

## **CARACTERÍSTICAS SEMINALES DEL TITÍ GRIS (*Saguinus leucopus*) BAJO CONDICIONES DE CAUTIVERIO OBTENIDAS POR ESTIMULACIÓN VIBRATORIA DEL PENE (EVP)**

*R. A. Poches<sup>1\*</sup>, C. I. Brieva<sup>2</sup>, C. Jiménez<sup>2</sup>*

*Artículo recibido: 10 de octubre de 2012; aprobado: 20 de noviembre de 2012*

### **RESUMEN**

Se evaluó la eficacia de la técnica de estimulación vibratoria del pene (EVP) para obtener semen en quince especímenes de *S. leucopus* bajo condiciones de cautiverio, en cuatro diferentes sitios en Colombia. Adicionalmente, se estandarizó la técnica EVP y se determinaron algunas características seminales (color, viscosidad, volumen, pH, motilidad, morfología, viabilidad, concentración y morfometría espermática). Se empleó clorhidrato de ketamina a dosis entre 5 y 10 mg/kg I.M. para la sedación previa al muestreo a fin de disminuir el estrés de la captura y del procedimiento, ya que los especímenes no estaban acostumbrados o entrenados para procesos de obtención de muestras biológicas. En el uso de la técnica se logró un 52,6% de éxito en la combinación de 90 Hz de vibración y 1 mm de amplitud; el tiempo de eyaculación promedio fue de 12:35±6:42 minutos; el pH, 7,5±0,26; el volumen, 24±18,82 µl; la motilidad masal fue de 3,7/5,0±0,5; la motilidad individual progresiva, 97,1±45,4%; la concentración espermática fue de 87.617±21.327 x 10<sup>4</sup> spz/µl; la normalidad fue del 69,3±11,06% y la viabilidad del 93,7±4,9%. Las características seminales fueron similares a las reportadas en otras especies de callitricidos y obtenidas por la misma técnica. Se empleó satisfactoriamente el diluyente TALP-HEPES y el cual no afectó las características antes descritas. La EVP es un método innovador, replicable, viable y seguro para la obtención de semen en *S. leucopus* y a otros callitricidos bajo sedación con ketamina en condiciones de cautiverio.

**Palabras clave:** callitricidos, estimulación vibratoria del pene (EVP), semen, espermograma, diluyente, cautiverio.

## **SEMINAL CHARACTERISTICS OF WHITE-FOOTED TAMARIN (*Saguinus leucopus*) UNDER CAPTIVITY CONDITIONS OBTAINED BY PENILE VIBRATORY STIMULATION (PVS)**

### **ABSTRACT**

The efficacy of the penile vibratory stimulation (PVS) for semen collection was evaluated in fifteen (15) specimens of white-footed tamarin (*S. leucopus*), held in captivity, at four different locations. Additionally the technique was standardized for semen collection in

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Cr. 45 nro. 26-85, Bogotá (Colombia).

<sup>2</sup> Departamento de Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Cr. 45 nro. 26-85, Bogotá (Colombia).

\* Autor para correspondencia: robinpoches@gmail.com

this species and seminal characteristics, color, viscosity, volume, pH, motility, morphology, viability, sperm concentration and morphometry were also evaluated. Ketamine hydrochloride was used at a dose between 5 to 10 mg/Kg for sedation and semen sampling. The technique was successful in 52.6% of the animals using the combination of 90 Hertz of vibration and 1 mm of amplitude; time of ejaculation was  $12.3 \pm 6.42$  minutes. Seminal characteristics were: pH of  $7.5 \pm 0.26$ ; volume of  $24 \pm 18.82$   $\mu$ l; masal motility of  $3.7/5.0 \pm 0.5$ ; progressive motility of  $97.1 \pm 45.4\%$ ; sperm concentration of  $87,617 \pm 21,327 \times 10^4$  spz/ $\mu$ l; normal morphology  $69.3 \pm 11.06\%$  and viability of  $93.7 \pm 4.9\%$ . TALP-HEPES extender was satisfactorily used and it did not appear to affect seminal characteristics. The PVS is an innovating, replicable, viable and safe method for obtain semen in *S. leucopus* and perhaps in other callitrichids under ketamine sedation and in captivity.

**Keywords:** callitrichids, penile vibratory stimulation (PVS), semen, spermogram, extender, captivity.

## INTRODUCCIÓN

Según Defler (2010) Colombia posee 34 especies de primates y está entre los primeros seis países con mayor diversidad en este orden de mamíferos, junto con Brasil, Zaire, Camerún, Indonesia, Madagascar y Perú. En los últimos treinta años se han incrementado las investigaciones en vida libre (*in situ*) y en cautiverio (*ex situ*) de fauna silvestre, en donde los primates son el grupo de mamíferos más estudiado en nuestro país (Defler 2010). Puede encontrarse una amplia variedad de investigaciones publicadas en áreas de la biología, la ecología y la veterinaria; sin embargo, son escasos los estudios en reproducción, por lo que se requiere ampliar la información respecto de la biología y la fisiología reproductiva de los primates colombianos.

Uno de los objetivos de las Tecnologías en Reproducción Asistida (TRA) es la conservación de la fauna, principalmente para mantener la diversidad genética, ya que representa un conjunto de herramientas útiles que permiten obtener, evaluar y almacenar gametos de animales valiosos y eliminar limitaciones de manejo, médicas y genéticas que impedirían la utilización de algunos individuos; además, las TRA facilitan la transferencia de material genético entre

poblaciones *ex situ* y/o *in situ* lo cual es de utilidad para tener el potencial de recrear una población silvestre sostenible (Durrant 1990; Eberhard 1995; Schaffer *et al.* 1989).

La obtención de semen en primates no humanos se reporta exitosa bajo diferentes técnicas o métodos. La electroeyaculación (EE) por sonda bipolar rectal se ha probado en diversas especies como *Saguinus mystax* por Harrison y Wolf (1985); en *Aotus griseimembra* por Campos y Quintero (1987); en *Saimiri sciureus* por Lang (1967) y Bennet (1967); en *Callithrix jacchus* por Cui *et al.* (1991) y Cui (1996), por Morrel *et al.* (1996), por Schneiders (2004) y por Silva *et al.* (2009); en *Macaca fuscata* por Enomoto *et al.* (1995); en *Cebus apella* por Bush *et al.* (1975), Guimarães (1994) y Barnabe *et al.* (2002); en *Ateles geoffroyi* por Hernández *et al.* (2007) y Cerda *et al.* (2009); en *Alouatta caraya* por Valle *et al.* (2004); en *Saguinus oedipus* y en *Saguinus fuscicollis* por Schneiders (2004) y en *Leontopithecus chrysomelas* por Delgado *et al.* (2007). También se reporta la colecta de semen por lavado vaginal post-coito, la cual se ha empleado en *Callithrix jacchus* por Kuederling *et al.* (1996) y Morrel *et al.* (1996). La masturbación, automasturbación y vagina artificial también se han

reportado en especies como *Pan troglodytes troglodytes* por Marson *et al.* (1989) y por Gould y Young (1996). Finalmente, la punción epididimal se ha reportado en *Macaca fascicularis* por Feradis *et al.* (2001).

Se ha informado de una técnica más novedosa y menos invasiva, la estimulación vibratoria del pene (EVP), empleada en *Callithrix jacchus* por Kuederling *et al.* (2000), Schneiders (2004), Schneiders *et al.* (2004) y Valle (2007); y en *Saimiri spp.* por Yeoman *et al.* (1998) y por Laverde y Medina (2001).

En Colombia se han realizado dos investigaciones en la obtención y análisis de características seminales de primates. La primera en *Aotus griseimembra* por Campos y Quintero (1987) mediante EE; y la segunda en *Saimiri sciureus* por Laverde y Medina (2001) con la técnica de EVP. Como se dijo, esta última es una técnica innovadora, poco invasiva y reporta mejores resultados comparada con la EE (Kuederling *et al.* 2000; Schneiders *et al.* 2004). Se desconoce si se han realizado otros estudios en primates con estas u otras técnicas; algunas de las razones podrían estar relacionadas con la escasa publicación de trabajos de investigación de pregrado en revistas indexadas; también el alto costo y desconocimiento de las técnicas y equipos disponibles para la obtención y análisis de semen. Adicionalmente, se tiene temor del uso en fauna silvestre, de uno de los métodos ampliamente empleado en algunos animales domésticos y de producción, que es la EE, ya que debe llevarse a cabo bajo anestesia profunda que implica riesgos para la vida del animal. Por otro lado, actualmente no existe en el país un banco de gametos específico para especies de fauna silvestre amenazadas o no amenazadas, que permita aprovechar la oportunidad de la obtención del ma-

terial seminal o de oocitos y embriones, y así ayudar a la conservación de la fauna silvestre colombiana mediante la investigación. El establecimiento de un banco de gametos puede ser una solución viable como paso inicial para estudiar y promover la diversidad biológica en poblaciones en vida silvestre o cautivas.

En esta investigación se evaluó la respuesta eyaculatoria de *S. leucopus* al aplicar la técnica de EVP bajo sedación con ketamina, se procuró la estandarización de la técnica y se realizó una descripción de las características seminales de la especie. El tití gris se encuentra en un alto grado de amenaza de conservación (en peligro) por ser endémica y ser objeto de tráfico ilegal de fauna; además, se desconoce información respecto a su fisiología reproductiva. Entre tanto, el Programa Nacional para Conservación de la Especie Endémica de Colombia Tití Gris (*Saguinus leucopus*) del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, propone entre sus objetivos promover y ejecutar programas de conservación *ex situ* con fines de investigación (Morales *et al.* 2008).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un censo sobre ejemplares en cautiverio en cuatro localidades. En total se dispuso de 15 machos de *S. leucopus* que pesaban más de 300 gramos y que formaban parte de un grupo social establecido o estaban solitarios. Estos animales se encontraban en el zoológico Matecaña (ZM) en Pereira, el parque zoológico Jaime Duque (PZJD) en Tocancipá, en el Centro de Rehabilitación de Fauna Silvestre del Oriente de Caldas (CRFSOC) de la Corporación Autónoma Regional de Caldas (Corpocaldas) ubicado en Victoria; y en la Unidad de Rescate y Rehabilitación de Animales Silvestres (URRAS) de la Facultad de Medicina Veterinaria y de

Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional de Colombia (UN), sede Bogotá. El acceso a los animales se logró mediante el permiso de investigación en diversidad biológica IDB0125-N°. 8 (agosto de 2011) otorgado por el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS).

Se empleó la restricción física manual y luego se procedió a realizar sedación con clorhidrato de ketamina (Ketamina® 50, Laboratorios Hollyday) en un rango de dosis de 5 a 10 mg/kg I.M., para minimizar el estrés de la manipulación (Varela 2005), ya que los especímenes no estaban acostumbrados o entrenados para la toma de muestras biológicas. Después de que la ketamina surtió efecto, se tomaron datos fisiológicos y biológicos como frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, temperatura rectal, peso y estado de desarrollo biológico (EDB), y se procedió a realizar un lavado y limpieza prepucial con 5 a 10 ml de solución salina fisiológica al 0,9% calentada a 37°C; luego, ayudado con una gasa, se removieron partículas de polvo, comida y orina. Después se posicionó el primate boca abajo, sobre una bolsa de solución salina calentada a temperatura corporal de 37°C envuelta en una bolsa de tela negra para evitar hipotermia y simular la posición natural de cópula (Figura 1).



**FIGURA 1.** Procedimiento de obtención de semen de *S. leucopus* mediante EVP y detalle del vibrador FertiCare® Personal con la adaptación sugerida.

Finalmente, se procedió a la colecta del semen mediante EVP empleando un vibrador FertiCare® Personal (Multicept-Rigshospitalet, Copenhage, Dinamarca), que consiste en una unidad de fuerza que controla la frecuencia (70 a 110 Hz) y la amplitud (0,5 a 3,0 mm) que permite una vibración fina y el cual se adaptó con un acople de teflón para adecuar un tubo Eppendorf de 200 µl como vagina artificial según lo sugerido por Yeoman *et al.* (1998); Kuederling *et al.* (2000); Schneiders *et al.* (2004) y Valle (2007).

El protocolo de combinación de frecuencia y amplitud para obtención de semen (Tabla 1) fue adaptado y modificado de Kuederling *et al.* (2000); Laverde y Medina (2001); Schneiders *et al.* (2004); Valle (2007) y Yeoman *et al.* (1998), sin pausas o descansos entre combinaciones ya que los especímenes no estaban entrenados o acostumbrados al procedimiento.

La acción fisiológica por la cual la EVP produce la eyacuación se origina en un mecanismo reflexogénico exteroceptivo proveniente de estímulos aferentes del pene que entran a la médula espinal por

**TABLA 1.** Protocolo de obtención de semen mediante la EVP.

Estímulo	Duración (segundos)	Frecuencia (Hz)	Amplitud (mm)
Inicio	120	80	0,5
Continuo	120	85	0,5
Continuo	120	80	1,0
Continuo	120	85	1,0
Continuo	120	90	0,5
Continuo	120	95	0,5
Continuo	120	90	1,0
Continuo	120	95	1,0
Continuo	120	100	0,5
Termina	120	100	1,0

la rama sensorial del nervio pudiendo a la altura del segundo al cuarto nervio sacro. El estímulo asciende al centro coordinador de la eyaculación en la región de la médula comprendida entre la onceava vértebra torácica (T11) y la segunda lumbar (L2), donde descienden los impulsos craneales y son integrados. Los reflejos eferentes salen y son relevados por la cadena simpática a la altura de la décima vértebra torácica (T10), luego descienden al ganglio hipogástrico para finalmente llegar a los órganos efectores que son las vesículas seminales, próstata, esfínter vesical y conducto deferente, mediante pequeñas fibras postganglionares. Esta inervación simpática es la responsable de la contracción de estos órganos y la emisión seminal hacia la uretra peneana. La contracción de los músculos isquiocavernoso y bulbocavernoso es responsabilidad del sistema parasimpático a través de las ramas sensorial y motora del nervio pudiendo. Esta contracción muscular induce, junto con la musculatura del piso de la pelvis, la emisión del material seminal al exterior (François *et al.* 1980; Brindley 1981; Nehra *et al.* 1996; Monga *et al.* 1999; Laverde y Medina 2001; y Sonksen *et al.* 1994 y 2002).

El análisis del material seminal se realizó inicialmente en los laboratorios de cada centro o zoológico, con ayuda de un microscopio óptico de luz con objetivos de 10X y 40X de aumento. Para evaluar la motilidad masal o vigor y la motilidad progresiva, se depositó una gota de semen sobre una lámina y posteriormente se cubrió con laminilla precalentada a 37°C. Para el resto del análisis, se mezclaron 5 µL de semen diluido con TALP-HEPES (Valle 2007) con 45 µL de formalina buferada al 10% (dilución 1:10) en un tubo Eppendorf de 200 µL. Las muestras fueron

llevadas al Laboratorio de Andrología y Gineco-Obstetricia de la Clínica de la Reproducción Animal de la FMVZ de la UN, sede Bogotá, para su posterior análisis de viabilidad, morfología, morfometría y concentración espermática.

La evaluación macroscópica del semen se llevó a cabo inmediatamente después de obtener la muestra; el color se observó sobre fondo oscuro y se consideró entre blanco opalescente o lechoso, blanco claro y traslúcido. Para la viscosidad se introdujo una punta desechable de una micropipeta determinándose la formación o no de filamento y clasificándose como muy viscoso cuando fue mayor a 1 cm, viscoso cuando fue igual a 1 cm, acuoso cuando fue menor a 1 cm y muy acuoso cuando no se formó filamento (Calamera 1978; Laverde y Medina 2001). Para la medición del pH se depositaron 5 µL de la muestra sobre una tira de papel indicador de pH escala de 4,5 a 9,0 (precisión 0,5; Civeq® CVQ 2055) y luego de 30 segundos se realizó la lectura en la escala cromática. (OMS 1999; Laverde y Medina 2001; Toro 2009).

La motilidad masal o vigor se evaluó sobre un lámina Cell-Vu® DMR-600 (Fertility Technologies, Inc.) precalentada a 37°C, según protocolo sugerido por Laverde y Medina (2001). Se colocaron 5 µL de semen sobre la lámina y luego se observó bajo microscopio óptico de luz con objetivo de 10X de aumento, donde se rastreó sistemáticamente el campo del microscopio y se clasificó la motilidad del grupo de espermatozoides en las escalas propuestas por Kuederling *et al.* (2000), Laverde y Medina (2001) y Yeoman *et al.* (1998), así:

- 0: No hay movimientos.
- 1: Movimientos convulsivos en el sitio o no progresivos.

- 2: Movimientos progresivos lentos en una dirección o variante.
- 3: Movimientos progresivos rápidos en una dirección o variante.
- 4: Movimientos progresivos rápidos en varias direcciones.
- 5: Hiperactivación caracterizada por movimientos vitales rápidos de la cola y de alta amplitud y progresiones lineales o variantes.

Se valoró la motilidad individual progresiva (MIP) empleando la misma muestra de la motilidad masal, solo que después de su valoración se colocó una lamilla y se observó bajo objetivo de 40X de aumento; se evaluaron 100 células espermáticas tomando la siguiente clasificación: progresivo rápido, progresivo lento, no progresivo e inmóvil (Laverde y Medina 2001; Toro 2009; Valle 2007).

Para estimar la viabilidad espermática se emplearon portaobjetos con laminillas en las que se depositaron 5  $\mu\text{L}$  de semen y se adicionaron 5  $\mu\text{L}$  de eosina-nigrosina; con un capilar se homogenizó suavemente y luego se realizó el extendido. Bajo microscopio óptico de luz en objetivo de 40X de aumento, en 100 células espermáticas, se estimó el porcentaje de viabilidad de la muestra. Con la misma muestra, en objetivo de 100X de aumento con aceite de inmersión, se evaluó la morfología espermática, determinando el porcentaje de espermatozoides normales y reportando las anomalías morfológicas primarias y secundarias de cabeza, pieza intermedia y cola del espermatozoide (Laverde y Medina 2001; Toro 2009; Valle 2007).

Para la concentración espermática se preparó una dilución 1:10 de la muestra obtenida, mezclando 5  $\mu\text{L}$  de semen con 45  $\mu\text{L}$  de formalina al 10% para su transporte y almacenamiento. Luego, en el laboratorio

se homogenizó la muestra por medio de un agitador o vortex y se depositaron 5  $\mu\text{L}$  de la dilución en una cámara Cell-Vu® DMR-600 (Fertility Technologies Inc.), según protocolo sugerido por Laverde y Medina (2001) y Chun *et al.* (2007). Después se realizó el conteo en 10 cuadros bajo microscopio óptico de luz con el objetivo de 40X de aumento; el resultado se dividió por 2 y luego se multiplicó por los factores de las diluciones iniciales con el diluyente TALP-HEPES y la formalina al 10%. El resultado se expresó en millones de espermatozoides por microlitro ( $\mu\text{L}$ ).

Para la morfometría del espermatozoide se empleó un microscopio Nikon® E600 dotado con cámara Nikon® DS-Fi1 (5 megapíxeles, CCD con resolución de 2.560 x 1.920 píxeles), perteneciente al Laboratorio Clínico de la FMVZ de la UN, sede Bogotá. Mediante el software del equipo se realizaron mediciones en 100 espermatozoides del área de la cabeza, los diámetros mayor y menor de la cabeza, la longitud de la pieza media, la longitud de la cola y la longitud total (Figura 2).



**FIGURA 2.** Espermatozoide normal de *S. leucopus* (100X con aceite de inmersión; microfotografía tomada con un microscopio Nikon® E600 dotado con cámara Nikon® DS-Fi1).

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se analizaron utilizando parámetros de estadística descriptiva: media y desviación estándar (DE) para variables cuantitativas con límites de confianza del 95%. Para los análisis estadísticos se empleó el software StatsGraphics Centurion V® para Windows®, licenciado en la Unidad de Informática y Comunicaciones de la Facultad de Ciencias Económicas de la UN, sede Bogotá.

### RESULTADOS

El presente estudio describe la primera aplicación exitosa del uso de la EVP en *S. leucopus* en Colombia con especímenes cautivos. El 66,6% de los especímenes cautivos muestreados (10/15) respondieron a la EVP: en el primer intento se consiguió 46,6% (7/15) y en el segundo intento, 75% (3/4) para un total de 52,6% (10/19) de éxito en los intentos.

Se presentó una coloración blanco opalescente en el 90% (9/10) de las muestras y tan solo una presentó coloración traslúcida.

En la Tabla 2 se presentan los resultados obtenidos para esta investigación en cuanto a tiempo de eyaculación (minutos), volumen (µL), pH, motilidad masal, motilidad individual progresiva (MIP), concentración espermática ( $\times 10^4$  spz/µL), morfología normal y viabilidad.

En la Tabla 3, se reportan los resultados para la morfometría espermática de *S. leucopus* y la comparación con otras tres especies de callitrichidos investigadas por Schneiders (2004).

### DISCUSIÓN

El porcentaje de éxito en el muestreo con EVP fue de 52,6%, lo cual es aceptable comparado con otras investigaciones con la misma técnica en *C. jacchus*, las cuales fueron de 35,2% (Kuederling et

**TABLA 2.** Características macro y microscópicas de las muestras de semen obtenidas de *S. leucopus*.

Parámetro	Tiempo de eyaculación (minutos)	Volumen (µl)	pH	Motilidad masal (0-5)	Motilidad progresiva %	Concentración $\times 10^4$ spz/µL	Morfología % normal	Viabilidad % vivos
<b>Promedio</b>	12:35	24	7,5	3,7	97,1	87.617	69,3	93,7
<b>±DE</b>	±6:42	±18,82	±0,26	±0,5	±4,54	±21.327	±11,6	±4,9

**TABLA 3.** Morfometría del espermatozoide de *S. leucopus* y comparación con otras especies de callitrichidos.

Callitrichido	Área de cabeza (µm²)	Diámetro mayor de la cabeza (µm)	Diámetro menor de la cabeza (µm)	Longitud de la cola (µm)	Longitud total (µm)
<i>S. leucopus</i>	9,67±0,89	4,94±0,66	3,28±0,32	58,62±1,96	64,88±2,82
<i>S. oedipus*</i>	SD	5,53±0,32	3,32±0,24	59,43±2,01	64,96±2,08
<i>S. fuscicollis*</i>	SD	5,58±0,36	3,22±0,19	55,16±2,66	60,74±2,79
<i>C. jacchus*</i>	SD	5,08±0,33	3,34±0,22	51,84±3,65	56,92±3,74

Sin datos: SD; \*Schneiders (2004).

al. 2000), 89,2% (Schneiders 2004) y 83,33% (Valle 2007). Sin embargo, en la presente investigación los especímenes no estaban acostumbrados a ningún tipo de procedimiento de colecta de muestras biológicas y las condiciones de manejo eran distintas en las cuatro localidades e incluso entre individuos del mismo sitio, ya que algunos estaban hospitalizados, en cuarentena o rehabilitación. En las investigaciones citadas anteriormente se trabajó con animales acostumbrados y condiciones de manejo y medioambientales controladas. El acostumbramiento o entrenamiento no se puede llevar a cabo en los Centros de Atención y Valoración de Fauna, ya que los especímenes provienen del tráfico ilegal y la gran mayoría serán rehabilitados y sujetos a una posible liberación o reintroducción. Los especímenes de zoológicos se podrían entrenar o acostumbrar a procedimientos cortos de obtención de muestras biológicas, facilitando y aumentando el éxito de la obtención de semen por EVP.

En otras investigaciones con EVP (Kuederling *et al.* 2000; Schneiders 2004 y Valle 2007) el tiempo de eyaculación varió de 1 minuto hasta 20; no obstante, algunos investigadores no tuvieron en cuenta el tiempo desde el inicio de la primera estimulación, sino más bien el inicio y pausa en cada combinación de frecuencia y amplitud. Para esta investigación se observó que entre más larga y difícil era la contención física para el muestreo, el tiempo de eyaculación era ligeramente mayor, lo que probablemente se debe a la agitación y ansiedad del estrés de la captura. Esto podría estar asociado al tiempo de cautiverio, volumen del encierro, alojamiento con otros especímenes (intraespecífico) y exhibición o contacto otras especies incluida el hombre (interespecífico).

El uso del clorhidrato de ketamina (Ketamina® 50, Laboratorios Hollyday) en dosis de 5 a 10 mg/kg, no pareció afectar la eyaculación y se empleó para disminuir el estrés por captura y evitar lesiones en el espécimen y los operarios durante el procedimiento. La ketamina es un anestésico disociativo derivado de las fenciclidinas que actúa sobre la corteza cerebral y no produce relajación muscular (Varela 2005); por esta razón, no afecta la erección, la cual es un indicativo positivo del estímulo aplicado. En ninguna investigación reportada previamente en las que se obtuvo semen mediante EVP, se empleó la restricción química, ya que los especímenes son de centros de investigación y estaban acostumbrados a procedimientos de colecta de muestras biológicas; por consiguiente, no era necesaria la restricción química. En contraste al implementar la recuperación del semen mediante EE en primates se recomienda la anestesia profunda para todos los casos sin excepción (Poches 2010).

En algunas muestras de semen se observaron bajo microscopio partículas de polvo, comida, heces y orina, lo cual no fue reportado por otros autores que trabajaron con la EVP. Es importante realizar una limpieza profunda de los genitales y zonas cercanas para evitar la contaminación de las muestras obtenidas por EVP, ya que *S. leucopus* y otros callitricidos realizan marcaje de territorio con la parte ventral de su abdomen y genitales en donde están las glándulas de marcaje (Defler 2004). Al llevar a cabo protocolos de biotecnologías reproductivas como congelación de semen e inseminación, la presencia de estas partículas puede afectar la calidad seminal.

La muestra de semen calificada como traslúcida procedía de un individuo con más de veinte años de edad que ya pre-



sentaba atrofia testicular posiblemente asociada a la edad; esta muestra no se incluyó dentro del análisis estadístico pero se reporta el hallazgo. El color se puede asociar con la concentración en donde el blanco opalescente o blanco lechoso son consistentes con altas concentraciones de espermatozoides, mientras que coloraciones blanco traslúcido y transparente indican concentraciones bajas y/o azoospermia (Calamera 1978; Toro 2009).

En cuanto la característica del volumen nuestros resultados se asemejan a lo encontrado en la especie más cercana a la de esta investigación que es *C. jacchus*. Kuederling (2000), Schneiders (2004) y Valle (2007) obtuvieron con la EVP 31,9  $\mu\text{L}$ ; 21,8 $\pm$ 9,9  $\mu\text{L}$  y 26,05 $\pm$ 2,88  $\mu\text{L}$ , respectivamente. Estos valores son similares a los reportados por Schneiders (2004) empleando EE, quien obtuvo 18,1  $\mu\text{L}$  y 39,9  $\mu\text{L}$  respectivamente con las especies cercanas *S. fuscicollis* y *S. oedipus*. Los autores citados previamente separaron los machos de las hembras al menos por siete días. Las variaciones de volumen reportadas en esta investigación se deben probablemente a que algunos individuos estaban alojados con hembras. Está reportado que los callitrichidos pueden presentar durante todo el año cópula (Tardif *et al.* 1984 y 2003; Defler 2010), mientras que los que presentaron volúmenes más altos estaban solitarios o con otros machos.

Para el pH en la especie *C. Jacchus*, utilizando la EE y la EVP, se obtuvieron respectivamente 7,51 $\pm$ 0,22 y 7,63 $\pm$ 0,05 (Cui *et al.* 1996; Valle 2007), valores muy similares los reportados en este estudio. La precisión de este estudio no pudo ser mayor debido a la limitante de 0,5 en la medición con papel indicador de pH.

No se conocen estudios previos de cualquier método de obtención de semen

para *S. leucopus*. Se reporta que el método de obtención de semen influye sobre las variables espermáticas, siendo los métodos que se aproximan más al evento fisiológico de la eyaculación o la cópula, los que proporcionan los mejores resultados. Esta circunstancia explica los mayores porcentajes de motilidad observados en virtud que la EVP puede considerarse fisiológicamente más natural que la EE, de acuerdo con lo reportado por Kuederling *et al.* (2000) y Schneiders *et al.* (2004) en *C. jacchus*.

Con relación a la concentración espermática el resultado de esta investigación es similar a los rangos publicados para el caso de muestras obtenidas por EVP en *C. jacchus* que reportan Kuederling *et al.* (2000) de 115.420 x 10<sup>4</sup> spz/ $\mu\text{L}$ ; Schneiders *et al.* (2004) de 655.00 $\pm$ 64.190 x 10<sup>4</sup> spz/ $\mu\text{L}$ ; y Valle (2007) de 1.096 $\pm$ 252,37 x 10<sup>4</sup> spz/ $\mu\text{L}$ . Por su parte, en el caso de muestras obtenidas mediante EE, la concentración espermática fue superior en especies de callitrichidos como *C. jacchus* con 13.020 $\pm$ 2.5430 x 10<sup>4</sup> spz/ $\mu\text{L}$ ; *S. fuscicollis* de 47.230 $\pm$ 44.560 x 10<sup>4</sup> spz/ $\mu\text{L}$ ; *S. oedipus* de 18.530 $\pm$ 13.140 x 10<sup>4</sup> spz/ $\mu\text{L}$  y *S. mystax* de 19.550 x 10<sup>4</sup> spz/ $\mu\text{L}$ . Se ha reportado que la concentración es mayor en las muestras obtenidas por EVP comparándola con la EE (Yeoman *et al.* 1998; Schneiders *et al.* 2004) ya que el impulso eléctrico de la EE estimula la producción de las glándulas accesorias. Cabe resaltar que en esta investigación se empleó la cámara Cell-Vu DRM-600, mientras que en las otras investigaciones emplearon la cámara de Neubauer. Las dos cámaras no tienen variaciones significativas en el conteo (Chun *et al.* 2007), pero en la cámara DMR-600 el conteo es más sencillo y rápido.

Respecto a la viabilidad y la morfología de los espermatozoides en esta investiga-

ción se obtuvieron los valores más altos comparados con otras investigaciones en *C. jacchus* mediante la misma técnica. La viabilidad fue de  $73,6 \pm 17,2\%$  y la morfología de  $33,8 \pm 20,5\%$ , reportada por Schneiders *et al.* (2004);  $74,6\%$  de viabilidad reportada por Kuederling *et al.* (2000); y  $85,25 \pm 3,42\%$  de viabilidad y  $61,65 \pm 4,74\%$  morfología reportadas por Valle (2007). Los obtenidos en este estudio fueron mucho más altos comparados con los reportados para la EE. Schneiders *et al.* (2004) obtuvieron una viabilidad de  $60,9 \pm 15,5\%$  en *C. jacchus*, de  $71,1 \pm 13,8\%$  para *S. fuscicollis* y de  $75,3 \pm 13,3\%$  para *S. oedipus*.

La morfometría espermática (Tabla 3) de las cuatro especies de primates fue muy similar, en especial entre *S. leucopus* y *S. oedipus*. Adicionalmente, se midió el área de la cabeza, dato que no había sido reportado en otros callitricidos. El área de la cabeza puede servir para establecer anomalías como microcefalia, macrocefalia y cabeza alargada, que pueden ser de utilidad cuando se emplean evaluaciones con sistemas computarizados de análisis de semen (*Computer Assisted Semen Analysis, CASA*).

## CONCLUSIONES

La técnica de la estimulación vibratoria del pene (EVP) es un método innovador, replicable, viable y seguro para la obtención de semen de *S. leucopus* en cautiverio bajo efectos de la ketamina. La combinación del protocolo fue sin pausas o descansos. Se empleó satisfactoriamente el diluyente TALP-HEPES reportado para *C. jacchus*, ya que el semen de los callitricidos es de bajo volumen y muy viscoso. El diluyente fue usado exitosamente y no pareció interferir con las características de la evaluación del semen en esta investigación; se recomienda

ensayar otros diluyentes. El volumen eyaculado en *S. leucopus* obtenido por EVP fue similar al reportado por otros autores en otras especies de callitricidos en los que se utilizó EVP y EE.

La concentración de espermatozoides fue similar a la encontrada en *C. jacchus* en muestras obtenidas a través de EVP; y fue mayor al compararla con *S. oedipus* y *S. fuscicollis*, obtenidas mediante EE. La viabilidad y la morfología normal fueron superiores a las encontradas para *C. jacchus* a través de EVP y en *S. oedipus* y *S. fuscicollis*, recuperadas mediante EE. Para la morfometría espermática, las medidas son similares a las otras tres especies de callitricidos citadas previamente.

Esta investigación es pionera para la especie *S. leucopus* y representa un gran aporte para el avance en su conservación; además, promueve un campo novedoso de investigación en el área de la reproducción animal de fauna silvestre, en especial de primates neotropicales. Se recomienda investigar en otras especies de primates con la EVP, tanto en condiciones *in situ* como *ex situ*, e incluso evaluar otros diluyentes y ensayar protocolos de congelación.

## AGRADECIMIENTOS

A la Asociación de Veterinarios de Vida Silvestre (VVS) por la confianza depositada y la financiación del vibrador FertiCare® Personal. Al Laboratorio de Andrología y Gineco-Obstetricia de la Clínica de la Reproducción Animal de la FMVZ de la UN, en especial al Dr. Jorge Pinzón; al Laboratorio Clínico de la FMVZ de la UN, en especial al Dr. Carlos Moreno; a la Dra. Liliana Rojas (URRAS), al Dr. Néstor Varela (ZM), al Dr. Leonardo Arias (PZJD) y al CRFSOC-Corpocaldas por el aval y apoyo prestado.

## REFERENCIAS

1. Barnabe R, Guimaraes M, Oliveira C, Barnabe A. 2002. Analysis of some normal parameters of the spermogram of captive capuchin monkeys (*Cebus apella* Linnaeus, 1758). Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. (39)6: 331-333. DOI:10.1590/S1413-95962002000600010.
2. Bennet J. 1967. Semen collection in the squirrel monkey. J. Reprod. Fertil. 13: 353-355.
3. Brindley G. 1981. Reflex ejaculation under vibratory stimulation in paraplegic men. Paraplegia. 19: 299-302.
4. Bush D, Russell L, Flowers A, Sorensen A. 1975. Semen evaluation in capuchin monkeys (*Cebus apella*). Lab. Anim. Sci. 25(5): 588-593.
5. Calamera J. 1978. El espermograma. Buenos Aires: Ed. Baesa. p. 139.
6. Campos R, Quintero G. 1987. Estandarización de técnicas para colección de material seminal en primates del género *Aotus griseimembra* [tesis pregrado]. [Bogotá, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia.
7. Cerda A, Hernández L, Chavira R, Cárdenas M, Mondragón R. 2009. Seasonality of LH, testosterone and sperm parameters in spider monkey males (*Ateles geoffroyi*). Am. J. Primatol. 71(5): 427-431.
8. Chun JL, Fang C, Hui RX, Yu FH, Nian QL. 2007. Comparison of three sperm-counting methods for the determination of sperm concentration in human semen and sperm suspensions. Lab. Med. 38(4): abril.
9. Cui K, Flaherty S, Newble C, Guerin M, Napier A, Matthews C. 1991. Collection and analysis of semen from the common marmoset (*C. jacchus*). J. Androl. 12: 214-220.
10. Cui K. 1996. The effect of stress on semen reduction in the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). Hum. Reprod. 11: 568-73.
11. Defler RT. 2010. Historia natural de los primates colombianos. Bogotá D.C.: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. p. 612.
12. Delgado F, Santos M, Góes T, Pissinatti A. 2007. Coleta de sêmen em mico-leão-de-cara-dourada (*Leontopithecus chrysomelas*, Kuhl 1820) através da eletroejaculação. R. Bras. Ci. Vet. 14(2): 67-71.
13. Durrant B. 1990. Semen collection, evaluation and cryopreservation in exotic animal species: maximizing reproductive potential. Ilar News. 32: 2-9.
14. Eberhard T. 1995. Conservation breeding as a tool for saving animal species from extinction. Trends Ecol. Evol. 10: 438-443.
15. Enomoto T, Matsubayashi K, Nagato Y, Nakano N. 1995. Seasonal changes in spermatogenic cell degeneration in the seminiferous epithelium of adult Japanese Macaques (*Macaca fuscata fuscata*). Primates. 36(3): 411-422.
16. Feradis A, Pawitri D, Suatha I, Amin M, Yusuf T, Sajuthi I, Budiarsa I, Hayes E. 2001. Cryo-preservation of epididimal collected by needle biopsy from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). J. Med. Primatol. 30(2): 100-106.
17. François N, Lichtenberg JM, Jouannet P, Desert JE, Maury M. 1980. L'éjaculation par le vibromassage chez le paraplégique a propos de 50 cas avec 7 grossesses. Ann. Med. Phys. 23: 24-36.
18. Gould KG, Young LG. 1996. Functional parameters of chimpanzee (*Pan troglodytes*) sperm from ejaculates collected by rectal probe electrostimulation and by artificial vagina. Am. J. Primatol. 39: 115-122.
19. Guimarães, M. 1994. Contribuição para o estudo da colheita e avaliação do sêmen do macaco prego (*Cebus apella*, Erxleben 1777) [tesis maestría]. [São Paulo, Brasil]: Universidade de São Paulo.
20. Harrison RM, Wolf HR. 1985. Sperm parameters and testicular volumes in *Saguinus mystax*. J. Med. Primatol. 14: 281-284.
21. Hernández L, Cerda A, Paez S, Rojas M, Mondragon R. 2007. Artificial insemination in black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). Theriogenology. 67: 399-406.
22. Kuederling I, Morrel J, Nayudu P. 1996. Collection of semen from marmoset monkeys *C. jacchus* for experimental use by vaginal washing. Lab. Anim. 30: 260-266.
23. Kuederling A, Schneiders A, Sonksen J, Nayudu PL, Hodges JK. 2000. Non-invasive collection of ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibrostimulation. Am. J. Primatol. 52: 149-154.
24. Lang CM. 1967. A technique for the collection of semen from squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) by electro-ejaculation. Lab. Anim. Care. 2: 218-221.

25. Laverde HJ, Medina VM. 2001. Contribución al conocimiento de las características seminales del mono ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio, obtenido por el método de estimulación vibratoria del pene [tesis pregrado]. [Villavicencio, Colombia]: Universidad de los Llanos.
26. Marson J, Gervais D, Meuris S, Cooper R, Jouannet P. 1989. Influence of ejaculation frequency on semen characteristics in chimpanzees (*Pan troglodytes*). J. Reprod. Fertil. 85: 43-50.
27. Monga M, Bernie J, Rajasekaran M. 1999. Male infertility and erectile dysfunction in spinal cord injury: a review. Arch. Phys. Med. Rehab. 80: 1331-1339.
28. Morales A, Vejarano S, Rodríguez C, Ospina O. 2008. Programa Nacional para la Conservación de la Especie Endémica de Colombia Titi Gris (*Saguinus leucopus*). Bogotá: Dirección Nacional de Ecosistemas, Viceministerio de Ambiente, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. p. 53.
29. Morrel JM, Kuederling I, Hodges JK. 1996. Influence of semen collection method on ejaculate characteristics in the common marmoset (*C. jacchus*). J. Androl. 17: 164-172.
30. Nehra A, Werner MA, Bastuba M, Title C, Oates RD. 1996. Vibratory stimulation and rectal probe electroejaculation as therapy for patients with spinal cord injury: semen parameters and pregnancy rates. J. Urol. 155: 554-559.
31. [OMS] Organización Mundial de la Salud. 1999. Manual de Laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción con el moco cervical. 4ª. ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. p. 130.
32. Poches RA. 2010. La estimulación vibratoria del pene (EVP), alternativa novedosa y no invasiva para la obtención de semen en primates y otras especies animales. En: Memorias de la IX Conferencia Interna en Medicina y Aprovechamiento de Fauna Silvestre, Exótica y No Convencional. 6(2): 59-65.
33. Schaffer N, Cranfield M, Kempse S, Meehan T. 1989. Semen collection and analysis in the conservation of endangered nonhuman primates. Zoo. Biol. Suppl. 1: 47-60.
34. Schneiders A, Sonksen J, Hodges J. 2004. Penile vibratory stimulation in the marmoset monkey: a practical alternative to electro-ejaculation, yielding ejaculates of enhanced quality. J. Med. Primatol. 33: 98-104.
35. Schneiders A. 2004. Ejakulatgewinnung und ejakulatanalyse bei Krallenaffen (Callitrichidae; Platyrrhini; Primates) [tesis doctorado]. [Gießen, Alemania]: Justus-Liebig-Universität Gießen.
36. Silva C, Ferreira F, Gilson H, Mansano J, Esper C. 2009. Colheita e avaliação do sêmen de sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). Ciênc. Anim. Bras. 10(2): 544-552.
37. Sonksen J, Biering F, Kristensen JK. 1994. Ejaculation induced by penile vibratory stimulation in men with spinal cord injuries: the importance of the vibratory amplitude. Paraplegia. 32: 651-660.
38. Sonksen J, Ohl D. 2002. Penile vibratory stimulation and electroejaculation in the treatment of ejaculatory dysfunction. Int. J. Androl. 25: 324-332.
39. Tardif S, Ritcher C, Carson R. 1984. Reproductive performance of three species of Callitrichidae. Lab. Anim. Scien. 34(3): 272-275.
40. Tardif S, Smuncy D, Abbott D, Mansfield K, Schultz N, Yamamoto ME. 2003. Reproduction in captive common marmoset (*Callithrix jacchus*). Comp. Med. 53(4): 364-368.
41. Toro A. 2009. Espermograma. Módulo 14. Medicina & Laboratorio. 15: 145-169. Bogotá: Editora Médica Colombiana S.A.
42. Valle R, Guimarães M, Muniz J, Barnabea R, Valec W. 2004. Collection and evaluation of semen from captive howler monkeys (*Alouatta caraya*). Theriogenology. 62: 131-138.
43. Valle R. 2007. Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*) [tesis doctorado]. [São Paulo, Brasil]: Universidade de São Paulo.
44. Varela N. 2005. Aproximación a la medicina clínica de los primates neotropicales con énfasis en especies presentes en Colombia [monografía]. [Bogotá, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia.
45. Yeoman R, Sonksen J, Gibson SV, Rizk BM, Abee CR. 1998. Penile vibratory stimulation yields increased spermatozoa and accessory gland production compared with rectal electroejaculation in a neurologically intact primate (*Saimiri boliviensis*). Hum. Reprod. 13(9): 2527-2531.