EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLO DE EYACULADO Y DE LA UTILIZACIÓN DE DILUYENTES SOBRE CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN TITÍ CABEZA DE ALGODÓN (*Saguinus oedipus*) EN CONDICIONES DE CAUTIVERIO BAJO ESTIMULACIÓN VIBRATORIA DEL PENE

SINDY LORENA QUITIAN OSORIO
CÓDIGO: 150210233

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
FUSAGASUGÁ
2016

EVALUACIÓN DE UN PROTOCOLODE EYACULADO Y DE LA UTILIZACIÓN DE DILUYENTES SOBRE CARACTERÍSTICAS SEMINALES EN TITÍ CABEZA DE ALGODÓN (*Saguinus oedipus*) EN CONDICIONES DE CAUTIVERIO BAJO ESTIMULACIÓN VIBRATORIA DEL PENE

Proyecto de grado opción investigación, como requisito parcial para la obtención del título de Zootecnista

SINDY LORENA QUITIAN OSORIO
CÓDIGO: 150210233

Director
CLAUDIA JIMÉNEZ ESCOBAR
Médico Veterinário, MSc. PhD.

Codirector
LAURA ALEXANDRA ROMERO SOLÓRZANO
Zootecnista, MSc.

UNIVERSIDAD DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
PROGRAMA DE ZOOTECNIA
FUSAGASUGÁ
2016

NOTA DE ACEPTACIÓN

Jurado
Sandra Sarmiento
Zootecnista

Jurado
Dr. Roger Suarez
Médico Veterinário
Esp en Acuicultura de Aguas Continentales

DEDICATORIA

A mi señor Jesús, por mostrarme que en él todo es posible. A mi familia; mis padres, mi hija y mi hermano; gracias por todo el apoyo que me han brindado durante este tiempo de formación, su compresión amor y paciencia

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras la Dra. Claudia Jiménez y la Dra. Laura Romero, por su apoyo, disciplina, orientación y paciencia.

Al Dr. Robin Poches por su apoyo, colaboración en campo y el acceso al equipamento vibrador *FertiCare® personal*.

Al Laboratorio de Andrología y Gineco-Obstetricia de la Clínica de la Reproducción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, a Andrea Ruiz, a Camilo Peña por el apoyo en la preparación del diluyente; a los, estudiantes, rotantes, pasantes y Albeiro por su asistencia.

Al Laboratorio Clínico de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, en especial al Dr. Carlos Alfonso Moreno, por su apoyo y orientación para realizar las tinciones, las mediciones de morfometría espermática, el uso del equipo para la toma de las fotografías y gracias al grupo de pasantes y a Gabriel por su asistencia.

Al Laboratorio de Reproducción animal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, del programa de Zootecnia, de la Universidad de Cundinamarca, sede Fusagasugá en especial a Daniel Castro por su colaboración.

A los zoológicos; Parque recreativo y Zoológico Piscilago y la Coordinadora Dra. Sandra Sarmiento, a la Dra. Luz Bernal y a July Gaviria, al Zootecnista David Ossa; al Zoológico Cafam, especialmente al Dr. Camilo Isaza; y a la Fundación Zoológico Santacruz, a la Dra. Haydy Monsalve, a la Dra. Laura León, a la Dra. Sandra Gómez y en general, a los pasantes, cuidadores y trabajadores por la colaboración prestada en los procedimientos.

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar un protocolo de eyaculado y la utilización de diluyentes sobre características seminales macroscópicas y microscópicas en tití cabeza de algodón (*Saguinus oedipus*) en condiciones de cautiverio bajo estimulación vibratoria del pene (EVP), al igual que establecer parámetros de medidas testiculares. Cinco machos adultos y sanos provenientes del Parque recreativo y Zoológico de Piscilago, Zoológico de Cafam y Fundación Zoológico Santacruz fueron sometidos a captura y posteriormente fueron sedados con un rango de dosis de 5 a 10 mg/kg de peso vivo de clorhidrato de ketamina para minimizar el estrés de la manipulación. Las medidas testiculares obtenidas fueron 1,48 ± 0,26 cm longitud derecho, 1,49±0,32 cm de longitud izquierdo, 0,91 ± 0,19 cm de ancho derecho, 0,98 ± 0,13 cm de ancho izquierdo y 2,04 ± 0,21cm de ancho total. Se obtuvo un 42,85 % de éxito entre combinaciones de 75 y 90 Hz y de 1 y 2,5 mm de amplitud; tiempo de eyaculación de 14:10 ± 9:17 minutos; El semen presentó color blanco opalescente 67 % (2/3) y 33 % (1/3) presentó color amarillento; volumen de 16 ± 15,6 µL; motilidad masal de 2,5 ± 0,71; motilidad individual de 25 ± 21,21; concentración espermática de 133,3 ± 120,03 $X10^6$ spz/mL; morfología normal de 57,33 ± 6,11 %; viabilidad de 75 ± 7,07 %. Tres diluyentes fueron probados en semen, en lo cual el diluyente que arrojó mejores resultados de motilidad fue TALP-HEPES. En las medidas de morfometría espermática se obtuvo un área de cabeza de 15,71 ± 0,51μm^2, longitud de cabeza de 5,52 ± 0,16 µm, un ancho de cabeza de 3,26±0,18 µm, longitud de pieza media de 7,45 ± 0,03 µm, longitud de cola de 47,96 ± 1,10 µm y longitud total de 60,89 ± 0,96 µm, para las células espermáticas tenidas con Wright y Giemsa. El método de tinción Wright arrojó mejores resultados de coloración, en términos de diferenciación de las estructuras de las células espermáticas. Este estudio permitió la obtención de muestras seminales mediante la técnica Estimulación Vibratoria del Pene, de manera segura y no invasiva para la especie *Saguinus oedipus* y permitió establecer medidas de morfometría espermática que no habían sido reportadas para esta especie.

Palabras clave: Estimulación Vibratoria del Pene, medidas testiculares, morfometría, *Saguinus oedipus*, semen.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate an ejaculation protocol with The Vibratory Stimulation of the Penis (EVP) and the use of diluents on macroscopic an microscopic seminal characteristics in captive marmoset head of cotton (*Saguinus oedipus*) , as well as to set parameters of testicular size. Five adult males and healthy from the Recreational Park and Zoo Piscilago, Zoo Cafam and Foundation Santacruz Zoo underwent capture and later were sedated with a dose of 5 to 10 mg / kg of hydrochloride ketamine to minimize handling stress. Testicular measurements obtained were, right length of 1.48 ± 0.26 cm, left length of 1.49 ± 0.32 cm right width of 0.91 ± 0.19 cm, left width of 0.98 ± 0.13 cm and total scrotal width of 2,04 ± 0,21cm. A 42.85% success rate was obtained for combinations between 75 and 90 of 1 Hz and amplitude of 2.5 mm; the ejaculation time was 14:10 ± 9:17 minutes. Semen color was opalescent in 67% (2/3) and yellowish in 33% (1/3) of the ejaculates; volume was 16 ± 15.6 uL; mass motility was 2,5 ± 0.71 and individual motility was 25 ± 21.21 %. Sperm concentration was 133.3 ± 120.03 spz $X10^6$ / mL with a Normal morphology in 57.33 ± 6.11%; viability was 75 ± 7.07%. Three extenders were used in which the best results with regard to motility was TALP-HEPES. Morphometry measures revealed a head area of 15.71 ± 0,51μm^2, head length of 5.52 ± 0.16 µm, and head width of 3.26 ± 0.18 µm head, Mid piece length was 7,45 ± 0.03 µm piece µm. Tail length was 47.96 ± 1.10 µm and total sperm length was 60.89 ± 0.96 µm. Wright staining allowed better differentiation of sperm morphology compared to Giemsa. This study showed the feasibility of obtaining semen samples by a Penile Vibratory Stimulation technique safely and noninvasively for the species *Saguinus oedipus* and allowed the measurement of sperm segments that had not been reported for this species.

Keywords: Penile Vibratory Stimulation (PVS), testicular measures, morphometry, *Saguinus oedipus*, semen.

Contenido

RESUMEN 6
Lista de fotografías 10
Lista de tablas 11
1. INTRODUCCIÓN 12
2. OBJETIVOS 14
2.1 Objetivo General 14
2.2 Objetivos específicos 14
3. REVISION DE LITERATURA 15
3.1. Generalidades del Orden Primate. 15
3.1.1 Especie *Saguinus oedipus*. 15
3.2 Clasificación taxonómica de la especie. 16
3.3 Estado actual de la especie. 16
3.3.1 Estado de amenaza según categorías de la IUCN. 16
3.3.2 Estado de amenaza según CITES. 17
3.4 Factores de amenaza. 17
3.5 Medidas de conservación. 17
3.6 Distribución geográfica. 18
3.7 Hábitat. 18
3.8 Morfología. 18
3.9 Comportamiento 19
3.10 Reproducción. 19
3.10.1 Jerarquías. 19
3.10.2 Cuidado parental. 20
3.11 Descripción anatómica del aparato reproductor 20
3.11.1 Aparato Reproductor del Macho. 20
3.12 Obtención de semen en primates. 22
3.13 Evaluación seminal. 23
3.13.3 Mediciones testiculares. 25
3.13.4 Diluyentes. 25
4. MATERIALES Y MÉTODOS 27
4.1 Ubicación y características agroclimatológicas. 27
4.3 Parámetros de evaluación 28
4.3.1 Protocolo de Adaptación de Colecta de Semen en Condiciones de Cautiverio. 28
4.3.2 Protocolos de eyaculación con la técnica de estimulación vibratoria del pene. 28
4.3.4 Utilización de diluyentes sobre el líquido seminal. 30
4.4 Evaluación del líquido seminal 30
4.4.1 Características Macroscópicas 30
4.4.2 Características microscópicas 31
4.5 Parámetros de medidas testiculares (MT). 32
4.6 Morfometría Espermática. 33
4.7 Análisis estadístico. 33
5. RESULTADOS 34
5.1 Protocolos de adaptación de colecta. 34
5.2 Protocolo y tiempo de eyaculación con la técnica de estimulación vibratoria del pene 35
5.3 Evaluación del líquido seminal. 36

5.3.1 Características macroscópicas. 36
5.3.2 Características microscópicas. 37
5.4 Parámetros de medidas testiculares. 39
5.5. Análisis de morfometría espermática. 40
6. DISCUSIÓN 41
6.1 Éxito en el protocolo y velocidad de eyaculado. 41
6.2 Características macroscópicas. 42
6.3 Características microscópicas. 42
6.4 Parámetros de medidas testiculares. 45
6.5 Morfometría espermática. 45
7. CONCLUSIONES 47
8. RECOMENDACIONES 48
9. BIBLIOGRAFÍA. 49
ANEXOS 55

Lista de fotografías

Pág.

Figura 1. Procedimiento de obtención de semen mediante la EVP…….……29

Figura 2. Mediciones testiculares (ancho total) a un macho *S. oedipus*¸ a través de un pie de rey……..……...…..32

Figura 3. Color blanco opalescente, de semen en *S. oedipus*. ……..……....37

Figura 4. Espermatozoides con cola enrollada proximal (CEP), (100x aceite de inmersión) tomada con microscopio Nikon® E600 con cámara Nikon® DS-Fi1 tinción Eosina-nigrosina……..……38

Figura 5. Espermatozoide con cabeza suelta (CS), (100x aceite de inmersión) tomada con microscopio Nikon® E600 con cámara Nikon® DS-Fi1tinción Eosina-nigrosina……..…...39

Figura 6. Espermatozoide con defecto de cabeza-DC macrocefalia (inferior), (100x aceite de inmersión) tomada con microscopio Nikon® E600 con cámara Nikon® DS-Fi1 tinción Wright…...…39

Figura 7. Espermatozoide normal, (100x aceite de inmersión) tomada con microscopio Nikon® E600 con cámara Nikon® DS-Fi1 tinción Wright……..…….39

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Características agroclimatológicas de los sitios de muestreo. ……...…….27

Tabla 2. Especímenes disponibles y características……..…….28

Tabla 3. Protocolo de eyaculación Yeoman para la obtención de semen…….....……29

Tabla 4. Fórmulas de los diluyentes utilizados……..……..30

Tabla 5. Especímenes disponibles y características…….……...35

Tabla 6. Obtención de semen y tiempo de eyaculación de ejemplares de la especie *Saguinus oedipus* utilizando la EVP …….…….……....35

Tabla 7. Características macroscópicas del semen de ejemplares de la especie *Saguinus oedipus* ……..……37

Tabla 8. Características microscópicas de las muestras obtenidas - motilidad masal, motilidad individual para semen fresco y diluido y concentración espermática ……....38

Tabla 9. Características microscópicas de las muestras obtenidas - porcentajes de morfología y viabilidad espermática…….…….……...38

Tabla 10. Medidas testiculares de individuos de la especie *Saguinus oedipus*……..…….…….....40

Tabla 11. Morfometría espermática con los métodos de tinción Wright y Giemsa…...…….……...……..…40

Tabla 12. Máximos y mínimos de los parámetros morfométricos con cada método de tinción……...…...……...40

1. INTRODUCCIÓN

Colombia tiene el 0.7% de la superficie total del planeta y de este porcentaje tiene un poco más 10% de la biodiversidad terrestre mundial de especies. Se estima que tiene aproximadamente 447 especies de mamíferos de los cuales 34 especies son primates (Defler, 2010). Entre éstas se encuentra el tití cabeza de algodón (*Saguinus oedipus*), especie endémica del país que habita en los bosques secundarios húmedos y secos. La especie está catalogada en la lista roja de la Unión Internacional Para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) en la categoría críticamente amenazado (CR) a nivel global según la IUCN (2008) y en el Apéndice 1 de acuerdo a CITES (2013), es decir que es una especie que se encuentra en peligro de extinción y podría ser afectada por el comercio de la misma. El *Saguinus oedipus* es una especie de prioridad de conservación, ya que la población se ve afectada por diversos factores tales como la reducción del hábitat, la deforestación, el tráfico ilegal de la especie, entre otras. Aunque en el país se ha avanzado en la protección de la especie a través de la intervención de autoridades ambientales y de programas de capacitación a las comunidades, las amenazas como la destrucción del hábitat y el tráfico ilegal siguen siendo el mayor inconveniente para mantener la viabilidad natural de esta especie (Rodríguez, 2006).

Los estudios que más se han realizado en primates son de ámbitos ecológicos, biológicos e incluso veterinarios, pero pocos han sido los estudios realizados en cuanto a la fisiología reproductiva de estos mamíferos en Colombia (Poches et. al., 2013). Las biotecnologías reproductivas son instrumentos significativos para la conservación de especies que estén en algún estado crítico de conservación, ya que son herramientas útiles de evaluación y conservación de gametos. De esta manera, se puede hacer a futuro un banco de gametos, lo que contribuiría con un aumento de la diversidad génica a través del intercambio de genes entre poblaciones *ex situ* y poblaciones *in situ* (Durrant, 1990; Eberhard, 1995; Schaffer et. al., 1989). En temas sobre reproducción de la especie *Saguinus oedipus*, se reporta una extracción seminal realizada por Schneiders (2004) en Alemania con la técnica de la electroeyaculación (EE) donde obtuvo como resultados un volumen promedio de 39,9 µl, una viabilidad de 75,3±13,3%y una motilidad de 61,4±17,5%.

Para una especie de importancia ecológica como lo es este primate, es significativo el desarrollo de más investigaciones dirigidas a las biotecnologías reproductivas, ya que éstas pueden ser una herramienta útil para la conservación de gametos.

Existen diversas técnicas para la extracción de semen. La más empleada en primates ha sido la electroeyaculación (EE) por sonda bipolar rectal, considerándose una técnica invasiva para los animales. Esta ha sido usada en diferentes especies de primates como *Callithrix jacchus*(Cui et. al.,1991; Cui, 1996; Morrel et. al., 1996; Schneiders, 2004; Silva et. al., 2009) en *Cebus apella* (Bush et. al., 1975; Guimarães, 1994; Barnabe et. al., 2002) en *Ateles geoffroyi*(Hernández et. al., 2007; Cerda et. al., 2009); en *Saguinus oedipus* y *Saguinus fuscicollis* (Schneiders, 2004) y en *Leontopithecus chrysomelas* (Delgado et. al., 2007).

Otra técnica de extracción seminal reportada se basa en una tecnología no invasiva, conocida como Estimulación Vibratoria del Pene (EVP), la cual fue usada originalmente en hombres con lesiones espinales en Dinamarca (Poches, 2010). Esta técnica también ha sido usada en primates no humanos como en *Callithrix jacchus* (Kuederling et. al., 2000; Schneiders et. al., 2004; Valle, 2007), en *Saimiri sciureus*, (Laverde y Medina, 2001), en *Saimiri boliviensis (*Yeoman et. al., 1998) y en *Saguinus leucopus* (Poches et. al., 2013).

En Colombia se han realizado tres investigaciones en extracción y evaluación de características seminales, la primera en *Aotus griseimembra* (Campos y Quintero, 1987) mediante EE, la segunda en *Saimiri sciureus* (Laverde y Medina, 2001) por medio de la EVP, donde obtuvieron un volumen de 106 ± 80 µL, concentración espermática de 362 ± 344 x10^6 spz/mL, motilidad de 70 ± 22 %, una viabilidad de 74 ± 17 % y una morfología normal de 76 ± 19 %; y la tercera en *Saguinus leucopus* (Poches et. al., 2013) mediante la EVP donde obtuvieron un volumen 24 ± 18,82 %,concentración espermática de 87.617±21.327x10^4spz/µL,motilidad progresiva de 97,1 ± 4,54 %, viabilidad de 93,7 ± 4,9 %, y morfología normal de 69,3 ± 11,6 %.

Por lo mencionado, cabe resaltar que son pocos los estudios realizados en reproducción, no solo en Colombia sino a nivel mundial, con el ánimo de contribuir al mantenimiento de esta especie. Por consiguiente, es necesario desarrollar proyectos de investigación en el área de reproducción, que favorezcan el mantenimiento de la especie, su preservación y conservación.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar un protocolo de eyaculado y la utilización de diluyentes sobre características seminales en tití cabeza de algodón (*Saguinus oedipus*) en condiciones de cautiverio bajo Estimulación Vibratoria del Pene.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar un protocolo de eyaculado y la utilización de diluyentes sobre características seminales en tití cabeza de algodón (*Saguinus oedipus*) en condiciones de cautiverio bajo estimulación vibratoria del pene.

2.2 Objetivos específicos

Evaluar un protocolo de eyaculado con la técnica de Estimulación Vibratoria del Pene (EVP), en machos de la especie *Saguinus oedipus*, sobre la velocidad de extracción seminal.

Analizar el efecto de algunos diluyentes sobre las características seminales de la especie *Saguinus oedipus*.

Evaluar las características macroscópicas y microscópicas del semen, así como, parámetros de medidas testiculares y de morfometría espermática del tití cabeza de algodón (*Saguinus oedipus*).

3. REVISION DE LITERATURA

3.1. Generalidades del Orden Primate.

El orden de los primates se divide en dos subórdenes: *Strepsirhini*, que comprende los *lemuroides*, *lorisoides* y *daubentonioides*; y *Haplorhini*, que agrupan los infraordenestarsiiformes, catarrhini (monos y simios del viejo mundo) y los *platyrrhini* (primates neotropicales).
Los primates colombianos, junto con los demás primates neotropicales se clasifican en el Infraorden *Platyrrhini* (del griego platy =plana y rhinos = nariz), en recuerdo a una nariz muy ancha o plana, producto de la ubicación de las ventanas u orificios nasales externos, los cuales se dirigen hacia cada lado; se contrastan con los Catarrhini (griego katarr = dirigido hacia abajo y rhinos= nariz) que posee una nariz con orificios situados uno cerca del otro y dirigidos hacia abajo. Estas dos categorías reflejan una gran cantidad de diferencias evolutivas, dado que estos grupos evolucionaron por separado desde el Oligoceno, hace 35 o más millones de años, cuando se aislaron los primeros platirrinos en la isla continente, conformada en aquella época en América del Sur. No hay registros fósiles conocidos de este continente antes de 25-26 millones de años del Oligoceo tardío (Defler, 2010).

3.1.1 Especie *Saguinus oedipus*.

En cautiverio, los adultos tienen una longitud cabeza-cuerpo de 22 a 24 cm, y la longitud de la cola está entre 35 y 45 cm. En general, las hembras son de apariencia más robusta y pesan entre 450 y 530 g. En vida silvestre se ha encontrado ejemplares de esta especie con un promedio de longitud total (cabeza-cuerpo) de 22,3 cm y una longitud de cola de 37,2 cm y pesos de 431,1 g en individuos adultos durante la época seca, mientras que en la época lluviosa el peso alcanza 442,6 g. El peso y la longitud del cuerpo son comparativamente mayores para animales nacidos o criados en cautiverio. La cabeza tiene la cara desnuda con piel negra; destaca la frondosa melena blanca que los caracteriza. Las partes superiores son de un colorido mayormente marrón a los lados del cuerpo; y las partes inferiores y superiores son de color blanco; la cola es café oscura con punta blanca o de color amarillenta (Defler, 2010).

En cuanto a la reproducción, el ciclo estral tiene una duración de alrededor de 15,5 días y el periodo de gestación es de 125 a 140 días; el nacimiento de gemelos es más frecuente que el nacimiento de un solo individuo. En condiciones controladas pueden tener hasta cuatro crías por parto cada 28 semanas (Preslock et al. 1973).

Esta especie, al igual que otros *Saguinus* consume frutos pequeños, artrópodos, flores, néctar y resina de los arboles sobre todo Enterolobium cyclocarpum. Ocasionalmente consumen pequeños vertebrados como ranas y lagartijas (Defler, 2010).

3.2 Clasificación taxonómica de la especie.

Pertenece al orden Primate, a la Familia *Cebidae*, Subfamilia *Callitrichinae*, Genero *Saguinus* y Especie S. *oedipus* (Linnaeus, 1758).

3.3 Estado actual de la especie.

El *Saguinus oedipus* se encuentra en Peligro Crítico según la IUCN (2008). Esta especie ha sido protegida legalmente en Colombia desde 1969 desde cuando ha estado en seguimiento y control; de esta manera se ha logrado que en la actualidad exista un cambio en la actitud de la comunidad hacia la conservación de la especie aunque no se sabe el total de la población en Colombia (Defler, 2010). En los años 1960 y 1975 se exportaron posiblemente entre 30.000 y 40.000 individuos a Estados Unidos; a partir del año 1974, este tipo de actividad fue prohibida (Defler, 2010).

3.3.1 Estado de amenaza según categorías de la IUCN.

En categoría internacional de acuerdo a la IUCN (2012) este se encuentra en Peligro Crítico Amenazado “CR”. Un taxón está en “Críticamente Amenazado” cuando se ha cumplido para la especie cualquiera de los criterios A a E, por lo que la especie enfrenta en el futuro, un riesgo de extrema amenaza de extinción en la vida silvestre.

De acuerdo a los procedimientos para aplicar las categorías de la IUCN, los especialistas son quienes evalúan el taxón, ellos analizan si los datos disponibles son correctos, o por sí lo contrario son insuficientes (DD). Si son correctos, se continúa investigando si esta extinto (EX) o extinto en estado silvestre (EW). Si no lo está, se continúa considerando la posibilidad de que sea un taxón Amenazado (VU, EN, o CR) y para ello hay que confrontar el taxón contra los criterios de los taxones amenazados, siendo estos de A a E:

A. Rápida reducción en tamaño poblacional.
B. Distribución geográfica en la forma de extinción de presencia o área de ocupación.
C. Población pequeña y en disminución, en menos de 250 individuos maduros.
D. Población muy pequeña estimándose que el tamaño de la población es menor de 50 individuos maduros.

E. El análisis cuantitativo muestra que la probabilidad de extinción en estado de vida silvestre es de, al menos, un 50 % dentro de 10 años o tres generaciones, dependiendo de cuál sea el período más largo (hasta un máximo de 100 años).

3.3.2 Estado de amenaza según CITES.

La especie se encuentra en el apéndice 1 según la Convención Sobre El Comercio Internacional De Especies Amenazadas De Fauna Y Flora Silvestres (CITES), siendo "apéndice I" la que incluirá todas las especies en peligro de extinción que son o pueden ser afectadas por el comercio. El comercio en especímenes de estas especies deberá estar sujeto a una reglamentación particularmente estricta a fin de no poner en peligro aún mayor su supervivencia y se autorizará solamente bajo circunstancias excepcionales (CITES, 2013).

3.4 Factores de amenaza.

La destrucción del hábitat original ha sido a gran escala desde hace varias décadas y en la actualidad los pocos relictos de bosques originales siguen siendo acosados por presiones de origen antrópico. No obstante, los procesos de desarrollo de bosques de tipo secundario y el crecimiento de rastrojos en numerosas regiones en especial aquellas con dificultades de orden público, han generado un nuevo espacio que permiten el mantenimiento saludable de poblaciones debido a la plasticidad de la especie para ocupar estos espacios y especialmente por la gran oferta alimenticia de estas áreas que ofrecen (Defler, 2010; Rodríguez, 2006).

3.5 Medidas de conservación.

El *Saguinus oedipus* ha sido una especie la cual ha tenido prioridad de conservación en Colombia. Por ello es importante continuar con las acciones de conservación en curso y reforzar la protección de las áreas naturales protegidas dedicadas a esta especie; entre estas acciones está el Santuario de Fauna y Flora Los Colorados donde se han mantenido poblaciones de esta especie, al igual que otras reservas privadas y bosques que se encuentran en buenas condiciones los cuales requieren ser conservados (Defler, 2010). El esfuerzo de las funciones legales locales para eliminar el tráfico, en planeamiento dirigido de evaluaciones de campo en áreas con potencial para programas de reintroducción, educación y recuperación de bosques, surgen como las acciones a corto y a largo plazo. Adicionalmente, se debe realizar un inventario de sitios claves que deben ser conservados para vincularse a un programa de protección, y por último unir esfuerzos para desarrollar planes ecoturísticos que generen ingresos monetarios a partir de la observación de la vida silvestre (Defler, 2010; Rodríguez, 2006). Actualmente la especie está protegida en los Parques Nacionales Naturales: Paramillo, Las Orquídeas, parte sur de los Katíos, el Santuario de Fauna y Flora los Colorados, la Reserva Forestal Cerro de Coraza-Montes de María, y Parque Nacional Natural

Tayrona. Cabe resaltar que la especie ha sido protegida legalmente en Colombia desde 1969 siendo objeto de labor de investigación y educación por parte del Proyecto Tití en la región de Colosó (Sucre) y de Santa Catalina (Bolívar). Igualmente, zoológicos como el de Barranquilla y el Parque Recreativo y Zoológico Piscilago, han adelantado actividades educativas con el desarrollo de herramientas educativas de creatividad orientadas a escolares urbanos (Defler, 2010 y Rodríguez, 2006).

3.6 Distribución geográfica.

El *Saguinus oedipus* se distribuye geográficamente en bosques secundarios húmedos y secos, y enredaderas bajas, desde el nivel del mar hasta los 1500 m, en los bosques de la región noroeste de Colombia, entre el Río Atrato y los Ríos Cauca y Magdalena, y en el noreste del Choco y al este del Río Atrato (EAZA, 2010; Defler, 2010).

El *Saguinus oedipus* es endémico de Colombia, se encuentra desde la región de Urabá en la margen del rio Atrato, pantanos aledaños a la ciénaga de Tumaradó, dentro del Parque Nacional Natural Los Katíos en el noroeste del departamento de Antioquia y parte del noroeste del departamento del Chocó, hasta la cuenca del Rio sucio, siguiendo luego al noroeste a través de los departamentos de Córdoba, Sucre, Atlántico y norte de Bolívar hasta la margen izquierda del río Cauca y parte baja del Magdalena. Está ausente en la isla de Mampós ya que es ocupada por el titi gris (*Saguinus leucopus*). Ha sido introducida en el Parque Nacional Tayrona y a otras pequeñas reservas naturales de carácter regional (Defler, 2010 y Rodríguez, 2006).

3.7 Hábitat.

Ha sido registrado hasta una altura de alrededor de 500 m, pero puede encontrarse a alturas superiores en la cuenca del río Sinú, dentro del Parque Nacional Natural Paramillo. Frecuencia las selvas pluviales, inundables, bosques secos caducifolios y rastrojos de diferente crecimiento secundario (Defler, 2010; Rodríguez, 2006).

3.8 Morfología.

Son primates pequeños que pesan alrededor de 411- 500 g y tienen una longitud cabeza-cuerpo de 350 a 380 mm. La cola es larga, peluda y no prensil, tiene una cresta larga, en forma de abanico, de coloración blanca sobre la cabeza que es de coloración gris. Su espalda es marrón y la mitad de su cola es roja. La zona ventral, las patas anteriores y posteriores son blancas. Las manos y los pies tienen garras en lugar de uñas, y su fórmula dental es 1,2/2, C 1/1,1, P 3/3, M 2/12= 32 (Defler, 2010).

3.9 Comportamiento.

El tamaño del grupo es de aproximadamente 12 individuos variando entre 3 y 13. El *Saguinus oedipus* se para sobre dos patas para realizar despliegues de agresividad y dominancia. Las hembras marcan más habitualmente con su olor que los mismos machos. El repertorio vocal es altamente complicado, los cuales contienen chillidos de sumisión, gritos de alarma y silbidos de alta frecuencia cuando observan predadores aéreos. Las crías realizan vocalizaciones cuando juegan, también manipulan las enredaderas altas y las bifurcaciones de árboles altos como lugares para dormir (EAZA, 2010).

3.10 Reproducción.

Existen evidencias de que el *Saguinus oedipus* puede practicar poliandra facultativa, como lo hacen los Saguinus *fuscicollis* y otros miembros del género puesto que más de un macho adulto ha sido encontrado en los grupos familiares pequeños. Savage (1990), observó que la mayoría de los grupos estaban conformados por parejas monógamas. En un estudio realizado por French et. al., (1984), observaron que las hembras que viven en un grupo familiar llegan a no ciclar hasta los 40 meses. El ciclo estral tiene una duración de alrededor de 15,5 días y el periodo de gestación es de 125 a 140 días, el ciclo estral postparto ocurre diez días después del nacimiento. En un estudio realizado por Preslock et. al., (1973) reportaron una época de nacimientos entre los meses de marzo a mayo, al inicio de la época de lluvias, la cual se repite seis meses más tarde durante los meses de septiembre a noviembre: en otro estudio realizado por Savage (1990), se pudo observar que los nacimientos, eran sin estacionalidad ya que ocurrían durante todos los meses del año.

3.10.1 Jerarquías.

En el hábitat libre se han observado en grupos de 2 a7 animales llegando en algunos casos a 13 individuos, los cuales mantienen territorios fijos, que defienden por medio de despliegues vocales y físicos. Existe jerarquización tanto en machos como en hembras. Es una especie con marcada territorialidad, la cual sostiene con enfrentamientos agonísticos violentes que pueden terminar la vida de los invasores. Por otro lado, se han observado machos subadultos emigrando entre grupos. French y Snowdon (1981), observaron que cuando eran introducidos individuos tanto macho como hembras, que no pertenecían a su grupo, las hembras de la pareja principal reaccionaban marcando un substrato con las glándulas supra púbicas e igualmente amenazaban desde cierta distancia a los individuos que no eran de sus grupo, por otro lado los machos también se han mostraban agresivos frente a los machos otros machos que no pertenecen a su grupo donde exhibieron respuestas agresivas cuando los otros individuos eran hembras, pero no realizaron ningún tipo de marcación (Defler,2010).

3.10.2 Cuidado parental.

Savage (1990) observó cuatro parejas de gemelos nacidos en vida silvestre. Durante el primer mes de vida, los animales presentaban sobre su cuerpo un pelaje infantil, a excepción de su abdomen el cual era lampiño. Cleveland y Snowdon (1984) encontraron que desde la primera semana de vida, el macho adulto y los hermanos cargaban durante más tiempo al infante que la madre. Después del nacimiento, Savage (1990) observó que tanto los padres como otras hembras, incluso crías mayores-juveniles, cuidaban a los infantes; en ningún caso evidenciaron una diferencia entre sexos de quienes los cargaban. Entre la semana 4 a 5, el infante se desplazó junto a quien lo cargaba, y durante la novena semana el infante se desplazó de manera independiente el 50% del tiempo; hacia la semana 14, era independiente y no necesitó ser cargado. Savage (1990) observó que después del nacimiento ambos padres, otras hembras y las crías más viejas cuidaban a los bebés; asimismo, los juveniles al final de las tres primeras semanas, lo hacían con los nuevos infantes maduros.

Se ha reportado que el nacimiento de gemelos es más frecuente que el de un solo individuo. El rechazo y la sobrevivencia de los jóvenes en las colonias mantenidas en cautiverio están determinadas por estabilidad familiar, la experiencia de los padres y la presencia y ayuda de los hermanos mayores (Defler, 2010). La cantidad de tiempo que el padre invierte en el cuidado del infante es inversamente proporcional al invertido por los individuos que lo ayudan, mientras que el tiempo que la madre invierte en estos menesteres es independiente de la cantidad de ayuda recibida de otros individuos del grupo. Los padres exhiben un mayor sentido de responsabilidad hacia los jóvenes que las madres (EAZA, 2010; Tardif et. al., 1993).

3.11 Descripción anatómica del aparato reproductor

3.11.1 Aparato Reproductor del Macho.

El sistema reproductivo masculino del *Saguinus oedipus* incluye los testículos donde se forman las células germinales masculinas y las hormonas sexuales (testosterona), el epidídimo como sitio de la maduración, almacenamiento y transporte de los espermatozoides, las glándulas sexuales accesorias y el órgano copulador (pene) (Harrison y Lewis, 1986).

3.11.1.1 Testículos.

Los testículos son dos. En este órgano se forman las células germinales haploides durante el proceso de la espermatogénesis y producción de la hormona sexual masculina testosterona. Estos dos procesos se llevan a cabo en dos compartimentos separados de los testículos. La testosterona es sintetizada por las células de Leydig localizadas en el intersticio. En los túbulos seminíferos se lleva a cabo la espermatogénesis (Weinbauer y Nieschlag, 1999).

3.11.1.2 Epidídimo.

El epidídimo es un conducto que conecta vasos eferentes (estructurales tubulares en testículo) con el conducto deferente. Este se divide en la cabeza del epidídimo, cuerpo epidídimo y cola del epidídimo.

El epidídimo se encuentra en los testículos en la dirección longitudinal y conecta el conducto deferente al reverso del testículo (Harrison y Lewis, 1986). En el epidídimo, los espermatozoides inmaduros experimentan cambios estructurales, bioquímicos y funcionales (Kumar y Phillips, 1991). Sólo los espermatozoides que están llegando a la cola del epidídimo y se almacenan allí, tienen la capacidad de fertilizar el óvulo femenino (Yeung et. al., 1996; Cooper y Yeung, 1999).

3.11.1.3 Conducto Deferente.

El conducto deferente es la continuación del conducto del epidídimo y se conecta con la pieza de Beck de la uretra. Para la sección de la pelvis, la uretra está rodeada por las glándulas sexuales accesorias, la glándula vesícular, la próstata (glándula prostática) y las glándulas bulbouretrales (Harrison y Lewis, 1986)

La glándula vesicular en los primates ofrece la mayor parte del plasma seminal. Una parte inferior está provista de la próstata. La proporción de la glándula bulbouretral en el plasma seminal es pequeño (Harrison y Lewis, 1986).

3.11.1.4 Órgano copulador.

El pene de los titíes es cilíndrico, el eje del pene está conformado por espinas queratinizadas las cuales desgarran levemente la paredes internas de la vagina; estos desgarros tienen la función de estimular la ovulación y también de retirar el semen de otros machos que realizaron cópula antes. El glande es pequeño y asimétrico. La abertura de la uretra divide el glande del pene por la mitad. En la mitad izquierda del glande, el pene es más sobresaliente. La mitad izquierda es por lo tanto mayor que la derecha (Hershkovitz, 1977; Harrison y Lewis, 1986; Schneiders, 2004).

El escroto en los titíes es situado de forma parapeneal. El prepucio y el escroto forman un bolsillo en el cual se encuentra el pene (Harrison y Lewis, 1986). La piel del escroto está llena de protuberancias y grandes glándulas sebáceas y glándulas apocrinas complejas que producen unas secreciones de olor (Hershkovitz, 1977; Harrison y Lewis., 1986).

3.12 Obtención de semen en primates.

La obtención de semen en primates se ha realizado sin anestesia y con anestesia. Los métodos que se han realizado ha sido la electroeyaculación por sonda bipolar rectal (Gould et. al., 1978; Wildt., 1986; Schaffer et. al., 1989; Schaffer et. al., 1991). Se ha realizado bajo anestesia general, con uso de electrodos, las sondas se insertan en el recto del animal. La estimulación eléctrica posterior se lleva a cabo por regla general en el ciclo rítmico.

Referente a métodos con eyaculación natural por vagina artificial y por masturbación. La aplicación de ambos métodos sólo es posible en grandes primates: siendo implementada la técnica de vagina artificial en chimpancés por Young et. al., (1995); Fussell et al., (1973) en orangutanes por Vandevoort et. al., (1993), gorilas por Brown y Loskutoff, (1998); y masturbación en chimpancés por Gould y Martin, (1986); Marson et.al., (1988).

Otros métodos de obtención de semen han sido mediante lavado vaginal inmediatamente después de la cópula (Kendrick y Dixson, 1984; .Kuederling et. al., 1996; Morrell et. al., 1996). Sin embargo, la aplicación de esta técnica requiere de tiempo y mano de obra intensiva. Además, el semen obtenido de este modo, se contamina con células y secreciones de los genitales femeninos y una parte impredecible de la eyaculación se pierde (Kuederling et. al., 1996; Morrell et. al., 1996).

La técnica más implementada para la extracción de semen en primates ha sido la electroeyaculación por sonda bipolar rectal bajo anestesia general. Otras técnicas reportadas son, estimulación directa del pene, vagina artificial, lavado vaginal post eyaculación, masturbación, automasturbación y punción epididimal (Campos y Quintero 1987; Cui et al. 1991; Delgado et al. 2007; Guimaraés 1994; Kuederling et al. 1996; Kuederling et al. 2000; Laverde y Medina 2001; Marson et al. 1991; Morrel et al. 1996, Morrel y Hodges 1998; Sonksen et al. 1994; Valle et al. 2007; Yeoman et al. 1998).

Existe una nueva técnica no invasiva que es la técnica de la Estimulación Vibratoria del Pene (EVP); esta técnica es originaria de Dinamarca la cual fue empleada a hombres con lesiones espinales (Poches, 2010). Esta técnica de extracción seminal ha sido usada en *Callithrix jacchus* por Kuederling et. al., (2000); Schneiders et. al., (2004); Valle, (2007) en *Saimiri sciureus*, por Laverde y Medina, (2001), en *Saimiri boliviensis* por Yeoman et. al., (1998) y en *Saguinus leucopus* por Poches et. al., (2013).

En Colombia se han realizado tres investigaciones en extracción y evaluación de características seminales, la primera en *Aotus griseimembra* por Campos y Quintero, (1987) mediante EE, la segunda en *Saimiri sciureus* por Laverde y Medina, (2001) por medio EVP donde obtuvieron un volumen de 106±80 µL, concentración espermática de 362±344 x106 spz/mL, motilidad de 70±22%, una viabilidad de 74±17% y una morfología normal de 76±19%; y la tercera en *Saguinus leucopus* por Poches et. al., (2013) por la técnica EVP, donde obtuvieron un volumen 24±18,82%,

concentración espermática de 87.617±21.327 x104 spz/µL, motilidad progresiva de 97,1 ±4,54%, viabilidad de 93,7 ±4,9%, y morfología normal de 69,3 ±11,6%.
La acción fisiológica por la cual la EVP produce la eyaculación se origina en un mecanismo reflexogénico exteroceptivo proveniente de estímulos aferentes del pene que entran a la médula espinal por la rama sensorial del nervio pudendo 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 pudendo. 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; Poches, 2010; Poches et.al., 2013).

3.13 Evaluación seminal.

Posterior a la colecta del semen éste es sometido a evaluaciones macroscópicas y microscópicas.

3.13.2.1 Evaluación de características macroscópicas.

3.13.2.1.1 Color. El color de un semen normal debe ser homogéneo, blanco opalescente. En ocasiones se obtiene un aspecto traslúcido que puede ser causado por baja concentración de espermatozoides. Si el aspecto del semen es marrón-pardo indica que unas horas o días antes ocurrió un sangrado en tracto genital. Si se llega a observar una coloración rojiza esto indicará la presencia de hematíes frescos, procedentes de un sangrado en el momento de la colecta. Cuando se observa un color amarillento es indicativo de ictericia, o presencia de ciertas vitaminas. También es posible que se deba a presencia de altos niveles de flavo proteínas oxidadas, procedentes de vesículas seminales (OMS, 1999).

3.13.2.1.2 Volumen. Para la medida del volumen el manual de la OMS (1999) describe dos métodos. Siendo el primero, mediante pesado, donde se debe asumir la siguiente aproximación: que la densidad de la muestra de semen es 1. Por tanto, la masa es igual al volumen, es decir un gramo de semen corresponde a un ml. La segunda es mediante la medida directa del volumen, la cual se recoge el semen en un recipiente graduado.

Un volumen bajo es indicativo de obstrucciones de vías seminales o ausencia de conductos deferentes y un volumen alto puede ser producido por el aumento de volumen de secreción de algunas glándulas, en caso de inflamación (López et. al., 2012).

3.13.2.1.3 Viscosidad. Existen dos métodos que se pueden utilizar para determinar la viscosidad del material seminal. Un método puede ser estimando, aspirando la muestra en una pipeta de 5 mL y permitiendo la libre caída de las gotas, en las que se observa la longitud del filamento formado. El otro método consiste en introducir una varilla de vidrio en la muestra y medir el filamento que se forma (OMS, 1999).

3.13.2.1.4 pH. Este parámetro refleja el balance entre las diferentes secreciones, principalmente entre el pH alcalino de vesículas seminales y el ácido de la próstata. El pH debe ser medido dentro de una hora de la eyaculación. Se distribuye una gota se semen sobre el papel de pH (rango pH: 6,1 a 10,0 ó 6,4 a 8,0), al cabo de 30 segundos el color de la zona impregnada debe ser uniforme y se compara con la cartilla de calibración para determinar el pH de la muestra. Cuando el pH es menor de 7,0 en una muestra con azoospermia se debe sospechar obstrucci6n de las vías eyaculatorias o ausencia bilateral congénita de los vasos deferentes (OMS, 1999).

3.13.2.2 Características microscópicas.

Para este tipo de evaluaciones es indispensable un microscopio, que cuente con la platina termostatizada a 37ºC.

3.13.2.2.1 Concentración espermática. La concentración espermática puede determinarse aplicando el método del hemocitómetro donde se evalúa el número de células espermáticas por unidad de volumen. En este método se diluye la muestra de semen en el cual se utiliza una pipeta para dilución en sangre y luego se hace un recuento individual de los espermatozoides en la cámara de Neubaüer (OMS, 1999).

Las pipetas para glóbulos blancos y las micropipetas que funcionan por desplazamiento de aire no son suficientemente precisas para hacer una dilución volumétrica de un material tan viscoso como el semen. Se deben utilizar las micropipetas del tipo de desplazamiento positivo (OMS, 1999).

3.13.2.2.2 Motilidad. La motilidad espermática puede tener inconvenientes al analizarla puesto que la motilidad puede disminuir con el tiempo, por lo tanto, la misma debe ser evaluada en primer lugar y de modo casi simultaneo. La motilidad espermática se evalúa generalmente sobre la cámara de Neubaüer con el fin de determinar el porcentaje total de las células móviles, ya sea en escalas de movimientos rápidos progresivos, rápidos en varias direcciones, rápidos en una sola dirección, lentos en una dirección, no progresivos o sin movimientos (0MS, 1999; Laverde y Medina, 2001).

3.13.2.2.3 Morfología. La clasificación de normalidad de la OMS se basa en considerar un espermatozoide normal al integrante de una subpoblación de espermatozoides potencialmente fertilizadores seleccionados naturalmente en el moco cervical (OMS, 1999).

3.13.2.2.4 Viabilidad. La vitalidad espermática se refleja en la proporción de los espermatozoides que están vivos de acuerdo al criterio de exclusión de algún colorante vital o mediante la expresión de su capacidad osmo-reguladora cuando se los expone a condiciones hipoosmóticas. Esto debe ser determinado si el porcentaje de espermatozoides inmóviles supera el 50%. La proporción de espermatozoides vivos puede ser determinada utilizando técnicas de tinción basadas en el principio de que las células muertas, cuyas membranas plasmáticas están dañadas y permiten la entrada de ciertos colorantes (OMS, 1999).

Las evaluaciones de la vitalidad espermática sirven para verificar la exactitud de la evaluación de motilidad, ya que el porcentaje de células muertas no debe ser mayor (dentro de los errores de contaje) que el de espermatozoides inmóviles. Además, la presencia de gran proporción de células vivas, pero inmóviles puede significar que existen defectos estructurales en el flagelo. (OMS, 1999).

3.13.3 Mediciones testiculares.

Las mediciones testiculares han sido muy utilizadas en el ganado, pero poco se ha realizado en primates neotropicales. En un estudio realizado por Oliveira et. al., (2011) realizaron mediciones testiculares en donde obtuvieron: anchura testicular 1,6± 0,1 cm, altura 1,5 ± 0,1 cm, longitud 2,5 ± 0,1 cm, circunferencia 6, 0± 0,3 cm y el volumen promedio de 2,0 ± 0,2cm^3.

Existen diferentes métodos para la evaluación de medidas testiculares; entre ellos está la medida de la máxima longitud escrotal sin incluir el epidídimo, utilizando un pie de rey (Carew y Egbunike 1980) y el diámetro testicular colocando el pie de rey en la zona de mayor anchura del testículo, en el plano anteroposterior (Knight, 1977).

La evolución del tamaño testicular en rumiantes está asociada con el desarrollo corporal es decir por la edad y por el peso vivo que tiene el animal, pero en cabras desarrollo testicular está más correlacionado por el peso que por la edad (Pérez, 1992). El tamaño testicular puede estar también asociado con las estaciones del año, ya que en algunas razas de ovinos y caprinos han visto que en algunas épocas o estaciones del año, el tamaño testicular cambia, y esto está influenciado por el fotoperiodo (Pérez, 1992). Otro factor que puede influir en el tamaño testicular de ovinos y caprinos es la tasa de ovulación de las hembras de la misma línea genética (Pérez, 1992)

3.13.4 Diluyentes.

Según Maqueda (2006) se considera diluyente a la solución acuosa cuyo objetivo es aumentar el volumen de un eyaculado obteniendo varias dosis en las que conserven las características funcionales de las células, así como el nivel de fertilidad adecuado.

3.13.4.1 Características y requisitos que debe tener un diluyente.

Los requisitos que debe cumplir un diluyente son: abastecer nutrientes como fuente de energía a los espermatozoides, proteger a los espermatozoides del shock térmico, proporcionar un amortiguador para prevenir los cambios nocivos en el pH cuando se forma ácido láctico, mantener la presión osmótica ideal y el correcto equilibrio electrolítico, inhibir el crecimiento bacteriano y los que sean para inseminación artificial deben ser fáciles de elaborar y económicos proporcionar la capacidad tampón contra productos metabólicos (Pérez y Pérez, 1990).

3.13.4.2 Componentes principales de un diluyente y su función.

- **Fuente de energía:** los nutrientes que pueden ser usados en un diluyente son principalmente la glucosa, fructosa, sucrosa, galactosa, ribosa y trealosa (Maqueda, 2006).
- **Búferes:** cuando se reduce el pH después de ser eyaculado, se reduce el metabolismo energético y la motilidad. El espermatozoide desarrolla el metabolismo glicolítico, hace que el pH intracelular se disminuya y de igual manera se reduce el metabolismo celular. Las sustancias buffer son necesarias en la preservación del semen controlando el pH, el ácido láctico es el principal metabolito de este proceso (Maqueda, 2006). Hay sustancias buffer como el bicarbonato de sodio, el citrato (sódico) TES Y TRIS.
- **Estabilizadores de membrana:** Las principales sustancias usadas son hidroxitolueno (BTH), seroalbúmina bovina (BSA), etilén disódico diamino tetraacetato (EDTA), polivinil pirrolidona (PVP-40).Estos se agregan en el diluyente con el fin de prevenir, retardar alteraciones no deseadas en la estructura y la función de las membranas de las células espermáticas (Maqueda, 2006).

3.13.4.3 Tasa de dilución.

Al agregar un diluyente en reemplazo del plasma seminal se hace necesario para continuar la integridad de los espermatozoides, también es útil para evitar la baja motilidad, acrosomas dañados formas anormales, espermatozoides aglutinados y contaminaciones, de esta manera se mantienen los parámetros de fertilidad (Rillo, 1994). Si se hace una dilución excesiva percute en una motilidad disminuida y de la capacidad del espermatozoide en su función fecundante, de esta manera debe ser una dilución correcta para la eficiencia del diluyente (Sauveur 1992).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación y características agroclimatológicas.

El presente trabajo se llevó a cabo en tres localidades del territorio nacional indicadas en la tabla 1, siendo éstas, el Parque y Zoológico de Piscilago ubicado en el municipio de Nilo, Cundinamarca, el Zoológico de Cafam ubicado en el centro recreacional Cafam en el municipio de Melgar, Tolima y La Fundación Zoológico Santacruz localizado en San Antonio de Tequendama, Cundinamarca.

Tabla 1.Características agroclimatológicas de los sitios de muestreo.

Sitio	Coordenadas geográficas	m.s.n.m	Temperatura promedio	% Humedad relativa
Z. Piscilago	4º13`09” N y 74º41`10” W	289	28° C	50%
Z. Cafam	4°12'14"N 74°38'34"O	323	28° C	60%
F.Z. Santacruz.	4°37’ N 74° 21'	1860	22° C	79,83%

4.2 Características de los animales.

El presente estudio se llevó a cabo con cinco machos adultos de la especie *Saguinus oedipus*, con peso aproximado de 531 gramos provenientes del Parque recreativo y Zoológico Piscilago (n:2), del Zoológico de Cafam (n:2) y de La Fundación Zoológico Santacruz (n:1), que estaban en grupos sociales de más de dos individuos, estos individuos no estaban entrenados ni acostumbrados a procedimientos de muestras biológicas. En la tabla 2 se indica algunas de las características de los individuos.

Cada uno de los ejemplares fue sometido a un protocolo de eyaculación. El líquido seminal obtenido fue almacenado en un tubo Eppendorf® previamente preparado, con un diluyente, para algunos de los individuos, con el objetivo de evaluar la calidad espermática así como el efecto del diluyente sobre la motilidad espermática.

Tabla 2. Especímenes disponibles y características.

Individuo	Sitio	ID	Edad	Peso (g)	Tipo de Alojamiento	Tipo Exhibición
1	Z. Piscilago	977170000040803	6 años	551	2 Machos y 1 hembra	IS PR
2	Z. Piscilago	977170000061106	2 años	570	2 Machos 1 y hembra	IS PR
3	Z. Cafam	977200005515198	5 años	500	1 macho	JA PG
4	Z. Cafam	977200005461116	5 años	600	1 macho	JA PG
5	Z. Santacruz	977170000056713	9 años	435	1 hembra y 3 crías	JA PG
Promedio ± DE			-	531± 64,92	-	-

Z: Zoológico; IS: Isla; JA: Jaula; PR: Público restringido; PG: Público general;

4.3 Parámetros de evaluación

4.3.1 Protocolo de Adaptación de Colecta de Semen en Condiciones de Cautiverio.

Inicialmente, se realizó captura a cada uno de los ejemplares donde fueron conducidos por túneles de manejo con el fin de ser inmovilizados y transportados en bolsas de tela, hasta las instalaciones de la clínica veterinaria. Los individuos fueron manipulados con guantes de carnaza donde se hizo sujeción de la cabeza y los dos miembros anteriores; posteriormente fueron sedados con un rango de dosis de 5 a 10 mg/kg de peso vivo de clorhidrato de ketamina para minimizar el estrés de la manipulación (Varela., 2005). Este procedimiento lo realizó el veterinario a cargo del zoológico. Una vez confirmada la sedación de los individuos, se realizó examen clínico general, donde se tomaron datos de peso e identificación del chip de cada ejemplar. Después se procedió a realizar un lavado y limpieza prepucial con 10 mL de solución salina fisiológica al 0,9%; luego, con ayuda de una gasa, se removieron partículas de polvo y orina de la zona. Finalmente, se posicionó cada primate sentado para facilitar la manipulación con el EVP.

Para la elaboración de un protocolo de adaptación a la colecta de semen, se tuvo en cuenta la dosis utilizada en la sedación del animal y la posición adecuada de cada ejemplar para la estimulación a una eyaculación.

4.3.2 Protocolos de eyaculación con la técnica de estimulación vibratoria del pene.

Posterior a la captura, se procedió a colecta seminal por medio de la técnica de EVP empleando un Vibrador FertiCare® Personal (Multicept- Rigshospitalet, Copenhage, Dinamarca) adaptado por Poches et. al*.,* (2013). En la figura 1 se muestra el procedimiento de obtención de semen mediante la EVP. Se empleó el protocolo de colecta denominado “Yeoman”, el cual tuvo una combinación de frecuencia de 75 a 90 Hz y una amplitud de 1,0 a 2,5 mm para la obtención del semen (Tabla 3). El protocolo de eyaculado consiste de cuatro estímulos con frecuencias de 75 a 90 Hz y amplitudes de

1,0 a 2,5 mm, con intervalos de descanso de 2 a 3 minutos. En la tabla 3 se describe el protocolo de la colecta adaptado de Yeoman et. al., (1998). En principio el protocolo de eyaculación a utilizar esta indicado en la tabla 3.

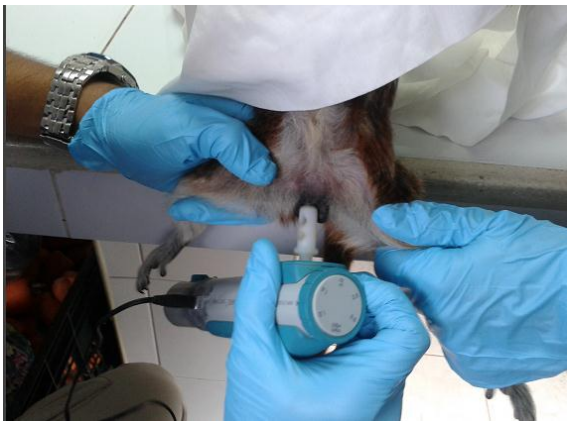

Figura 1. Procedimiento de obtención de semen mediante la EVP.

En cada procedimiento por ejemplar se colectó la muestra seminal en un tubo Eppendorf de 200 µL adaptado como vagina artificial según lo sugerido por Yeoman et. al., (1998); Kuederling et. al., (2000); Schneiders et.al., (2004) Valle (2007) y Poches et. al., (2013).

Tabla 3. Protocolo de eyaculación Yeoman para la obtención de semen.

Estímulo	**Duración (segundos)**	**Frecuencia (Hz)**	**Amplitud (mm)**
Primera estimulación	60	75	1,0
Continuo	60	75	1,5
Descanso	2 a 3 minutos		
Segunda estimulación	60	75	1,0
Continuo	60	75	1,5
Descanso	2 a 3 minutos		
Tercer estimulo	60	75	1,0
Continuo	60	75	1,5
Continuo	60	80	1,5
Descanso	2 a 3 minutos		
Cuarto estimulo	30	75	1,0
Continuo	30	75	1,5
Continuo	30	80	1,5
Continuo	30	85	2,0
Continuo	30	90	2,5
Continuo	30	90	2,5

(Adaptado de Yeoman et. al., 1998)

4.3.4 Utilización de diluyentes sobre el líquido seminal.

El semen colectado se diluyó en un medio para identificar los efectos y la viabilidad del diluyente utilizado. El líquido seminal se mezcló con diluyente TALP-HEPES, Zorlesco y Androhep en un tubo Eppendorf de 200 µL en una relación de 1:5 (semen: diluyente), y posteriormente se analizó inmediatamente. Los diluyentes utilizados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Fórmulas de los diluyentes utilizados.

Componente	TALP-HEPES (g/500mL)	Zorlesco (g/L)	Androhep (g/L)
NaCl	3,710	0	0
KCl	0,118	0	0
$NaHCO_3$	0,084	0	0
NaH_2PO_4 X H_2O	0,021	0	0
Lactato de Na (60%)	930 µL	0	0
$MgCl_2$ X $6H_2O$	0,050	0	0
Glucosa	0,4505	11,5	26
Hepes (Na-Sal)	0,651	0	0.
Hepes(Acido)	0,596	0	0
Fenolrot	0,0050	0	0
H_20 biodestilada	500 mL	0	0
Ácido cítrico (monohidrato) (g)	0	4.1	0
Citrato Sodico ($2H_20$)	0	11.7	8.0
EDTA	0	2.3	2.4
Bicarbonato sódico	0	1.25	1.2
HEPES	0	0	9.0
BSA	0	5.0	2.5
TRIS	0	6.5	0
Cisteina	0	0.1	0
mOsm	0	240	309
pH	7,38	0	6.8

(Tomado de Valle (2007); Poches et. al., (2013); Maqueda (2006).

4.4 Evaluación del líquido seminal

4.4.1 Características Macroscópicas

La evaluación macroscópica del semen se llevó a cabo inmediatamente después de extraer la muestra. Para analizar el **color** del semen se observó sobre fondo oscuro, se tuvo en cuenta patrones de color para inferir si la muestra estaba en condiciones normales o no. Se consideró escalas de color de: blanco opalescente o lechoso, traslucido, amarillento, marrón-pardo y rojiza (OMS, 1999; Poches et. al., 2013).

Para determinar el **volumen** seminal este se medió con una micropipeta, expresando su valor en µL. Este procedimiento se realizó antes de diluir el semen y colocarlo en los respectivos tubos Eppendorf®.

Para evaluar la **viscosidad** se introdujo una micropipeta para determinar la formación o no de filamento y así clasificar como semen muy viscoso, cuando este 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; Poches et. al., 2013).

4.4.2 Características microscópicas

La **motilidad masal** se evaluó sobre una lámina a temperatura ambiente. Se colocó una pequeña gota de semen fresco con un capilar 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), Yeoman et. al., (1998) y Poches et. al., (2013) de la siguiente manera:

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.

La **motilidad individual** Progresiva (MIP) se valoró empleando la misma muestra de la motilidad masal solo que después de su valoración se colocó una laminilla y se observó bajo objetivo de 40x de aumento; se clasificó la muestra seminal como:
Semen muy bueno--------Igual o mayor a 70 %
Semen bueno----------De 50 a 69%
Semen regular----------De 30 a 49%
Semen malo----------menor al 29% (Jiménez, 2002)

La **concentración espermática** por mL de semen, se determinó mediante cámara de Neubaüer, utilizando un microscopio de luz, con objetivo de 40x. Para este proceso se tomaron 5 µL de semen en 25 µL de diluyente para una relación de 1:5, luego se tomaron 5 µL de la muestra (semen: diluyente) en 50 µL agua destilada para una relación de 1:10 y después se dividió el número de espermatozoides del recuento de los recuadros en cuatro y posteriormente, este resultado se

multiplicó por 10 para establecer una concentración en millones de espermatozoides por mL 1:200 (Romero et. al., 2010).

Para estimar la **viabilidad espermática** se empleó un portaobjetos con laminillas en las que se diluyó una gota de la muestra seminal (semen o semen: diluyente) con una gota de eosina-nigrosina y con un capilar se homogenizó suavemente realizando un extendido. Con un microscopio óptico de luz en objetivo de 40x de aumento, se evaluaron 100 células espermáticas, calculando el porcentaje de células muertas en cada muestra seminal (OMS, 1999).

Para el análisis de **morfología espermática**, se realizó una tinción con Eosina-Nigrosina en donde se tomó una gota de la muestra seminal (semen o semen: diluyente) y se mezcló suavemente en una lámina con una gota de eosina-nigrosina para posteriormente realizar un extendido. La muestra se observó en un microscopio de luz con objetivo de 100x con aceite de inmersión, y se determinó el porcentaje de espermatozoides normales y se identificaron las anormalidades morfológicas, clasificándolas en primarias y secundarias teniendo en cuenta la cabeza, pieza intermedia y cola del espermatozoide (Laverde y Medina2001; Toro 2009; Valle 2007).

4.5 Parámetros de medidas testiculares (MT).

Se realizó las medidas testiculares (MT) las cuales se ejecutaron con ayuda de un pie de rey, tomando medidas de longitud de cada testículo; de igual manera se midió el diámetro testicular en la zona de mayor anchura de cada testículo y también se midió el ancho escrotal total, midiendo la longitud ocupada por los dos testículos (Knight, 1977). En la figura 2 se observa las medidas testiculares tomadas a un macho, a través de un pie de rey.

Figura 2. Mediciones testiculares (ancho total) a un macho *S. oedipus*¸ a través de un pie de rey.

4.6 Morfometría Espermática.

El análisis de morfometría espermática se realizó en el Laboratorio Clínico de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá. Se utilizó un microscopio Nikon Eclipse E600 con cámara Nikon® DS-Fi1 (1,3[12] megapíxeles).

Para este análisis se implementaron dos métodos de tinción Wright y Giemsa a diferentes tiempos de coloración. Para el método Wright se usaron tres tiempos diferentes; en el tiempo uno (1) se dejó el colorante por 1:30 minutos posteriormente se realizó una mezcla de 2 minutos de colorante y agua destilada y finalmente se lavó la lámina (1:30 -2 min); en el tiempo dos (2) se dejó el colorante por dos minutos y posterior a ello a los 3 minutos se colocó la mezcla de colorante y agua destilada y finalmente se lavó la lámina (2- 3 min); el tercer tiempo (3) fue de 2:30 minutos en colorante y tres minutos en mezcla de colorante y agua destilada, para su posterior lavado (2:30- 3 min). Para el método Giemsa se fijó el colorante durante 15 minutos y después se lavó la lámina.

Se realizaron mediciones al azar a un objetivo de 100X, a través del software del equipo, donde se midió; el área (μm^2), longitud (µm) y ancho (µm) de la cabeza, longitud (µm) de pieza media, longitud (µm) de la cola y longitud (µm) total según mediciones propuestas por Poches et. al., (2013).

4.7 Análisis estadístico.

Se realizó una estadística descriptiva para presentar los resultados obtenidos, determinando la media, desviación estándar (DE), máximos y mínimos.

5. RESULTADOS

5.1 Protocolos de adaptación de colecta.

Se intentó colecta de semen por el método de EVP en 5 individuos de los cuales se logró obtener semen en tres de ellos.

El macho N^{O} 1, era un individuo dominante con actividad sexual, el cual habitaba en una isla artificial acompañado de un macho adulto un macho juvenil y una hembra. Este macho tenía seis años de edad y era proveniente del Parque recreativo y Zoológico de Piscilago, el cual recibió una dosis de Ketamina de 10 mg / Kg de peso vivo, respondiendo bien al procedimiento de sedación.

El macho N^{O} 2 era un individuo sin actividad sexual en el grupo, el cual habitaba en una isla artificial acompañado de un macho dominante, una hembra dominante y un macho juvenil. Este individuo tenía dos años de edad, era proveniente del Parque Recreativo y Zoológico de Piscilago, el cual recibió una dosis de Ketamina de 10 mg / Kg de peso vivo. El animal requirió de una dosis de mantenimiento de 5 mg / kg de Ketamina ya que no hubo una buena respuesta a la sedación al mostrarse muy activo, lo que causó y estrés al momento de la manipulación con el EVP.

El macho N^{O} 3 era un individuo sin actividad sexual, el cual habitaba con otro macho en jaula. Este individuo de 5 años de edad, era procedente del Zoológico de Cafam. Se le suministró Ketamina a una dosis de 10 mg / kg de peso vivo, respondiendo de forma adecuada al procedimiento de sedación.

El macho N^{O} 4 era un individuo sin actividad sexual, el cual habitaba con otro macho en jaula. Tenía 5 años de edad procedente del Zoológico de Cafam, se le suministro Ketamina a una dosis de 8 mg / kg de peso vivo. Este individuo recibió una dosis de mantenimiento de 8 mg/ kg de ketamina, a los 81 minutos posteriores de la primera dosis, ya que el individuo no respondió al protocolo de extracción. Posterior al efecto de la sedación de la dosis de mantenimiento se realizó un segundo intento de colecta.

El macho N^{O} 5 era un individuo con actividad sexual, ya que habitaba con una hembra con la cual tenía 3 crías. Era un ejemplar de 9 años de edad, procedente de la Fundación Zoológico Santacruz, se le suministro Ketamina a una dosis de 5 mg / Kg de peso vivo, respondiendo al procedimiento de la sedación. Este individuo recibió una dosis de mantenimiento de 2,5 mg / Kg, ya que se estaban pasando de forma rápida los efectos de la sedación, esto se hizo con el fin de continuar con el procedimiento. El individuo respondió también al protocolo de colecta. En la tabla 5 se describe las características de los individuos disponibles.

Tabla 5. Especímenes disponibles y características.

Individuo	ID	Peso (g)	Dosis de ketamina utilizada	Dosis de ketamina de mantenimiento
1	977170000040803	551	10 mg/ Kg	-
2	977170000061106	570	10 mg/ Kg-	5mg/kg
3	977200005515198	500	10 mg/ Kg	-
4	977200005461116	600	8 mg/ Kg-	8mg/kg
5	977170000056713	435	5 mg/ Kg	2,5 mg/ Kg

ID: Identificación

5.2 Protocolo y tiempo de eyaculación con la técnica de estimulación vibratoria del pene.

El tiempo de estimulación varió entre los individuos, dependiendo de la reacción de éstos a cada estimulación, por lo cual fue necesario adaptar un protocolo de eyaculado por individuo. En la tabla 6 se describe el porcentaje de éxito y el tiempo de eyaculación implementado para cada uno de los ejemplares.

El protocolo que se utilizó para el macho N^{O}1 consistió de tres sesiones con dos intervalos de descanso cada uno de un minuto, la primera sesión consistió de dos estímulos de 60 segundos cada uno, la segunda sesión correspondió a otros dos estímulos de 60 segundos cada uno y la tercera sesión de un estímulo de 90 segundos. En este protocolo de colecta se usaron frecuencias de 75 Hz y amplitud de 1,0 a 1,5 mm. Este ejemplar mantuvo una erección y eyaculado rápido siendo este último obtenido a los 450 segundos del protocolo, es decir 7 minutos y medio.

Tabla 6. Obtención de semen y tiempo de eyaculación de ejemplares de la especie *Saguinus oedipus* utilizando la EVP.

Individuo	Sitio	1er intento	2do intento	Tiempo de Obtención en minutos
1	Z. Piscilago	Semen	-	7:30
2	Z. Piscilago	No exitoso	-	No exitoso
3	Z. Cafam	Semen	-	12:00
4	Z. Cafam	No exitoso	No exitoso	No exitoso
5	Z. Santacruz	No exitoso	Semen	24:00
% de éxito		40% (2 / 5)	50% (1 / 2)	**-**
Promedio ± DE		-	-	14:10±9:17 min

ID: identificación.

Para el macho N^{O} 2 se generaron estímulos sin pausas con el fin de no interrumpir el proceso de erección del pene. Se realizaron 12 estímulos, siendo éstos de 30 a 60 segundos cada uno. Se mantuvieron frecuencias de 75, a 90 Hz y amplitudes de 1,0 a 2,5 mm. La erección que hubo en

este macho fue mínima y no respondió al protocolo. En este macho, no se realizó un segundo intento ya que este ejemplar, recibió dos dosis de sedación, ya que la primera dosis no generó la sedación esperada. A pesar de las dos dosis, al terminar el protocolo el animal se encontraba muy activo.

Referente al macho N^{O}3, el protocolo de eyaculado consistió de 14 estímulos con frecuencias de 75 a 90 Hz y amplitudes de 1,0 a 2,5 mm, sin intervalos de descanso. Cada estímulo fue entre 30 a 60 segundos. La erección total de este macho fue a partir de estímulos de 80 Hz y se tuvo un eyaculado a los 12minutos del protocolo.

Para el macho N^{O} 4 se realizaron dos intentos de colecta. El primer intento consistió de 10 estímulos entre 30 a 120 segundos, con frecuencias de 70 a 100 Hz y amplitud de 1,0 a 2,5 mm; en este proceso el individuo presentó erección total a los 13 segundos del inicio de la estimulación; sin embargo, a los pocos segundos, la erección bajó y no se obtuvo material seminal en el primer intento. Posteriormente, se generó una dosis de mantenimiento de 8mg/kg de ketamina y se realizó un segundo intento el cual consistió de 14 estímulos, con duración de 30 hasta 120 segundos por estimulo, con frecuencias de 70 a 100 Hz y una amplitud de 1,0 a 2,5 mm. En este intento no hubo erección total ni eyaculado seminal.

En el macho N^{O} 5 se realizaron dos intentos de colecta el cual fue exitoso al segundo intento. El primer intento consistió de 12 estímulos, cada estimulo fue de 30 a 60 segundos, con frecuencias de 75 a 90 Hz y amplitud de 1,0 a 2,5 mm; en este proceso el individuo presentó erección a los 28 segundos del inicio de la estimulación y pocos minutos después bajó la erección sin generar eyaculado. Se dio un descanso de 12 minutos, después de lo cual se realizó cambio del protocolo de estimulación, se cambió el tamaño de la vagina artificial y se dio una segunda dosis de mantenimiento de 2,5 mg/ Kg de ketamina. El segundo intento consistió de 10 estímulos con duración de 60 hasta 120 segundos por estímulo, con frecuencias de 80 a 100 Hz y una amplitud de 0,5 a 1,0 mm. Se obtuvo el eyaculado a los 1440 segundos es decir a los 24 minutos del inicio de todo el protocolo y a los 4 minutos de haber iniciado el segundo procedimiento.

5.3 Evaluación del líquido seminal.

5.3.1 Características macroscópicas.

Las características macroscópicas fueron evaluadas en las muestras seminales de los individuos 1 y 3, donde se evaluó el volumen, color y viscosidad (tabla 7). En la figura 3 muestra el color blanco opalescente, de semen en *S. oedipus.*

Figura 3. Color blanco opalescente, de semen en *S. oedipus*.

Tabla 7. Características macroscópicas del semen de ejemplares de la especie *Saguinus oedipus*.

Individuo	Sitio	Volumen µL	Color	Viscosidad
1	Z. Piscilago	5	Blanco opalescente	Viscoso
3	Z. Cafam	27	Blanco opalescente	Muy viscoso
5	Z. Santacruz	NE	Amarillento	NE
Promedio ± DE	----	16 ± 15,6	----	----
%		----	67% (2/3)-33%(1/3)	----

NE. No evaluado.

5.3.2 Características microscópicas.

El total de las características microscópicas se pudieron evaluar para los individuos 1 y 3, pero para el individuo 5 solo fue posible determinar la concentración y la morfología espermática. En la tabla 8 se describe la motilidad masal, motilidad individual y la concentración espermática de las muestras seminales.

Debido a que la muestra de semen del macho N^{O}1 fue de poco volumen, esta se diluyó únicamente con el diluyente TALP-HEPES y a partir de esa muestra se realizaron las pruebas para la evaluación de las características microscópicas, restringiendo la comparación con los otros diluyentes. Para esta muestra seminal se obtuvo una motilidad individual del 10%.

Para la muestra de semen del macho N^{O}3 fue posible realizar la comparación de los tres distintos diluyentes, donde se obtuvo una motilidad individual de semen fresco del 40%, mientras que al ser diluido la motilidad fue del 30% con TALP-HEPES; 1% con Androhep y 0% para Zorlesco. La motilidad a las dos horas fue del 40% en fresco.

Tabla 8. Características microscópicas de las muestras obtenidas - motilidad masal, motilidad individual para semen fresco y diluido y concentración espermática.

Individuo	Motilidad masal (0-5)	% Motilidad individual					Concentración X10^6 spz/mL
		Semen fresco	Semen a 2 horas post.	TALP-HEPES	Androhep	Zorlesco	
1	2	10	NE	NE	NE	NE	65
3	3	40	40	30	1	0	250
5	NE	NE	NE	NE	NE	NE	25
Promedio ± DE	2,5 ± 0,71	25±21,21	-	-	-	-	133,3 ± 120,03

ID: Identificación. *NE:* No evaluado

En la tabla 9 se describen los porcentajes obtenidos de morfología y viabilidad espermática, donde se obtuvo un promedio de morfología Normal de 57,33±6,11%, y un promedio de viabilidad de 75 ± 7,07%

Tabla 9. Características microscópicas de las muestras obtenidas - porcentajes de morfología y viabilidad espermática.

Individuo	% Morfología								% Viabilidad
	N	CS	CEP	CED	DC	DPM	GCP	GCD	
1	56	21	2	0	6	6	4	5	70
3	64	5,31	0	0	3,19	9.57	4,25	13,82	80
5	52	4	5	37	0	0	2	0	NE
Promedio ± DE	57,33 ±6,11	10,10 ±9,46	2,33 ±2,52	12,33 ±21,36	3,06 ±3,0	5,19 ±4,84	3,42 ±1,23	6,27 ±7,0	75 ± 7,07

N: Normal; CS: Cabezas sueltas; CEP: Cola enrollada proximal; CED: Cola enrollada distal; DC: Defecto de cabeza; DPM: Defecto de pieza media; GCP: Gota citoplasmática proximal; GCD: Gota citoplasmática distal. NE: No evaluado

En las figuras 4, 5 y 6 se muestra algunas de las anormalidades presentes en las células espermáticas, mientras que en la figura 7 se muestra un espermatozoide normal.

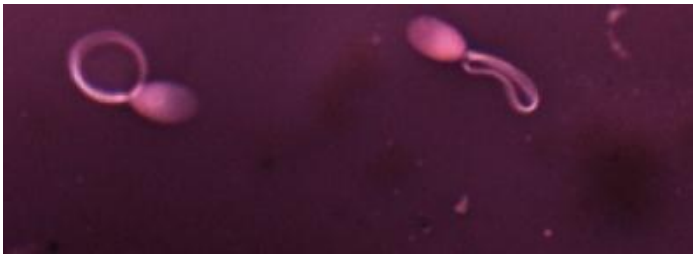

Figura 4. Espermatozoides con cola enrollada proximal (CEP), (100x aceite de inmersión) tomada con microscopio Nikon® E600 con cámara Nikon® DS-Fi1 tinción Eosina-nigrosina.

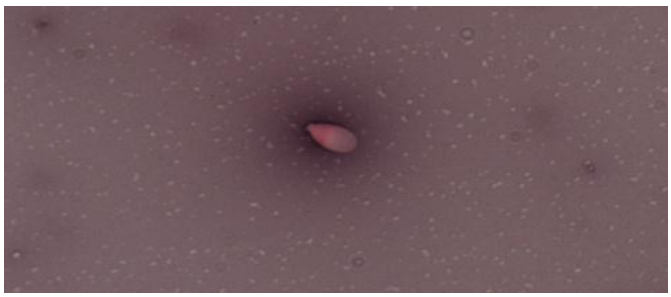

Figura 5. Espermatozoide con cabeza suelta (CS), (100x aceite de inmersión) tomada con microscopio Nikon® E600 con cámara Nikon® DS-Fi1tinción Eosina-nigrosina.

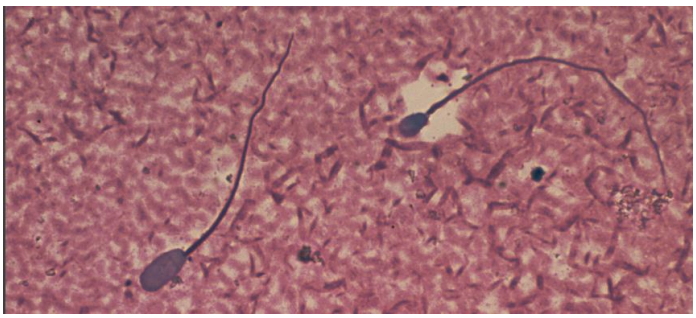

Figura 6. Espermatozoide con defecto de cabeza-DC macrocefalia (inferior), (100x aceite de inmersión) tomada con microscopio Nikon® E600 con cámara Nikon® DS-Fi1 tinción Wright.

Figura 7. Espermatozoide normal, (100x aceite de inmersión) tomada con microscopio Nikon® E600 con cámara Nikon® DS-Fi1 tinción Wright.

5.4 Parámetros de medidas testiculares.

En la tabla 10 se indican las medidas testiculares obtenidas con un pie de rey en los cinco machos evaluados. Donde se obtuvo promedios de Longitud Derecho de 1,48 ± 0,26 cm, Longitud Izquierdo

de 1,49 ± 0,32 cm, Ancho Derecho 0,91 ± 0,19 cm, Ancho Izquierdo de 0,98 ± 0,13 cm y Ancho Total de 2,04 ± 0,21 cm.

Tabla 10. Medidas testiculares de individuos de la especie *Saguinus oedipus.*

Individuo	Edad años	Peso (g)	LD (cm)	LI (cm)	AD (cm)	AI (cm)	AT (cm)
1	6	551	1,4	1,5	1,0	0,9	1,9
2	2	570	1,8	1,85	0,9	1,1	2,0
3	5	500	1,5	1,7	0,95	1,0	2,3
4	5	600	1,6	1,4	1,1	1,1	2,2
5	9	435	1,1	1,0	0,6	0,8	1,8
Promedio ± DE	-	531,2± 64,92	1,48 ± 0,26	1,49 ± 0,32	0,91 ± 0,19	0,98 ± 0,13	2,04 ± 0,21

LD: Longitud derecho; LI: Longitud izquierdo; AD: Ancho derecho; AI: Ancho izquierdo; AT: Ancho total.

5.5. Análisis de morfometría espermática.

Se analizó una población total de 100 espermatozoides para cada una de las tinciones (Wright y Giemsa), donde se determinó el área (µm^2), longitud (µm) y ancho (µm) de cabeza, longitud (µm) de pieza media, longitud (µm) de cola y longitud (µm) total del espermatozoide. En la tabla 11 se describen las medidas con cada una de las tinciones utilizadas (Wright y Giemsa), mientras que en la tabla 12 se describen los valores máximos y mínimos de los parámetros morfométricos con los diferentes métodos de tinción. En las medidas obtenidas para la morfometría con tinción Wright y Giemsa respectivamente fueron, Área de la cabeza 15,61±1,51 y 15,80±2,27 µm2, Longitud de la cabeza 5,40±0,33 y 5,63±0,55 µm, Ancho de la cabeza 3,31±0,57 y 3,20±0,32 µm, Longitud de la pieza media 7,83±0,79 y 7,06±0,75, longitud de la cola 47,67±4,10 y 48,24±5,66 y Longitud Total de 60,90±4,21 y 60,87±5,57.

Tabla 11. Morfometría espermática con los métodos de tinción Wright y Giemsa.

Método de tinción	N	Cabeza			P. Media	Cola	Longitud Total(µm)
		Área µm2	Longitud (µm)	Ancho (µm)	Longitud (µm)	Longitud (µm)	
Wright	100	15,61±1,51	5,40±0,33	3,31±0,57	7,83±0,79	47,67±4,10	60,90±4,21
Giemsa	100	15,80±2,27	5,63±0,55	3,20±0,32	7,06±0,75	48,24±5,66	60,87±5,57
TOTAL	200	15,71±0,51	5,52±0,16	3,26±0,18	7,45±0,03	47,96±1,10	60,89±0,96

N. Número de espermatozoides analizados.

Tabla 12.Máximos y mínimos de los parámetros morfométricos con cada método de tinción.

Método de tinción		Cabeza			P. Media	Cola	Longitud Total(µm)
		Área µm2	Longitud (µm)	Ancho (µm)	Longitud (µm)	Longitud (µm)	
Wright	**Mínimos**	11,91	4,56	2,75	5.28	27,69	66,53
	Máximos	19,44	6,13	8.23	9,87	53,54	40,31
Giemsa	**Mínimos**	12,03	3,13	2,39	3,13	5,28	59,82
	Máximos	21,03	6,97	3,96	8,91	8,91	20,02

6. DISCUSIÓN

6.1 Éxito en el protocolo y velocidad de eyaculado.

Este es el primer estudio exitoso con la técnica de la EVP en la especie *S. oedipus* en Colombia con individuos en cautiverio y sin entrenamiento previo. El 60% de los individuos muestreados (3/5) respondieron a la EVP. Hubo un 40% de éxito en el primer intento (2/5) y un 50% de éxito en el segundo intento (1/2); para un total de 42,85% (3/7) de éxito de los intentos, siendo este valor obtenido con combinaciones de 75 y 90 Hz y 1 y 2,5 mm. Este resultado es aceptable comparado con otras investigaciones que utilizaron la técnica de EVP, las cuales fueron realizadas en la especie *Saguinus leucopus* donde obtuvieron 52,6% de éxito con combinaciones de 80 y 90 Hz y 0,5 y 1mm (Poches et. al., 2013); en la especie *Saimiri sciureus* con un 83,33% de éxito con combinaciones entre 80 y 95 Hz y 0,5 y 1,0 mm (Valle 2007); en la especie *Callithix jacchus* con un 89,2% de éxito con combinaciones de 80 y 90 Hz y 1 y 2,5 mm (Schneiders et. al., 2004) y un 80% de éxito en la especie *Saimiri boliviensis* con frecuencias de combinaciones de 75 y 100 Hz y 1 y 2 mm (Yeoman *et. al*., 1998), siendo estos últimos estudios realizados con animales entrenados a este tipo de procedimientos, en cuanto a que en el presente estudio los animales no contaban con ningún tipo de entrenamiento para procedimientos de muestras biológicas.

El tiempo promedio de obtención de semen para este estudio fue de 14:10 ± 9:17 minutos. El individuo N^{O}5 presentó un mayor tiempo de eyaculación al superar los 14 minutos, esto pudo ser debido a copulas recientes con la hembra en la que se encontraba alojado. Para este estudio son resultados aceptables ya que en otros estudios como el de Poches et. al., (2013) el tiempo promedio fue de 12:35 ± 6:42 minutos, donde los individuos fueron anestesiados con Clorhidrato de Ketamina para minimizar estrés ya que estos individuos no estaban acostumbrados a este tipo de procedimientos. En este estudio los individuos también fueron anestesiados con Clorhidrato de Ketamina, lo que lo hace similar al de Poches et. al*.,* (2013). En otros estudios como los realizados por Valle (2007), Schneiders (2004) y Kuederling *et al.,* (2000) el tiempo para la eyaculación varió hasta 20 minutos, aunque en estas investigaciones realizaron los individuos no contaban con anestesia por lo cual estaban entrenados para este tipo de procesos.

Dos de los cinco machos no respondieron al EVP. El individuo N° 2 fue el que más se estresó en el momento de la captura, por lo que fue necesario añadir una dosis de mantenimiento al no responder a la primera dosis de sedación. Este individuo no tenía historia de actividad sexual ya que estaba en un grupo donde había un macho de mayor jerarquía que copulaba con una hembra. En un estudio realizado por Savage (1990), se observó que la mayoría de los grupos de *S. oedipus*, estaban conformados por parejas monógamas y que los demás miembros del grupo no se reproducían, tal vez el hecho que el individuo no tuviera experiencia sexual pudo influir en la no obtención del eyaculado .

La no respuesta al protocolo de eyaculado por parte del individuo N^{O}4 pudo ser debido a que no se realizó una restricción química inmediatamente después de la captura, este tiempo de espera pudo aumentar el estrés en el animal. En este individuo se realizaron dos intentos de eyaculado, en el primer intento se presentó erección, pero no eyaculación, posterior a un tiempo de descanso se suministró una dosis de mantenimiento y se realizó un segundo intento el cual no generó respuesta.
En este estudio se pudo observar que, animales que presentaron mayor resistencia y demora al momento de la captura, mostraron un tiempo mayor de eyaculado, lo cual pudo relacionarse con la falla en la respuesta a la estimulación.

6.2 Características macroscópicas.

El volumen de eyaculado promedio que presentó este estudio fue de 16 ± 15,6 µL, valor este menor a lo reportado por Schneiders (2004) para la especie *Saguinus oedipus* al utilizar la técnica de EE, quien obtuvo un volumen de 39,9 µL. Entre otras investigaciones realizadas con la técnica EVP, este valor también fue menor al reportado por Poches et. al., (2013) para la especie *S. leucopus* indicando un volumen promedio de 24 ± 18,8 µL; por Valle (2007) en *C. jacchus* donde obtuvieron un volumen de 26,05 ± 2,88 µL; por Schneiders (2004) 21,8 ± 9,9 µL y Kuederling (2000) 31,9 µL. Por otro lado, el valor obtenido fue próximo al mencionado por Schneiders (2004) en *S. fuscicollis* con un volumen de 18,1 µL con la técnica de EE.

El individuo N^{O}3 presentó un volumen de 27 µL, este individuo no tenía ningún tipo de contacto con hembras, a diferencia del individuo N^{O}1 que presentó un volumen más bajo de 5 µL, siendo un macho que copulaba con la hembra del grupo, por lo cual puede inferirse que el mantener una vida reproductiva activa, puede interferir con la cantidad de volumen eyaculado.

El color es un indicador de la concentración espermática del semen, un semen muy viscoso puede asociarse con la determinación de la motilidad y la concentración de espermatozoides (Calamera 1978; Toro 2009 y OMS 1999). El color observado en este estudio fue blanco opalescente en 2/3 (67%) de los machos y correspondió al semen de mayor concentración. Uno (1/3) de los machos presentó color amarillento; este puede ser un indicador de presencia de ciertas vitaminas, también es posible que se deba a presencia de altos niveles de flavo-proteínas oxidadas, procedentes de vesículas seminales (OMS, 1999).

6.3 Características microscópicas.

La **motilidad masal** promedio de este estudio fue 2,5 ± 0,71, valor este menor al reportado por Poches et. al., (2013) para la especie *Saguinus leucopus*, quien obtuvo una motilidad masal de 3,7 ± 0,5. En otros estudios que fueron realizados a través de la EVP no fue evaluada la motilidad masal.

En el individuo N^{O}1 se obtuvo una motilidad masal de 2, lo que indica que el grupo de espermatozoides tuvieron movimientos progresivos lentos en una dirección o variante, lo que indica una motilidad pobre para el grupo de células.

La motilidad masal del individuo N^{O}3 fue de 3, al presentarse movimientos progresivos rápidos en una dirección o variante del grupo de espermatozoides, lo que se podría decir que es un grupo aceptable en comparación a la muestra seminal del macho N^{O}1.

El promedio de la **motilidad individual** de semen fresco fue de 25 ± 21,2 % la motilidad del semen en fresco varió entre 10 al 40 %. La motilidad evaluada en cada uno de los diferentes medios varió del 0 hasta el 30 % de motilidad.

En el macho N^{O}1 se obtuvo una motilidad del 10% en fresco posiblemente debido al bajo volumen seminal. No fue posible determinar la motilidad con ninguno de los diluyentes evaluados en el presente estudio debido a la baja motilidad inicial y a que el semen se murió rápidamente.

En el macho N^{O}3 se obtuvo una motilidad del 40% en fresco, lo que se considera como un semen regular conforme indicado por Jiménez (2002). Para este macho, fue posible utilizar los tres diluyentes evaluados. De acuerdo a esto, con el diluyente TALP-HEPES se obtuvo un 30% de motilidad individual, entre tanto, con los diluyentes Androhep y Zorlesco se obtuvo una motilidad de 1 y 0%, respectivamente, donde las células espermáticas murieron en el momento en que se hizo contacto con los medios.

La motilidad de este estudio fue relativamente baja comparado a otros estudios, esto pudo deberse a que el semen se analizó a una temperatura ambiente entre 20 y 24^{0}C aproximadamente, lo que pudo afectar el grado de motilidad, como lo sugiere la OMS (1999), donde se indica que en otros estudios realizados, se ha mantenido una temperatura de 37^{0}C para determinar la motilidad, lo que pudo inferir en obtener valores más altos de motilidad.

En estudios realizados para la especie *Saguinus oedipus* por Schneiders (2004), se reportó una motilidad del 61,4 ± 17,5 % por medio de la técnica EE. En estudios que utilizaron la técnica EVP, para la especie *Saimiri boliviensis* se observó una motilidad de 80,6 ± 4,3 % (Yeoman et. al., 1998); mientras que para la especie *Saimiri sciureus* se observó una motilidad del 70 ± 22% (Laverde y Medina, 2001); así como para *Saguinus leucopus* se reportó una motilidad progresiva de 97,1 ± 45,4% por Poches et. al., (2013), valores estos superiores al observado en el presente experimento.

La **concentración espermática** promedio de este estudio fue de 133,3 ± 120,03x10^{6} spz/mL, se puede especular que es una concentración regular, en comparación a la concentración reportada en *Callithrix jacchus* por Kuederling et. al., (2000) de 1154,2x10^{6} spz/ml con la EVP, siendo esta la más alta de los estudios realizados en callitrichidos. La concentración de este estudio fue mayor a la reportada en *Saimiri boliviensis* por Yeoman et. al., (1998) quienes obtuvieron una concentración de 2,8±1,7x10^{6} spz/mL, por la técnica EE y una concentración de 77,1±20,4x10^{6} spz/mL por la EVP.

Entre otros estudios donde obtuvieron muestras por medio de la EVP se observaron concentraciones espermáticas en *Saimiri sciureus* por Laverde y Medina (2001) de 362±344x10^6 spz/mL; por Schneiders (2004) de 665±641,9x10^6 spz/mL; por Valle (2007) de 1096±252,37x10^6 spz/mL y en *Saguinus leucopus* por Poches *et.al* (2013) de 876,17±213,27x10^6 spz/mL. En muestras obtenidas por medio de la EE se reportan en *Saguinus oedipus* por Schneiders (2004) de 185,3±131,4x10^6 spz/mL; en *Saguinus fuscicollis* por Schneiders (2004) de 472,3±445,6x10^6 spz/mL y en *Callithix jacchus* por Schneiders (2004) de 130,2±254,3x10^6 spz/mL.

La **morfología normal** promedio en el presente estudio fue de 57,33± 6,11%. Según Jiménez (2002), la morfología normal mínima debe estar en un 70%, motivo por el cual, se puede especular que el rango observado en este estudio, hace referencia a un semen regular, en comparación a morfologías reportadas para la especie *Callithrix jacchus* por Schneiders (2004) de 33,8±20,5%, siendo esta la más baja reportada, mientras que la morfología normal más alta reportada fue de 76±19% en la especie *Saimiri sciureus* por Laverde y Medina (2001). Entre otros estudios donde analizaron morfología espermática con muestras colectadas mediante la técnica de EVP, se indican en la especie *Callithrix jacchus* por Valle (2007) morfologías de 61,65±4,74% y en *Saguinus leucopus* por Poches et.al (2013) de 69,3±11,06% en morfología normal. Mientras que en muestras colectadas mediante la EE, se encuentran en la especie *Callithrix jacchus* por Cuit et.al., (1996) con 51,8±13,7% de morfología normal.

Las anormalidades más frecuentemente observadas, fueron secundarias, tales como, colas enrolladas distales con un promedio de 12,33±21,36% seguido de cabezas sueltas con un 10,10±9,46% y las anormalidades menos frecuentes fueron primarias como gota citoplasmática proximal con un 3,42±1,23% y defectos de cabeza con un 3,06±3,0%.

Según Álvarez (2008), cuando se presentan anormalidades, se pueden deber a procesos defectuosos por baja variabilidad genética de la espermatogénesis, también se puede presentar por estrés en la exposición de medios ambientes adversos (frio y calor), estrés por alteraciones en la salud y/o deficiencias nutricionales, reposo sexual extenso mayor a 60 días y manipulación inadecuada del semen.

Según Pérez y Pérez (1985) las anormalidades secundarias, se encuentran asociadas a perturbaciones bioquímicas del plasma seminal, por causas frecuentes de inflación del testículo y de las glándulas accesorias, en cuanto a perturbaciones físicas, puede ser el aumento o disminución de temperatura en el testículo y en los procesos de manipulación del semen.

Las colas enrolladas son una asociación de motilidades bajas espermáticas o que las células espermáticas estuvieron expuestas a condiciones de hipoosmolaridad según la OMS (1999). De acuerdo con Holt (1982), los defectos de cola enrollada distal pueden originarse en el tránsito por el epidídimo. Cabe indicar que en este estudio esta fue la anormalidad más significativa con un 12,33

± 21,36 %, de colas enrolladas. Por otro lado, las cabezas sueltas pueden estar relacionadas a la falla de adherencia entre el acrosoma y el núcleo, lo que podría explicar la causa por lo cual las cabezas y las colas se desprendan durante el proceso de la espermiación (OMS, 1999).

El porcentaje de **viabilidad** promedio de este estudio fue de 75±7,07%. Este es un resultado aceptable ya que para la especie *Saguinus oedipus* a través de la EE por Schneiders (2004) presentó 75,3±13,3% de viabilidad. En estudios donde las muestras fueron extraídas a través de la EVP en *Saimiri sciureus* por Laverde y Medina (2001) se reportó un 74±17% de viabilidad; en la especie *Callithrix jacchus* por Kuederling et. al., (2000) un 74,6% de viabilidad; Valle (2007) de 85,25±3,42% de viabilidad; por Schneiders (2004) viabilidad de 73,6±17,2% y en la especie *Saguinus leucopus* por Poches et.al., (2013) donde reportaron una viabilidad de 93,7±4,9%, siendo esta la mayor viabilidad reportada con la EVP e incluso con la EE.

6.4 Parámetros de medidas testiculares.

Este es el primer reporte de medidas testiculares en la especie *Saguinus oedipus*. En las medidas longitudinales no hubo diferencia significativa entre testículos derecho e izquierdo donde se obtuvo 1,48 ± 0,26 cm de longitud derecho y 1,49 ± 0,32 cm en la longitud izquierdo. En las medidas de anchura testicular se obtuvo 0,91 ± 0,19 cm de ancho derecho y 0,98± 0,13 cm de ancho izquierdo, donde se puede ver que no hubo gran diferencia entre testículo derecho e izquierdo. Se obtuvo un promedio de ancho total testicular de 2,04 ± 0,21 cm. Las diferencias de asimetrías entre los testículos de los individuos presentados fueron mínimas, al no superar los 2 mm de diferencia entre los testículos derecho e izquierdo.

El individuo que presentó menor anchura total (1,8 cm) correspondió al individuo de mayor edad el cual, fue al individuo N^{O}5 con edad de 9 años. Cabe resaltar que este individuo tenía una consistencia dura en los testículos lo que fue diferente de los demás individuos de este estudio. También el individuo N^{O}1 con una edad de 6 años obtuvo menor anchura total (1,9 cm). Algo en común que tenían estos dos individuos es que presentaron menores anchuras totales fue su vida sexual activa, siendo estos individuos dominantes.
El macho que presentó mayor anchura total fue el individuo N^{O}3 con una edad de 5 años presentando 2,3 cm, comparado con el individuo N^{O}4 con una medida de 2,2 cm con 5 años de edad. Estos dos individuos tenían edades iguales, no tenían actividad sexual y no estaban en un grupo conformado por hembras y eran hermanos

6.5 Morfometría espermática.

Para el análisis de morfometría espermática, fueron utilizados dos métodos de tinción (Wright y Giemsa) en diferentes tiempos de coloración, donde se buscaba el método y tiempo de tinción que revelara contrastes de escalas grises con el fin de identificar cada estructura de la célula espermática.

Los métodos utilizados en este estudio permitieron la diferenciación de las estructuras de las células. Las medidas obtenidas entre los métodos de tinción no mostraron diferencias. El método de tinción Wright mostró mejores resultados de coloración, en el cual se pudo diferenciar de manera clara y fácilmente las estructuras de las células espermáticas. Los tiempos de coloración 1:30- 2min (1:30 minutos en colorante y 2 minutos en mezcla de colorante y agua destilada) y el tiempo 2- 3 min (2 en colorante y 3 minutos en mezcla de colorante y agua destilada), fueron los más óptimos para la valoración de las células espermáticas. Por otro lado, en el método Giemsa no se pudo diferenciar claramente la pieza media de la cola, lo cual dificultó la medición de cada estructura de los espermatozoides.

En este estudio se obtuvieron medidas del área de la cabeza de 15,71±0,51 μm^2,la longitud o diámetro mayor de la cabeza fue de 5,52±0,16µm, el ancho de la cabeza o diámetro menor fue de 3,26±0,18 µm, la longitud de la pieza media fue de 7,45±0,03µm, la longitud de la cola fue de 47,96±1,10 µm y la longitud total fue de 60,89±0,96 µm. En el estudio realizado por Schneiders (2004) en la especie *Saguinus oedipus*, obtuvieron medidas de longitud de cabeza de 5,53±0,32µm, ancho de la cabeza de 3,32±0,24µm, longitud de la cola de 59,43±2,01µm y longitud total de 64,96±2,08 µm; en la especie *Callithrix jacchus* por Schneiders (2004) se reportan medidas de longitud de cabeza de 5,08±0,33µm, ancho de la cabeza de 3,34±0,22µm, longitud de la cola 51,84±3,65µm y longitud total de 56,92±3,74µm; en la especie *Saguinus fuscicollis* realizado por Schneiders (2004) se reportó medidas de longitud de la cabeza de 5,58±0,36µm, ancho de la cabeza de 3,22±0,19 µm, longitud de la cola de 55,16±2,66 µm y longitud total de 60,74±2,79µm;solo en el estudio de *Saguinus leucopus* realizado por Poches et. al*.,* (2013) reportaron 9,67±0,89 μm^2 del área de la cabeza, longitud de la cabeza de 4,94 ± 0,66µm, ancho de la cabeza de 3,28±0,32µm, longitud de la cola de 58,62±1,96µm y longitud total de 64,88±2,82µm. No se muestra mayor diferencia en las medidas reportadas en las células espermáticas en otros estudios y este estudio reporta las primeras medidas del área de la cabeza (μm^2) y longitud de pieza media para la especie *Saguinus oedipus.*

7. CONCLUSIONES

- El protocolo de eyaculado implementado obtuvo mejores resultados de estimulación con combinaciones de frecuencia y amplitud entre 75 y 90 Hz y entre 1 y 2,5 mm. Los individuos que tuvieron un tiempo de espera desde la captura hasta la sedación, no respondieron al protocolo de eyaculado.

- El diluyente TALP-HEPES, fue empleado de manera satisfactoria para evaluar motilidad espermática. Por otro lado los diluyentes utilizados Androhep y Zorlesco, tuvieron efecto negativo en las células espermáticas matándolas al instante de contacto del semen con el medio, a pesar de que solo se realizó en uno de los ejemplares.

- La edad y el estado de actividad sexual pueden influir en el tamaño de los testículos de los machos *Saguinus oedipus.*

- El método de tinción Wright en los tiempos de tinción (1:30- 2min) y (2- 3 min) fueron los más óptimos para la valoración de las células espermáticas, siendo el tiempo (2- 3 min) el que presentó una mayor nitidez para el análisis de morfometría espermática, revelando y diferenciando claramente cada estructura de las células espermáticas.

- El presente estudio es el primero realizar la extracción y evaluación seminal a través de la técnica EVP realizado en la especie *Saguinus oedipus*, dando un significativo aporte en la conservación y reproducción de esta especie, útil para ser replicable en primates neotropicales y en otras especies silvestres.

8. RECOMENDACIONES

- En el momento en que se realice la captura debe realizarse de forma inmediata la sedación, ya que, al permitir un tiempo de espera muy alto, los individuos pueden estresarse, lo que genera menos posibilidades de eyaculado.

- Se recomienda un periodo de entrenamiento a los animales que se encuentren en zoológicos o parques para minimizar el estrés en el momento de la captura, el cual es factible realizarlo con el método de captura túnel, ofreciéndoles alimento con el fin de que los animales se acostumbren y hagan uso diario del túnel para cuando se realice capturas, los individuos no estén sometidos a estrés.

- Se recomienda la separación de las hembras con 7 días de anticipación como mínimo para la colecta de la muestra, debido a que los callitríchidos mantienen copulas constantes lo que puede disminuir el volumen y la concentración seminal en un análisis seminal.

- Se recomienda realizar estudios de características bioquímicas del semen en la especie *Saguinus oedipus.*

- Es de gran interés que en estudios posteriores se realice posible relación de medidas escrotales con la edad, peso, producción espermática en *S. oedipus*.

- Se sugiere el uso de la EVP para extracción seminal en diferentes especies de fauna silvestre que se encuentren o no en peligro de extinción.

9. BIBLIOGRAFÍA.

Álvarez, I. 2008. Efectos negativos del estrés sobre la reproducción en animales domésticos. Revisión literaria. Arch. Zootec. 57(R) 39-59.

Aslam H., Schneiders A., Perret M., Weinbauer G.F., Hodges J.K. (2002). Quantitative assessment of testicular germ cell production and kinematic and morphometric parameters of ejaculated spermatozoa in the grey mouse lemur, *Microcebus murinus*. Reproduction 123: 323-332.

Barnabe R, Guimaraes M, Oliveira C, Barnabe A. 2002. Analysis of some normal parameters of the spermiogram of captive capuchin monkeys *Cebus apella* Linnaeus, 1758). Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. (39)6: 331-333

Brindley G. 1981. Reflex ejaculation under vibratory stimulation in paraplegic men. Paraplegia.19: 299-302.

Brown C.S., Loskutoff N.M. (1998). A training program for non-invasive semen collection in captive western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). Zoo Biology 17: 143-151

Bush D, Russell L, Flowers A, Sorensen A.(1975). Semen evaluation in capuchin monkeys *Cebus apella*). Lab. Anim. Sci. 25(5): 588-593

Calamera, J. 1978. El espermograma. Buenos Aires, Argentina. Ed. BAESA, 139 pgs.

Campos R, Quintero G. (1987). Estandarización de técnicas para colección de material seminal en primates del genero *Aotus griseimembra* [tesis pregrado]. [Bogotá, Colombia]: Universidad Nacional de Colombia.

Carew, B. y Egbunike, G.N. (1980). “Sperm production rates in Maradi goats extensively managed in a tropical environment”. 9th mt. Congr. on Anim. Reprod. and AL, 16-20 Junio, Madrid, España.

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.

CITES. (2013) Convensión Sobre El Comercio Internacional De Especies Amenazadas De Fauna Y Flora Silvestres. https://cites.org/esp/app/appendices.php

Cooper T.G., Yeung, C.H. (1999). Sperm maturation in the primate epididymis. In: Weinbauer G.F., Korte R. (eds). Reproduction in non human primates. Waxmann Verlag, Münster. 61-78.

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.

Cui K. (1996). The effect of stress on semen reduction in the marmoset monkey (Callithrix jacchus). Hum. Reprod. 11: 568-73.

Defler RT. (2010). Historia natural de los primates colombianos. Bogotá D.C.: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. p. 612.

Delgado F, Santos M, Góes T, Pissinatti A. (2007). Coleta de sêmen em mico-leão-de-caradourada *(Leontopithecus chrysomelas*, Kuhl1820) a través da eletroejaculação. R. Bras. Ci.Vet. 14(2): 67-71.

Durrant B.S. (1990). Semen collection, evaluation, and cryopreservation in exotic animal species: maximizing reproductive potential. ILAR News 32: 2-10

Eberhard T. (1995). Conservation breeding as atool for saving animal species from extinction. Trends Ecol. Evol. 10: 438-443.

EAZA guía de manejo para callítricidos. (2010). 2a Edición. Editada por Eric Bairrão Ruivo. ZooParc de Beauval.

François N, Lichtenberg JM, Jouannet P, Desert JF, Maury M. 1980. L'ejaculation par le vibromasage chez le paraplegique a propos de 50 cas avec 7 grossesses. Ann Med Phys 23: 24-36.

French, J. A. & C.T. Snowdon 1981. Sexual dimorphism in response to unfamiliar intruders in the tamarin, *Saguinus oedipus*. *Animal Behaviour* 29:822.

French, J. A., D. H. Abbott & C. T. Snowdon. (1984). The effect of social environment on estrogen excretion, scent marking, and sociosexual behavior in tamarins (*Saguinus oedipus*). *American Journal Primatology* 6:155- – 167.

Fussell E.N., Franklin L.E., Franta R.C. (1973). Collection of chimpanzee semen with an artificial vagina. Lab AnimSci 23: 252-255.

Guimarães, M. (1994). Contribuição para o estudoda colheita e avaliação do sêmen do macaco prego (*Cebus apella*, Erxleben 1777) [tesis maestría]. [São Paulo, Brasil]: Universidade de São Paulo.

Gould K.G., Martin D.E. (1986). Artificial insemination of nonhuman primates. In: Benirschke K. (ed.). Primates, the roadto self-sustaining populations. Springer-Verlag, New York. 425-443

Gould K.G., Warner H., Martin D.E. (1978). Rectal probe electroejaculation of primates. J Med Primatol 7: 213-222

Harrison R.M., Lewis R.W. (1986). The male reproductive tract and its fluids. In: Dukelow W.R., Erwin, J. (eds).Comparative Primate Biology. Volume 3: Reproduction and Development. Alan R. LissInc., New York. 101-148

Hernández L, Cerda A, Paez S, Rojas M,Mondragon R. (2007). Artificial insemination inblack-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*).Theriogenology. 67: 399-406.

Hershkovitz, P. (1977). Living New Wold Primates (Platyrrhini). The University of Chicago Press, Chicago.

Holt W. 1982. Epididimal origin of a coiled-tail sperm defect in a boar. J Reprod fertile; 64:485-489.

Holt, W.V., Pickard, A.R.(1999). Role of reproductive technologies in geneticresource banks in animal conservation. Rev.Reprod. 4, 143–150.

UICN. (2012). Categorías y Criterios de la Lista Roja de la UICN: Versión 3.1. Segunda edición. Gland, Suiza y Cambridge, Reino Unido: UICN. vi + 34pp. Originalmente publicado como IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Second edition. (Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, 2012).

Jiménez Escobar. (2002). Evaluación de la Salud Reproductiva del Toro. [Traducción]. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

J. Marson, S. Meuris, F. Moysan, D. Gervais, R. W. Cooperand P. Jouannet. (1988). Cellular and biochemical characteristics of semen obtained from pubertal chimpanzees by masturbation. Journals of Reproduction &Fertility Ltd. 82, 199-207.

Kendrick K.M., Dixson A.F. (1984). A quantitative description of copulatory and associated behaviours of captive marmosets (*Callithrix jacchus*). Int J Primatol 5: 199-212

Knight,T.W. (1977). “Methods for the indirecí estimation of testes weight atid sperm numbers in Merino and Romney rams”. N. Z. J. Agric. Res. 20, 291-296.

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.

Kuederling A, Schneiders A, Sonksen J, Nayudu PL, Hodges JK. (2000). Non-invasive collection of ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibro stimulation. Am. J. Primatol. 52: 149-154.

Kumar R.A., Phillips D.M. (1991). Spermiation and sperm maturation in the marmoset. Anat Rec 229: 315-320.

Laverde HJ, Medina VM. (2001). Contribución al conocimiento de las características seminal es del mono ardilla (*Saimiri sciureus*) en cautiverio, obtenido por el método de estimulación vibratoria del pene [tesis pregrado]. [Villavicencio, Colombia]: Universidad de los Llanos.

Linnaeus, C. (1758). Systema Naturae, ed. 10, vol. i, Regnum Animale. Holmiae.

López, M., Urbano, A., Cárdenas, M. (2012). Manual analítico y técnico de ayuda al diagnostico de la esterilidad y subfertilidad de origen masculino y preparación del semen para las técnicas de reproducción asistida. 1ª edición © 2012 Omnia Science (Omnia Publisher SL).

Maqueda, Lourdes. (2006). Conservación de la calidad del semen: diluyentes, empaques, temperature y transporte. http://www.engormix.com/s_articles_view.asp?AREA=POR&art=133

Miraglia T., Filho M.T., Branco A.L.C. (1970). The male reprodutive system of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). Acta Anat76: 594-611.

Monga, M.; Bernie, J.; Rajasekaran, M. 1999. Male infertility and erectile disfunction in spinal cord injury: A review. Archives of Physical Medicine and Rehabilitation. Vol 80, pg 1331-1339.

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.
Oliveira, K. G., Miranda, S.A., Leão, D.L., Brito, A.B., Santos, R.R., Domingues, F.S. (2011). Semen coagulum liquefaction, sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (Cebus apella) semen in coconut water solution (CWS) and TES–TRIS. Animal Reproduction Science 123 75–80.

Nehra, A.; et al*.,* 1996. Vibratory stimulation and rectal probe electroejaculation as therapy for patients with spinal cord injury: semen parameters and pregnacy rates. Journal of Urology. Vol. 155, pg 554-559.

Organización Mundial de la Salud (OMS). (1999). Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical. 4rd ed. Editorial Médica Panamericana S.A.

Pérez Llano. (1992). Estudio de los Parametros de Valoracion del Rendimiento Reproductivo en Macho Cabrio de las Razas Verata Y Malagueña. [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid Facultad de Veterinaria Departamento de Patología Animal II.

Pérez Y y Pérez F (1985). Reproducción animal, inseminación artificial y trasplanté deembriones. Capítulo II. Inseminación Artificial de 105 Suinos. Editorial CientíficoMédica, España, pp. 447 - 495.

Poches RA. (2010). La estimulación vibratoria del pene (EV P), 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.

Poches, R.A.; Brieva,C.I; Jimenez, C. (2013). Características seminales del titi gris (*Saguinus leucopus*) bajo condiciones de cautiverio obtenidas por estimulación vibratoria del pene (EVP). REV. MED. VET. ZOOT.

Price, E.C. (1992). Changes in the activity of the captive cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*) over the breeding cycle. *Primates* 33(1):99- – 106.

Preslock, J. P., S. H. Hampton, J. (1973). Cyclic vations of serum progestins and immune reactive estrogens in marmosets. Endocrinology 92:1096--1101

Rillo, Martín. (1994). Curso Superior de Reproducción Animal, Centro Internacional de latos estudios agronómicos mediterráneos, España.

Roldán, E. R. S. y Garde, J. (2004). Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), Madrid e Instituto deInvestigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCCM) Albacete.

Rodríguez-Mahecha J.V., M. Alberico, F.Treujillo, J. Jorgenson (EDs). (2006). Libros Rojos de los mamíferos de Colombia. Series de especies amenazadas de Colombia. Conservación Internacional Colombia, Ministerio de Medio Ambiente, Vivienda y desarrollo territorial. Bogotá, Colombia, 429 pp

Romero, L, Ardila, M, Moreno,C, Jimenez, C.(2010). Extracción y análisis de las características macroscópicas y microscópicas del semen de cocodrilo del Orinoco (*Crocodylus intermedius*)

Savege, A. 1990. The reproductive biology of the cotton- top tamarin (*Saguinus oedipus*) in Colombia. TAesis de Ph. D., University of Wisconsin, Maison.

Sauveur ,B. (1992). Reproducción de la aves. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

Savage, A. 1990. The reproductive biology of the cotton-top tamarin (*Saguinus oedipus*) in Colombia. Tesis de Ph. D., University of Wisconsin, Madison.

Savage, A. & Causado, J. 2014. *Saguinus* . La Lista Roja de la UICN de Especies Amenazadas 2014:e.T19823A17930260. Http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.20143.RLTS.T19823A17930260.

Schaffer N, Cranfield M, Kempske S, Meehan, T. (1989). Semen collection and analysis in the conservation of endangered non human primates. Zoo. Biol. Suppl. 1: 47-60.

Schaffer N., Jeyendran R.S., Beehler B. (1991). Improved sperm collection from the lowland gorilla: recovery of sperm from bladder and urethra following electroejaculation. Am J Primatol 24: 265-271.

Schneiders A. (2004). Ejakulatgewinnung und ejakulatanalyse bei Krallenaffen (*Callitrichidae*; Platyrrhini; Primates) [tesis doctorado]. [Gieben,Alemania]: Justus-Liebig-UniversitatGieben.

Silva C, Ferreira F, Gilson H, MansanoJ, Esper C. (2009). Colheita e avaliação do sêmende sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*).Ciênc. Anim. Bras. 10(2): 544-552.

Snowdon, C. T., Cleveland J. (1984). “Conversations” among pygmy marmosets. American Journal of Primatology 7:15--20.

Sonksen J.; OHL, D. A. 2002. Penile vibratory stimulation and electroejaculation in the treatment of ejaculatory dysfunction. Int J Androl 2002; 25:324-32.

Sonksen J, Biering-Sorensen F, Kristensen JK. 1994. Ejaculation induced by penile vibratory stimulation in men with spinal cord injuries: The importance of the vibratory amplitude. Paraplegia; 32:651-60.

Tardif, S.D., Harrison, M.L. and Simek, M.A. (1993): Communal infant care in marmosets and tamarins: Relation to energetics, ecology, and social organization. In: Marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology, A.B. Rylands (ed). Oxford University Press, Oxford. 220–234.

Toro, A. 2009. Espermograma. Medicina & laboratorio, 15:145-169, modulo 14 (Tecnología) numero 11, Editora Medica Colombiana S.A.

Valle, R. 2007. Colheita, análise e criopreservação de sêmen de uma espécie modelo de primata neotropical, Sagui-de-tufo-branco (*Callithrix jacchus*). Tese doutorado departamento de reprodução animal. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo. 173 págs

VandeVoort C.A., Neville L.E., Tollner T.L., Field L.P. (1993). Non-invasive semen collection from an adult orang-utan. Zoo Biology 12: 257-265.

Varela, N. 2005. Aproximación a la Medicina Clínica de los Primates Neotrópicales con énfasis en especies presentes en Colombia. Monografía, 410 páginas. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia.

Weinbauer G.F., Nieschlag E. (1999). Testicular physiology of primates. In: Weinbauer G.F., Korte R. (eds). Reproduction in nonhuman primates. Waxmann Verlag, Münster. 13-26.

Weinbauer G.F., Aslam H., Krishnamurthy H., Brinkworth M.H., Einspanier A., HodgesJ.K. (2001). Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and highs permatogenic efficiency. Biol Reprod 64: 120-126

Wildt D.E. (1986). Spermatozoa: collection, evaluation, metabolism, freezing, and artificial insemination. In: Dukelow W.R., Erwin J. (eds). Comparative Primate Biology, Volume 3: Reproduction and Development. Alan R. Liss Inc., New York. 171-193

Wildt, D. E., Rall, W. F., Critser, J. K., Monfort, S. L., Seal, U. S. (1997). Genome resource banks: living collections for biodiversity conservation. Bio Science 47,689—698.

Yeung C.H., Morrell J.M., Cooper T.G., Weinbauer G.F., Hodges J.K., Nieschlag E.(1996). Maturation of sperm motility in the epididymis of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) and the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Int J Androl 19: 113-121.

Young L.G., Smithwick E.B., Gould K.G. (1995). Characteristics of chimpanzee (*Pan troglodytes*) ejaculates collected by rectal probeelectro stimulation and by artificial vagina. Am J Primatol 35: 293-304.

ANEXOS

Figura 1. Vibrador *FertiCare® personal*, implementado para la EVP y pie de rey para medición de las medidas testiculares.

Figura 2. Ejemplar *Saguinus oedipus*, bajo los efectos de la sedación con Clorhidrato de ketamina.

Figura 3. Pesaje de individuo en balanza digital.

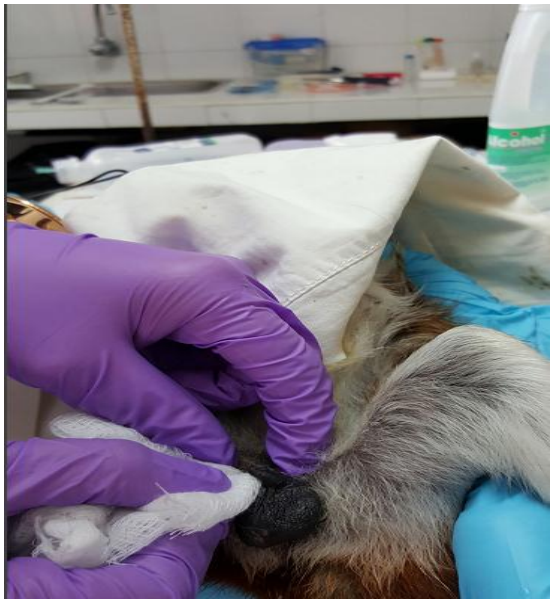

Figura 4.

Figura 5.

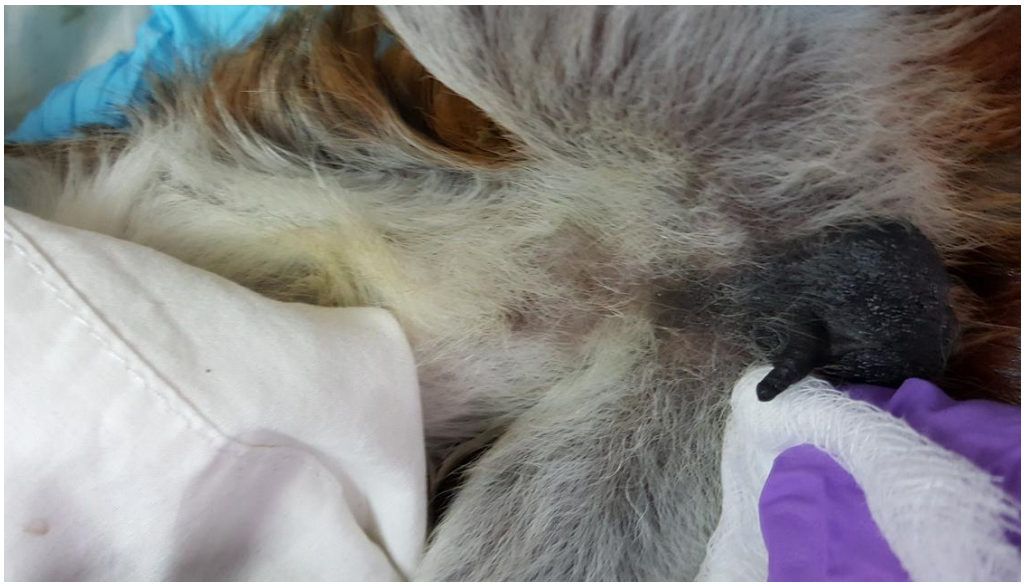

Figura 6

Figuras 4, 5 y 6. Limpieza de pene y testículos con suero fisiológico y gasas.

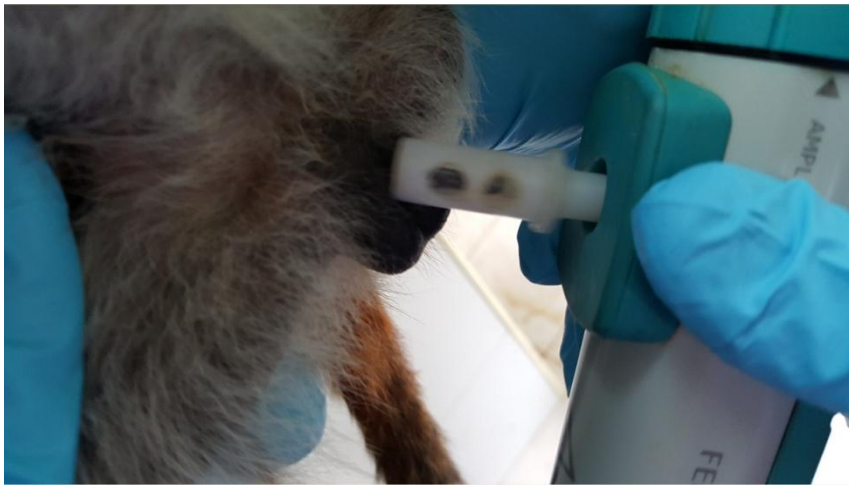

Figura 7.

Figura 8.

Figuras 7 y 8 protocolo de eyaculado con la EVP, sujeción de la cabeza y los miembros anteriores.