazi* sperm tail (X 8,000). (a) Middle piece, (b) principal piece, (c) end piece

from the vas deferens or different epididymal regions, but at the light microscopy level [1, 6, 9, 18]. Normally mature sperm have been collected from the epididymal tail so we start this study on tail sperm trying to obtain comparable mature morphometric and ultrastructural data of cells of *R. diazi*, an almost unknown lagomorph.

Even when sperm from animals of the same taxonomical order and the same taxonomical group could maintain a close morphology similarity [2, 8, 12], characteristic details can be observed and are the result of speciation processes [4, 11-14]. When compared to the results of Ambriz and coworkers [1] with laboratory rabbit, *R. diazi* sperm head is bigger it is 5.8 μm , whereas they report a 4.82 μm measurement at light microscopy resolution for laboratory rabbit. Also, total head length is different from that obtained by the same authors for *R. diazi* since they report an 8.63 μm total length whereas we found a 7.44 μm head. This apparent discrepancy could be explained by the accuracy of the method used due to the difference in resolution power.

Cummins and Woodall [6] reported that rabbit and hare sperm head are 8–8.5 μm and 6.4–6.8 μm , respectively, so the measurements of *R. diazi* are between their estimates. These data are in accordance to those studies that indicate that *R. diazi* is closely related to hares than to rabbits and that is actually an intermediate, as results on bone analysis, chromosome, and reproductive habits indicate [3, 20, 22].

Volcano rabbit sperm are flat as is that of cattle and human sperm. Whereas cattle sperm is 1.0 μm thick and human sperm is 1.5 μm thick [15, 17], *R. diazi* sperm is only 0.6–0.63 μm thick. Tail morphology and ultrastructure of the volcano rabbit sperm is similar to that of all mammals in both organelle distribution and region structure. Morphological descriptions of rabbit tail morphology are scarce. The only report by Cummins [6] of a 0.73 μm middle piece is the most known data on laboratory rabbits. In humans, it has been determined that middle and principal pieces are 0.88 μm and 0.53 μm , respectively [21]. We found that these two tail segments in the volcano rabbit are 0.7 μm and 0.42 μm , smaller than those of human sperm. End piece region of *R. diazi* sperm is significant thicker than its human counterpart: 0.37 μm in *R. diazi* and 0.2 μm in human [21]. Our results show that morphometry can be used for comparative purposes on sperm morphology and to develop a database for future studies dealing with sperm-based taxonomical evaluations.

REFERENCES

1. Ambriz GD, Contreras MJL, et al. (2003): Comparative study of testis, epididymus, accessory sex glands and sperm from three lagomorph species (*Romerolagus diazi*, *Lepus californicus* y *Oryctolagus cuniculus*). *Acta Zool Mex* 88:257–269 (In Spanish).
2. Austin CR (1976): Specialization of gametes. In: *The Evolution of Reproduction*. Austin CR, Short RV (Eds). Cambridge: Cambridge University Press, Vol. 6, pp 149–182.
3. Cervantes FA, Lorenzo C, Hoffmann RS (1990): *Romerolagus diazi*. *Mammalian Species* 360: 1–7.
4. Cetica PD, Solari AJ, et al. (1998): Evolutionary sperm morphology and morphometry in armadillos. *J Submicrosc Cytol Pathol* 30:309–314.
5. Chemes HE, Rawe VY (2003): Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Hum Reprod Update* 9:405–428.

6. Cummins JM, Woodall PF (1985): On mammalian sperm dimensions. *J Reprod Fert* 75: 153-175.
7. Eddy EM, O'Brien DA (1994). The spermatozoon. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD (Eds). New York: Raven Press, Ltd., pp 29-79.
8. Fawcett DW (1975). The mammalian spermatozoon. *Dev Biol* 44:394-436.
9. Flechon JE (1975). The head of epididymal and ejaculated spermatozoa (rabbit). In: *Atlas of mammalian reproduction*. Hafez ESE (Ed). Tokyo: Igaku Shoin Ltd., pp 70-81.
10. Fuentes-Mascorro G, Serrano H, Rosado A (2000): Sperm chromatin. *Arch Androl* 45:215-225.
11. Gage JGM (1998). Mammalian sperm morphometry. *Proc R Soc Lon B* 265:97-103.
12. Gould KG, Martin DE, Hafez ESE (1975): Mammalian spermatozoa. In: *Atlas of Mammalian Reproduction*. Hafez ESE (Ed). Tokyo: Igaku Shoin, Ltd., pp 42-57.
13. LaMunyon CW, Ward S (1998): Larger sperm outcompete smaller sperm in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc R Soc London* 265:1997-2002.
14. LaMunyon CW, Ward S (1999). Evolution of sperm size in nematodes: sperm competition favours larger sperm. *Proc R Soc Lond* 266:263-267.
15. Mann T, Lutwak-Mann C (1981): Male reproductive function and semen. *Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*. Berlin:Springer-Verlag, pp 64-67.
16. Millette CF (1998): Spermatozoa. In: *Encyclopedia of Reproduction*. Neill KJD (Ed) San Diego: Academic Press, Vol. 4, Pro-Z, pp 586-596.
17. Monesi V (1978): Spermatogenesis and the spermatozoa. In: *Germ cells and Fertilization*. Austin CR, Short RV (Eds) London: Cambridge University Press, *Reproduction Mammals Series*, book1, pp 68-73.
18. Overstreet JW, Bedford JM (1976). Embryonic mortality in the rabbit is not increased after fertilization by young epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 15:54-57.
19. Pogany GC, Linder KA (1993): Morphometric analysis of intact sperm heads and of sperm nuclei in the mouse. *Anat Rec* 235:539-546.
20. Robinson TJ, Elder FFB, Lopez-Forment W (1981): Banding studies in the Volcano rabbit *Romerolagus diazi* and Crawshay's hare *Lepus crawshayi*. Evidence of the leporid ancestral karyotype. *Canadian J Genetic & Citology* 22:469-474.
21. Serres C, Escalier D, David G (1983). Ultrastructural morphometry of human sperm flagellum with a stereological analysis of the lengths of dense fibres. *Biol Cell* 49:153-162.
22. Velázquez A, Romero FJ, López-Paniagua J (1996): Ecology and conservation of the zacatuche rabbit and its habitat. México: Fondo de Cultura Económica, pp. 203 (In Spanish).
23. World Health Organisation (1994): WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. New York: Cambridge University Press.