

00381



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS TESTÍCULOS,
EPIDÍDIMOS, GLÁNDULAS SEXUALES ACCESORIAS Y
CARACTERÍSTICAS DE LOS ESPERMATOZOIDES EN TRES
ESPECIES DE LAGOMORFOS: *Romerolagus diazi*, *Lepus
californicus* y *Oryctolagus cuniculus*.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

PRESENTA:

M. EN C. DEMETRIO ALONSO AMBRIZ GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: DR. ADOLFO ROSADO GARCÍA

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

EXCMO. SEÑOR

SEÑOR DON

SEÑOR DON

SEÑOR

SEÑOR DON

SEÑOR

SEÑOR DON

SEÑOR DON

SEÑOR

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSIDAD DE BURGOS

COMITÉ TUTORIAL.

DIRECTOR:

Dr. Adolfo Rosado García.

ASESORES:

Dr. Efraín Mercado Pichardo.

Dr. Fernando A. Cervantes Reza.

MIEMBROS DEL JURADO

Dr. José Miguel Betancourt Rule

Dr. Fernando A. Cervantes Reza

Dra. María Genoveva González Morán

Dr. Ricardo López Wilchis

Dr. Efraín Mercado Pichardo

Dr. Adolfo Rosado García

Dr. Javier de Jesús Valencia Méndez

autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Demetrio

Aubriz García

FECHA: 9 Junio 04

FIRMA: 

Agradecimientos y Dedicatorias:

A Ti DIOS: Porque Tu conocimiento y acercamiento es la más maravillosa realidad.

A mi MADRE, Ana María: Desde tu ventanita del cielo, asómate un momentito, quiero decirte que te quiero y enviarte un amoroso beso.

A mi PADRE, José Guadalupe: Gran Maestro en mi vida. Cambiaste la teoría por el ejemplo, te amo y te admiro, quédate muchos años más.

A PAU, ALE y GRIS: En el silencio de los corazones está la voz más pura. Amadas hijas nunca dejen de escucharla.

HERMANOS, CUÑADOS y SOBRINOS: "La gran familia Ambriz" recuerden siempre que la función tiene que continuar.

A CECI, KAREN y WENDY: Que me recuerdan frecuentemente aquello de que "lo esencial es invisible para los ojos".

A la UAMI: Y a todos los que la representan, porque siempre tuve el apoyo justo en mis necesidades y aliento en mis dificultades.

A mi MAESTRO: Dr. Adolfo Rosado: Por ser la sal, azúcar y pimienta de la investigación y motivo de gran parte de mi vocación y carácter.

A mi COMITÉ TUTORIAL Dr. Adolfo Rosado, Dr. Efraín Mercado y Dr. Fernando Cervantes: Ahora soy parte de su obra, parte de Ustedes.

Al MenC. José Luis Contreras: con cuyo apoyo y fe, empecé esta aventura.

A los Dres Omar Hernández y Enrique Canchola: por su crítica certera, severa y amistad duradera.

Carmen: Gracias por acompañarme en este tiempo y este espacio.

A mi JURADO: Quienes aportando su tiempo y valiosos conocimientos, dieron a esta obra un maravilloso toque final.

Y ESPECIALMENTE A TI: Que fuiste parte esencial de este trabajo, que me estuviste apoyando en muchos momentos, que me dijiste sabias palabras en momentos precisos y que hoy una vez más, amorosamente, toleras incluso que no mencione Tu nombre. A Ti amigo, amiga, compañero del Laboratorio y de la vida, sinceramente MIL GRACIAS.

A MIS VIEJOS CON AMOR Y RESPETO:

Nadie envejece sólo por vivir un número de años.
La gente envejece únicamente al abandonar sus ideales.

Los años, arrugan el rostro pero perder el entusiasmo,
arruga el alma.

La preocupación, la duda, el egoísmo, el miedo, la
desesperación, son largos, largos años que inclinan la cabeza y
llevan al espíritu de nuevo al polvo.

CICERÓN

INDICE

	pág
1.- RESUMEN	4
2.- ABSTRACT	5
3.- INTRODUCCIÓN	
3.1 Espermatoología y reproducción asistida	6
3.2 Los lagomorfos	8
3.3 El zacatuche (<i>Romerolagus diazi</i>), la liebre cola negra (<i>Lepus californicus</i>) y el conejo europeo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>).	9
3.4 El epidídimo y la maduración de los espermatozoides	14
3.5 Capacitación y reacción acrosomal	17
4.- JUSTIFICACIÓN	20
5.- HIPÓTESIS	21
6.- OBJETIVOS	22
7.- MATERIAL Y MÉTODOS	
7.1 Material biológico	23
7.2 Morfología de espermatozoides	24
7.3 Capacitación y reacción acrosomal	26
7.4 Movilidad y viabilidad espermática	27
7.5 Análisis estadísticos	28
8.- RESULTADOS	
8.1 Características de los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias	29
8.2 Recuperación de espermatozoides epididimarios	32

8.3	Características morfológicas de los espermatozoides	33
8.4	Longitud de los espermatozoides	37
8.5	Reacción acrosomal espontánea e inducida con ionóforo A23187	37
8.6	Movilidad	39
9.- DISCUSIÓN		51
10.- CONCLUSIONES		60
11.- REFERENCIAS CITADAS		61
12.- ANEXO		68
13.- DIFUSIÓN DE RESULTADOS		70

INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

		pág
Figura 1	Áreas núcleo y periféricas de la distribución natural de poblaciones de <i>Romerolagus diazi</i> .	11
Figura 2	Área de distribución natural en México de poblaciones de <i>Lepus californicus</i> .	13
Figura 3	Morfometría para los espermatozoides.	25
Cuadro 1	Morfometría de los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias de tres especies de lagomorfos.	30
Figura 4	Testículos y epidídimos de tres especies de lagomorfos con tamaños comparativos de los testículos.	31
Cuadro 2	Concentración ($\times 10^6$) de los espermatozoides obtenidos por región epididimaria.	32
Cuadro 3	Concentración ($\times 10^6$) y dimensiones lineales (μm) de los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo.	34
Figura 5	Fotografías de espermatozoides de <i>O. cuniculus</i> , <i>L. californicus</i> y <i>R. diazi</i> amplificadas a 1745X.	35
Figura 6	Espermatozoides de <i>O. cuniculus</i> , <i>L. californicus</i> y <i>R. diazi</i> amplificadas a 382X.	36
Figura 7	Espermatozoides de <i>O. cuniculus</i> , <i>L. californicus</i> y <i>R. diazi</i> con reacción acrosomal, amplificadas a 740X.	38
Cuadro 4	Porcentaje de reacción acrosomal de espermatozoides epididimarios de <i>R. diazi</i> y <i>O. cuniculus</i> después de 8 h de capacitación.	39

Figura 8	Porcentaje de movilidad de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).	40
Figura 9	Porcentaje de movimiento progresivo de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm DE$).	42
Figura 10	Velocidad de la trayectoria promedio (VAP) de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).	43
Figura 11	Velocidad de progresión (VSL) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).	44
Figura 12	Velocidad curvilínea (VCL) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).	46
Figura 13	Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).	47
Figura 14	Frecuencia de cruce del flagelo (BCF) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).	48
Figura 15	Porcentaje de rectitud (STR) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).	49
Figura 16	Porcentaje de linealidad (LIN) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).	50

1. RESUMEN

Se hizo un estudio de los testículos, epidídimos, glándulas sexuales accesorias y características de los espermatozoides del zacatuche (*Romerolagus diazi*) con la finalidad de establecer bases para su reproducción asistida y además se compararon con los de la liebre de cola negra (*Lepus californicus*), especie sin problema en sus poblaciones y el conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*), especie bien conocida al respecto.

Se obtuvo el aparato reproductor de los especímenes. Los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias fueron disecados, liberados de grasa y tejido conectivo y pesados. Los espermatozoides de la cabeza, cuerpo y cola del epidídimo fueron obtenidos, contados, fijados y medidos utilizando técnicas fotográficas. La masa testicular, como porcentaje de la masa corporal, fue más de dos veces mayor en *Lepus californicus* y en *Romerolagus diazi* que en *Oryctolagus cuniculus*. La masa epididimaria, como porcentaje de la masa corporal fue mayor en *R. diazi* que en *L. californicus* y en éste fue mayor que en *O. cuniculus*. El número de espermatozoides en la cola del epidídimo fue mayor en *L. californicus*. El largo y ancho de la cabeza espermática de *R. diazi*, fueron mayores que los de *Oryctolagus* y los de *Lepus*, y su forma más ancestral. La longitud total y el largo del flagelo fueron similares en *O. cuniculus* y *R. diazi* mientras que los espermatozoides de *L. californicus* fueron menores.

La mayor presencia de gotas citoplasmáticas en *Romerolagus diazi* indica que la maduración de sus espermatozoides ocurre en segmentos más avanzados del epidídimo en comparación con *O. cuniculus*. Además los espermatozoides de *R. diazi* mostraron un patrón de movilidad más estable durante la capacitación *in vitro*, que el de los de *O. cuniculus*, y tuvieron mayor respuesta a la inducción de reacción acrosomal.

Este es el primer estudio que describe características de los espermatozoides, glándulas sexuales accesorias, testículos y epidídimos en *Romerolagus diazi* y *Lepus californicus*.

2. ABSTRACT

A study of the male reproductive organs and spermatozoa from two Mexican lagomorphs species, the zacatuche (*Romerolagus diazi*), and the black-tailed jackrabbit (*Lepus californicus*), and comparisons with the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) were conducted. The animals were euthanased and their reproductive organs dissected. Testes, epididymides and accesory sex glands were isolated, removed and freed of fat any and connective tissues and weighed. Caput, corpus and tail spermatozoa were obtained from epididymides, counted, fixed and measured. The testicular mass considered as a percentage of body mass, the values for *L. californicus* and *R. diazi* were twice as large as determined for *O. cuniculus*. The epididymal mass, when expressed as a percentage of the body mass, was highest in *R. diazi*, and smallest in *O. cuniculus*. Spermatozoa counts from the epididymal tail were larger in *Lepus californicus* than in *R. diazi* or *O. cuniculus*. Lengths and widths of the spermatozoa head from *Romerolagus diazi* were larger than from *Oryctolagus cuniculus* and *Lepus californicus*. Total length and flagellar length of caudal spermatozoa from *O. cuniculus* and *R. diazi* were found to be similar but larger than those records from *Lepus californicus*. Spermatozoa of *R. diazi* had more cytoplasmic droplet and had better motility pattern during *in vitro* capacitation than *O. cuniculus*, also more acrosomal reaction were induced with A23187.

This is the first such quantitative and comparative study of wild lagomorphs, such as *Romerolagus diazi* and *Lepus californicus*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Espermatoología y reproducción asistida

En nuestro planeta existen más de 4,500 especies de mamíferos, de las cuales se desconoce en gran medida su biología reproductiva. El realizar estudios en esas especies permitirá la generación de conocimiento, base para ofrecer alternativas de reproducción, especialmente para especies amenazadas o en riesgo de extinción (Wildt *et al.*, 1995).

El campo de la conservación de la biodiversidad está cambiando rápidamente. Existe cada vez más cooperación global de personas entusiastas, que trabajan a favor de la vida silvestre, sin embargo el progreso de la conservación, depende de la investigación sistemática y multidisciplinaria, dispuesta a resolver problemas básicos. La reproducción es la esencia de la sobrevivencia de las especies, y se requiere de gran esfuerzo para abordar estudios en especies de mamíferos silvestres. La espermatoología en coordinación con otras áreas del conocimiento, tales como la endocrinología, embriología y criobiología (entre otras), posibilitarán la aplicación de la reproducción asistida (Wildt *et al.*, 1995).

Bajo esta nueva perspectiva espermatoológica, el establecimiento de los protocolos de laboratorio deben ser adaptados para obtener, evaluar y procesar el semen, y simultáneamente debe estudiarse el estado reproductivo de la hembra. Desde luego que la reproducción asistida no debe ser ofrecida como una solución simple a la conservación de especies, porque técnicas desarrolladas para animales domésticos tales como vacunos (*Bos taurus*) y cerdos (*Sus scrofa*), pueden no mostrar la misma eficiencia al aplicarlas a especies silvestres, así los futuros estudios deben

analizar las particularidades de cada especie, más que la sola extrapolación de conocimientos (Gómez-Pompa y Kaus, 1999). Como ejemplo de ello se tiene el caso del leopardo de las nieves *Panthera uncia*, el cual es uno de los 37 miembros de la familia *Felidae* y un miembro del género *Panthera*. Sus espermatozoides mostraron intolerancia al ser colocados en el medio Ham F-10, el cual es el de elección para los espermatozoides de los grandes felinos, pero resultó adecuado en cambio, el usar PBS, que es un medio mucho más simple. Además esos espermatozoides mostraron incapacidad de penetrar *in vitro* ovocitos de gata, lo que no ocurre con los de otras especies del mismo género.

Dentro de un grupo taxonómico dado, es poco usual encontrar grandes diferencias en las características seminales, sensibilidad de las hembras a las gonadotropinas exógenas o en los protocolos de sincronización de estros y de maduración *in vitro* de ovocitos o de fertilización *in vitro* (Wildt *et al.*, 1995).

Los ejemplos de la utilidad de la reproducción asistida en mamíferos silvestres, son ahora abundantes, como en los macacos *Macaca fascicularis* (Sankai *et al.*, 1994); el lobo rojo *Canis rufus* (Goodrowe *et al.*, 1998); el impala *Aepyceros melampus*, el elefante africano *Loxodonta africana* y el león *Panthera leo* (Gilmore *et al.*, 1998); el mono aullador *Alouatta caraya* (Valle *et al.*, 2003) y el jaguar *Panthera onca* (Gonçalves *et al.*, 2004).

Por otro lado, cuando existen pocos individuos aptos para la reproducción o cuando por consanguinidad se afecta la calidad seminal (reducción del volumen o número de células normales), se provocan problemas para la sobrevivencia natural de las especies, lo que se puede conocer estudiando su espermátología (Wildt *et al.*, 1995).

La espermatología puede contribuir a la conservación de la diversidad biológica y genética de poblaciones animales amenazadas o en riesgo de extinción, además de ayudar a la generación de conocimiento básico y al establecimiento de relaciones filogenéticas (Cummins y Woodall, 1985).

3.2 Los lagomorfos

Los lagomorfos son pequeños mamíferos, con gran importancia en las cadenas ecológicas, ya que son la fuente principal de alimento para los depredadores, contribuyen a la remoción de suelos, la regulación de poblaciones de plantas y a la diseminación de semillas. Dada su posición trófica intermedia aunada a su gran habilidad de dispersión, pueden hacer cambios de consideración en ambientes bióticos y abióticos. La capacidad de respuesta de los lagomorfos a cambios ambientales severos, como por ejemplo la perturbación de su hábitat, no es inmediata, dada su conducta flexible y su relativa larga vida media y rápida sucesión generacional. Además, los lagomorfos son importantes por su contribución a la dieta de la gente en el medio rural y por ser los mamíferos de presa más abundantes para la cacería deportiva (Leopold, 1977).

El orden Lagomorfa comprende dos grandes familias con 12 géneros y alrededor de 80 especies. Su registro fósil data de aproximadamente 45 millones de años y se le ubica en el Mioceno tardío (Dawson, 1981). En este orden están incluidos pikas (familia *Ochotonidae*), conejos y liebres (familia *Leporidae*). Las pikas son los lagomorfos más pequeños, con un peso promedio de 200 g, tienen orejas diminutas y redondeadas, patas cortas y cola vestigial. Paleontológicamente, las pikas son

extremadamente primitivas por lo que se les considera un “fósil viviente”. Viven en áreas frías de montañas elevadas como el Himalaya, la Manchuria, las Rocallosas y las Urales (Chapman y Flux, 1990).

En el Continente Americano, México es el país con el mayor número de lagomorfos: 10 especies de conejos (9 del género *Sylvilagus* y 1 del *Romerolagus*) y 5 especies de liebres del género *Lepus*. Ocho de estas especies de lagomorfos son endémicas y tienen una distribución restringida. La lista roja de la Unión Internacional para Conservación de la Naturaleza (IUCN, 2003), incluye 8 especies de lagomorfos mexicanos, 3 de los cuales (*Romerolagus diazi*, *Sylvilagus graysoni* y *Lepus flavigularis*) están en peligro de extinción y una (*Sylvilagus insonus*) como críticamente en peligro.

Algunas especies de lagomorfos, por ejemplo la liebre de cola negra (*Lepus californicus*) y el conejo silvestre europeo (*Oryctolagus cuniculus*), son consideradas perniciosas debido a su impacto sobre la agricultura y la producción animal (Best, 1996; Cervantes y González, 1996). Otros lagomorfos en cambio son poco comunes y están amenazados o en peligro de extinción (*Romerolagus diazi*). A pesar de su importancia en los sistemas ecológicos, el conocimiento sobre su biología, particularmente la reproductiva, es fragmentario y escaso.

3.3 El zacatuche (*Romerolagus diazi*), la liebre cola negra (*Lepus californicus*) y el conejo europeo (*Oryctolagus cuniculus*)

Romerolagus diazi (zacatuche, conejo de los volcanes o teporingo) es un lagomorfo atípico, endémico y relictos de México (Barrera, 1966; Hibbard, 1963; Hoth et

al., 1987). Es una especie asignada a un género monotípico. Es el lagomorfo de menor talla de nuestro país, y se caracteriza por un color pardo oscuro homogéneo. A diferencia de otros conejos, *Romerolagus diazi* tiene orejas cortas y redondeadas, patas cortas, su cola no es fácilmente visible, tiene clavícula, la cual está articulada al esternón (Cervantes et al., 1990). Tiene gran parecido físico a la pika, y al igual que ésta, habita en grandes elevaciones. Su origen se ha ubicado en el Plioceno, es decir, anterior al de las liebres y otros conejos (Dawson, 1981).

Ha sido incluido en el grupo de los conejos, a pesar de tener características que lo asemejan más a liebres o a pikas. El número cromosómico de *R. diazi* es de 48, el cual es igual al de *Lepus* y superior a *Sylvilagus* que tiene 42. El periodo de gestación en *R. diazi*, es de 39 días, mientras que en las liebres es de 37 a 47 días y en *Sylvilagus*, *Oryctolagus* y *Ochotona* de 28 a 32 días. *R. diazi* tiene en promedio 2.1 gazapos por camada, semejante a *Lepus* e inferior a *Sylvilagus* y *Oryctolagus* con 4-6 gazapos (Cervantes-Reza, 1982).

Romerolagus diazi tiene una distribución actual limitada a áreas localizadas principalmente en 4 volcanes del Eje Neovolcánico Transversal al sur de la Ciudad de México: la Sierra Nevada (Popocatepetl e Iztaccíhuatl) y en el Volcán Pelado y Tláloc, con una extensión no mayor de 250 km² (Velázquez, 1994), los cuales son principalmente bosques abiertos de pino con densas coberturas de gramíneas amacolladas. Esta localización tan cercana al complejo urbano con mayor crecimiento del mundo, ha resultado en un serio deterioro de su ya restringido hábitat y una seria amenaza para sus poblaciones, las cuales están actualmente muy fragmentadas.

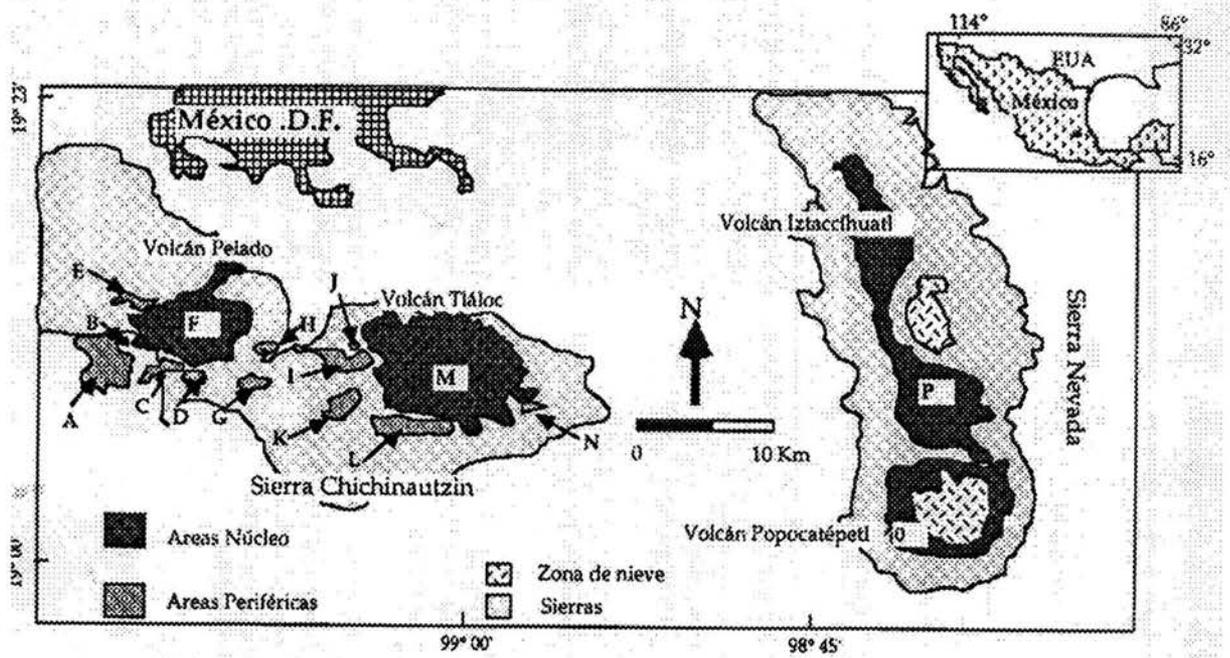


Fig 1. Áreas núcleo y periféricas de la distribución natural de poblaciones de *Romerolagus diazi* (Velázquez *et al.*, 1996).

Por otro lado, se han hecho algunos intentos de reproducir a *R. diazi* en cautiverio, no solo en nuestro país sino también en Jersey, Inglaterra; Amberes, Bélgica y Hokkaido, Japón (Hoth y Granados, 1987; Lindsay, 1982; Matsuzaki *et al.*, 1982). Solo la colonia de reproducción en el zoológico de Chapultepec en nuestro país, se mantiene activa a pesar de algunos problemas por consanguinidad. En esta colonia no solo se ha reducido el número de machos adultos que participan en la reproducción, sino que también se ha modificado su organización social (Hoth y Granados, 1987).

En un taller del Grupo Especialista de Reproducción en Cautiverio (CBSG) de la IUCN, sobre la conservación de lagomorfos de México en 1996, *Romerolagus diazi* fue elegido como el símbolo de la conservación de varias especies endémicas en peligro de

extinción para nuestro país y se recomendó, el establecimiento de técnicas desarrolladas en colaboración interinstitucional, para la reproducción asistida de individuos de esta especie mantenidos en cautiverio.

L. californicus es la más común de las liebres que habitan en nuestro territorio, se distribuye en Baja California y en la zona norte y centro del país. La cuenca de México parece ser el límite sur de su distribución.

Tiene una talla relativamente grande, con orejas largas y patas grandes. Presenta una coloración gris negruzca en el dorso del cuerpo y blanca amarillenta en el vientre. Las orejas se caracterizan por tener negra la parte posterior en su extremo terminal. La cola es gris clara en la parte inferior y tiene una franja en la parte superior que se extiende hacia el dorso (Best, 1996).

Habita principalmente en regiones áridas y zonas de pastizales donde la cubierta vegetal se ha reducido sensiblemente, La vegetación que predomina en estas áreas es de tipo xerófilo (con mezquites, pastos y arbustos espinosos). Sus poblaciones son abundantes, con gran potencial reproductivo, por lo que pueden soportar la cacería intensa sin que se reduzca su densidad actual (Cervantes, 1993; Haskell y Reynolds, 1947; Leopold, 1977). Pueden habitar en campos de cultivo y con esta disponibilidad de recursos, aumentar rápidamente sus poblaciones, causando serios daños a los cultivos, huertos y viñedos, lo mismo que a las áreas destinadas a la ganadería.

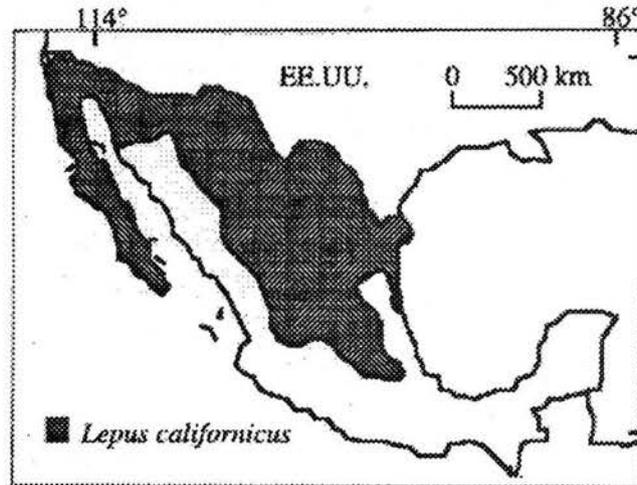


Fig 2. Área de distribución natural en México de poblaciones de *Lepus californicus* (Cervantes y González, 1996).

Paren de 2 a 4 lebratos y tienen varios partos al año (Best, 1996; Hayssen *et al.*, 1993). A pesar de la importancia que tiene *Lepus californicus*, por su amplia distribución y aprovechamiento, su biología reproductiva ha sido muy poco estudiada.

El conejo europeo *Oryctolagus cuniculus*, es nativo de Europa oriental y del noroeste de África. El conejo Nueva Zelanda blanco es la raza de *O. cuniculus*, que se ha difundido prácticamente a todo el mundo. Es un animal de talla media, de color blanco, con masas musculares abundantes, sus orejas y patas son de tamaño regular y fuertes. Tiene gran importancia como animal de laboratorio y de producción de carne, en él se ha producido un extenso conocimiento de sus características reproductivas, como en ningún otro tipo de lagomorfo (Alvariño, 2000; Ambriz *et al.*, 2002). De las

poblaciones silvestres que aún existen de *Oryctolagus cuniculus*, se sabe que es un animal gregario, promiscuo y que vive en madrigueras (Ben Saad y Maurel, 2002).

Por otro lado, dada la dificultad de obtención de muestras de semen en lagomorfos silvestres, lo usual es obtener los espermatozoides del epidídimo, por lo que se hará una breve descripción de este órgano.

3.4 El epidídimo y la maduración de los espermatozoides

Su nombre significa arriba del testículo, al cual se adosa por un borde de polo a polo y se sostiene por la túnica albugínea y tejido conectivo (Setchell *et al.*, 1994). Está constituido por un túbulo largo y contorneado, de alrededor de 1 metro de longitud en los roedores (Robaire, 1988). Se divide en 3 regiones: cabeza, cuerpo y cola, cada una con un patrón celular característico (Aman *et al.*, 1993; D'Addario *et al.*, 1980). La cabeza del epidídimo está en íntima conexión con el testículo por los conductos eferentes que salen por la cara posterior del testículo en la *rete testis*. Las funciones del epidídimo son, servir como reservorio de espermatozoides, la producción de líquido epididimario, la maduración de espermatozoides, la eliminación de espermatozoides viejos o muertos y la protección contra el estrés oxidativo, proteasas y sistema inmune (Amann *et al.*, 1993; Cooper, 1995; Reyes-Moreno *et al.*, 2002). En la cabeza y cuerpo del epidídimo maduran los espermatozoides y en la cola, se almacenan, para de ahí ser liberados durante la eyaculación o eliminados con la orina (Turner, 1995).

El epitelio epididimal tiene característicamente una gran capacidad absortiva, llegando a absorber hasta el 95 % del líquido testicular, además de reducir su pH (Hinton *et al.*, 1995; Yanagimachi, 1994). Dicha capacidad es altamente selectiva y al

igual que la velocidad de tránsito de espermatozoides es dependiente del segmento epididimario que lo realiza (Turner *et al.*, 1990). Por su parte la actividad secretora del epidídimo ayuda a mantener la viabilidad de los espermatozoides durante su almacenamiento, el cual puede ser de varios días o semanas. Cuando los espermatozoides son eyaculados, disponen de unas cuantas horas de vida en el tracto reproductor femenino (Jones y Murdoch, 1996; Yanagimachi, 1994), sufriendo paulatinamente la pérdida de su capacidad fertilizante, pérdida de la movilidad y después son desintegrados o fagocitados.

Por otro lado, los espermatozoides testiculares de mamífero no son capaces de fertilizar (Gadella y Harrison, 2002, Nixon *et al.*, 2002; Orgebin-Crist, 1981). Su maduración consiste fundamentalmente en la adquisición de la movilidad progresiva y de la habilidad fertilizante. La maduración del espermatozoide continúa en el aparato reproductor femenino, hasta completar su capacidad funcional indispensable para llevar a cabo una exitosa interacción con el ovocito (Gadella y Harrison, 2002; Rosado y Hernández, 1988). El espermatozoide experimenta como parte de su proceso de maduración las siguientes modificaciones:

- 1.- Se le agrega gliceril fosforilcolina y carnitina (Eddy *et al.*, 1985; Jones, 1998).
- 2.- Migra la gota citoplasmática (enzimas lisosómicas) (Rosado, 1988)
- 3.- Maduran el acrosoma, núcleo y flagelo (Hinton *et al.*, 1995)
- 4.- Aumentan los puentes disulfuro para estabilización de la cromatina (Bedford y Calvin, 1974; Jones, 1998).
- 5.- Desarrollan la movilidad progresiva (Visconti *et al.*, 1998).

En la porción distal de la cabeza del epidídimo, se acumula en la membrana de la cabeza de los espermatozoides, un material glicoprotéico parecido al glicocálix; en los de la región proximal de la cola, dicho material comienza a desprenderse y ya no se presenta en la parte distal de la cola del epidídimo. Esto ha sugerido la posibilidad de unión de componentes a la capa externa de la membrana que cambian su organización estructural, lo que refleja la contribución del líquido epididimario, del cual depende el desarrollo de la movilidad y habilidad de fertilizar (Court, 1984, Flesh y Gadella, 2000).

Por otro lado, la movilidad del flagelo es una expresión fundamental de la viabilidad de la célula espermática, además es esencial para su función reproductiva, es requerida durante su migración desde el sitio de inseminación al sitio de fertilización y para la penetración de las distintas estructuras que rodean al ovocito (Reyes, 1994; Yanagimachi, 1994).

Los mecanismos para la movilidad flagelar comprenden una serie compleja de procesos químicos, electroquímicos y mecanoquímicos que culminan con movimiento de los filamentos axiales o axonema, el cual consiste en nueve microtúbulos dobles con arreglo circular en torno a un cilindro, con un par central de microtúbulos simples. El modelo "nueve más dos" ha sido ampliamente conservado entre las especies (Baccetti, 1986).

Durante el patrón de movimiento conocido como hiperactivación los espermatozoides se mueven rápidamente, siguiendo trayectorias accidentadas, de serpentineo o latigazo (Olds-Clarke, 1990, Suárez *et al.*, 1992). El batimiento flagelar se torna más asimétrico, con una movilidad no progresiva en trayectorias circulares o de ocho. El aumento en la curvatura y en la asimetría del batimiento flagelar están

acompañadas por un aumento de la velocidad curvilínea y una disminución de la linealidad de la trayectoria (Kay y Robertson, 1998; Suárez *et al.*, 1992). Con el advenimiento de los métodos CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) se ha podido evaluar la movilidad espermática más objetivamente. La velocidad curvilínea (**VCL**, CurviLineal Velocity), es la velocidad en la cual la cabeza espermática sigue su trayectoria curvilínea, la velocidad lineal (**VSL**, Straight-Line Velocity), es la velocidad en que la cabeza espermática es proyectada por una línea recta entre el primero y último punto detectado, la velocidad de trayectoria promedio (**VAP**, Average Path Velocity) es la velocidad promedio de la cabeza espermática a través de una trayectoria promedio espacial, este promedio es computarizado como una forma matemática, sin picos, de la VCL. El movimiento espermático también se halla descrito por la frecuencia del cruce flagelar (**BCF**, Beat Cross Frequency) que es la frecuencia promedio en que la VCL atraviesa la VAP. La amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (**ALH**, Amplitude of Lateral Head Displacement) es el promedio o amplitud máxima de la distancia lateral de la trayectoria de la cabeza espermática en relación a la vía promedio espacial. Además el patrón de movilidad está cuantificado por dos relaciones dimensionales: linealidad (**LIN**, Linearity), que es la relación a lo largo del total de la longitud de la trayectoria curvilínea, y la rectitud (**STR**, Straightness) que es la linealidad efectiva de la vía promedio (Davis *et al.*, 1992).

3.5 Capacitación y reacción acrosomal

La capacitación espermática, se describió desde 1951 de manera independiente por M.C. Chang, quien trabajó con espermatozoides de conejo y C.R.

Austin con los de rata (citados por Austin, 1967). Comprende una serie de cambios bioquímicos que preparan al espermatozoide para la reacción acrosomal, adhesión y penetración al ovocito (Yanagimachi, 1994). En las especies en las que en el coito, el semen es depositado en el útero (cerdo, caballo, perro y algunos roedores) los espermatozoides completan su capacitación en el segmento bajo del istmo del oviducto, mientras que las que lo hacen en la vagina (primates, vaca y conejo) la capacitación comienza al pasar los espermatozoides por el moco cervical, donde se pierden elementos del líquido seminal y se completa cuando los espermatozoides llegan al lugar de la fertilización.

Durante la capacitación *in vivo*, ocurre la remoción gradual de las glicoproteínas periféricas, la redistribución de las proteínas integrales, la disminución del colesterol membranal y cambios de distribución y composición de fosfolípidos, aumento en la permeabilidad de la Fosfolipasa A en la región acrosomal espermática, se reduce la carga neta superficial de la membrana espermática, hay cambios en la distribución y contenido de los antígenos de superficie y en la permeabilidad membranal a los iones, principalmente al calcio (Brucker y Lipford, 1995; Reyes, 1994).

La reacción acrosomal es una exocitosis, en la que se fusiona la membrana plasmática con la membrana acrosomal externa. El acrosoma contiene gran cantidad de enzimas hidrolíticas y ha sido comparado con un lisosoma o gránulo secretor debido a su origen, estructura y función (Gadella y Harrison, 2002). La fusión de membranas se realiza en la región frontal o en la región periférica del acrosoma, este proceso dura de 30 segundos a 3 minutos. Se activan enzimas contenidas en el

acrosoma y otras más se secretan aún antes de que inicie la vesicularización (Yanagimachi, 1994).

A pesar de que la reacción acrosomal puede ocurrir de manera espontánea, se sabe que hay necesidad de la inducción con señales extracelulares que provienen del ovocito, de las células que lo rodean y del tejido del aparato genital femenino del sitio donde se realizará la fertilización (Reyes, 1994). *In vitro*, para estimular la reacción acrosomal se ha utilizado el líquido folicular, la presencia o interacción de las células del *cumulus oophorus*, la progesterona, la 17-hidroxiprogesterona, las células de la granulosa y las prostaglandinas (PGE₂), el calcio extracelular, los ionóforos como la ionomicina y el A23187 (Brucker y Lipford, 1995; Reyes, 1994).

4. JUSTIFICACIÓN

A pesar de la relevancia ecológica y económica que tienen los lagomorfos de nuestro país, y a que algunos de ellos enfrentan problemas poblacionales tales como la amenaza de su extinción, los estudios especializados sobre su biología de la reproducción, han sido característicamente limitados, aislados y en ocasiones nulos.

El generar conocimientos en relación con su biología de la reproducción no solo permitirá aumentar el acervo en este campo, sino además posibilitará el establecimiento de las bases formales sobre las cuales se puedan planear y reforzar los programas de control y de reproducción asistida *in situ* o *ex situ* para la conservación y aprovechamiento de estas especies en colaboración multidisciplinaria e interinstitucional para la realización de esta compleja tarea.

El comparar las características morfométricas de los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias, así como las de los espermatozoides de las tres especies de lagomorfos señaladas, permitirá establecer semejanzas y diferencias en relación a su particular biología de la reproducción. Así también, los estudios espermáticos *in vitro* de *R. diazi* y *O. cuniculus* permitirán inferir sobre la posible aplicación de otros conocimientos ya generados en este último, para el establecimiento de técnicas de reproducción asistida en *R. diazi*.

5. HIPÓTESIS

1. Dada la condición de reproducción poliándrica en *Romerolagus diazi* y *Lepus californicus*, se espera que la morfometría de los testículos, epidídimos, glándulas sexuales accesorias y la concentración espermática de las regiones del epidídimo, sean similares (en proporción), y diferentes a las de *Oryctolagus cuniculus*, por ser una especie monoándrica.
2. Dado que las tres especies estudiadas pertenecen a la misma familia, se espera que las características morfológicas de sus espermatozoides sean similares, así como el comportamiento *in vitro* de los espermatozoides de *Romerolagus diazi* y *Oryctolagus cuniculus* durante la capacitación y la inducción de la reacción acrosomal.

6. OBJETIVOS

- 1.- Realizar un análisis comparativo de los pesos de los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias en relación a la masa corporal de *Romerolagus diazi*, *Lepus californicus* y *Oryctolagus cuniculus*.
- 2.- Obtener los espermatozoides de cada región epididimaria, en las especies mencionadas. Registrar y comparar su concentración espermática total y en proporción a la masa testicular y epididimaria.
- 3.- Describir la morfología de los espermatozoides epididimarios en los tres lagomorfos estudiados.
- 4.- Analizar el patrón de movilidad espermática bajo un sistema *in vitro*, así como la capacitación y la inducción de la reacción acrosomal, de los espermatozoides de *Romerolagus diazi* y *Oryctolagus cuniculus*.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Se utilizaron cinco especímenes de *Romerolagus diazi* machos, adultos, capturados en época reproductiva (febrero a julio) en el volcán “El Pelado” situado en la región de Parres, Delegación de Tlalpan, México D.F. (permiso DOO 750-2618/97, SEMARNAP). Los ejemplares fueron llevados al laboratorio, sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico (Anestosal, Bayer, México, D.F.) administrado por vía intraperitoneal (Canadian Council on Animal Care, 1984). Se disecaron los testículos con sus epidídimos, los conductos deferentes y las glándulas sexuales accesorias.

También se utilizaron once especímenes de *Oryctolagus cuniculus* (Nueva Zelanda blanco) adultos, de fertilidad comprobada y sexualmente activos, que provenían del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, en donde se mantuvieron alojados a temperatura ambiente promedio de 26°C, con ciclos de 12 h luz y 12 h oscuridad; alimentados con “pellets” (Conejina, Purina, México, D.F) y agua *ad libitum*. Se sacrificaron siguiendo el mismo procedimiento que se aplicó a los ejemplares de *R. diazi* y se obtuvieron los mismo órganos y glándulas.

Además, ocho especímenes de *Lepus californicus* fueron obtenidos a través de cacería durante su época reproductiva (junio), en la zona desértica del norte de Durango. Los testículos con epidídimos fueron extraídos *in situ*, congelados en nitrógeno líquido y transportados al laboratorio.

Los testículos con epidídimos (frescos de *Romerolagus diazi* y *Oryctolagus cuniculus* y descongelados de *Lepus californicus*) fueron perfundidos a través de la arteria espermática con 1 ml del medio de Brackett y Oliphant (BO) (Brackett y Oliphant, 1975) que contiene NaCl 112 mM, KCl 4.02 mM, CaCl₂ 2.25 mM, MgCl₂ 0.52 mM, NaH₂PO₄ 0.83 mM, glucosa 13.9 mM, piruvato de sodio 1.25 mM, suplementado con 0.3% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma Co., St Louis, MO, EUA. Cat #A9418). Se disecaron los testículos, los epidídimos y las glándulas sexuales accesorias, y se pesaron por separado utilizando una balanza analítica digital Mettler, con una precisión de 0.1 mg.

Las regiones de cabeza, cuerpo y cola (con el conducto deferente) de cada uno de los epidídimos, fueron delimitadas por dobles ligaduras y después seccionados entre estas ligaduras para separarlas, sin que se perdiera o mezclara el contenido de cada región y se pesaron. Los espermatozoides de la cola del epidídimo fueron recuperados por retro-perfusión con 1 ml de medio BO a través del conducto deferente. Para recuperar los de cabeza y cuerpo del epidídimo, estas regiones fueron cortadas finamente sobre un vidrio de reloj con 0.5 ml de medio BO, de manera independiente, y después se filtró el tejido macerado a través de una malla de nylon licra (Mercado *et al.*, 1992). La cantidad de espermatozoides recuperados fue valorado siguiendo el método propuesto en el manual de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1987).

7.2 Morfología de espermatozoides

Una alícuota de la suspensión de espermatozoides de cola de epidídimo, fue

fijada con una mezcla de glutaraldehído/paraformaldehído (Baker *et al.*, 1986) y usada para hacer un frotis en portaobjetos que fueron teñidos con eosina 1% y nigrosina 5% (Adelman y Cahill, 1989), y fotografiados a 2400X, utilizando un microscopio Zeiss (Axiophot) de contraste de fases. Se midieron 200 espermatozoides por especie, registrando el tamaño de la cabeza, longitud de la región acrosomal y de la región postacrosomal, longitud del segmento ecuatorial, pieza media, pieza principal y longitud total del flagelo con una regla flexible y un vernier (Fig 3). También se registraron las anomalías morfológicas, presencia de gotas citoplásmicas y colas desprendidas, en 100 espermatozoides de cada individuo estudiado (Ambriz *et al.*, 2003).

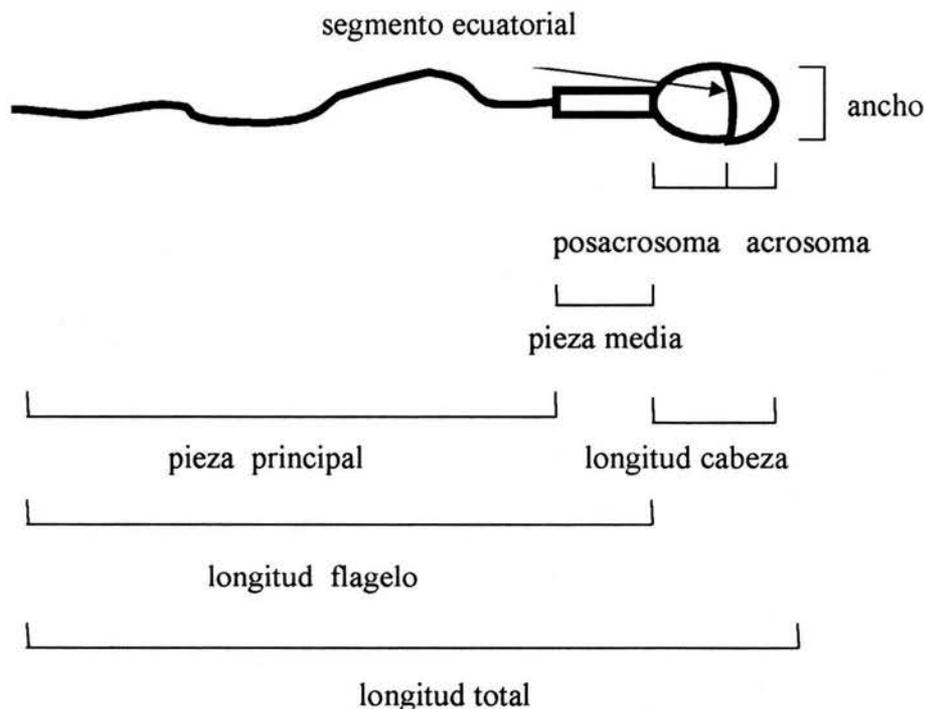


Fig 3. Morfometría para los espermatozoides.

7.3 Capacitación y reacción acrosomal

Dado que los espermatozoides de las liebres al llegar al laboratorio estaban muertos, no fue posible conocer su movilidad, capacitación y reacción acrosomal, utilizando solo los de *Romerolagus diazi* y *Oryctolagus cuniculus*.

Los espermatozoides de sus tres regiones epididimarias a una concentración de 15×10^6 /ml, fueron capacitados en tubos Eppendorf con 1 ml de medio BO suplementado, incubados durante 6 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 60% de humedad relativa (Niwa *et al.*, 1983; Rosado, 1988). Posteriormente se indujo la reacción acrosomal con Ionóforo de Calcio A23187 (Sigma Co., St Louis, MO, EUA, Cat #C7522) a una concentración final de 10µM, durante 10 minutos (Byrd y Wolf, 1986; García *et al.*, 2001). Los espermatozoides fueron fijados en glutaraldehído/paraformaldehído. Se colocaron 25 µl de la muestra fijada en 200 µl de acetato de amonio 0.1M y se centrifugó a 3,500 rpm/ 5 min, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 15 µl de acetato de amonio 0.1M, se colocaron 10 µl de esta suspensión sobre un portaobjetos tratado previamente con 8 µl de polilisina al 1% (Sigma Co., St Louis, MO, EUA Cat #P8920), se secaron al aire y fueron teñidos durante 15 minutos con azul brillante de Coomassie al 0.22% (Sigma Co., St Louis, MO, EUA Cat #B0149).

Se analizaron 100 espermatozoides por espécimen y región epididimaria antes y después de la inducción con A23187 y se registró el número de espermatozoides reaccionados utilizando el microscopio de contraste de fases a 40X (García *et al.*, 2001).

7.4 Movilidad y viabilidad espermática

Se colocaron 5 μ l de cada suspensión de espermatozoides en una cámara Makler de 10 μ m de profundidad, al inicio del periodo de capacitación y cada hora durante éste. Para determinar la movilidad por el sistema de CASA, Hamilton Thorne V.10. Se utilizaron los siguientes parámetros de calibración: frecuencia de medición 60 Hz, campos medidos 30, contraste mínimo 50, tamaño mínimo celular 5 pixeles, umbral de rectitud 80%, velocidad promedio de la trayectoria (VAP) media 50 μ m/seg y baja 30 μ m/seg, tamaño de cabeza no móvil 5 pixeles, intensidad de cabeza no móvil 90 pixeles, límite mínimo de tamaño estático 0.80 pixeles y máximo 2.99 pixeles, límite mínimo de intensidad estática 0.50 pixeles y máximo 1.70 pixeles, límite mínimo de elongación estática 0 pixeles y máximo 0.64 pixeles (Farrell *et al.*, 1995). Los parámetros medidos fueron: velocidad promedio de la trayectoria (VAP), velocidad curvilínea (VCL), velocidad en línea recta (VSL), frecuencia de cruce flagelar (BCF), amplitud lateral de la cabeza (ALH), rectitud (STR) y linealidad (LIN) de la trayectoria (Davis, *et al.*, 1992; Farrell *et al.*, 1995).

La viabilidad espermática fue valorada al inicio y cada hora durante del periodo de capacitación (Reyes, 1994) para ello se colocaron 5 μ l de la muestra en un portaobjetos y se adicionaron 5 μ l de eosina 1% y nigrosina 5%, se mezclaron y se hizo un frotis que se secó al calor, finalmente se determinó en 100 espermatozoides por individuo y tiempo de incubación, bajo el microscopio de contraste de fases a 40X.

7.5 Análisis estadísticos

Los datos de pesos de los órganos, cantidad de espermatozoides epididimarios, y los de la morfometría de los espermatozoides, fueron comparados por análisis de varianza de una vía y prueba de Tukey. Los de las glándulas sexuales por prueba t-Student. Los datos de los espermatozoides con reacción acrosomal fueron comparados por análisis de varianza de una vía y prueba de Mann-Whitney.

Los datos de movilidad espermática, velocidad de la trayectoria promedio (VAP), velocidad de progresión (VSL), velocidad curvilineal (VCL), amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH), frecuencia de cruce del flagelo (BCF), rectitud (STR) y linealidad (LIN) aparecen graficados con sus valores promedio \pm el error estándar. Los datos de movilidad progresiva aparecen con el promedio y el desvío estándar. Todos los datos de movilidad fueron comparados entre especie (*Romerolagus diazi* y *Oryctolagus cuniculus*) y región epididimaria (cabeza y cola), por medio de análisis de varianza de una vía y prueba de Mann-Whitney, utilizando para ello el paquete estadístico Sigmastat (Jandel Corporation).

8. RESULTADOS

8.1 Características de los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias

Todos los especímenes estudiados de las tres especies tuvieron los testículos escrotados. La masa testicular total (ambos testículos) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en *Lepus* (8.48 ± 0.87 g) que en *Oryctolagus* (5.76 ± 0.65 g) y en *Romerolagus* (1.88 ± 0.20 g) (Cuadro 1, Figura 4 y Anexo). Nuestros datos indican, además, que no existe relación directa entre la masa corporal y la masa testicular. Cuando la masa testicular se expresó como porcentaje de la masa corporal, fue dos veces mayor en *L. californicus* (0.378 ± 0.04 %) y en *R. diazi* (0.393 ± 0.05 %) que en *O. cuniculus* (0.162 ± 0.015 %) ($p < 0.05$).

La masa epididimaria relativa (expresada como porcentaje de la masa corporal) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en *R. diazi* (0.108 ± 0.010 %) que en *L. californicus* (0.086 ± 0.011 %) y en *O. cuniculus* (0.062 ± 0.009 %).

El peso relativo de todas las glándulas sexuales accesorias fue significativamente mayor ($p < 0.01$, Análisis de varianza previa transformación de valores por raíz cuadrada del arco seno) en *R. diazi* que en *O. cuniculus*. Esta diferencia fue particularmente importante en el caso de las glándulas seminales y de las glándulas vesiculares, las cuales fueron respectivamente, tres y cuatro veces mayores en *R. diazi* que en *O. cuniculus*.

Cuadro 1. Morfometría de los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias de tres especies de lagomorfos.

	<i>Oryctolagus cuniculus</i> n=11	<i>Lepus californicus</i> n=8	<i>Romerolagus diazi</i> n=5
Masa corporal (g)	3520 ± 250 ^a	2250 ± 320 ^b	486 ± 90 ^c
Masa testicular (g)[§]	5.76 ± 0.65 ^a	8.48 ± 0.87 ^b	1.88 ± 0.20 ^c
Masa epididimaria[§] (g)			
Total	2.28 ± 0.42 ^a	1.90 ± 0.3 ^b	0.52 ± 0.09 ^c
Cabeza	0.61 ± 0.05	0.66 ± 0.06	0.12 ± 0.04
Cuerpo	0.19 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02
Cola	1.61 ± 0.18	1.32 ± 0.09	0.39 ± 0.09
Glándulas Accesorias (g)			
Total	2.25 ± 0.42 [*]	ND	0.72 ± 0.15
Próstata	0.46 ± 0.09 [*]	ND	0.11 ± 0.02
Glándulas Vesiculares	0.64 ± 0.11 [*]	ND	0.32 ± 0.06
Glándulas Seminales	0.53 ± 0.14 [*]	ND	0.20 ± 0.04
Gl. Bulbouretrales	0.48 ± 0.23 [*]	ND	0.10 ± 0.02
Masa testicular[§] como % de la masa corporal	0.162 ± 0.015 ^a	0.378 ± 0.04 ^b	0.393 ± 0.05 ^b
Masa epididimaria[§] como % de la masa corporal	0.062 ± 0.009 ^a	0.086 ± 0.011 ^b	0.108 ± 0.010 ^c
Glándulas Accesorias como % de masa corporal			
Total	0.062 [*]	ND	0.150
Próstata	0.012 [*]	ND	0.020
Glándulas Vesiculares	0.017 [*]	ND	0.067
Glándulas Seminales	0.014 [*]	ND	0.042
Gl. Bulbouretrales	0.013 [*]	ND	0.021

Los números expresan el promedio ± desviación estándar de los datos obtenidos de la determinación de n sujetos.

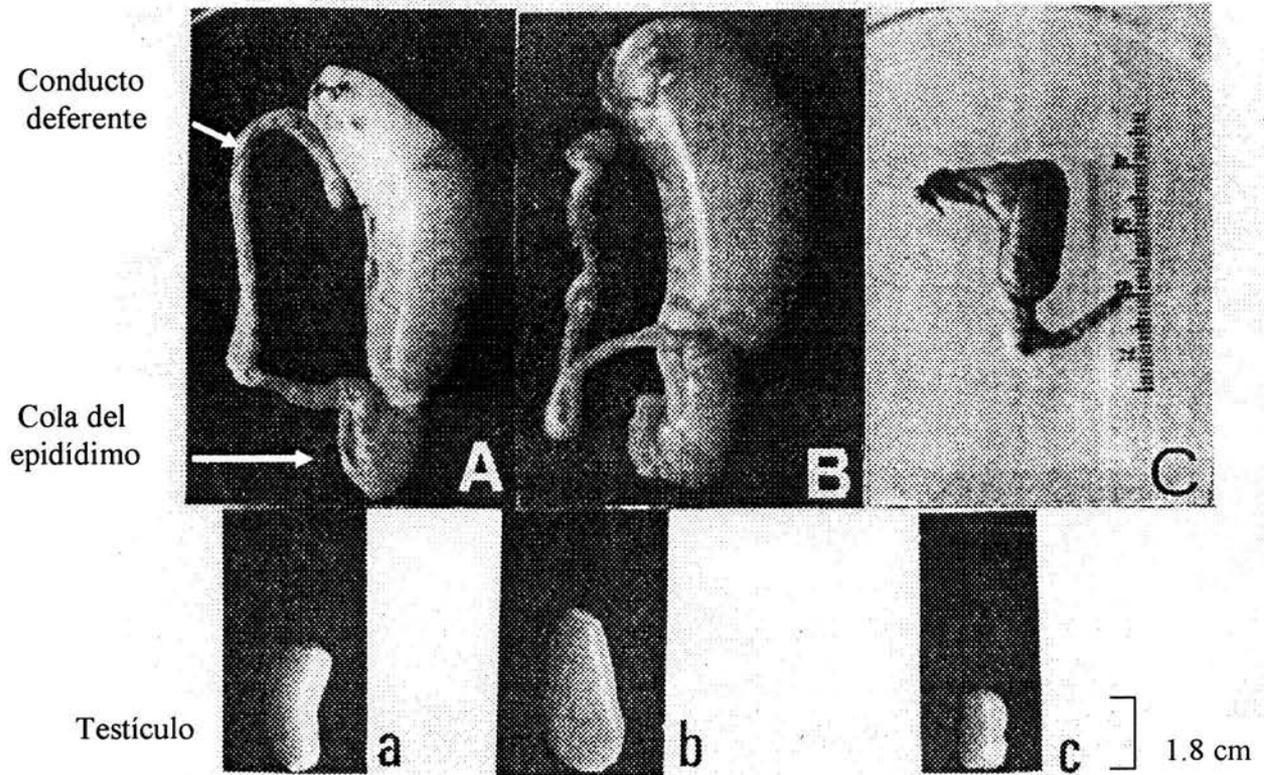
[§] Indica que se utilizó el peso de ambos testículos o de ambos epidídimos.

^{a, b, c} Letras diferentes en la misma fila indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre las tres especies de lagomorfos, obtenidas por Análisis de varianza de una vía y prueba de Tukey.

^{*} indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos en *O. cuniculus* y en *R. diazi* (p<0.01) (prueba de t de Student).

ND no determinado. Los ejemplares de *L. californicus* fueron cazados y solamente los testículos y epidídimos fueron extraídos y transportados en nitrógeno líquido hasta nuestro laboratorio.

Figura 4. Testículos y epidídimos de tres especies de lagomorfos: *Oryctolagus cuniculus* (A), *Lepus californicus* (B) y *Romerolagus diazi* (C). También se muestran los tamaños comparativos de los testículos aislados (a,b,c), escala en cm.



8.2 Recuperación de espermatozoides epididimarios

La cantidad de espermatozoides recuperados de cabeza de epidídimo fue similar entre *Oryctolagus cuniculus* y *Romerolagus diazi* y significativamente mayor ($p < 0.05$) en *Lepus californicus* (Cuadro 2). Los espermatozoides recuperados del cuerpo de epidídimo fueron menos, aunque no significativamente ($p > 0.05$), en *R. diazi* que en los otros dos y los recuperados de la cola del epidídimo fueron casi tres veces más en *L. californicus* que en *O. cuniculus* o en *R. diazi*. Por otro lado, el número total de espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo, expresados por gramo de testículo, mostró no ser significativamente diferente ($p > 0.05$) entre *L. californicus* y *R. diazi*, pero fue más grande en estas especies que en *O. cuniculus* (Cuadro 3).

Cuadro 2. Concentración ($\times 10^6$) de los espermatozoides obtenidos por región epididimaria

	<i>Oryctolagus cuniculus</i> n = 11	<i>Lepus californicus</i> n = 8	<i>Romerolagus diazi</i> n = 5
cabeza	25 ± 6 ^a	67 ± 14 ^b	24 ± 2 ^a
cuerpo	8 ± 2 ^a	8 ± 1 ^a	5 ± 2 ^a
cola	165 ± 42 ^a	521 ± 139 ^b	155 ± 49 ^a

Los números expresan el promedio \pm desviación estándar de los datos obtenidos de la determinación de n sujetos.

^{a, b} Letras diferentes en la misma fila indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las tres especies de lagomorfos, obtenidas por Análisis de varianza de una vía y prueba de Tukey.

8.3 Características morfológicas de los espermatozoides

La forma espermática de las tres especies es similar (Figura 5 A, B y C). El plano frontal de la cabeza de los espermatozoides de *Oryctolagus cuniculus* y de *Lepus californicus* es elipsoidal, mientras que la forma de la cabeza en *R. diazi* es ovoide, con la parte más ancha cerca de la porción apical. La unión entre la cabeza y la pieza media parece ser especialmente lábil en *R. diazi*, puesto que es posible observar numerosas cabezas aisladas (Figura 6 C).

El acrosoma es claramente visible en *Oryctolagus cuniculus* y en *Romerolagus diazi*, pero no en *Lepus californicus*. En las tres especies, el acrosoma cubre solo un 48% de la mitad anterior de la cabeza, pero es significativamente mayor en *R. diazi* (Cuadro 3). *R. diazi* es también la especie que muestra más espermatozoides con gotas citoplásmicas (8% comparada con 3 y 4% para *L. californicus* y *O. cuniculus*). Para *Oryctolagus cuniculus*, esta proporción parece baja comparándola con el 10% reportado (Bedford, 1963), debiendo señalarse que las técnicas de obtención y procesamiento han sido modificados significativamente en estos 40 años haciéndolas considerablemente menos agresivas. Fuera de ello no existen anomalías morfológicas importantes en ninguna de las tres especies.

Cuadro 3. Concentración (10^6) y dimensiones lineales (μm) de los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo.

	<i>Oryctolagus cuniculus</i> n = 11	<i>Lepus californicus</i> n = 8	<i>Romerolagus diazi</i> n = 5
Espermatozoides de cola de epidídimo	165 ± 42 ^a	521 ± 139 ^b	155 ± 49 ^a
Concentración espermática expresada por g de testículo	65 ± 16 ^a	123 ± 22 ^b	132 ± 18 ^b
Concentración espermática expresada por g de cola de epidídimo	205 ± 54 ^a	942 ± 195 ^b	785 ± 234 ^b
Espermatozoides			
Longitud total	55.29 ± 3.35 ^a	50.32 ± 2.25 ^b	54.61 ± 2.21 ^a
Longitud de la cabeza	8.26 ± 0.27 ^a	8.12 ± 0.24 ^b	8.63 ± 0.30 ^c
Ancho de la cabeza	4.82 ± 0.21 ^a	5.38 ± 0.27 ^b	5.88 ± 0.25 ^c
Longitud del acrosoma	3.91 ± 0.13 ^a	3.92 ± 0.26 ^a	4.23 ± 0.25 ^b
Longitud total de la cola pieza media	47.00 ± 3.30 ^a 9.22 ± 0.34 ^a	41.45 ± 3.06 ^b 8.36 ± 0.36 ^b	46.07 ± 2.19 ^a 8.85 ± 0.38 ^c
Componentes del espermatozoide expresados como % de la longitud total			
cabeza	14.7 ^a	16.8 ^b	15.9 ^c
pieza media	16.6	16.9	15.6
pieza principal	68.3	65.2	68.2

Los números expresan el promedio ± desviación estándar de los datos obtenidos de la determinación de **n** sujetos.

^a, ^b, ^c Letras diferentes en la misma fila indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las tres especies de lagomorfos, obtenidas por Análisis de varianza de una vía y prueba de Tukey.

Figura 5. Fotografías de espermatozoides de *Oryctolagus cuniculus* (A), *Lepus californicus* (B) y *Romerolagus diazi* (C), tomadas en microscopio de luz y amplificadas a 1745X.

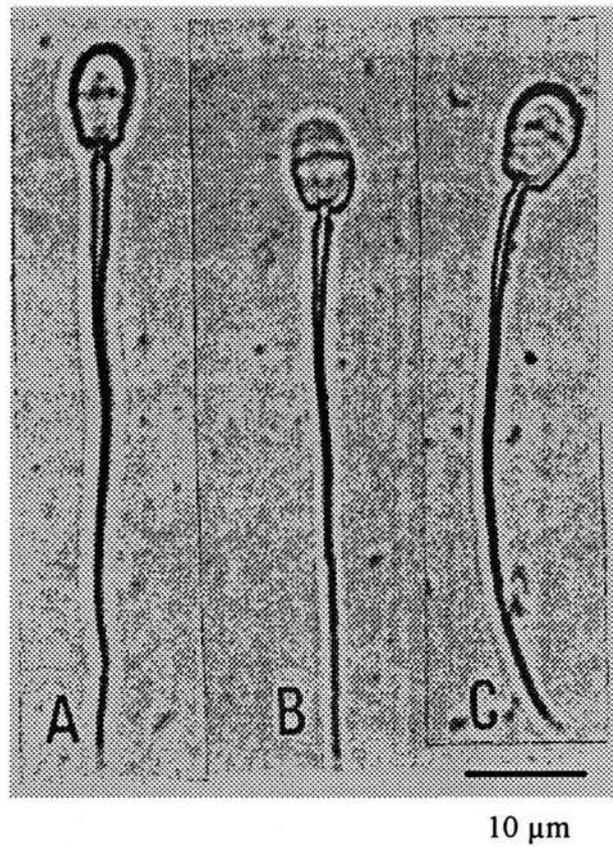
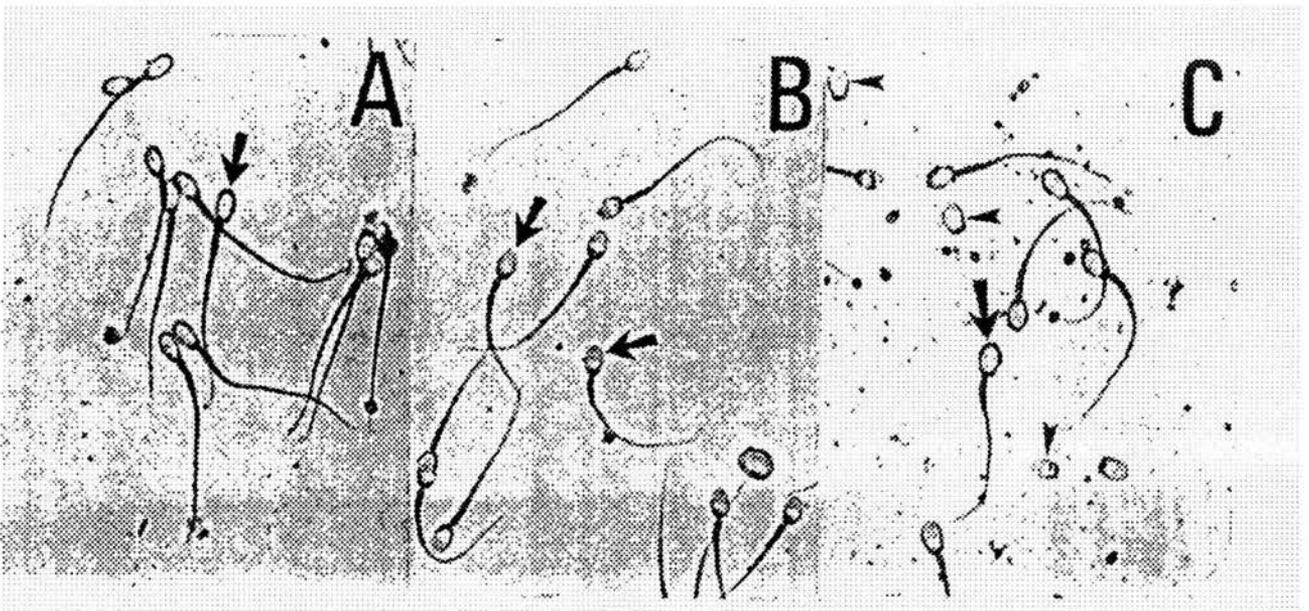


Figura 6. Espermatozoides de *Oryctolagus cuniculus* (A), *Lepus californicus* (B) y *Romerolagus diazi* (C), tomadas en microscopio de luz y amplificadas a 382X. Las flechas completas indican la zona apical del acrosoma y las puntas de flechas indican cabeza de espermatozoides desprendidas de sus colas.



8.4 Longitud de los espermatozoides

Se encontró que las dimensiones espermáticas de *Lepus californicus* fueron menores (Cuadro 3). La longitud ($8.63 \pm 0.30 \mu\text{m}$) y el ancho ($5.88 \pm 0.25 \mu\text{m}$) de la cabeza de espermatozoides de *Romerolagus diazi*, fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) que las mismas dimensiones en *Oryctolagus cuniculus* y en *Lepus californicus*. La longitud total de la cola fue semejante en *O. cuniculus* y *R. diazi* (47.00 ± 3.3 y $46.07 \pm 2.19 \mu\text{m}$), mientras que en *L. californicus* fue significativamente menor ($p < 0.05$, $41.45 \pm 3.06 \mu\text{m}$).

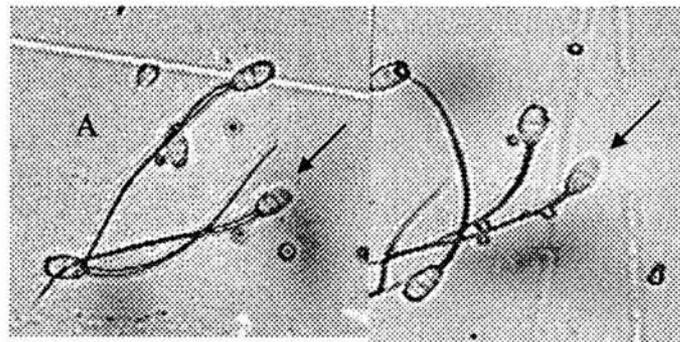
El ancho y largo de la cabeza de espermatozoides de *O. cuniculus*, fueron similares a los reportados ($4.58\text{--}4.88 \mu\text{m}$, $8.02\text{--}8.47 \mu\text{m}$, respectivamente) (Bedford, 1963), mientras que la longitud del acrosoma ($4.29\text{--}4.60 \mu\text{m}$) fue menor. El largo de la cola y la longitud total, así como la longitud de la pieza media es similar a lo reportado ($49.5 \mu\text{m}$, $58.02 \mu\text{m}$ y $8.81 \mu\text{m}$ respectivamente) (Cummins y Woodall, 1985).

8.5 Reacción acrosomal espontánea e inducida con ionóforo A23187

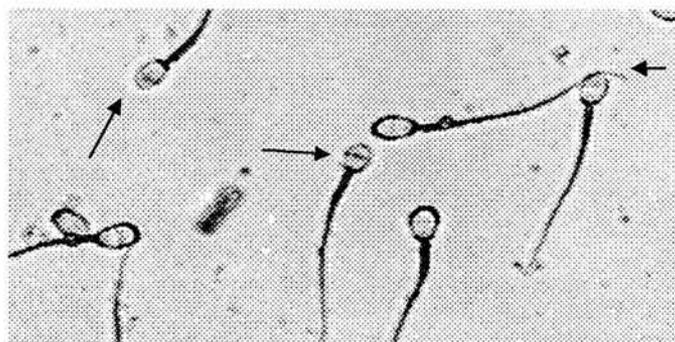
Los espermatozoides de cabeza de epidídimo de *O. cuniculus* y *R. diazi*, tuvieron reacción acrosomal en proporción similar (0.8 y 1.0% para la reacción acrosomal espontánea y 2.5 y 3.5% para la inducida, respectivamente). Los espermatozoides de cuerpo y cola de epidídimo de *Romerolagus diazi* tuvieron una significativa mayor ($p < 0.05$) proporción de reacción acrosomal en comparación a los espermatozoides de *Oryctolagus cuniculus* (Figura 7 y Cuadro

4). Los datos de *O. cuniculus* concuerdan con lo reportado para espermatozoides reaccionados por inducción con A23187 ($15\pm 4\%$) (García *et al.*, 2001).

Figura 7. Espermatozoides de *Oryctolagus cuniculus* (A) y *Romerolagus diazi* (B) con reacción acrosomal (flechas), fotografiados en microscopio de luz y amplificados a 740X.



A



B

Cuadro 4. Porcentaje de reacción acrosomal de espermatozoides epididimarios de *Romerolagus diazi* y *Oryctolagus cuniculus* después de 6 h de capacitación.

Espontánea		
	<i>O. cuniculus</i>	<i>R. diazi</i>
cabeza de epidídimo	0.8±0.3 ^a	1.0±0.6 ^a
cuerpo	1.3±0.4 ^a	2.4±0.5 ^b
cola	2.5±0.4 ^a	4.0±1.0 ^b

Inducida con A23187		
	<i>O. cuniculus</i>	<i>R. diazi</i>
cabeza de epidídimo	2.5±0.6 ^a	3.5±0.7 ^a
cuerpo	2.0±0.2 ^a	3.5±0.7 ^b
cola	15.0±1.9 ^a	23.4±2.8 ^b

Los números expresan el promedio ± desviación estándar de los datos obtenidos de la determinación de n sujetos.

^{a, b} Letras diferentes en la misma fila indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las especies de lagomorfos, obtenidas por Análisis de varianza de una vía y prueba de Mann-Whitney.

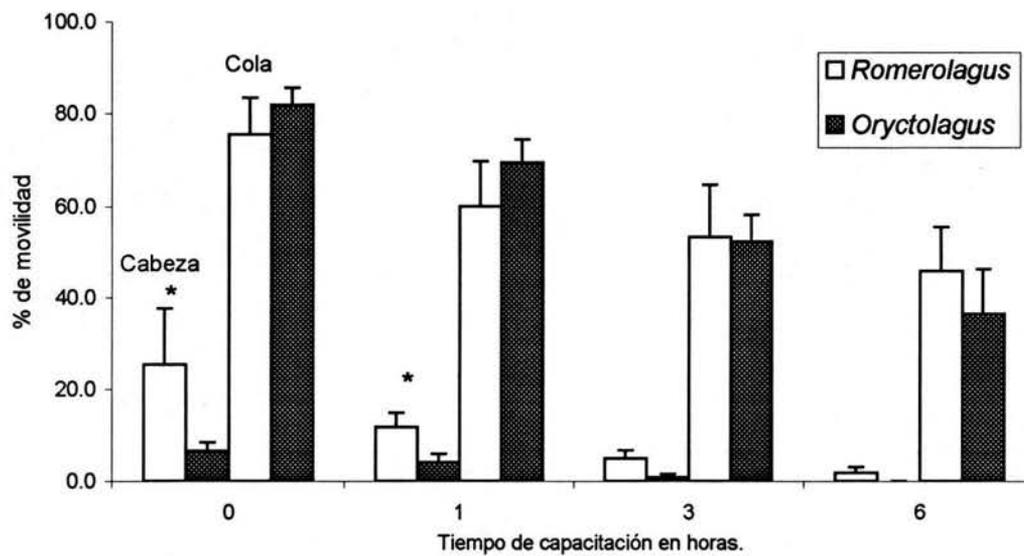
En el caso de la reacción acrosomal inducida con A23187 a los resultados obtenidos se les ha restado el porcentaje de reacciones acrosomales espontáneas.

8.6 Movilidad

Los espermatozoides de cuerpo de epidídimo por su reducido número no pudieron ser evaluados, por lo que se presentan únicamente los resultados obtenidos de cabeza y de cola del epidídimo.

El porcentaje de espermatozoides móviles de cabeza de epidídimo disminuye durante las primeras horas de capacitación y llega a ser casi nulo a las 3 h. Los espermatozoides de cabeza de epidídimo de *R. diazi* tuvieron significativamente ($p < 0.05$) mayor movimiento que los de *O. cuniculus* a las 0 y 3 h (Figura 8). La movilidad mostrada por los espermatozoides de la cabeza del

Figura 8. Porcentaje de movilidad (\pm EE) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación.



*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre espermatozoides de ambas especies y región epididimaria, obtenidas por Análisis de varianza de una vía y de Mann-Whitney.

epidídimo es poco consistente, lo que demuestra la necesidad de un tiempo de permanencia mayor en el epidídimo para su maduración.

El porcentaje de movimiento progresivo, disminuyó conforme transcurrió el tiempo de incubación. Los espermatozoides de cola de epidídimo de *Oryctolagus cuniculus* tuvieron inicialmente mayor movimiento progresivo que los de *Romerolagus diazi*. Estos últimos fueron más consistentes, de manera tal que a las 6 h de incubación, los espermatozoides de *O. cuniculus*, tuvieron valores menores (Figura 9). La disminución en la movilidad progresiva de los espermatozoides epididimarios durante su capacitación también ha sido señalado por Suárez *et al.*, 1992.

La velocidad de la trayectoria promedio (VAP) fue más consistente en los espermatozoides de cola de epidídimo de *R. diazi*, siendo estadísticamente diferente ($p < 0.05$) con respecto a los de *O. cuniculus* a las 3 y 6 h de capacitación. Los espermatozoides de cabeza de epidídimo de *R. diazi* mostraron mayor VAP a las 3 y 6 h de capacitación (Figura 10). La literatura indica que la VAP debe aumentar conforme ocurre la capacitación. Para espermatozoides de cola de epidídimo de conejo capacitados debe de ser de 120 a 135 $\mu\text{m}/\text{seg}$ (Suárez *et al.*, 1992).

La velocidad de progresión (VSL, Figura 11) se comportó de manera similar a la VAP: un patrón más consistente para los espermatozoides de cola de *R. diazi*, sin embargo lo esperado era una disminución de esta velocidad conforme transcurrió el tiempo de capacitación, ya que el espermatozoide capacitado y en proceso de hiperactivación tiene trayectorias menos lineales (Kay y Robertson, 1998).

Figura 9. Porcentaje de movimiento progresivo de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm DE$) .

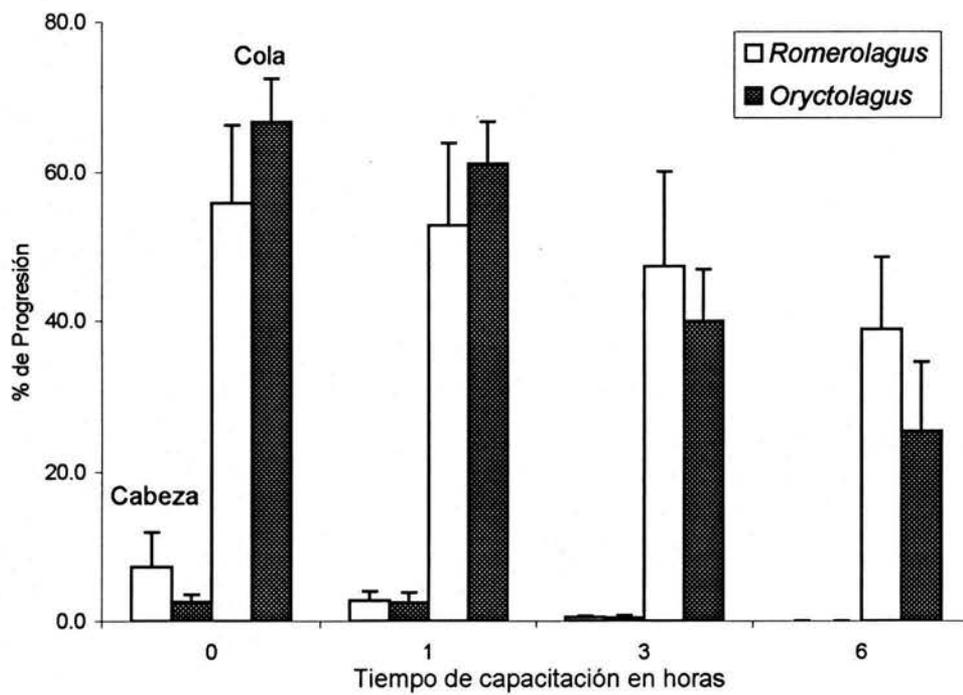
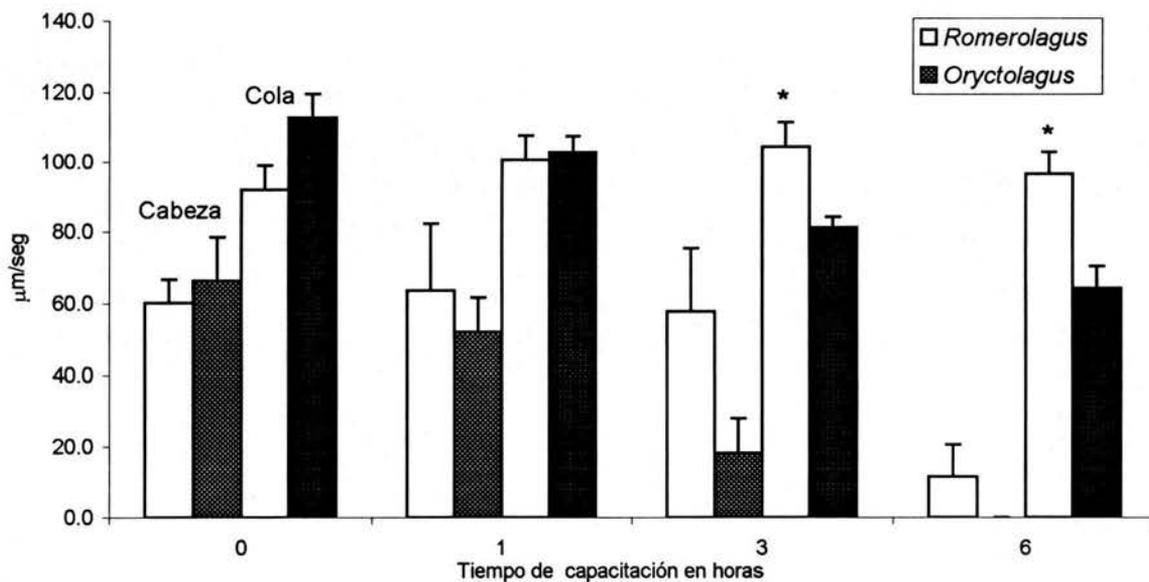
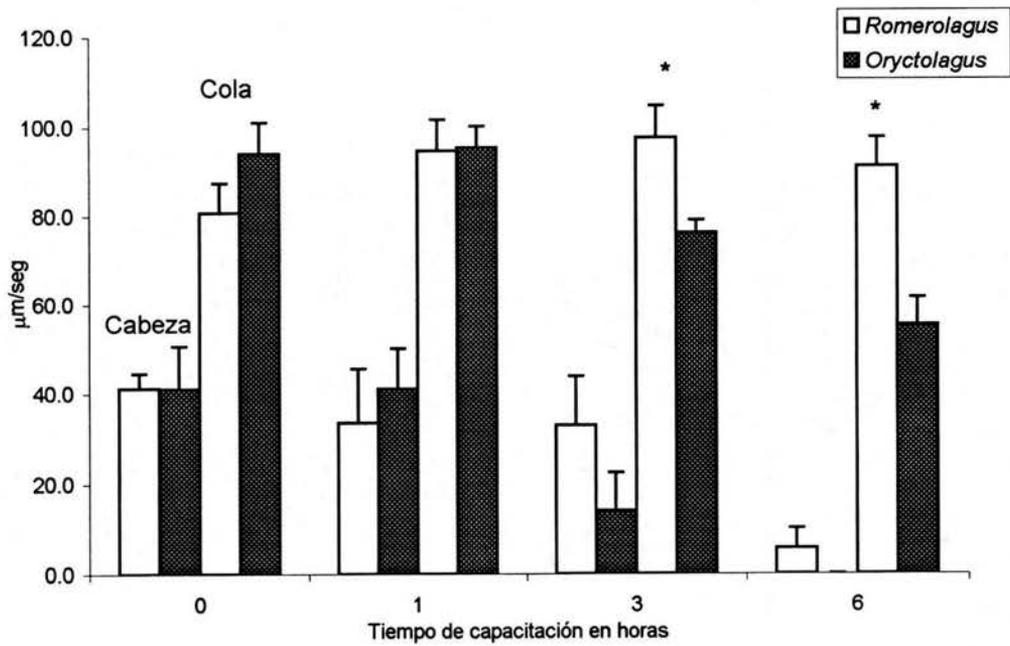


Figura 10. Velocidad de la trayectoria promedio (VAP) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).



*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre espermatozoides de ambas especies y región epididimaria, obtenidas por Análisis de varianza de una vía y de Mann-Whitney.

Figura 11. Velocidad de progresión (VSL) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($\bar{X} \pm EE$).



*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre espermatozoides de ambas especies y región epididimaria, obtenidas por Análisis de varianza de una vía y de Mann-Whitney.

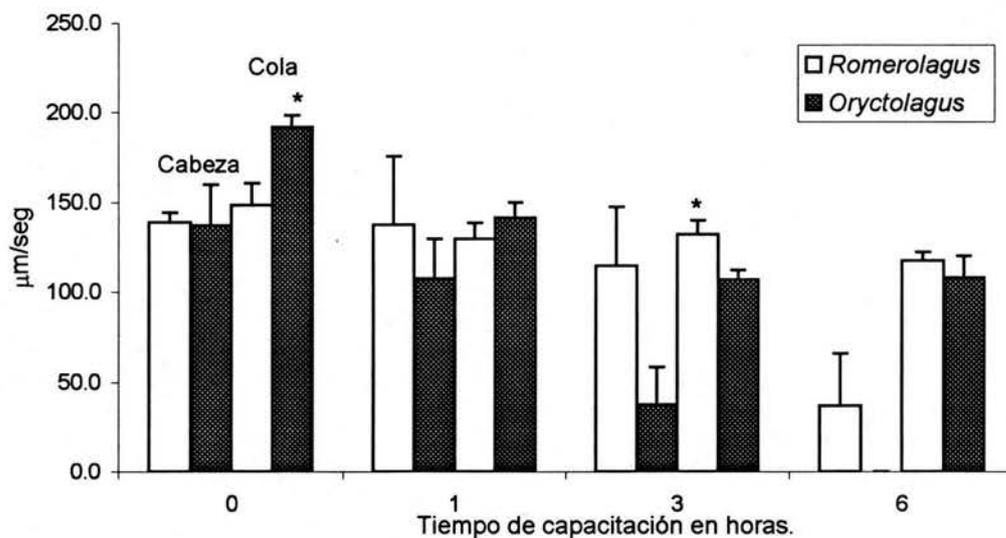
La disminución de la velocidad curvilínea (VCL, Figura 12) de los espermatozoides epididimarios de *Oryctolagus cuniculus* fue más drástica que los de *Romerolagus diazi*. Esta velocidad debió aumentar conforme el tiempo de capacitación, para al final ser de 25 a 70% mayor que la velocidad inicial (Robertson *et al.*, 1988 y Suárez *et al.*, 1992).

Al inicio del periodo de incubación, los espermatozoides de cabeza de epidídimo en ambas especies, tuvieron valores similares para el desplazamiento lateral de la cabeza (ALH, Figura 13), al paso del tiempo, descendieron bruscamente para los de cabeza de epidídimo y de manera menos pronunciada para los de cola. Se esperaba que ALH aumentara con el tiempo de capacitación, la literatura señala un aumento de hasta 100% (Robertson *et al.*, 1988).

La frecuencia de cruce del flagelo (BCF, Figura 14) es el único parámetro en donde los valores de los espermatozoides de cola de epidídimo de *O. cuniculus* son mayores a los de *R. diazi*. Al momento de que el espermatozoide va adquiriendo su hiperactividad y sigue una trayectoria poco lineal, en forma de "ocho", o de "estrella" (Robertson *et al.*, 1988), la posibilidad de cruce de la trayectoria curvilínea y la de línea recta, disminuye, y de esta manera debiera también hacerlo la BCF, lo que en el presente trabajo no se encontró.

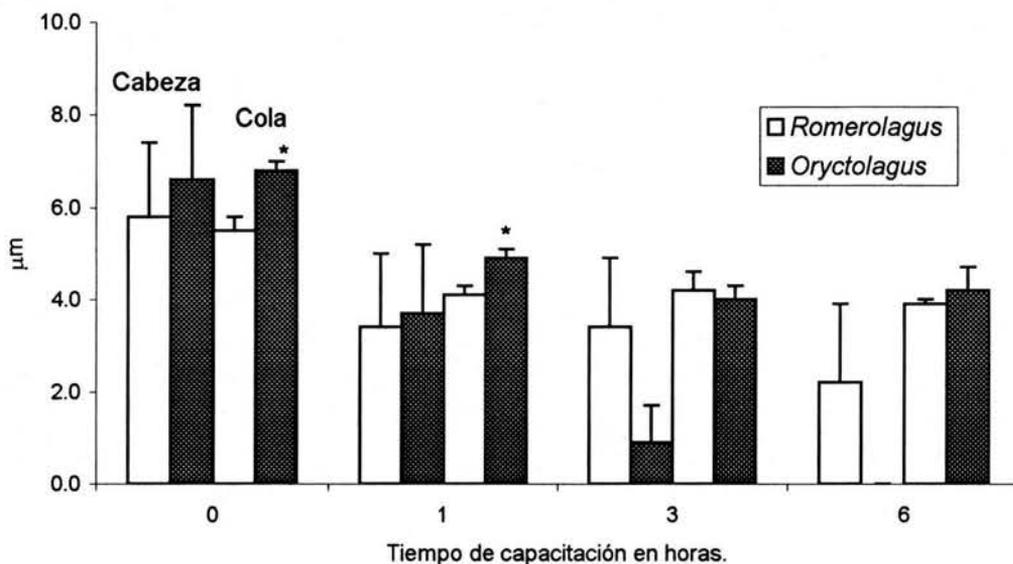
El porcentaje de rectitud (STR, Figura 15) y linealidad (LIN, Figura 16) aumentó de manera similar, en los espermatozoides de cola de epidídimo de ambas especies. Sin embargo, lo esperado era la disminución de estos parámetros, conforme transcurrió el tiempo de incubación. Tanto

Figura 12. Velocidad curvilínea (VCL) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).



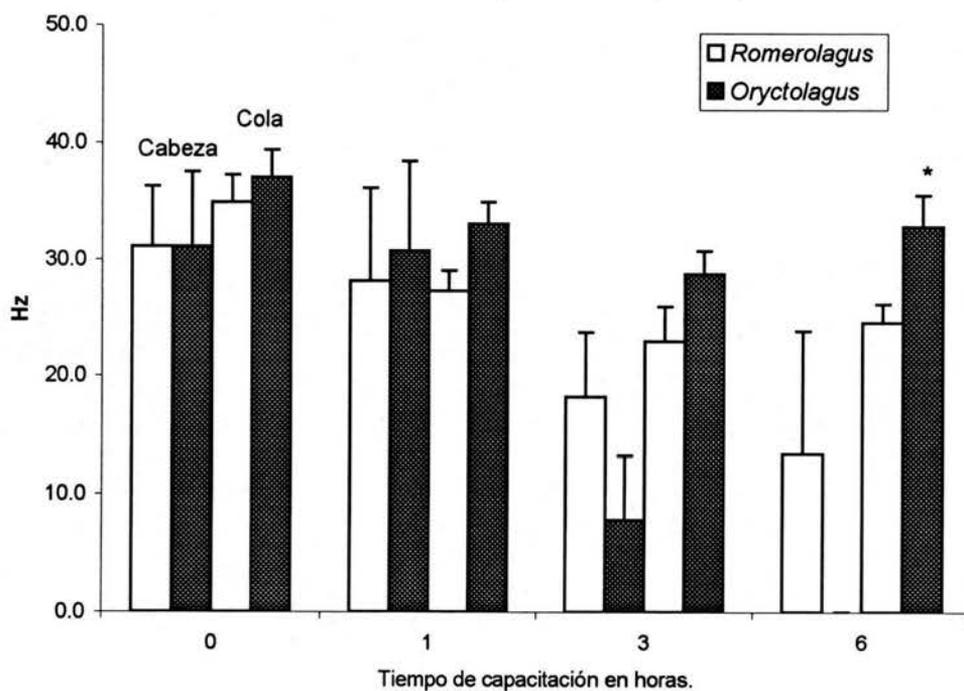
*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre espermatozoides de ambas especies y región epididimaria, obtenidas por Análisis de varianza de una vía y de Mann-Whitney.

Figura 13. Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).



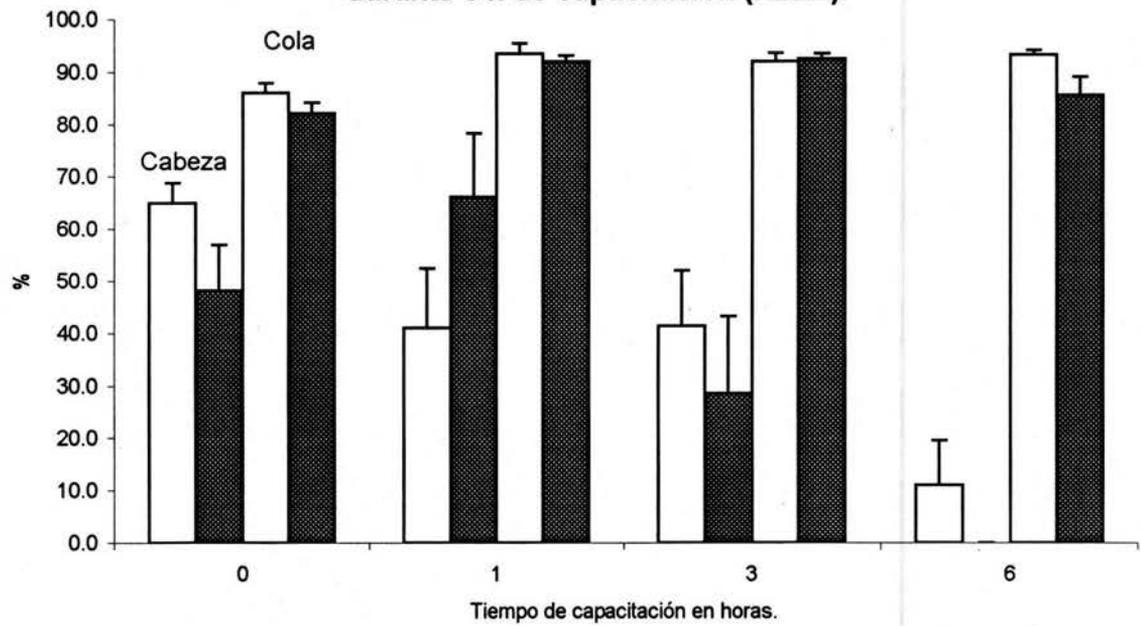
*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre espermatozoides de ambas especies y región epididimaria, obtenidas por Análisis de varianza de una vía y de Mann-Whitney.

Figura 14. Frecuencia de cruce del flagelo (BCF) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).



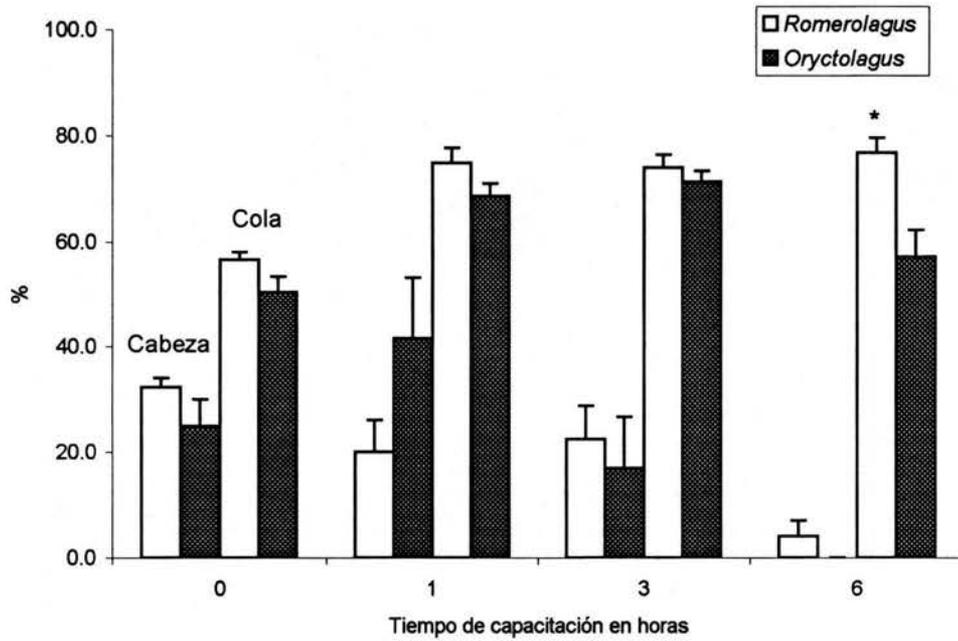
*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre espermatozoides de ambas especies y región epididimaria, obtenidas por Análisis de varianza de una vía y Mann-Whitney.

Figura 15. Porcentaje de rectitud (STR) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).



*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre espermatozoides de ambas especies y región epididimaria, obtenidas por Análisis de varianza de una vía y de Mann-Whitney.

Figura 16. Porcentaje de linealidad (LIN) de espermatozoides de cabeza y cola de epidídimo durante 6 h de capacitación ($X \pm EE$).



*Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre espermatozoides de ambas especies y región epididimaria, obtenidas por Análisis de varianza de una vía y prueba de Mann Whitney.

Robertson *et al.* (1988) como Suárez *et al.* (1992) señalan una disminución del 50% en STR y LIN.

9. DISCUSIÓN

El promedio (\pm desviación estándar) de la masa corporal en *Romerolagus diazi* está dentro de lo reportado (418 g) (Cervantes *et al.*, 1990). El promedio de masa corporal para las liebres de cola negra fue 2250 ± 320 g, como las del sur de Arizona que pesan 2475 g (Best, 1996), y para el conejo doméstico de 3520 ± 250 g, similar a lo reportado (3470 a 3850 g) (Bencheik, 1995). El peso de los testículos de *Oryctolagus* es similar a lo reportado (6.06 g) (Kenagy y Trombulak, 1986), sin embargo los pesos de los testículos de *Lepus californicus* y de *Romerolagus diazi* no pudieron ser contrastados por carecer de ellos en la literatura, lo que refuerza la necesidad de generar el conocimiento básico de su biología reproductiva.

De los datos del presente trabajo, podemos decir que los lagomorfos, al menos los lepóridos, expresan en la forma de su cabeza espermática, el tipo sugerido como ancestral (Bacceti, 1986; Cetica *et al.*, 1993, 1998), es decir, redondo/ovoide, y que la morfología y dimensiones espermáticas, están altamente conservadas en las tres especies estudiadas. El que la cabeza de los espermatozoides en *Romerolagus diazi* sea ovoide y en *Oryctolagus cuniculus* y *Lepus californicus* sea elipsoidal, apoya el argumento de que el zacatuche es más primitivo que otras especies actuales de conejos y liebres (Barrera, 1966; Corbet, 1983; Velázquez *et al.*, 1993).

Se ha postulado que en los mamíferos, particularmente en los euterios, existe una correlación negativa entre el tamaño espermático y la masa corporal, lo cual no existió en los lagomorfos aquí estudiados, siendo esto similar a lo

reportado para artiodáctilos, carnívoros y primates. Si consideramos la necesidad energética requerida por el organismo para la generación de los espermatozoides y la disyuntiva de las especies por tener pocos espermatozoides grandes o muchos pequeños, y dependiendo además de las características del patrón copulatorio, es posible que los lagomorfos opten por producir muchos espermatozoides aunque de tamaño pequeño, comparativamente con otros mamíferos, como los roedores, donde los espermatozoides miden de 100 μm a 200 μm (Ambriz *et al.*, 2002; Cummins y Woodall, 1985).

En los euterios existen pocas especies, que poseen espermatozoides con cabeza grande, acrosoma pequeño y cola corta (Cetica *et al.*, 1993; Cummins y Woodall, 1985; Fawcett, 1970, 1975), sin embargo, esto fue lo característico en los espermatozoides estudiados. Se ha mencionado que el largo y el ancho de la cabeza espermática en los armadillos *Prionomys maximus* y *Chetophractus villosus* (Cetica *et al.*, 1993) y en la musaraña asiática *Suncus murinus* (Cummins y Woodall, 1985), son los mayores entre los euterios, sin embargo, la longitud relativa de las cabezas de los espermatozoides de *Romerolagus diazi* (15.9%) y *Lepus californicus* (16.8%) no son diferentes de la longitud relativa de la cabeza de *P. maximus* (17%) y *Ch. villosus* (16.5%). Es necesario mayor estudio para la comprensión del significado fisiológico de estos datos, mismos que podrían estar relacionados con los mecanismos de compactación nuclear durante la espermatogénesis, con la migración espermática en el tracto reproductor femenino y con la fertilización luego de la inducción de la ovulación por el coito.

La longitud espermática total en las tres especies de lagomorfos estudiadas, especialmente en *Lepus californicus*, es menor que la mayoría de lo reportado para otros euterios, solo el orden artiodáctila, tiene espermatozoides más pequeños (50.8 μm contra 53.4 μm) (Cummins y Woodall, 1985; Roldán *et al.*, 1992).

Por otro lado, estudios experimentales han mostrado que en sistemas de reproducción poliándricos (Clutton-Brock, 1989; Kenagy y Trombulak, 1986), existe una presión selectiva a favor de los machos dominantes y pueden depositar más espermatozoides con capacidad fertilizante en la hembra (principio de "raffle") (Agren, 1990; Dewsbury, 1984; Huck *et al.*, 1985; Parker, 1982; Roldán *et al.*, 1992). Aunque el número total de espermatozoides depositados en la hembra puede depender de la habilidad del macho para aumentar sus apareamientos, es más determinante el número de espermatozoides eyaculados por coito y la frecuencia de cópula, los cuales dependerán de la eficiencia de la espermatogénesis y de los tiempos de maduración y almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo. Bacceti (1986) propone que en los sistemas donde la competencia espermática es importante, la producción de espermatozoides pequeños, requiere de menos recursos metabólicos y permite producir un número mayor de espermatozoides para ser depositados en un solo coito. Los datos de la presente investigación apoyan el "principio de raffle" porque los espermatozoides de *Lepus californicus* (especie poliándrica), son significativamente ($p < 0.05$) más pequeños que los espermatozoides del conejo de laboratorio *Oryctolagus cuniculus*, sin embargo, las células espermáticas de

Romerolagus diazi, presumiblemente poliándrico, no son significativamente ($p > 0.05$) más pequeñas que las de *O. cuniculus*. En contraparte, Gomendio y Roldán (1991) y Roldán *et al.*, (1992) encontraron que los espermatozoides de especies poliándricas tienden a ser de mayor tamaño que los de especies monoándricas, sugiriendo que los espermatozoides pequeños no confieren ventajas durante la competencia espermática.

Harcourt *et al.* (1981) propusieron que el tamaño testicular relativo debe ser considerado un elemento importante de los sistemas de reproducción. Esta propuesta puede ser aceptada en el caso de los machos poliginos, en los cuales la competencia espermática debe acompañarse de una alta frecuencia de cópula y producción de esperma, lo cual requiere un aumento del peso testicular. En ausencia de competencia espermática (machos monógamos) o en sistemas de poliginia extrema (un solo macho fertiliza a numerosas hembras), el tamaño relativo de los testículos tiende a ser menor. De los 3 lagomorfos aquí estudiados, el tamaño testicular relativo fue similar para *R. diazi* y para *L. californicus* y significativamente mayor ($p < 0.05$) que para *O. cuniculus*, por lo que estos datos, sugieren que la competencia espermática no ocurre en el conejo doméstico, y que existe en *L. californicus* y en *R. diazi*.

La posibilidad de almacenar mayor número de espermatozoides maduros en el epidídimo es otra característica de las especies que tienen competencia espermática, en ellas es importante evaluar las reservas epididimarias y testiculares, la producción diaria de esperma y la capacidad de almacenamiento del epidídimo. Estas variables se han registrado en distintas especies animales,

incluyendo el conejo *Oryctolagus cuniculus*, el cual produce cerca de 210×10^6 espermatozoides diariamente y cuya reserva de espermátidas representa 3.43 ± 0.03 días de producción de esperma (Amann y Lambiase, 1969; Orgebin-Crist, 1968). La naturaleza del presente estudio, no permitió realizar esas mediciones. Sin embargo, si consideramos el número total de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo, expresado como millones de células por gramo de testículo, los presentes resultados indican que la función espermatogénica testicular es mayor en *Romerolagus diazi* ($132 \pm 18 \times 10^6$ células espermáticas por gramo de testículo) y *Lepus californicus* ($123 \pm 22 \times 10^6$) que en *Oryctolagus cuniculus* ($65 \pm 16 \times 10^6$). La capacidad de almacenamiento en la cola del epidídimo es más de dos veces mayor en *L. californicus* que en *R. diazi* o en *O. cuniculus*. Si consideramos la capacidad de almacenamiento del epidídimo en relación a su tamaño (millones de espermatozoides por gramo de masa húmeda) no existen diferencias entre *L. californicus* y *R. diazi*, mientras que la capacidad de almacenamiento de la cola del epidídimo en *O. cuniculus* es menor.

Kenagy y Trombulak (1986) encontraron en mamíferos, una relación alométrica entre la masa corporal y la masa testicular. Esta relación queda establecida por la función $Y = 0.035X^{0.72}$, donde Y representa la masa de ambos testículos en gramos y X la masa corporal en gramos. Aplicando esta fórmula a los datos del presente trabajo, es posible mostrar que el valor calculado para *Lepus californicus* y para *Romerolagus diazi* se ajusta a esta propuesta, no así para *Oryctolagus cuniculus*, sin embargo se considera, el peso promedio de individuos silvestres (1537 ± 210 g) (Boyd y Myhill, 1987; Delibes y Calderón, 1979)

sí se ajusta. Al respecto es importante mencionar que la domesticación de las especies y en concreto la selección de individuos con caracteres deseables para beneficio del hombre, como es la prolificidad, precocidad y el rendimiento cárnico, ha llevado a la modificación de los parámetros reproductivos originales.

Cohen (1983) postuló que las células espermáticas pueden producirse en gran número pero muchas de ellas con defectos. Sin embargo, en el presente estudio no se observaron anormalidades morfológicas particularmente en *Lepus californicus*, la especie con mayor número de espermatozoides en la cola del epidídimo.

La mayor frecuencia de gota citoplásmica en los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo de *R. diazi* indica que la maduración de sus espermatozoides, tiene lugar en segmentos más avanzados del epidídimo que en otros lepóridos. Esta maduración tardía podría ayudar a explicar la importante proporción de espermatozoides decapitados encontrados en *R. diazi*.

Se sabe que el número de camadas por año y hembra constituye uno de los aspectos más importantes para el éxito reproductivo, especialmente en especies con poca participación parental en el cuidado de los críos como es el caso de los lagomorfos (Boyd y Myhill, 1987) o en donde las poblaciones de adultos en condición reproductiva están fragmentadas, como en el caso de *R. diazi* (López Forment y Cervantes-Reza, 1981; Velázquez *et al.*, 1996). Bajo estas circunstancias es ventajoso que se maximice la producción de crías, lo cual puede lograrse por la corta duración de la gestación, el aumento en el número de crías por camada y, sobre todo, una larga época reproductiva. En *Romerolagus diazi* la

gestación es mayor que en la mayoría de las especies de *Sylvilagus* y *Ochotona* y el tamaño de sus camadas es pequeño, en promedio 2.07 crías por camada según Cervantes-Reza (1982) o 2.7 según Matsuzaki *et al.* (1996), compensando esto con reproducción durante todo el año (Cervantes-Reza, 1982; Cervantes *et al.*, 1990; Matsuzaki *et al.*, 1982; 1996).

Respecto a la reacción acrosomal espontánea e inducida, nuestros datos para espermatozoides de cola de epidídimo de *Oryctolagus cuniculus* (2.5 y 15.0%), concuerdan con lo reportado (García *et al.*, 2001), lo que avala el sistema empleado. El que los espermatozoides de cuerpo y cola de *Romerolagus diazi* mostraran reacción acrosomal inducida y espontánea, indica su tolerancia al sistema de incubación e inducción empleado, y el que fuera mayor (más del 60%) que la mostrada por los de *O. cuniculus*, denota su mayor capacidad de respuesta ante el agente inductor empleado (ionóforo A23187). Esto podría implicar una mayor eficiencia de sus poblaciones espermáticas para el éxito reproductivo. El que el peso relativo de sus glándulas sexuales accesorias fuera significativamente diferente ($p < 0.01$) al las de *O. cuniculus* hace pensar que su participación en el semen y en consecuencia en la fisiología espermática sea diferente, y que tal vez esto tenga implicaciones reproductivas especie específicas de relevancia.

La movilidad de los espermatozoides de *Romerolagus diazi* resultó más consistente y de mejores valores (VAP, VCL, VSL, ALH, BCF, LIN y STR) que la de los de *O. cuniculus* y en ambas especies tendió a disminuir conforme transcurrió el tiempo de capacitación. Los espermatozoides de cola de epidídimo

de *O. cuniculus*, tuvieron mayores valores iniciales de velocidad (VAP, VCL y VSL) en comparación con los de *R. diazi*, pero posteriormente fueron disminuyendo drásticamente, para terminar por debajo de los registrados para *R. diazi*. Este movimiento espermático consistente en *R. diazi*, posiblemente esté relacionado con una mayor estabilidad membranal del flagelo espermático, como por ejemplo mayor presencia de puentes disulfuro (Yanagimachi, 1994). Sin embargo el que los espermatozoides de *Romerolagus diazi*, hayan reaccionado acrosomalmente en mayor cantidad que los de *Oryctolagus cuniculus*, podría señalar un patrón diferencial de la composición y dinámica de la membrana plasmática a nivel del flagelo en comparación con la del acrosoma.

El que la ALH (Amplitud Lateral Head) y BCF (Beat Cross Frequency), se mantuvieran con valores superiores desde el inicio, hasta el término de la capacitación en los espermatozoides de *O. cuniculus*, en comparación a los de *R. diazi*, indica que la onda de batimiento y curvatura del flagelo de sus espermatozoides es mayor, lo que refuerza la idea de la mayor estabilidad membranal (rigidez) del flagelo de los espermatozoides de *R. diazi*.

Por otro lado los patrones de movilidad aquí encontrados, no dan evidencia de un patrón característico de hiperactivación espontánea. Los espermatozoides en capacitación se hiperactivan paulatinamente y por subpoblaciones, iniciando unos cuantos y, en caso de ser estimulados, hasta llegar al 80% de ellos (Kay y Robertson, 1998). Este patrón de movimiento hiperactivo, permite al espermatozoide realizar movimientos muy vigorosos para desprenderse de las criptas oviductales y para mejor penetración a través del medio viscoso del

líquido oviductal, así como para penetrar la cubierta viscoelástica (células *cumulus* y zona pelúcida) que rodea al ovocito (Lefebvre y Suárez, 1996; Rathi *et al.*, 2001; Suárez y Dai, 1992).

Finalmente, es conveniente señalar que el presente estudio es particularmente importante por ser el primero que describe características del espermatozoide, glándulas sexuales, testículos y epidídimos de *Romerolagus diazi* y de *Lepus californicus* y que a través de esta información permite plantear nuevas directrices para estudios en pro del conocimiento de la reproducción natural o asistida de estas especies.

10. CONCLUSIONES

El análisis comparativo aquí presentado, demostró una mayor masa relativa, testicular y epididimaria, así como mayor concentración espermática expresada por gramo de testículo o de cola del epidídimo en *L. californicus* y *R. diazi*. La masa relativa de las glándulas sexuales accesorias fueron también mayores en *Romerolagus diazi*, que para *Oryctolagus cuniculus*, recordando con ello, las semejanzas que otros autores han reportado para *R. diazi* y las liebres, más que con otros conejos.

Se encontró además que los espermatozoides de *R. diazi* tienen una forma más ancestral (ovoide). Los espermatozoides de *L. californicus* son los más pequeños y presentan un acrosoma menos visible.

Los espermatozoides de *R. diazi*, tuvieron tolerancia al medio de Brackett y Oliphant, y a las condiciones de incubación específicas para *O. cuniculus*. Mostraron un patrón de movilidad *in vitro* más estable durante las 6 h de incubación y con mayor capacidad para responder a la inducción de la reacción acrosomal, en comparación a los espermatozoides de *Oryctolagus cuniculus*.

Finalmente, la trascendencia del presente estudio no sólo es hacia el conocimiento básico de la reproducción de las especies referidas, sino que aporta elementos del manejo de los gametos masculinos, para futuras acciones de reproducción asistida, especialmente en especies que, como *Romerolagus diazi*, enfrentan la grave amenaza de su extinción.

11. REFERENCIAS CITADAS

- ADELMAN, M. y E. CAHILL.** 1989. *Atlas of sperm morphology*. American Society of Clinical Pathologists. Chicago, U.S.A. pp. 99-100.
- AGREN, G.** 1990. Sperm competition, pregnancy initiation and litter size: influence of the amount of copulatory behavior in Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*. *Animal Behaviour* 40:417-427.
- ALVARIÑO, J.M.** 2000. Reproductive performance of male rabbits. 7° Congreso Mundial de Cunicultura. Valencia, España. Julio 4-7. pp 13- 35.
- AMANN, R.P. y J.T. LAMBIASE.** 1969. The male rabbit III. Determination of daily sperm production by means of testicular homogenates. *Journal of Animal Science* 28:369-374.
- AMANN, R.P., R.H. HAMMERSTEAD y A.N. VEERAMACHANENI.** 1993. The epididymis and sperm maturation: a perspective. *Reproduction Fertility and Development* 5:361-381
- AMBRIZ, G.D., A.M. ROSALES, R. SOTELO, J. MORA y A. ROSADO.** 2002. Changes in the quality of rabbit semen in 14 consecutive ejaculates obtained every 15 minutes. *Archives of Andrology* 48:389-395.
- AMBRIZ, G.D., J.L. CONTRERAS, E. MERCADO, O. HERNANDEZ, F-A CERVANTES y A. ROSADO.** 2003. Estudio comparativo de los testículos, epidídimos, glándulas sexuales accesorias y espermatozoides en tres especies de lagomorfos (*Romerolagus diazi*, *Lepus californicus* y *Oryctolagus cuniculus*). *Acta Zoológica de México*. NS. 88:257-269.
- AUSTIN, C.R.** 1967. Capacitation of spermatozoa. *Internal Journal of Fertility* 12:23-31.
- BACCETI, B.** 1986. Evolutionary trends in sperm structure. *Comprehensive Biochemical and Physiology*. 85A:29-36.
- BAKER, W.G., F.T. MURRAY, L.S. JEFFERSON, J. LI. y C.W. BARDIN.** 1986. Perfusion of sex organs and testes. pp. 215-222 En: *Male accessory sex glands*. (Spring-Mills y Hafez. E.S.E. eds). Elsevier/North Holland, Boston, U.S.A.
- BARRERA, A.** 1966. Redefinición de *Cediopsylla jordan* y *Hoplopsyllus*. Nuevas especies, comentarios sobre el concepto de relicto y un caso de evolución convergente. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* 27:67-83.
- BEDFORD, J.** 1963. Changes in the electrophoretic properties of rabbit spermatozoa during passage through the epididymis. *Nature* 200:1178-1180.
- BEDFORD, J. y H. CALVIN.** 1974. Changes in S-S linked structures of the sperm tail during epididymal maturation with comparative observation on sub mammalian species. *Journal of Experimental Zoology* 187:181-204.

- BENCHEIK, N.** 1995. Effet de la fréquence de la collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoides récoltés chez le lapin. *Annales de Zootechnie* 44: 263-279.
- BEN SAAD, M. y D. MAUREL,** 2002. Long-Day inhibition of reproduction and circadian photogonadosensitivity in Zembra Island Wild Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Biology of Reproduction* 66:415-420.
- BEST, T.L.** 1996. *Lepus californicus*. *Mammalian Species*. 530:1-10.
- BOYD, I.L. y D.G. MYHILL.** 1987. Seasonal changes in condition and fecundity in the wild European rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *Journal of Zoology* 212:223-233.
- BRACKETT, B. y G. OLIPHANT.** 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biology of Reproduction* 12:260-272.
- BRUCKER, C. y G.B. LIPFORD.** 1995. The human sperm acrosoma reaction: physiology and regulatory mechanism. *Human Reproduction* 1:51-62.
- BYRD, W. y D.P. WOLF.** 1986. Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm. *Biology of Reproduction* 34:859-869.
- CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE.** 1984. Euthanasia. pp. 70-76. En: Guide to care and use of Experimental Animals. Vol I. Ontario, Canadá.
- CERVANTES-REZA, F.** 1982. Observaciones sobre la reproducción del zacatuche o teporingo (*Romerolagus diazi*) Mammalia: Lagomorpha. *Doñana, Acta Vertebrata* 9:416-420.
- CERVANTES-REZA, F.** 1993. Conejos y liebres silvestres de México. *Ciencia y Desarrollo* 115:58-69.
- CERVANTES, F.A., V. LORENZO y R.S. HOFFMAN.** 1990 *Romerolagus diazi*. *Mammalian Species* 360:1-7.
- CERVANTES, F.A. y F.X. GONZÁLEZ.** 1996. Los conejos y liebres silvestres de México. pp. 17-25 En: *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su habitat* (A. Velázquez, F.J. Romero, and J.L. Paniagua, eds) Fondo de Cultura Económica, México.
- CETICA, P.D., J. SASSAROLI, M.S. MERANI y A. SOLARI.** 1993. Comparative spermatology in Dassipodidae: *Priodontes maximus*, *Chaetophractus villosus* and *Dasytus hybridus*. *Biocell* 18:89-103.
- CETICA, P.D., A.J. SOLARI, M.S. MERANI, J.C. DE ROSAS y M.H. BURGOS.** 1998. Evolutionary sperm morphology and morphometry in amadillos. *Journal of Submicroscopy Cytology and Pathology* 30:304-314.
- CHAPMAN, J.A. y E.C. FLUX.** 1990. *Rabbits, hares and pikas*. Status, survey and conservation action plan. The World Conservation Union and World Wide Fund for Nature. Suiza. pp 1-6

- CLUTTON-BROCK, T.H.** 1989. Mammalian matting systems. *Proceedings of Royal Society London (B)* 236:339-372.
- COHEN, J.** 1983. Selection among spermatozoa. pp. 33-37 En: *The Sperm Cell*. (Martinus Nijhoff, J. Andre, ed). La Haya, Holanda.
- CORBET, G.B.** 1983. A review of classification in the family Leporidae. *Acta Zoologica Fen* 174:11-15.
- COOPER, T.G.** 1995. Interaction between epididymal secretions and spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 53(Suppl): 119-136.
- COURT, M.** 1984. *The male in animal farm reproduction*. Institut National de la Recherche Agronomique.Francia. pp 79-101.
- CUMMINS, J.M. y P.F. WOODALL.** 1985. On mammalian sperm dimensions. *Journal of Reproduction and Fertility* 75:153-175.
- D'ADDARIO, D., T. TURNER y S. HOWARDS.** 1980. Effect of vasectomy on osmolarity of hamster testicular and epididymal intraluminal fluid. *Journal of Andrology* 1:167-170.
- DAVIS, R., P. NISWANDER y D. KATZ,** 1992. New measures of sperm motion. *Archives of Andrology* 13:139-152
- DAWSON, M.** 1981. Evolution of the modern lagomorphs. World Lagomorph Conference. Guelph, Ontario; Canadá. pp. 1-8.
- DELIBES, M. y J. CALDERON.** 1979. Datos sobre la reproducción del conejo, *Oryctolagus cuniculus* en Doñana, S.O. de España, durante un año seco. *Doñana, Acta Vertebrata* 6:91-99.
- DEWSBURY, D.A.** 1984. Sperm competition in muroid rodents. pp. 547-571 En: *Sperm competition and the evolution of animal matting systems* (R.L Smith, ed.) Academic Press, Orlando. EUA.
- EDDY, E., R. VERNON, C. MULLER, C. HAHNEL y B. FENDERSON,** 1985. Immunodissection of sperm surface modification during epididymal maturation *Journal of Anatomy* 174:225-237.
- FARRELL, P., V. TROUERN-TREND, R. FOOTE y D. DOUGLAS-HAMILTON.** 1995. Repeatability of measurements on human, rabbit, and bull sperm by computer-assisted sperm analysis when comparing individual fields and means of 12 fields. *Fertility and Sterility* 64: 208-210.
- FAWCETT, D.W.** 1970. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biology of Reproduction* 2(Suppl 2), 90-127.
- FAWCETT, D.W.** 1975. The mammalian spermatozoa. *Developmental Biology* 44:394-436.
- FLESH, F.M. y B.M. GADELLA.** 2000. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochemical Biophysics Acta* 1469:197-235.

- GADELLA, B.M. y R.A. HARRISON**, 2002. Capacitation induces cyclic adenosine 3',5'-monophosphate dependent, but apoptosis unrelated exposure to aminophospholipids at the apical head plasma membrane of boar sperm cells. *Biology of Reproduction* 67:340-350.
- GARCIA, M. R, A.M. ROSALES, O. HERNANDEZ-PEREZ, M.E. CHAVARRIA, A. REYES y A. ROSADO A.** 2001. Effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar (V-type) proton ATPases, on the capacitation of rabbit spermatozoa. *Andrologia* 33: 113-21.
- GILMORE, J., L. MCGANN, E. ASHWORTH, J. ACKER, J. RAATH, M. BUSH y J. CRITSER.** 1998. Fundamental cryobiology of selected African mammalia spermatozoa and its role in biodiversity preservation through the development of genome. *Animal Reproduction Science* 53:277-297.
- GOMENDIO, M. y E.R. ROLDAN.** 1991. Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proceedings of Royal Society London (B)* 243:181-185.
- GOMEZ –POMPA, A y A. KAUS.** 1999. From pre-hispanic to future conservation alternatives: lessons for Mexico. *Proceedings of National Academy Scientific USA.* 96:5982-5986.
- GONÇALVES, M.R., I.T. VERRESCHI, M.A. GUIMARAES, K. CASSARO, C. PESSUTI, y R.C. BARNABE.** 2004. Seasonal variation in the endocrine–testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). *Theriogenology* 62:1273-1281.
- GOODRWE K., M. HAY, C. PLATZ, S. BEHRNS, M. JONES, y E. WADDELL.** 1998. Characteristics of fresh and frozen thawed red wolf (*canis rufus*) spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 53:299-308.
- HAFEZ, E.S.** 1980. Reproducción e Inseminación Artificial de animales de Granja. Ed. Interamericana, México, D.F. pp 7-28
- HARCOURT, A.H., P.H. HARVEY, S.G. LARSON y R.V. SHORT.** 1981. Testis weight, body weight and breeding system in primates. *Nature* 293:55-57.
- HASKELL, H.S. y H.G. REYNOLDS.** 1947. Growth, developmental food requirements and breeding activity of the California jack rabbit. *Journal of Mammalogy* 28:129-136.
- HAYSEN, V., A. TIENHOVEN y A. TIENHOVEN.** 1993. Asdell's patterns of Mammalian Reproduction. Ed. Comstock Publishing Associates. Cornell University, EUA. pp 681-701.
- HIBBARD, C.W.** 1963. The origin of the P3 pattern of *Sylvilagus*, *Caprolagus*, *Oryctolagus* and *Lepus*. *Journal of Mammalogy* 44:1-15.
- HINTON, B., M. PALLADINO, D. RUDOLPH y J.C. LABUS.** 1995. The epididymis as protector of maturing spermatozoa. *Reproduction Fertility and Development* 7:731-745.
- HOTH, J. y H. GRANADOS.** 1987. A preliminary report on the breeding of the volcano rabbit *Romerolagus diazi* at the Chapultepec Zoo, México City. *Internal Zoo Year Book* 26:261-265.

- HOTH, J., A. VELÁZQUEZ, F.J. ROMERO, L. LEÓN, M. ARANDA y D.J. BELL.** 1987. The volcano rabbit a shrinking distribution and a threatened habitat. *Oryx* 21:85-91.
- HUCK, U.W., R.P QUINN y R.D. LISK.** 1985. Determinants of mating success in the golden hamster, *Mesocricetus auratus* IV. Sperm competition. *Behaviour Ecology Society* 17:239-252.
- IUCN.** 2003. Red list of thretened species. www.redlist.org
- JONES, R.** 1998. Plasmic membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility* 53(Suppl) 73-78.
- JONES, R.C. y R.N. MURDOCH.** 1996. Regulation of the motility and metabolism of spermatozoa for storage in the epididymis of euterian and marsupial mammals. *Reproduction Fertility and Development* 8:553-568.
- KAY, V. y L. ROBERTSON.** 1998. Hyperactivation motility of human spermatozoa: a review of physiological function and application in assisted reproduction. *Human Reproduction* 4: 776-786.
- KENAGY, G.J. y S.C. TROMBULAK.** 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy* 67:1-22.
- LEFEBVRE, R. y S. SUAREZ.** 1996. Effect of capacitation on bull sperm binding to homologous oviductal epithelium. *Biology of Reproduction* 54: 575-582.
- LEOPOLD, A.S.** 1977. Fauna Silvestre de México. Ed. Pax-México. Instituto Mexicano de Recursos Naturales Renovables. pp 391-410.
- LINDSAY, N.B.** 1982. A second report on the management and breeding of the volcano rabbit *Romerolagus diazi* at the Jersey Wildlife Preservation Trust. *Jersey Wild Press Trust* 19:46-51.
- LÓPEZ-FORMENT, W. y F. CERVANTES-REZA.** 1981. Preliminary observations on the ecology of *Romerolagus diazi* in México. pp. 949-955 En: Proceedings of the World Lagomorph Conference. University of Guelph (K. Myers and C.D. Mac Innes, eds), Guelph. Ontario, Canada
- MATSUZAKI, T., M. SAITO, y M. KAMIYA.** 1982. Breeding and rearing of the volcano rabbit *Romerolagus diazi* in captivity. *Experimental Animal* 31:185-188.
- MATSUZAKI, T., M. KAMIYA, H. SUSUKI, T. NOMURA y A. VELÁZQUEZ.** 1996. Reproducción en el laboratorio del conejo zacatuche. pp. 51-66 En: *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat* (A. Velázquez, F.J. Romero, and J.L. Paniagua, eds). Fondo de Cultura Económica, México.
- MERCADO, E., R. DOMINGUEZ y A. ROSADO.** 1992. Changes in membrane fluidity during epididymal maturation of rabbit spermatozoa. A study with the fluorescent probe diphenyl hexatriene. *Advance Cont. Deliver System* 8:253-266.
- NIWA, K., Y. HOSHOI, K. OHARA y A. IRITANI.** 1983. Fertilization in vitro of rabbit eggs with or without follicular cells by epididymal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. *Animal Reproduction Science* 6:143-149.

- NIXON, B., R., JONES, L. HANSEN y M. HOLLAND.** 2002. Rabbit epididymal secretory proteins I. Characterization and hormonal regulation. *Biology of Reproduction* 67:133-139.
- OLDS-CARKE, P.** 1990. Variation in the quality of sperm motility and its relationship to capacitation. Cap 8 pp 91-99. En: Fertilization in mammals. Bavister, Roldán y Cummins Eds. Ed. Plenum Press, EUA.
- ORGBIN-CRIST, M.C.** 1968. Gonadal and epididymal sperm reserves in the rabbit. Estimation of daily sperm production. *Journal of Reproduction and Fertility* 15:15-25.
- ORGBIN-CRIST, M.C.** 1981. Epididymal physiology and sperm maturation. *Biology of Reproduction* 8:80-89.
- PARKER, G.A.** 1982. Why are there so many tiny sperm? Sperm competition and the maintenance of two sexes. *Journal of Theoretical Biology*. 96:281-294.
- RATHI, R., B. COLENBRANDER, M. BEVERS y B. GADELLA.** 2001. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction* 65:462-470.
- REYES, A.** 1994. Bioquímica de la capacitación-reacción acrosomal del gameto masculino. Tesis Doctoral. Panotla Tlaxcala. 78 pp.
- REYES-MORENO, C. M. BOILARA, R. SULLIVAN y M. SIRARA.** 2002. Characterization and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biology of Reproduction* 66:159-166.
- ROBAIRE, H.** 1988. Efferent ducts, epididymis and vas deferens: structure, functions and their regulation. En: *Physiology of Reproduction*. (Knobil, E y Neil, J.D. eds) Vol 2. Raven Press, New York, EUA. pp 999-1080.
- ROBERTSON, L., D. WOLF y J. TASH.** 1988. Temporal changes in motility patterns related to acrosomal status: Identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biology of Reproduction* 39:397-805.
- ROLDAN, E.R., M. GOMENDIO y A.D. VITULLO.** 1992. The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: Female selection and sperm competition. *Biology Reviews* 67:551-593.
- ROSADO A.** 1988. New aspects of old ideas about capacitation and the acrosomal reaction. A review. *Archives of Medical Research* 19:253-64.
- ROSADO, A. y O. HERNÁNDEZ.** 1988. Biología molecular del espermatozoide humano. *Ciencia* 39:249-260.
- SANKAI, T., K. TERAU, R. YANAGIMACHI, F. CHO y Y. YOSHIKAWA.** 1994. Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) *Journal of Reproduction and Fertility* 101:273-278.

- SETCHELL, B., S. MADDOCKS y D.E. BROOKS.** 1994. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. pp 1079-1175. En: *Physiology of Reproduction*. (Knobil, E y Neil, J.D. eds) Vol 1. Raven Press, New York, EUA.
- SUÁREZ, S. y X. DAI.** 1992. Hyperactivación enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic medium. *Biology of Reproduction* 46: 686-691.
- SUÁREZ, S., X. DAI, R. DeMOTT, I.K. REDFERN y M. MIRANDO,** 1992. Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *Journal of Andrology* 13:75-80.
- TURNER, T.** 1995. On the epididymis and its role in the development of the fertile ejaculate. *Journal of Andrology* 16:292-298.
- TURNER, T., J. GLEAVY y J. HARRIS.** 1990. Fluid movement in the lumen of the rat epididymis: effect of vasectomy and subsequent vasovasostomy. *Journal of Andrology* 11:422-428.
- VALLE, R., M.A. GUIMARAES, J. MUÑIZ, R.C. BARNABE y W.G. WALE.** 2003. Collection and evaluation of semen from captive howler monkeys (*Alouatta caraya*). *Theriogenology* 62:131-138.
- VELÁZQUEZ, A., F.A. CERVANTES y C. GALINDO-REAL.** 1993. The volcano rabbit *Romerolagus diazi* a peculiar lagomorph. *Lutra* 36:62-70.
- VELÁZQUEZ, A., F.J. ROMERO y L. LEÓN.** 1996. Fragmentación del hábitat del conejo zacatucho. pp. 73-86 En: *Ecología y conservación del conejo zacatucho y su hábitat*. (A. Velázquez, F.J. Romero, y J.L. Paniagua, eds). Fondo de Cultura Económica, México.
- VISCONTI, P.E., H. GALANTINO-HOMER, G.A. MOORE, J. L. BAILEY, P. NING, M. FORNES y G.S. KOPF.** 1998. The molecular basis of sperm capacitation. *Journal of Andrology* 19:242-248.
- WILDT, D., B. PUKAZHENTHI, J. BROWN, S. MONFORT, J. HOWARD y T. ROTH.** 1995. Spermatology for understanding, managing and conservation rare species. *Reproduction Fertility and Development* 7:811-824.
- World Health Organization.** 1987. *WHO manual for the examination of human semen and semen-cervical-mucus interaction*. Cambridge: Cambridge University Press. 80 pp
- YANAGIMACHI, R.** 1994. Mammalian fertilization. . pp 189-280. En: *Physiology of Reproduction*. (Knobil, E y Neil, J.D. eds) Vol 2. Raven Press, New York, EUA

12. ANEXO

Rango de la masa de testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias de tres especies de lagomorfos.

	<i>Oryctolagus cuniculus</i> n=11	<i>Lepus californicus</i> n=8	<i>Romerolagus diazi</i> n=5
Masa corporal (g)	3200 – 4460	1930 - 2800	390 – 576
Masa testicular* (g)	2.48 - 4.62	2.14 - 5.59	0.74 - 1.01
Masa epididimaria* (g)			
Total	0.85 - 1.54	0.61 - 1.2	0.18 - 0.33
Cabeza	0.19 - 0.44	0.18 - 0.44	0.05 - 0.13
Cuerpo	0.04 - 0.15	0.02 - 0.05	0.03 - 0.04
Cola	0.52 - 1.04	0.41 - 0.71	0.11 - 0.14
Glándulas Accesorias (g)			
Total	1.81 – 2.75	ND	0.38 – 0.99
Próstata	0.33 – 0.56	ND	0.05 – 0.13
Glándulas Vesiculares	0.52 – 0.78	ND	0.24 – 0.39
Glándulas Seminales	0.39 – 0.75	ND	0.16 – 0.31
Gl. Bulbouretrales	0.22 – 0.75	ND	0.08 – 0.14

* peso de un órgano.

Rango de concentración ($\times 10^6$) de los espermatozoides
obtenidos por región epididimaria

	<i>Oryctolagus cuniculus</i> n = 11	<i>Lepus californicus</i> n = 8	<i>Romerolagus diazí</i> n = 5
Cabeza	13 – 63	53 - 220	15 – 28
Cuerpo	4 – 13	5.5 - 29	2 – 13
Cola	65 – 300	216 - 920	103 - 225

Rango de concentración ($\times 10^6$) de los espermatozoides
de cola de epidídimo

	<i>Oryctolagus cuniculus</i> n = 11	<i>Lepus californicus</i> n = 8	<i>Romerolagus diazí</i> n = 5
por g de testículo	22 – 109	101 - 314	88 - 260
por g de cola de epidídimo	51 – 259	410 - 1362	288 - 1019

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS TESTÍCULOS, EPIDÍDIMOS,
GLÁNDULAS SEXUALES ACCESORIAS Y ESPERMATOZOIDES EN
TRES ESPECIES DE LAGOMORFOS (*ROMEROLAGUS DIAZI*,
LEPUS CALIFORNICUS Y *ORYCTOLAGUS CUNICULUS*).

Demetrio AMBRIZ GARCÍA, José Luis CONTRERAS MONTIEL,
Omar HERNÁNDEZ PÉREZ, Efraín MERCADO PICHARDO, Fernando A. CERVANTES
REZA* y Adolfo ROSADO GARCÍA.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
Departamento de Biología de la Reproducción.
Av. San Rafael Atlixco 186 Col Vicentina, Iztapalapa, México, D.F. CP 09340 MÉXICO
e-mail deme@xanum.uam.mx

*Departamento de Zoología, Instituto de Biología, UNAM,
Apdo. Postal 70-153, Coyoacán 04510, México, D.F. MÉXICO

RESUMEN

Se hizo un estudio comparativo del aparato reproductor masculino entre tres especies de lagomorfos: el conejo zacatuche (*Romerolagus diazi*), la liebre cola negra (*Lepus californicus*) y el conejo doméstico (*Oryctolagus cuniculus*). Se extrajo el aparato reproductor de los especímenes sacrificados y los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias fueron aislados, liberados del tejido conectivo y pesados. Los espermatozoides de la cola del epidídimo fueron obtenidos por retroperfusión, contados, fijados y medidos, utilizando técnicas fotográficas. La masa testicular no estuvo relacionada con la masa corporal y, considerada como porcentaje en relación a la masa corporal, fue más de dos veces mayor en *L. californicus* y *R. diazi* que en *O. cuniculus*. La masa epididimaria, expresada como porcentaje de la masa corporal, fue más grande en *R. diazi* que en *L. californicus* y en *O. cuniculus*. Hubo más espermatozoides, en la cola del epidídimo, de *L. californicus* que en *R. diazi* o en *O. cuniculus*. El largo y ancho de la cabeza espermática de *R. diazi*, superaron a los de *O. cuniculus* y *L. californicus*. La longitud total y el largo de la cola espermática, fueron similares en *O. cuniculus* y *R. diazi*, mientras que los espermatozoides de *L. californicus* fueron menores.

Los datos que se presentan en este estudio, son los primeros cuantitativos de testículos, epidídimos, glándulas sexuales accesorias y espermatozoides, de especies de lagomorfos silvestres de Norteamérica.

Palabras Clave: *Romerolagus diazi*, *Lepus californicus*, *Oryctolagus cuniculus*, espermatozoides, epidídimo, glándulas sexuales accesorias, testículos, lagomorfos, reproducción.

ABSTRACT

A comparative study of the male reproductive organs and spermatozoa from three lagomorph species, the volcano rabbit or Zacatuche (*Romerolagus diazi*), the black-tailed hare (*Lepus californicus*) and the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), was conducted. The animals were euthanased and their reproductive organs excised. Testes, epididymes and accessory sexual glands were isolated, removed of any of connective and other tissues and weighed. Caudal spermatozoa were obtained from

the epididymal tail, counted, fixed and measured. The testicular mass was not related to body mass, but when considered as a percentage of body mass, the values for *L. californicus* and *R. diazi* were twice as large as that determined for *O. cuniculus*. The epididymal mass, when expressed as a percentage of the body mass, was highest in *R. diazi* and smallest in *O. cuniculus*. Spermatozoa counts from the epididymal tail were larger in *L. californicus* than in *R. diazi* or *O. cuniculus*. Lengths and widths of the spermatozoa head from *R. diazi* were larger than from *O. cuniculus* and *L. californicus*. Total length and tail length of caudal spermatozoa from *O. cuniculus* and *R. diazi* were found to be similar but larger than those recorded from *L. californicus*. This is the first such quantitative and comparative study of wild lagomorph species from North America.

Key Words: *Romerolagus diazi*, *Lepus californicus*, *Oryctolagus cuniculus*, spermatozoa epididymes, testes, accessory sexual glands, lagomorphs, reproduction.

INTRODUCCIÓN

El orden Lagomorfa comprende alrededor de 80 especies, clasificadas en dos grandes familias: *Leporidae* (liebres y conejos) y *Ochotonidae* (pikas). Los lagomorfos son pequeños mamíferos que, en las cadenas ecológicas, constituyen la fuente principal de alimento para muchos depredadores y contribuyen a la regulación de poblaciones de plantas y la diseminación de semillas. Además, forman parte de la dieta de muchos habitantes en el medio rural (Cervantes & González 1996).

México es el país del continente americano, con mayor número de especies de lagomorfos: 10 de conejos (nueve del género *Sylvilagus* y 1 de *Romerolagus*) y cinco de liebres del género *Lepus*. Ocho de estas especies son endémicas y tienen una distribución restringida. A pesar de que algunas especies, como *Lepus californicus*, son consideradas perniciosas debido al impacto de sus poblaciones sobre la agricultura y la producción animal (Best 1996, Cervantes & González 1996), otras especies son poco comunes y están amenazadas o en peligro de extinción.

En la lista roja de la Unión Internacional para Conservación de la Naturaleza (IUCN) están registradas ocho especies de lagomorfos mexicanos, tres de ellas (*R. diazi*, *S. graysoni* y *L. flavigularis*) en peligro de extinción y una (*S. insonus*) críticamente en peligro (Cervantes 1993). Por esta razón, el estudio de los lagomorfos mexicanos, entre ellos el de sus características reproductivas, debería ser una prioridad.

Romerolagus diazi (teporingo, conejo de los volcanes o zacatuche) es endémico y relicto de México (Hibbard 1963, Barrera 1966, Thornback & Jenkins 1984, Hoth et al. 1987, Velázquez 1994), es además un conejo atípico, con número cromosómico y período de gestación similar al de las especies del género *Lepus* (López-Formont & Cervantes 1981, Velázquez et al. 1993, 1996). *R. diazi* tiene un hábitat restringido al bosque de pino asociado al zacatón, por arriba de los 3,000 msnm, en cuatro volcanes al sur de la ciudad de México, cuya extensión

es menor a 250 km² (Velázquez 1994). El hecho de que su biología reproductiva sea poco conocida, restringe la posibilidad de plantear un programa de conservación adecuado, a pesar de los esfuerzos que se han llevado a cabo para su reproducción en cautiverio (Granados 1981, Cervantes 1982, Lindsay 1982, Matsuzaki et al. 1982, Hoth & Granados 1987).

Lepus californicus es la más común de las liebres que habitan en nuestro país, se distribuye en Baja California y en la zona norte y centro del país. La cuenca de México parece ser el límite sur de su distribución. *L. californicus* habita principalmente en regiones áridas y zonas de pastizales donde la cubierta vegetal se ha reducido. Sus poblaciones son abundantes, debido a que también puede habitar en campos de cultivo. Se permite su cacería y permanece sin riesgo (Haskell & Reynolds 1947, Cervantes 1993). A pesar de esta amplia distribución, su biología reproductiva ha sido muy poco estudiada.

Oryctolagus cuniculus tiene su distribución natural en Europa, aunque por su domesticación se le puede encontrar en casi cualquier parte de mundo. La raza de *O. cuniculus* domesticado más difundida es la Nueva Zelanda blanco (Boyd & Myhill 1987, Bencheikh 1995, Trout & Smith 1995) ya que es utilizada como animal de consumo y de laboratorio. Su reproducción, junto con otros aspectos de su biología, han sido ampliamente estudiados y con frecuencia sirve como referencia para comparar los de otros lagomorfos, existiendo un vacío de información en torno a las semejanzas y diferencias en relación con los lagomorfos mexicanos.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar algunas estructuras anatómicas del aparato reproductor masculino (testículos, epidídimos y glándulas accesorias) de dos especies de lagomorfos mexicanos (*R. diazi* y *L. californicus*) y la especie europea (*O. cuniculus*), comparando además, la morfometría de sus espermatozoides.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 11 conejos Nueva Zelanda blanco (*O. cuniculus*) adultos, de fertilidad comprobada y sexualmente activos. Los animales provenían del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, donde permanecieron alojados a temperatura ambiente promedio de 26°C, con ciclos de 12 hrs luz y 12 hrs oscuridad; alimentados con "pellets" (Conejina, Purina, México, D.F.) y agua *ad libitum*. Para la obtención de los órganos reproductores, los ejemplares fueron sacrificados por sobredosis de pentobarbital sódico (Anestesa[®], Bayer, México, D.F.) administrado por vía intraperitoneal. Se diseccionaron los testículos con sus epidídimos y conductos deferentes, y las glándulas sexuales accesorias.

Cinco *R. diazi* machos, adultos, fueron capturados entre febrero y julio (sexualmente activos), en el volcán El Pelado en la región de Parres, Delegación de Tlalpan, México D.F. (permiso DOO 750-2618/97, SEMARNAP). Los animales fueron llevados al laboratorio, donde se sacrificaron siguiendo el mismo procedimiento que se aplicó a los ejemplares de *O. cuniculus* y se obtuvieron los mismo órganos y glándulas.

Ocho especímenes de *L. californicus* fueron obtenidos a través de cacería en el mes de junio (sexualmente activos), en la zona desértica del norte de Durango. Sus testículos con epidídimos, fueron extraídos *in situ*, congelados en nitrógeno líquido y transportados al laboratorio.

Los testículos con epidídimos (frescos de *O. cuniculus* y *R. diazi* y descongelados de *L. californicus*) fueron perfundidos a través de la arteria espermática con 1 ml de medio de Brackett-Oliphant (Brackett & Oliphant 1975, Baker *et al.* 1986) suplementado con 0.3% de albúmina sérica bovina (Sigma Co., St. Louis, MO, EUA). Se disecaron los testículos, los epidídimos y las glándulas sexuales accesorias, y se pesaron por separado.

Las regiones de los epidídimos fueron delimitadas por dobles ligaduras y cortando entre ellas para separar cabeza, cuerpo y cola con el conducto deferente. Posteriormente se pesaron. Los espermatozoides contenidos en la cola del epidídimo fueron recuperados por retro-perfusión con 1 ml de medio de Brackett-Oliphant, a través del conducto deferente. Los espermatozoides fueron lavados y su número evaluado, siguiendo los métodos de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1987).

Una alícuota de la solución con espermatozoides fue fijada con una mezcla de glutaraldehído/paraformaldehído (Baker *et al.* 1986) y usada para hacer un frotis en un portaobjetos teñido con eosina/nigrosina (Adelman & Cahill 1989). Los frotis fueron observados y fotografiados con un aumento final de 2400X, utilizando un microscopio Zeiss (Axiophot) con contraste de fases. Los espermatozoides se midieron en las fotografías. Para reducir el error en las mediciones, éstas fueron realizadas por dos personas entrenadas, en cuatro laminillas independientes para cada especie. Cada persona midió tres veces 50 células espermáticas, comparando los resultados en cada laminilla. Bajo estas condiciones el error intra-observador fue menor de 2% y el error inter-observador, menor del 5%. En total 200 espermatozoides fueron medidos, por triplicado, para cada una de las especies.

Los datos obtenidos fueron comparados con la prueba t de Student y por ANDEVA de una vía. Para determinar diferencias, se utilizó la prueba de Tukey, todo ello con el programa estadístico de computadora Sigmastat® (Jandel Corporation).

RESULTADOS

1. Características de los testículos, epidídimos y glándulas sexuales accesorias

El promedio (\pm desviación estándar) de la masa corporal en *R. diazi* fue 486 ± 90 g (Tabla 1). Es posible que estos animales tuvieran alrededor de cinco meses de edad a considerar por los datos publicados por Matsuzaki *et al.* (1982, 1996) sobre el crecimiento de *R. diazi* nacidos en cautiverio. El promedio de masa corporal para las ocho liebres de cola negra fue 2250 ± 320 g y para el conejo doméstico de 3520 ± 250 g. Todos los especímenes mostraron los testículos esrotados (Fig. 1).

La masa testicular no tuvo relación directa con la masa corporal (Tabla 1), sino que fue significativamente mayor en *Lepus* (8.48 ± 0.87 g) que en *Oryctolagus* (5.76 ± 0.65 g) y en *Romerolagus* (1.88 ± 0.20 g). Cuando la masa testicular se expresó como porcentaje de la masa corporal, fue dos veces más en *L. californicus* ($0.378 \pm 0.04\%$) y en *R. diazi* ($0.393 \pm 0.05\%$) que en *O. cuniculus* ($0.162 \pm 0.015\%$).

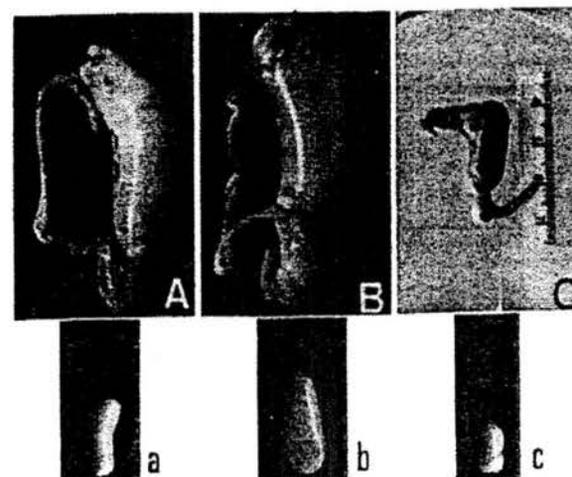


Figura 1

Testículos y epidídimos aislados del aparato reproductor del macho *Oryctolagus cuniculus* (A), *Lepus californicus* (B) y *Romerolagus diazi* (C). Los testículos fueron fotografiados después de eliminar la grasa epididimaria y el tejido conectivo, mostrando sus tamaños relativos (a, b, c).

Tabla 1
Morfometría Reproductiva General de las tres especies de lagomorfos estudiadas.

	<i>Oryctolagus cuniculus</i> n = 11	<i>Lepus californicus</i> n = 8	<i>Romerolagus diazi</i> n = 5
Masa corporal (g)	3520 ± 250*	2250 ± 320*	486 ± 90*
Masa testicular (g) ¹	5.76 ± 0.65*	8.48 ± 0.87*	1.88 ± 0.20*
Masa epididimaria ¹ (g)			
Total	2.28 ± 0.42*	1.90 ± 0.3 ¹	0.52 ± 0.09*
Caput	0.61 ± 0.05	0.66 ± 0.06	0.12 ± 0.04
Corpus	0.19 ± 0.03	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02
Cauda	1.61 ± 0.18	1.32 ± 0.09	0.39 ± 0.09
Glándulas Accesorias (g)			
Total	2.25 ± 0.42*	ND	0.72 ± 0.15
Próstata	0.46 ± 0.09*	ND	0.11 ± 0.02
Glándulas Vesiculares	0.64 ± 0.11*	ND	0.32 ± 0.06
Glándulas Seminales	0.53 ± 0.14*	ND	0.20 ± 0.04
Glándulas Bulbouretrales	0.45 ± 0.23*	ND	0.10 ± 0.02
Masa testicular ¹ como % de la masa corporal	0.162 ± 0.015*	0.378 ± 0.04*	0.393 ± 0.05*
Masa epididimaria ¹ como % de la masa corporal	0.062 ± 0.009*	0.086 ± 0.011*	0.108 ± 0.010*
Glándulas Accesorias como % de la masa corporal			
Total	0.062*	ND	0.150
Próstata	0.012*	ND	0.020
Glándulas Vesiculares	0.017*	ND	0.067
Glándulas Seminales	0.014*	ND	0.042
Glándulas Bulbouretrales	0.013*	ND	0.021

Los números expresan el promedio ± desviación estándar de los datos obtenidos de la determinación de n sujetos.

* indica que se utilizó el peso de ambos testículos o de ambos epidídimos

¹ Letras diferentes en la misma fila indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas (p < 0.05) entre las tres especies de lagomorfos, obtenidas por ANDEVA de una vía y prueba de Tukey.

* indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los datos obtenidos en *O. cuniculus* y en *R. diazi* (p < 0.01) (prueba de t de Student)

ND: no determinado. Los ejemplares de *L. californicus* fueron cazados y solamente los testículos y epidídimos fueron extraídos y transportados en nitrógeno líquido hasta nuestro laboratorio.

La masa epididimaria relativa (masa epididimaria expresada como porcentaje de la masa corporal) fue significativamente mayor (ANDEVA usando valores con transformación arcoseno) en *R. diazi* (0.108 ± 0.010%) que en *L. californicus* (0.086 ± 0.011%) y en *O. cuniculus* (0.062 ± 0.009%).

Las características anatómicas macroscópicas de las glándulas sexuales accesorias fueron similares en *Romerolagus* y en *Oryctolagus*. El peso relativo de

todas las glándulas accesorias fue significativamente mayor (prueba usando valores con transformación arcoseno) en *R. diazi* que en *O. cuniculus*. Esta diferencia fue particularmente importante en el caso de las vesículas seminales y de las glándulas vesiculares, las cuales fueron tres y cuatro veces mayores, respectivamente, en *R. diazi* que en *O. cuniculus*.

2. Número espermático

El número total de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo (Tabla 2), fue más de dos veces mayor en *Lepus californicus* (521 ± 139 x 10⁶) que en *O. cuniculus* (165 ± 42 x 10⁶) o en *R. diazi* (155 ± 49 x 10⁶). Por otro lado, el número total de espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo, expresados por gramo de testículo, mostró no ser significativamente diferente entre *L. californicus* y *R. diazi*, pero fue más grande en estas especies que en *O. cuniculus*.

Tabla 2
Concentración (10⁶) y dimensiones lineales (µm) de los espermatozoides obtenidos de la cola del epidídimo de las tres especies de lagomorfos estudiadas.

	<i>Oryctolagus cuniculus</i> n = 11	<i>Lepus californicus</i> n = 8	<i>Romerolagus diazi</i> n = 5
Espermatozoides recuperados de la cola de un epidídimo	165 ± 42*	521 ± 139*	155 ± 49*
Concentración espermática por g de testículo	65 ± 16*	123 ± 22*	132 ± 18*
Concentración espermática por g de cola de epidídimo	205 ± 54*	942 ± 195*	785 ± 234*
Espermatozoides			
Longitud total del espermatozoide	55.29 ± 3.35*	50.32 ± 2.25*	54.61 ± 2.21*
Longitud de la cabeza	8.26 ± 0.27*	8.12 ± 0.24*	8.63 ± 0.30*
Ancho de la cabeza	4.82 ± 0.21*	5.38 ± 0.27*	5.86 ± 0.25*
Longitud del Acrosoma	3.91 ± 0.13*	3.92 ± 0.26*	4.23 ± 0.25*
Longitud de la cola	47.00 ± 3.30*	41.45 ± 3.06*	46.07 ± 2.19*
Pieza media	9.22 ± 0.34*	8.36 ± 0.36*	8.85 ± 0.38*
Componentes de la célula espermática expresados como % de la longitud total			
Cabeza	14.7*	16.8*	15.9*
Pieza media	16.6	16.9	15.6
Pieza Principal	68.3	66.2	68.2

Los números expresan el promedio ± desviación estándar de los datos obtenidos de la determinación de n sujetos.

* Letras diferentes en la misma fila indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las tres especies de lagomorfos, obtenidas por ANDEVA de una vía y prueba de Tukey.

3. Características de los espermatozoides

La forma espermática de las tres especies es similar en muchos aspectos (Fig. 2 A, B y C). En el plano frontal la cabeza del espermatozoide de *O. cuniculus* y de *L. californicus* es visiblemente elipsoidal, mientras que la forma de la cabeza en *R. diazi* es ovoide, con la parte más ancha cerca de la porción apical. La unión entre la cabeza y la pieza media, parece ser especialmente lábil en *R. diazi*, puesto que es posible observar numerosas cabezas aisladas (Fig. 3 C). El acrosoma es claramente visible en *O. cuniculus* y en *R. diazi*, pero no en *L. californicus*. En las tres especies, el acrosoma cubre solo un 40% de la mitad anterior de la cabeza, pero es significativamente mayor (60%) en *R. diazi* (Tabla 2). *R. diazi* es también la especie que muestra más espermatozoides con gotas citoplásmicas (8% comparada con 3 y 4% para *L. californicus* y *O. cuniculus*). Fuera de ello no existen anomalías morfológicas importantes en ninguna de las tres especies.

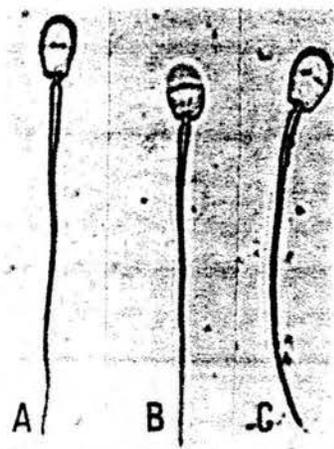


Figura 2

Espermatozoides de *Oryctolagus cuniculus* (A), *Lepus californicus* (B) y *Romerolagus diazi* (C). Se aprecia la forma elipsoidal de los dos primeros y ovooidal en el tercero así como también sus acrosomas.

4. Tamaño espermático

Se encontró que las dimensiones del espermatozoide de *L. californicus* fueron menores (Tabla 2). La longitud ($8.63 \pm 0.30 \mu\text{m}$) y el ancho ($5.88 \pm 0.25 \mu\text{m}$) de la cabeza del espermatozoide de *R. diazi*, fueron significativamente mayores

($p < 0.01$) que las mismas dimensiones en *O. cuniculus* y en *L. californicus*. La longitud total de la cola fue semejante en *O. cuniculus* y *R. diazi* (47.00 ± 3.3 y $46.07 \pm 2.19 \mu\text{m}$), mientras que en el espermatozoide de *L. californicus* fue significativamente menor ($41.45 \pm 3.06 \mu\text{m}$).

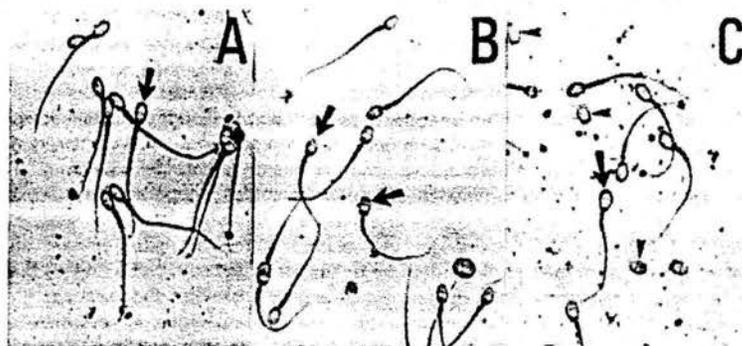


Figura 3

Espermatozoides aislados de la cola del epidídimo de *Oryctolagus cuniculus* (A), *Lepus californicus* (B) y *Romerolagus diazi* (C). Las flechas indican la presencia de acrosomas claramente teñidos en *O. cuniculus* y *R. diazi*, mientras que para *L. californicus* son apenas aparentes. En la Figura 3C se señala con las puntas de las flechas las cabezas espermáticas sin cola.

DISCUSIÓN

La masa corporal de *R. diazi*, aquí encontrada (486 ± 90 g), fue mayor a la reportada por Cervantes *et al.* en 1990 (418 g, con límites entre 387 y 480 g, $n=31$), pero similar a la reportada por Lindsay (1982) y Matsuzaki *et al.* (1982, 1996). La masa de *L. californicus* (2250 ± 320 g) fue similar a la de esta especie en el sur de Arizona durante la estación reproductiva (en promedio 2475 g con límites entre 1980 y 3375 g; Best 1996), y a la de las liebres en California (2000-2950g; Best 1996) y mayor que el promedio de la masa corporal de *L. californicus* en Washington (1770 g en promedio, con límites entre 1510 y 1880 g; Best 1996). La masa corporal del conejo doméstico (3520 ± 250 g) fue parecida a la reportada por Bencheikh (1995) de entre 3470 y 3850 g.

No se encontraron diferencias en el tamaño testicular relativo entre *R. diazi* y *L. californicus* (0.393% y 0.378%, respectivamente), pero el de éstos fue significativamente mayor que para *O. cuniculus* (0.162%).

Dado que una de las funciones principales de la cola del epidídimo es el almacenamiento de espermatozoides, podemos decir que esta capacidad es el doble en *L. californicus* que en *R. diazi* o en *O. cuniculus*. Sin embargo, si se considera por gramo de masa húmeda, no existen diferencias entre *L. californicus* y *R. diazi*, mientras que esta capacidad de almacenamiento en *O. cuniculus* es significativamente menor.

Cohen (1983) indicó que muchas de las células espermáticas producidas tanto en especies animales como en humanos, presentan anomalías morfológicas. Sin embargo, en este estudio no fueron observadas ni aún en *L. californicus*, que es la especie con mayor número de espermatozoides en la cola del epidídimo. La frecuencia de gota citoplásmica, en los espermatozoides recuperados de la cola del epidídimo de *R. diazi*, fue mayor que en los de *L. californicus* y *O. cuniculus*, indicando que la maduración de los espermatozoides epididimarios en *Romerolagus*, ocurre más tardíamente que en las otras dos especies. Esto podría también estar relacionado con la presencia de espermatozoides decapitados.

El conocimiento acerca de la evolución de los espermatozoides de vertebrados es muy reducido (Roldán et al. 1992). Se ha sugerido, sin embargo, que la forma ovalada de la cabeza espermática, es más primitiva que la elipsoidal (Baccetti 1986, Cetica et al. 1993, 1998). Desde este punto de vista es interesante mencionar que la forma de la cabeza, oval en *R. diazi* y elipsoidal en *O. cuniculus* y *L. californicus*, apoya la idea de que *Romerolagus*, es más antiguo que otras especies de conejos y liebres (Barrera 1966, Corbet 1983, Velázquez et al. 1993).

Se ha indicado que en los mamíferos, particularmente en euterios, existe una relación inversa entre la longitud total del espermatozoide y el tamaño corporal (Cummins & Woodall 1985). Esta relación negativa entre el tamaño espermático y la masa corporal no parece existir en los lagomorfos. Esto podría ubicar a los lagomorfos en la misma categoría que los artiodáctilos, carnívoros y primates, en los cuales esta relación inversa no se cumple (Cummins & Woodall 1985).

Entre los euterios existen pocas especies que posean espermatozoides con cabeza grande, acrosoma pequeño y cola corta (Fawcett 1970, 1975, Cetica et al. 1993, Cummins & Woodall 1985). Sin embargo esto parece ser característica de los espermatozoides de leporídeos. El largo y el ancho de la cabeza espermática en *Priodontes maximus* (armadillo gigante) y *Cnetophractus villosus* (armadillo peludo) (Cetica et al. 1993) y en *Suncus murinus* (museraña asiática), son los mayores entre los euterios estudiados (Cummins & Woodall 1985). Sin embargo la longitud relativa de las cabezas de los espermatozoides de *R. diazi* (15.9%) y *L. californicus* (10.5%), no parece ser diferente de la longitud relativa de la cabeza

de *P. maximus* (17%) y *C. villosus* (16.5%). Esta elevada relación cabeza/longitud espermática total en los leporídeos es debida, fundamentalmente, a la pequeña longitud de la cola.

La longitud espermática total de las tres especies de lagomorfos estudiados particularmente la de *L. californicus*, es menor que la de otros euterios. De los resultados del presente estudio, los de Cummins y Woodall (1985), y los de Roldán et al. (1992), es evidente que sólo el orden artiodáctilo tiene espermatozoides más pequeños que los lagomorfos (50.8 contra 53.4 μm).

Finalmente, los datos que se presentan en este trabajo, son los primeros cuantitativos obtenidos de testículos, epididimos, glándulas sexuales y espermatozoides, de especies de lagomorfos silvestres de Norteamérica.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado en parte por CONACyT 400200-5-321N y 400262-3-519M y por FOMES 98-35-27.

LITERATURA CITADA

- Adelman, M. & E. Cahill. 1989. *Atlas of sperm morphology*. Pp. 99-100. American Society of Clinical Pathologists. Chicago, U.S.A.
- Baccetti, B. 1986. Evolutionary trends in sperm structure. *Comp. Bioch. and Physiol.* 85A:29-36.
- Baker, W. G., F. T. Murray, L. S. Jefferson, J. Li, & C. W. Bardin. 1986. Perfusion of sex organs and testes. Pp. 215-222 en (Spring-Mills and Hafez, E.S.E. eds). *Male accessory sex glands*. Elsevier/North Holland, Boston, U.S.A.
- Barrera, A. 1966. Redefinición de *Cediopsylla jordan* y *Hoplopsyllus*. Nuevas especies, comentarios sobre el concepto de relicto y un caso de evolución convergente. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 27:67-83.
- Bencheik, N. 1995. Effet de la fréquence la semence sur les caractéristiques du sperme et des spermatozoides récoltes chez le lapin. *Ann. Zootech.* 44: 263-279.
- Best, T.L. 1996. *Lepus californicus*. *Mammal Sp.* 530:1-10.
- Boyd, I.L. & D. G. Myhill. 1927. Seasonal changes in condition and fecundity in the wild European rabbit *Oryctolagus cuniculus*. *J. Zool.* (London) 212:223-233.
- Brackett, B. & G. Oliphant. 1975. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.* 12:260-272.
- Cervantes, F.A. 1993. Conejos y liebres silvestres de México. *Ciencia y Desarrollo* 115:56-59.
- _____. 1982. Observaciones sobre la reproducción del zacatuche o teporingo *Romerolagus diazi* Mammalia Lagomorpha. *Doñana Acta Veri.* 9:416-420.

- Cervantes, F.A. & F.X. González. 1996. Los conejos y liebres silvestres de México. Pp. 17-25 en *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat* (A. Velázquez, F.J. Romero y J.L. Paniagua, eds). Fondo de Cultura Económica, México.
- Cervantes, F. A., C. Lorenzo, & R. S. Hoffman. 1990 *Romerolagus diazi*. *Mammal. Sp.* 360:1-7.
- Cetica, P.D., J. Sassaroli, M. S. Merani & A. Solari. 1995. Comparative spermatology in Dassipodidae: *Prodonates maximus*, *Chaetophractus villosus* and *Dasytus hybridus*. *Biozell* 18:89-103.
- Cohen, J. 1983. Selection among spermatozoa. Pp. 33-37 en *The Sperm Cell*. Martinus Nijhoff, (J. Andre, ed): The Hague, Netherlands.
- Corbet, G. B. 1983. A review of classification in the family Leporidae. *Acta Zool. Fen.* 174:11-15.
- Cummins, J. M. & P. F. Woodall. 1985. On mammalian sperm dimensions. *J. Rep. Fert.* 75:153-175.
- Fawcett, D. W. 1970. A comparative view of sperm ultrastructure. *Biol. Rep.* 2(Suppl. 2), 90-127.
- _____. 1975. The mammalian spermatozoa. *Dev. Biol.* 44:394-436.
- Granados, H. 1981. Basic information on the volcano rabbit. Pp. 940-948 en *Proceedings of the World Lagomorph Conference*. University of Guelph, Ontario, Canada.
- Haskell, H. S. & H. G. Reynolds. 1947. Growth, developmental food requirements and breeding activity of the California jack rabbit. *J. Mammal.* 26:126-136.
- Hibbard, C. W. 1963. The origin of the P3 pattern of *Sylvilagus*. *Captolagus*, *Oryctolagus* and *Lepus*. *J. Mammal.* 44:1-15.
- Hoth, J. & H. Granados. 1957. A preliminary report on the breeding of the volcano rabbit *Romerolagus diazi* at the Chapultepec Zoo, México City. *Int. Zoo Year Book* 26:261-265.
- Hoth, J., A. Velázquez, F. J. Romero, L. León, M. Aranda, & D. J. Bell. 1987. The volcano rabbit a shrinking distribution and a threatened habitat. *Oryx* 21:85-91.
- Lindsay, N. B. 1952. A second report on the management and breeding of the volcano rabbit *Romerolagus diazi* at the Jersey Wildlife Preservation Trust. *Jersey Wild. Pres. Trust* 19:46-51.
- López-Forment, W. & F. Cervantes-Reza. 1981. Preliminary observations on the ecology of *Romerolagus diazi* in México. Pp. 949-955 en *Proceedings of the World Lagomorph Conference*. University of Guelph, Ontario, Canada.
- Matsuzaki, T., M. Kamiya H. Susuki, T. Nomura, & A. Velázquez. 1996. Reproducción en el laboratorio del conejo zacatuche. Pp. 51-66 en *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat* (A. Velázquez, F.J. Romero, y J.L. Paniagua, eds). Fondo de Cultura Económica, México.
- Matsuzaki, T., M. Saito, & M. Kamiya. 1982. Breeding and rearing of the volcano rabbit *Romerolagus diazi* in captivity. *Exp. Anim.* 31:185-188.
- Roldán, E. R. S., M. Gamendio, & A. D. Vitullo. 1992. The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: Female selection and sperm competition. *Biol. Rev.* 67:551-583.
- Thornback, J. & M. Jenkins. 1994. The IUCN mammal red data book Part 1. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Gland, Switzerland. 1-516 Pp.
- Trout, R. C. & G. C Smith. 1995. The reproductive productivity of the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* in southern England on sites with different soils. *J. Zool. (London)* 237:411-422.
- Velázquez, A. 1994. Distribution and population size of *Romerolagus diazi* on El Peñado volcano, México. *J. Mammal.* 75:743-749.
- Velázquez, A., F. A. Cervantes, & C. Galindo-Real. 1993. The volcano rabbit *Romerolagus diazi* a peculiar lagomorph. *Lutra* 36:62-70.
- Velázquez, A., F. J. Romero, & L. León. 1996. Fragmentación del hábitat del conejo zacatuche. Pp. 73-86 en *Ecología y conservación del conejo zacatuche y su hábitat*. (A. Velázquez, F.J. Romero, y J.L. Paniagua, eds). Fondo de Cultura Económica, México.
- World Health Organization. 1987. *WHO manual for the examination of human semen and semen-cervical-mucus interaction*. Cambridge: Cambridge University Press. 26 pp.

Recibido: 7 de enero 2002
 Aceptado: 30 de agosto 2002