



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y  
ZOOTECNIA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TRIPSINA SOBRE EL  
EYACULADO Y LAS CARACTERÍSTICAS ESPERMÁTICAS  
DE MONOS ARAÑA (*Ateles geoffroyi*) EN CAUTIVERIO EN  
ZOOLOGICOS DE LA CIUDAD DE MÉXICO

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A

**ACUÑA HERNÁNDEZ DEYANIRA  
GUADALUPE**

ASESORES:

M. en C. JUAN ARTURO RIVERA REBOLLEDO

M. en C. ALBA ZULEMA RODAS MARTÍNEZ

M. en C. HÉCTOR FLORES HERRERA

México, D. F.

2009





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**Este trabajo está dedicado a:**

**Las mujeres de mi vida:**

- **María Esther, sabes que sin ti éste momento nunca hubiera llegado, TE AMO gracias por todo, por ser un roble y haberme apoyado incondicionalmente en esta mega aventura. Gracias mamá, éste grado es más tuyo que mío.**
- **Guadalupe Medina, por apoyarnos a mi mamá y a mi cuando lo necesitamos y por todo el cariño recibido.**
- **Teodora Reyes, por recibirnos siempre con los brazos abiertos y permitirnos formar parte de la familia Acuña.**

**Los hombres de mi vida:**

- **Manuel Acuña Reyes, siempre presente en mi vida, gracias por hacer mezclas cromosómicas con mi mamá.**
- **Juan Hernández Rivera, la imagen paterna más fuerte que tuve, por aceptarme como una hija más.**
- **Román Acuña, por el apoyo recibido en todo momento.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Ti@s Roxana, Delia, Enedina, Juan y Judith, Noemí, Victor y Julio Hernández, gracias por dejarme crecer con ustedes, por consentirme y apoyarme en todo momento. Ti@s José Román, Consuelo, Lola, Tere, Adela y Rosario Acuña, por dejarme conocerlos y convivir con ustedes, por el apoyo y la confianza siempre recibidos.

Lizette Castro, Ivonne y Judith Villalpando y Alma Arias gracias por seguir siendo mis grandes primas-amigas, por el apoyo y la confianza; Román y Ariel Acuña, Carlos y David Villalpando, Juan I. Hernández gracias por las experiencias compartidas; Omarchas por ser una gran responsabilidad para mi. Y para los demás primos espero que este trabajo sea igualado y/o superado en muchas ocasiones.

Paty Moreno, Martha Reyes, Luismi Rangel, Rosalía Ávalos, Fernanda Castillo, Saraí Sánchez, Paloma Ricarte y Uziel Castillo, gracias por ser firme e incondicional apoyo en mi vida profesional y personal, por la confianza, paciencia, complicidad y experiencias compartidas y por comenzar juntos éste sueño ¡gracias!. Bere Meza y Diana Mendoza, por ser pacientes conmigo y brindarme su amistad siempre. Josué Ramírez por darme ánimos todo el tiempo, por tenderme la mano en todas las ocasiones que lo he necesitado, por brindarme tú amistad y confianza siempre, ¡mil gracias doc! A todos ¡los quiero mucho!

Ricardo Arriaga, mil gracias por el apoyo dado para realizar este trabajo, gracias por compartir conmigo ésta aventura de la tesis desde que comenzó, has sido parte fundamental de este rompecabezas y de mi vida, la pieza que faltaba está aquí y también es tuya, ¡te quiero muchísimo!

Paty Castro, Mafer Mejía, Adri Fernández, Saúl Soto, Mariano Sánchez, Lorena Jiménez, Juanma Lechuga (DGZVS), Lulú, David Ortega, José L. Torres, Diana Guadarrama, Joel Frías, Óscar Pliego y Jessy, gracias por el apoyo moral y físico para terminar este proyecto.

A mis asesores: Alba Rodas, Juan Arturo Rivera y Héctor Flores, gracias por la atención prestada a este trabajo, por el apoyo en toda la extensión de la palabra, por seguir creyendo en mi a pesar de mis inconsistencias, disculpen la tardanza y las molestias ocasionadas pero ¡terminamos! Gracias por confiar en mí.

A la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre y al Laboratorio de Reproducción de la misma por permitirme trabajar con ejemplares de su colección y darme accesibilidad al material y equipo para cada uno de los muestreos y evaluaciones realizadas. A Javier Ojeda (zoochapultepec) y Homero Arroyo (zooaragón) por el apoyo en el manejo de los ejemplares estudiados.

Al INPer "IER" y a Héctor Flores, al Depto de Reproducción de la FMVZ UNAM, a Toño y al Dr. Balcazar por apoyarme en la capacitación para la evaluación seminal. A mi jurado: Dr. Javier Valencia, Dra. Dulce Brousset, Dr, Carlos Gutiérrez, M.Sc. Fernando Gual y M. en C. Juan Arturo Rivera por sus importantes comentarios al trabajo y por el tiempo invertido en el mismo.

A toda persona involucrada en este trabajo y que mi memoria olvide en este momento (disculpen), muchísimas gracias.

***Y mi más profundo y eterno agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México, estos han sido años excelentes, años de grandes experiencias y crecimiento, gracias por formarme y permitirme conocer gente maravillosa.***

***¡Por siempre UNAMITA!***

***¡Gracias UNAM!***

## CONTENIDO

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Descripción de la especie	2
1.2 Comportamiento social y reproductivo	4
1.3 Características del semen de los primates	5
1.4 Semenogelina, formación y licuefacción del coágulo	6
1.4.1 Mecanismo de la formación y licuefacción del coágulo	6
1.5 Obtención y manejo del semen en primates no humanos	7
1.5.1 Obtención del semen	7
1.5.2 Manejo del semen de primate	8
2. Justificación	10
3. Hipótesis	12
4. Objetivos	12
5. Material y métodos	13
5.1 Sitio y animales de estudio	13
5.2 Contención	14
5.3 Electroeyaculación	14
5.4 Procesamiento del eyaculado	15
5.5 Determinación de la concentración espermática	15
5.6 Motilidad espermática individual	15
5.7 Integridad del acrosoma y viabilidad espermática	16
5.8 Morfología espermática	17
5.9 Análisis estadístico	17
6. Resultados	18
6.1 Colección del semen	18
6.2 Número total de eyaculados (características de las muestras)	18
6.3 Características seminales de la población de monos cautivos	19
6.4 Tiempo de dilución	19
6.5 Características del eyaculado	20
6.5.1 Volumen	20
6.5.2 Potencial de Hidrógeno	21
6.5.3 Motilidad espermática	21
6.5.4 Concentración espermática	21
6.5.5 Viabilidad espermática	21
6.5.6 Morfología espermática	22
6.5.6.1 Defectos de cabeza	22
6.5.6.2 Defectos de pieza media	23
6.5.6.3 Defectos de flagelo	23
6.5.6.4 Presencia de gota citoplasmática	23
6.5.6.5 Espermatozoides normales	23
6.5.7 Reacción acrosomal y viabilidad espermática por fluorescencia	24
7. Discusión	26
7.1 Electroeyaculación	26
7.2 Características seminales de la población	26
7.3 Tiempo de dilución	27
7.4 Características del eyaculado	28
7.4.1 Volumen	28
7.4.2 Potencial de Hidrógeno	29

7.4.3 Motilidad espermática	29
7.4.4 Concentración espermática	30
7.4.5 Viabilidad espermática	31
7.4.6 Morfología espermática	32
7.4.7 Reacción acrosomal	34
8. Conclusiones	35
9. Literatura citada	36
10. Anexos	41

## RESUMEN

ACUÑA HERNÁNDEZ DEYANIRA GUADALUPE. Evaluación del efecto de la tripsina sobre el eyaculado y las características espermáticas de monos araña (*Ateles geoffroyi*) en cautiverio en zoológicos de la Ciudad de México. (Bajo la dirección de: MVZ M. en C. Juan Arturo Rivera Rebolledo, MVZ M. en C. Alba Zulema Rodas Martínez, Biol. Exp. M. en C. Héctor Flores Herrera)

Las poblaciones de primates a nivel mundial están disminuyendo considerablemente debido a la destrucción del hábitat y al comercio ilegal. Poco se conoce acerca de la fisiología reproductiva de varias especies de primates del nuevo mundo, en especial de los cébidos, tal es el caso del mono araña (*Ateles geoffroyi*) el cual forma un coágulo seminal posterior a la eyaculación, coágulo que necesita diluirse para ser evaluado, para esto se realizan tratamientos físicos (calor, agitación) y químicos (adición de enzimas). En el presente trabajo se evaluaron 3 diferentes concentraciones de tripsina en 16 coágulos seminales obtenidos de 7 monos araña alojados en los Zoológicos de Chapultepec y San Juan de Aragón de junio a octubre de 2006. Se evaluaron la motilidad, viabilidad, concentración, morfología y tiempo de dilución de: grupo control (PBS), 0.1%, 1.0% y 5.0% de tripsina y de la fracción líquida. Con respecto al grupo control se obtuvo diferencia estadística significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el tiempo de dilución para los tratamientos con 0.1%, 1.0% y 5.0% de tripsina; en motilidad en la fracción líquida y el tratamiento con 1.0% de tripsina; en la viabilidad el tratamiento con 1.0% y 5.0% de tripsina; en los espermatozoides completos en los tratamientos con 1.0% y 5.0% de tripsina y para la presencia de gota citoplasmática en el tratamiento con 5.0% de tripsina ( $p=0.016$ ). Las concentraciones de tripsina para diluir el coágulo seminal de mono araña, sin disminuir de manera sustancial la viabilidad y motilidad espermática, fueron 1.0 y 5.0%.

## 1. INTRODUCCIÓN

México alberga a los primates que viven en la parte más al norte del continente Americano. Tres especies de estos mamíferos habitan las selvas del sur de nuestro país, dos especies pertenecen al género *Alouatta* (*A. pigra* y *A. palliata*) y la otra al género *Ateles* (*A. geoffroyi*)<sup>[1]</sup>. Las poblaciones de estos tres primates se han ido reduciendo de manera alarmante desde hace más de 20 años. Este hecho se debe principalmente a la transformación y desaparición del hábitat para estas especies<sup>[2]</sup>.

El mono araña (*Ateles geoffroyi*) es una especie catalogada en peligro de extinción conforme a la NOM-059-ECOL-2001<sup>[3]</sup>, la International Union for Conservation of Nature and Natural Resources<sup>[4]</sup>, ambas instituciones lo consideran como “vulnerable” en su lista roja de especies en peligro de extinción y se encuentra incluida en el Apéndice II de la Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora<sup>[5]</sup>.

El mono araña es una especie que comúnmente podemos observar en cautiverio, principalmente en zoológicos. Estas instituciones tienen como objetivos, además de la educación y recreación del público que los visita, la conservación e investigación de los animales que resguardan, estos últimos dos puntos son un gran reto para las instituciones zoológicas ya que los animales que albergan son de gran valor biológico y genético. Uno de los medios para lograr la conservación de estos animales son las investigaciones reproductivas relacionadas con la generación de conocimientos sobre las características de machos y hembras, lo cual permite el diseño de programas reproductivos que en cautiverio pueden apoyar las labores de conservación *in situ* y *ex situ* de la especie.

### 1.1 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Los miembros del género *Ateles* son primates neotropicales, alcanzan entre 94 y 150 cm de longitud total (la cola representa desde el 50% hasta el 75% de esa longitud). Pueden llegar a pesar entre 6.5 y 9 Kg. Los brazos y piernas son muy largos y delgados pero musculosos. El dedo pulgar es apenas un vestigio. La coloración del dorso puede variar entre pardo oscuro, rojizo o grisáceo; la cara es de tono negruzco y con color rosa pálido alrededor de los ojos y la boca. El vientre tiende a ser más claro que el dorso<sup>[6]</sup>.

Las diferencias entre especies y subespecies dentro de género *Ateles* están basadas casi completamente en características del pelaje y debido a esto, actualmente existe incertidumbre respecto al número de especies que lo conforman <sup>[7]</sup>. Por tanto, aún continúa vigente la taxonomía descrita por Kellogg y Goldman, 1944 en Hernández –López <sup>[8]</sup>, como se observa a continuación.

### **Clasificación taxonómica de los monos araña**

Reino: Animal  
 Phylum: Chordata  
 Subphylum: Vertebrata  
 Clase: Mammalia  
 Subclase: Theria  
 Intrafase: Eutheria (verdaderos placentados)  
 Orden: Primates  
 Suborden: Haplorrhini  
 Infraorden: Simiiformes  
 Superfamilia: Ceboidea  
 Familia: Atelidae  
 Subfamilia: Atelinae  
 Género: *Ateles*  
 Especie: *A. geoffroyi*  
           *A. fusciceps*  
           *A. belzebuth*  
           *A. paniscus*  
 Subespecie: *A. g. geoffroyi*  
                   *A. g. azuerensis*  
                   *A. g. frontatus*  
                   *A. g. grisenscens*  
                   *A. g. pan*  
                   *A. g. panamensis*  
                   *A. g. ornatos*  
                   *A. g. vellerosus*  
                   *A. g. yucatanensis*  
                   *A. f. fusciceps*  
                   *A. f. robustus*  
                   *A. b. belzebuth*  
                   *A. b. hybridus*  
                   *A. b. marginatus*  
                   *A. p. paniscus*  
                   *A. p. chamek*

---

Considerando la clasificación anteriormente descrita, en México habita la especie *A. geoffroyi*; representada por dos subespecies, *Ateles geoffroyi vellerosus* que se limita geográficamente a los estados de Veracruz, Tabasco, Oaxaca y Chiapas; y *Ateles geoffroyi yucatanensis* que habita en la península de Yucatán <sup>[7]</sup>.

## 1.2 COMPORTAMIENTO SOCIAL Y REPRODUCTIVO

Los monos araña tienen hábitos arborícolas, en pocas ocasiones bajan al suelo. Conforman grupos que van de los 17 a los 19 monos y estos grupos a su vez se subdividen en otros más pequeños que pueden variar en tamaño y composición, por ejemplo, pueden ser de machos y hembras adultos, juveniles e infantes o grupos compuestos sólo por machos adultos (dos o tres) o pueden agruparse sólo hembras con sus crías. <sup>[6]</sup>. Silva-López y cols. estimaron la proporción sexual en los monos adultos en los Tuxtlas Veracruz, obteniéndola de un macho por cada uno punto cincuenta y seis hembras (1:1.56, machos:hembras) <sup>[9]</sup>.

Los monos araña inician su vida reproductiva entre los 50 y 60 meses, cuando son subadultos, de acuerdo a lo reportado por Marc y cols. <sup>[6]</sup>.

Al sistema de apareamiento que presenta el mono araña se le denomina multimacho - multihembra, en este las hembras se aparean normalmente con un grupo determinado de compañeros pero estas relaciones no ocurren sólo con un macho. Se ha reportado en algunas especies los acuerdos o asociaciones temporales entre machos y hembras, especialmente durante la fase fértil del ciclo ovárico pero rara vez se prolongan <sup>[10]</sup>. Estas asociaciones no son garantía de que exista actividad sexual entre dos animales. La elección de un compañero tanto en hembras como en machos depende de varios factores entre ellos los lazos estrechos, rango social, edad, atracción sexual y preferencias sexuales individuales. Esto ha dado como resultado que se le catalogue incorrectamente de promiscuo a este tipo de apareamiento; de igual manera se etiqueta a las hembras como pertenecientes a grupos multimacho - multihembra de que su actividad sexual es mucho mayor comparada con las hembras que son monógamas y poligínicas. Los monos araña no presentan abotonamiento durante la cópula y sólo ocurre una sola penetración con empuje pélvico la cual es prolongada <sup>[10]</sup>, Klein (1971) <sup>[11]</sup> reporta un rango de 8 a 25 minutos *Ateles belzebuth* y Van Roosmalen y Klein (1988) <sup>[6]</sup> reportan un promedio de 10 min para *Ateles paniscus*.

Se ha observado en cautiverio que el ciclo menstrual dura de 23 a 27 días; el tiempo de gestación va de los 226 a los 232 días y el intervalo entre nacimientos puede variar de 17 a 45 meses. [6, 8].

### **1.3 CARACTERÍSTICAS DEL SEMEN DE LOS PRIMATES**

Algunas especies de primates como el gorila (*Gorilla gorilla gorilla*) eyaculan semen con poca viscosidad (casi líquido), pero en otras especies, donde se incluye al mono araña, las moléculas de semenogelina, que es una proteína secretada por las vesículas seminales, se entrelazan entre sí químicamente incrementando la viscosidad del semen. En casos extremos los efectos de la semenogelina, (responsable de la formación del coágulo seminal) sobre la viscosidad son tan fuertes que el semen se convierte en un tapón sólido en la vagina [12, 13].

En primates del nuevo mundo como *Saimiri*, *Cebus*, *Lagothrix* y *Ateles*, así como en humanos, las vesículas seminales proveen el 60% del fluido eyaculado y otro 30% lo produce la próstata (los espermatozoides aportan el otro 10%). El fluido seminal se compone de varias sustancias entre ellas la fosforilcolina, ergoteína, ácido ascórbico, flavinas, fructosa, prostaglandinas, semenogelina, inhibidor de la proteína C [10, 14-17]. El líquido prostático contiene sustancias como el colesterol, fosfolípidos, calcio, ácido cítrico, fosfatasa y magnesio, también contiene una enzima coagulante y profibrinolisisina las cuales contribuyen a la formación de un coágulo seminal [14].

Existen varias teorías que tratan de explicar el objetivo de un coágulo seminal firme también llamado “tapón copulatorio”, una de estas teorías dice que actúa como barrera física sellando la entrada del tracto reproductivo de la hembra y previniendo cópulas subsecuentes [12]; la otra es que el tapón copulatorio minimiza la pérdida de semen del aparato reproductor femenino. Un coágulo suave puede ser una desventaja en competencia espermática si la función es proteger los espermatozoides hasta que ellos puedan ascender por el tracto reproductivo de la hembra [12].

## 1.4 SEMENOGELINA, FORMACIÓN Y LICUEFACCIÓN DEL COÁGULO

A la fecha no se han llevado a cabo investigaciones relacionadas con los componentes estructurales del eyaculado ni del coágulo de la mayoría de los primates no humanos sin embargo, en el humano, los mayores componentes estructurales del coágulo seminal son las semenogelina I, II y III (Sg I, Sg II, Sg III) (Figura 1, ver anexos). Esta semenogelina I es una proteína de 52 kDa la cual se encuentra en mayor proporción y en menor proporción aparecen la Sg II de 71 kDa y la Sg III de 76 kDa <sup>[10, 18]</sup>. Algunas investigaciones han demostrado la propiedad de bloquear la motilidad espermática de Sg I así como de activar la hialuronidasa espermática <sup>[18]</sup>.

Otras enzimas involucradas en estos procesos son las proteasas prostáticas, catalogadas como las responsables de la degradación de las proteínas del coágulo, eventualmente la actividad proteolítica fue asociada con el antígeno prostático específico (PSA) (Figura 1, ver anexos). También se ha demostrado que el PSA tiene una actividad parecida a la quimiotripsina <sup>[10, 18]</sup>.

**1.4.1 Mecanismo de la formación y licuefacción del coágulo.** En el momento de la eyaculación, la estructura de la Sg I cambia, se activa la fibronectina debido a la presencia de los componentes prostáticos (más  $Zn^{2+}$ ) lo que provoca que las moléculas de Sg interactúen (por mecanismos todavía desconocidos) y dan como resultado la agregación de los componentes y la coagulación del semen. Por esta razón los espermatozoides quedan inmovilizados en el coágulo <sup>[18]</sup>. Cuando los iones zinc se comienzan a quelar, se activan las moléculas del PSA contenidas en el coágulo, éste poco a poco va degradando a la Sg I y Sg II lo que da como resultado que se vayan liberando pequeños trozos del coágulo y que los espermatozoides recuperen su movilidad. También se liberan el zinc y el inhibidor de la proteína C los cuales se unen e inactivan al PSA para prevenir alguna destrucción innecesaria de proteínas (Figura 1, ver anexos).

## 1.5 OBTENCIÓN Y MANEJO DEL SEMEN EN PRIMATES NO HUMANOS

**1.5.1 Obtención del semen.** Un método apropiado para la colección de semen debe proveer eyaculados con volumen, concentración y motilidad adecuada y que ocasionen un estrés mínimo al animal muestreado. Los métodos para obtener estas muestras incluyen: a) la estimulación manual, b) el uso de vagina artificial, c) la electroeyaculación y d) la recuperación epididimal de espermatozoides (post mortem) <sup>[19]</sup>.

La estimulación a través de masaje manual del pene produce una erección refleja y posterior eyaculación. Esta técnica, originalmente desarrollada en cánidos domésticos ha sido utilizada exitosamente en colectas de semen en zorros y lobos, chimpancés, gorilas, orangutanes y rinocerontes <sup>[20-22]</sup>. El tipo de animales en los que se realiza, hace que el campo de acción y la eficacia del procedimiento sean limitados por lo que este método es usado rutinariamente para la obtención de semen en animales silvestres <sup>[19]</sup>.

La vagina artificial se utiliza comúnmente en animales domésticos (caballos, vacas, borregos, cabras, perros y gatos) para la colección de semen. El macho monta a una "hembra artificial" y el pene se dirige hacia una vagina artificial para la colección de la muestra en un vial estéril localizado al final de la misma. Para llevar a cabo este procedimiento se requiere del entrenamiento previo del animal así como del personal. Hay que tomar en cuenta que existe un potencial de riesgo al realizar esta técnica con animales silvestres, sin embargo se han obtenido muestras seminales de camellos, ciervos, alpacas y chimpancés <sup>[19]</sup>.

Debido a la dificultad en el uso de las técnicas antes descritas, la electroeyaculación es un método ampliamente utilizado en fauna silvestre en especies como guepardos, elefantes, gacelas, osos, zorros y varias especies de primates <sup>[19, 21, 23]</sup>. Esta técnica se basa en la estimulación de los nervios que regulan los órganos reproductivos masculinos con pequeñas corrientes eléctricas (Howard *et al* 1986). En el mono araña, la electroeyaculación es la opción a elegir, aunque se pudiera intentar la recolección por otros métodos como el masaje manual del pene o la utilización de vagina artificial <sup>[2, 21, 24]</sup>. Para realizar el masaje

manual del pene y/o utilizar una vagina artificial se necesita del condicionamiento operante de los ejemplares y de instalaciones especiales, situaciones que no siempre están disponibles con los ejemplares que se mantienen en los zoológicos. Por otra parte, el entrenamiento para llevar a cabo la recolección de la muestra puede ser tardado, por ejemplo Brown y Loskutoff en 1998 <sup>[22]</sup> reportan que el condicionamiento operante de 3.0 gorilas de tierras bajas (*Gorilla gorilla gorilla*) duró entre 5 y 14 meses para recolectar por primera vez una muestra de semen de alguno de los ejemplares, además de que, algunos animales necesitan una sedación previa aún cuando se les realice algunos de estos métodos ya que muchas especies cautivas en zoológicos son muy nerviosas.

**1.5.2 Manejo del semen de primate.** Diversos investigadores han trabajado con semen de primates no humanos, reportando que en algunas especies el semen coagula casi por completo poco tiempo después de haber sido eyaculado. La coagulación del semen impide la evaluación del mismo ya que no se pueden llevar a cabo los procedimientos microscópicos que permitan determinar la morfología, movilidad, viabilidad así como la concentración espermática, lo que limita la obtención de resultados confiables relacionados con las características de los espermatozoides. Por lo que se requiere de procedimientos físicos (calor y movimiento) y/o químicos (enzimas) que disuelvan de manera parcial o total el coágulo formado <sup>[2, 24-26]</sup>.

Dentro de los procedimientos químicos utilizados en primates no humanos se encuentra el uso de enzimas proteolíticas (p.ej. pronasa, beta-amilasa, peptidasa, quimiotripsina y tripsina) las cuales permiten la disolución del coágulo <sup>[27]</sup>, siendo la tripsina la más utilizada.

La tripsina es una enzima proteolítica secretada en forma de proenzima por las células acinares del páncreas, activándose en el lumen del intestino delgado. La tripsina se adhiere a los péptidos en el lado C-terminal de los residuos de aminoácidos lisina y arginina, también hidroliza las uniones éster y amino de varios sustratos sintéticos <sup>[28, 29]</sup>.

La tripsina ha sido utilizada para diluir el coágulo seminal en diversas especies de primates no humanos como el mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*),

papión (*Papio* sp.), chimpancé (*Pan troglodytes*) y el mono rhesus (*Macaca mulatta*). Sin embargo existe controversia en su uso ya que algunos investigadores han demostrado que la tripsina afecta la viabilidad de los espermatozoides durante los procesos de criopreservación, particularmente ruptura entre la cabeza y la pieza media lo cual afecta motilidad y viabilidad espermática [2, 24, 26, 30, 31].

Hoskins y Patterson en 1967 [32] añadieron 2% de tripsina al coágulo de mono rhesus (*Macaca mulatta*) obteniendo una dilución completa del coágulo entre 15 y 30 minutos y en el cual observó una motilidad progresiva entre el 80 y 90%.

Kraemer y Vera Cruz en 1969 [26], utilizaron 1% de tripsina a 27°C durante 30 minutos con semen de papión sagrado (*Papio hamadryas*). En este trabajo se comparó la calidad espermática entre eyaculados espontáneos y electroeyaculados y entre la fracción líquida y el coágulo en ambos casos pero no reportan que exista un daño en los coágulos diluidos con tripsina.

Roussel y Austin en 1967 [33] llevaron a cabo sus investigaciones con 0.5% de tripsina en primates como *Macaca mulatta*, *Macaca speciosa*, *Erythrocebus patas*, *Cercopithecus aethiops*, *Cercocebus galeritus* y *Pan troglodytes*, los espermatozoides fueron examinados después de permanecer a 37° C por 30 minutos y se refrigeraron, se realizó de nuevo una evaluación a las 5 horas siguientes al tratamiento y después de almacenarse por 24 horas a 5° C; aparentemente no se observaron efectos deletéreos por el uso de tripsina antes de congelar.

Marson y cols. en 1988 [24] trabajando con chimpancés (*Pan troglodytes*) añadieron 0.5% de tripsina a la porción del coágulo que no se diluyó en el baño María a 37°C durante 1 hora, obteniendo así la completa disolución del coágulo, lo cual ocurrió entre los 30 y 60 minutos, reportando sin embargo alteraciones en la morfología, como la separación entre cabeza, pieza media y cola. Estas alteraciones pueden afectar significativamente la motilidad de los espermatozoides.

En cuanto al uso de la tripsina en el semen de mono araña (*Ateles geoffroyi*), se han realizado algunas investigaciones. Hernández-López y cols. en 2002 [34, 35]

compararon la dilución del coágulo con un método físico (agitación) y uno químico (tripsina). En esas investigaciones el semen se mantuvo a 37°C en baño María y las muestras se dividieron en dos tratamientos; el primero sólo se agitó durante 10 minutos y se evaluó la parte del semen que se encontró diluida en ese momento, al segundo se le adicionó tripsina al 0.25% en una proporción 2:3 (solución de tripsina: eyaculado) y se dejó pasar 10 minutos, al cabo de este tiempo la parte del coágulo que se diluyó fue evaluada y comparados los resultados. Se encontró una concentración mayor de espermatozoides en la fracción que se trató con tripsina también un porcentaje mayor de movimiento lineal rápido y lento, un porcentaje similar de espermatozoides con movimiento no lineal, un porcentaje menor de espermatozoides inmóviles, mayor cantidad (%) de espermatozoides vivos y una cantidad similar de anomalías espermáticas.

Rodas en 2005 <sup>[36]</sup> por su parte, utilizó 200 µl de tripsina al 10% la cual adicionó a las muestras de semen colectado, las mantuvo a 37° C en Baño María, la disolución total del coágulo se reporta en un lapso no mayor a 5 minutos sin alteración morfológica significativa con respecto al grupo control.

Cabe mencionar que Rodas realizó un ajuste de la concentración utilizada en sus experimentos, obteniendo una dilución final promedio de  $4.52 \pm 2.02\%$ , esta variación se obtuvo debido a que se adicionó una cantidad estándar de tripsina diluida al 10% (200 µl) en volúmenes diferentes de eyaculado (comunicación personal).

## **2. JUSTIFICACIÓN**

Existe evidencia en diversas especies de primates no humanos sobre el uso de la tripsina para la disolución del coágulo seminal, sin embargo, hay que tomar en cuenta que las características seminales de cada una de las especies de primates puede variar, por lo tanto, los resultados obtenidos anteriormente en otras especies de primates y en el mismo mono araña, no permiten conocer realmente el efecto que tiene la adición de tripsina sobre el semen de la especie en cuestión. Conocer el efecto de la tripsina sobre los parámetros de motilidad, morfología y concentración espermática en el género *Ateles* es fundamental para diseñar

protocolos de manejo que permitan la criopreservación del semen y por lo tanto su uso en programas de reproducción artificial que puedan apoyar los programas de conservación de la especie.

### 3. HIPÓTESIS

La adición de tripsina (5.0%, 1,0% y 0.1%) al eyaculado de mono araña (*Ateles geoffroyi*) permitirá la disolución del coágulo de manera más rápida comparado con el eyaculado sin tripsina, lo cual disminuirá los posibles efectos deletéreos sobre la viabilidad, motilidad, morfología así como integridad del acrosoma de los espermatozoides que son causados por el largo periodo de licuefacción del coágulo.

### 4. OBJETIVOS

- Describir las características espermáticas de un grupo de 7 monos araña (*Ateles geoffroyi*) en cautiverio.
- Establecer el tiempo de licuefacción del eyaculado de mono araña (*Ateles geoffroyi*) sometido a un control (0%) y tres diferentes concentraciones de tripsina (0.1, 1.0 y 5.0%).
- Evaluar el uso de estas concentraciones de tripsina y sus posibles efectos sobre la viabilidad, motilidad, morfología e integridad acrosomal espermática en el eyaculado de mono araña (*Ateles geoffroyi*).

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

**5.1 Sitio y animales de estudio.** El estudio se llevó a cabo en los Zoológicos de Chapultepec y San Juan de Aragón en la Ciudad de México, ambos pertenecen a la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre que depende a su vez de la Secretaría de Medio Ambiente del Gobierno del Distrito Federal.

El Zoológico de Chapultepec se localiza en la Delegación Miguel Hidalgo, en la primera sección del Bosque de Chapultepec a 19°25' de latitud norte, 99°12' de longitud oeste y una altitud de 2250 msnm, el clima que presenta la zona es templado subhúmedo con lluvias en verano de humedad media (CW1), la temperatura media es de 15°C y la precipitación pluvial anual es de 801.1 mm <sup>[37]</sup>.

El Zoológico San Juan de Aragón se encuentra en la Avenida Loreto Fabela s/n en la delegación Gustavo A. Madero a 19°28' de latitud norte, 99°05' longitud oeste y una altitud de 2240 msnm. El clima que se presenta en esta zona es semiseco templado con lluvias en verano (BS1K), la temperatura media anual es de 16.8°C y la precipitación pluvial promedio es de 580.9 mm <sup>[38]</sup>.

Se trabajó con 7 monos araña (*Ateles geoffroyi*) machos, dos se encuentran en el Zoológico de Chapultepec y los cinco restantes en el Zoológico San Juan de Aragón. Algunos de ellos fueron donados a los zoológicos por personas que los mantenían como mascotas, mientras que otros fueron depositados después de su decomiso por parte de las autoridades correspondientes por lo que no se tiene la edad exacta de cada uno. Sin embargo, con base en exámenes físicos y en la fecha de recepción de los individuos, se ha estimado que los ejemplares tienen una edad de 10 años o más, considerándolos sexualmente maduros <sup>[21]</sup> (cuadro 1, ver cuadros).

Dentro de los zoológicos los animales se encuentran distribuidos de la siguiente manera: en el Zoológico de Chapultepec existe una sola tropa conformada por dos machos y ocho hembras (2:8), mientras que en el Zoológico San Juan de Aragón se encuentran dos tropas, una tiene tres machos y cuatro hembras (3:4) y otra tiene dos machos y tres hembras (2:3). Las condiciones de manejo y

alimentación en ambos zoológicos son similares: las tres tropas se alojan en instalaciones que cuentan con un cuarto de noche y un exhibidor en el que se encuentran durante el día, se les alimenta con frutas, verduras (manzana, uva, naranja, lechuga, jitomate, elote), alimento comercial para primates (Monkey chow®), y agua *ad libitum*.

**5.2 Contención.** Cada animal se contuvo físicamente dentro de su casa de noche con ayuda de una red de aro, para luego administrar Tiletamina-Zolacepam (Zoletil® Virbac) a dosis de 5mg/kg vía intramuscular. Con este protocolo de anestesia se produce la relajación muscular necesaria para llevar a cabo la electroeyaculación [2, 39].

**5.3 Electroeyaculación.** Todas las muestras fueron obtenidas entre junio y octubre del 2006 (cuadro 10.1, ver anexo). Para llevar a cabo la electroeyaculación, el pene se limpió con una gasa humedecida con solución salina fisiológica (SSF) para evitar posible contaminación de la muestra. Se utilizó una sonda de 2.5 cm de diámetro y 20 cm de largo que cuenta con 3 electrodos longitudinales de cobre de 3 cm y un electro estimador (PT Electronics, Boeing, OR). La sonda, previamente lubricada, se insertó suavemente dentro del recto de cada animal, los electrodos estuvieron dirigidos ventralmente. Se colocó un vial estéril y tibio al final del pene para recolectar el eyaculado antes de comenzar la estimulación eléctrica [40]. Se aplicaron varias series de estímulos eléctricos en todos los casos para cada animal, cada serie tuvo una duración no mayor a cinco minutos la cual finalizaba una vez que se lograba la eyaculación. Los estímulos eléctricos tuvieron una duración de 3 segundos y se aplicaron en un rango de 1 a 9 voltios. Antes de iniciar una nueva serie se dejaba transcurrir un periodo de 5 minutos entre cada serie. Los ejemplares fueron observados y evaluados clínicamente hasta la total recuperación del procedimiento anestésico. Se dejó un lapso de tiempo entre 28 y 35 días entre una electroeyaculación y otra, tiempo en el que se supone se completa la espermatogénesis, según lo reporta Barr en mono ardilla, papión, mono verde africano y mono rhesus (28-31 días) [41].

La información sobre los datos generales de cada animal, espermatobioscopia así como los tiempos de dilución del coágulo, fueron anotados en un registro elaborado para esta investigación (ver cuadro 2).

**5.4 Procesamiento del eyaculado.** Las muestras obtenidas se procesaron en el zoológico de Chapultepec, en el zoológico de San Juan de Aragón, en la Laboratorio de Reproducción de la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre y en el Instituto de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes. Cada eyaculado se dividió en cuatro fracciones similares, a tres de éstas fracciones se les añadió una solución de tripsina de páncreas bovino en proporción 1:1 (Sigma Chemical CO; St Louis) para llegar a una dilución del 0.1%, 1% y 5% para cada una de las fracciones a evaluar. A la otra fracción se le añadió PBS en proporción 1:1 como grupo control del experimento. Las muestras se mantuvieron durante todo su procesamiento en baño María a 37°C siendo evaluada la disolución del coágulo a diferentes tiempos de recolectada la muestra (3, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos), una vez diluido totalmente el coágulo, se procedió a evaluar los diferentes parámetros que se describen a continuación:

**5.5 Determinación de la concentración espermática.** La concentración espermática se determinó utilizando un hemocitómetro siguiendo la metodología descrita por Howard y cols., <sup>[19]</sup>. De los diferentes tratamientos con la tripsina se tomaron 10 µl de la muestra para realizar una dilución que se ajustó a la densidad espermática estimada (1:10). A partir de la muestra diluida se colocaron 10 µl en cada cámara del hemocitómetro para luego contar el número de espermatozoides en ambas cámaras y calculando un promedio se obtuvo el número de espermatozoides en millones/ml <sup>[42]</sup>.

**5.6 Motilidad espermática individual.** Se tomaron 10µl de los diferentes tratamientos en un portaobjetos y se evaluó el porcentaje de motilidad espermática en un microscopio óptico (Karl Zeiss Axiostar ®) con el objetivo 40x. Éste se calculó observando sistemáticamente el campo del microscopio y la motilidad de

cada espermatozoide, siendo clasificada de acuerdo al siguiente criterio: a. motilidad progresiva rápida; b. motilidad progresiva lenta; c. motilidad no progresiva; d. inmóviles. De esta forma se contabilizaron 100 células espermáticas obteniendo así un porcentaje para cada categoría [42]. Al redactar los resultados se tomaron en cuenta sólo la suma de los dos primeros puntos de la clasificación (motilidad progresiva rápida y lenta) ya que, de la clasificación, son los espermatozoides que podrían llevar a cabo la fertilización del óvulo.

**5.7 Integridad del acrosoma y viabilidad espermática.** Se tomaron 20 $\mu$ l de los diferentes tratamientos por separado y se colocaron en una laminilla permitiendo que los espermatozoides sedimentaran y se fijaron con etanol al 95% por 5 minutos. Posteriormente se bloquearon las preparaciones con una solución de PBS con 0.5% de BSA por 30 min. Al término de este tiempo las laminillas se lavaron dos veces con PBS. Se realizó la doble tinción mediante la incubación de 1 $\mu$ g/ml (20  $\mu$ l) de isotiocianato de fluoresceína para evaluar la integridad de la membrana acrosomal (FITC-PNA, Sigma) y con 5 $\mu$ g/ml (20  $\mu$ l) de Hoechst 33248 (Sigma-Aldrich CO; St. Louis) para evaluar la viabilidad espermática y se incubaron por un tiempo de 15 minutos. En este proceso y en los siguientes las laminillas se mantuvieron en una cámara de humedad y en oscuridad. Posteriormente las laminillas se lavaron dos veces con PBS, se fijaron de nuevo con 20 $\mu$ l de paraformaldehído durante quince minutos previo a un último lavado doble con PBS (5 minutos cada lavado), finalmente se añadió la solución de montaje <sup>[43]</sup>.

Las muestras se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Karl Zeiss, Alemania) con un objetivo de 100x y se contó en cada caso 100 espermatozoides. De acuerdo a la localización de la fluorescencia se clasificó en cuatro diferentes patrones de tinción: tipo I no reaccionado; tipo II no reaccionado; tipo III reaccionado (línea ecuatorial) y tipo IV reaccionado (ausencia de acrosoma), así como el porcentaje de viabilidad para cada una de las muestras <sup>[44, 45]</sup>.

**5.8 Morfología espermática.** En los eyaculados que presentaron coágulo y fracción líquida se llevaron a cabo dos evaluaciones morfológicas: una a la fracción líquida y otra al coágulo ya diluido después de agregarle tripsina, con los eyaculados que no presentaron fracción líquida solo se llevó a cabo la última evaluación. Se utilizó un microscopio de contraste de fases (Kart Zeiss Axiostar ®) en el objetivo 100x. Se colocaron 10µl de la mezcla de semen con 10µl de tinción eosina-nigrosina (E-N) y se realizó un frotis en el cual se evaluaron 100 espermatozoides por duplicado clasificándolos con el siguiente criterio: a. Defectos de la cabeza; b. Defectos de pieza media; c. Defectos de cola d. Presencia de gota citoplasmática y e. Formas normales (Figura 2, ver anexos). Con la tinción de eosina-nigrosina también evaluamos la viabilidad de los espermatozoides, la coloración de los espermatozoides es rosa y los espermatozoides vivos permanecen blancos. La evaluación de la viabilidad y la morfológica se llevó a cabo con cada uno de los tratamientos <sup>[19, 42]</sup>.

**5.9 Análisis estadístico.** Todos los datos fueron expresados como la media  $\pm$  DE y fueron sometidos a un análisis de varianza (Dunnett) para determinar diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos. El análisis se realizó con el programa estadístico de GraphPad Instat.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Colección de semen

Se realizaron 18 electroeyaculaciones en 7 monos araña (cuadro 10.1, ver anexos). Se utilizó un rango voltaje entre 1 y 9 volts, sin embargo 17 muestras (94.44%) fueron obtenidas con menos de 5 volts y sólo 1 eyaculado (5.56%) se obtuvo con un voltaje mayor a 5 sin superar los 9 volts. Todas las muestras obtenidas tuvieron espermatozoides y sólo una de ellas tuvo contaminación con orina.

### 6.2 Número total de eyaculados (Características de las muestras)

Se obtuvo un total de 18 eyaculados con las siguientes características:

**Cuadro 3. Obtención de los eyaculados y descripción de sus partes (fracción líquida y coágulo)**

Individuo	Eyaculado	Características de la muestra
I	1	Coágulo y fracción líquida
	2	Coágulo y fracción líquida
	3	Todo el eyaculado fue líquido (fracción líquida)
II	4	Coágulo y fracción líquida
	5	Coágulo y fracción líquida
	6	Coágulo y fracción líquida
III	7	Coágulo y fracción líquida
	8	Coágulo y fracción líquida
	9	Coágulo y fracción líquida
IV	10	Coágulo y fracción líquida
	11	Coágulo y fracción líquida
	12	Coágulo y fracción líquida
V	13	Eyaculado desechado contaminado con orina
	14	Coágulo y fracción líquida
VI	15	Coágulo y fracción líquida
	16	Coágulo y fracción líquida
VII	17	Coágulo y fracción líquida
	18	Coágulo y fracción líquida

Por lo tanto:

- 83.33% de las muestras presentaron un coágulo y una fracción líquida.
- 5.55% de las muestras presentaron sólo coágulo.
- 5.55% de las muestras se contaminó con orina y
- 5.55% de las muestras sólo presentó fracción líquida.

El coágulo contaminado con orina se desechó y el eyaculado del cual se obtuvo solo la FL se evaluó como las otras fracciones líquidas, esto da un total de 16 coágulos y 16 fracciones líquidas evaluadas. Cabe señalar que la cantidad de fracción líquida obtenida fue, en promedio menor a los 40µl.

### **6.3 Características seminales de la población de monos cautivos**

Uno de los objetivos del presente trabajo fue describir las características espermáticas de un grupo de 7 monos araña (*Ateles geoffroyi*) en cautiverio, los cuadros 4, 5, 6, 7, 8 (ver cuadros) muestran el número de muestras obtenidas, los promedios y la desviación estándar de los valores obtenidos para cada una de las pruebas realizadas a los eyaculados de los siete machos evaluados.

### **6.4 Tiempo de dilución**

El tiempo que cada fracción se tardó en disolver fue el siguiente:  $994.18 \pm 844.08$  minutos para el grupo control (0% de tripsina),  $507.07 \pm 564.33$  minutos el tratamiento con 0.1% de tripsina,  $32.25 \pm 13.95$  minutos el tratamiento con 1.0% de tripsina y  $21.25 \pm 10.58$  minutos el tratamiento con 5.0% de tripsina (Figura 3). Cabe señalar que algunas muestras del grupo control y del tratamiento con 0.1% de tripsina no se diluyeron después de 30 horas y se desecharon.

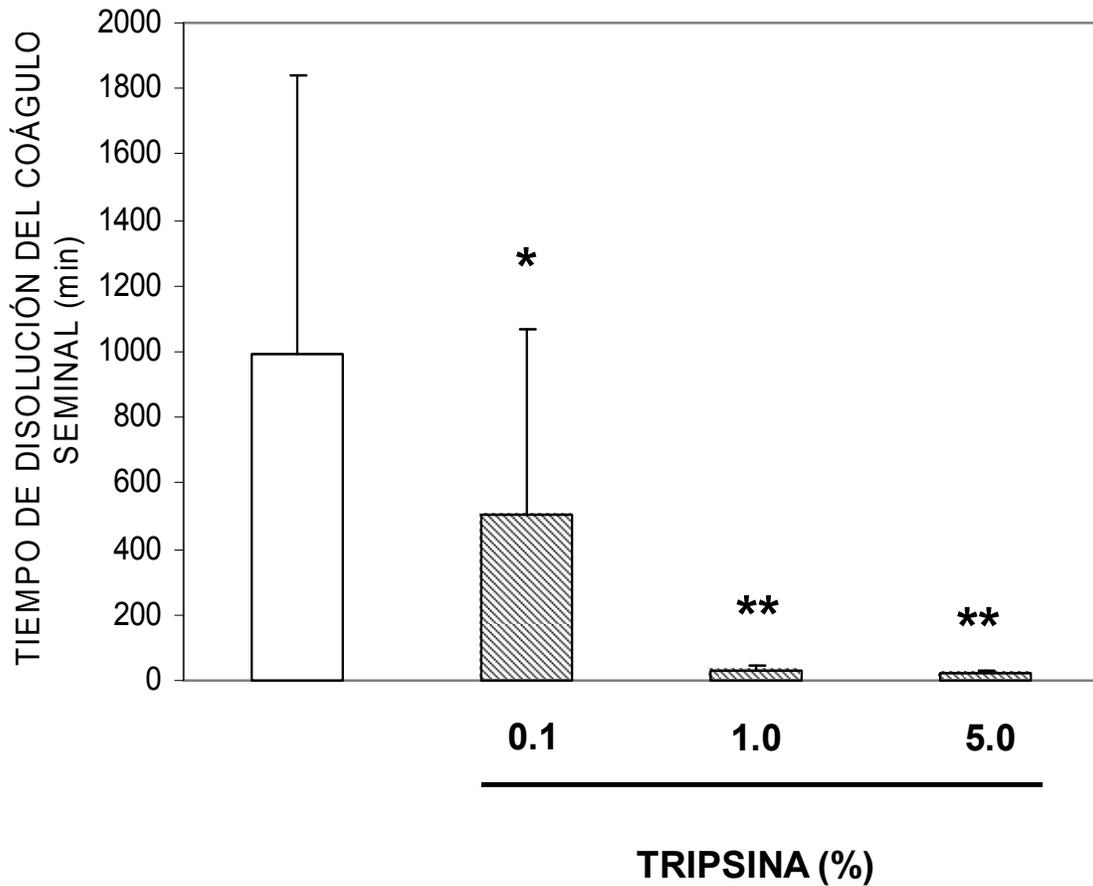


Figura 3. Tiempo de dilución del coágulo seminal, cada columna representa la concentración de tripsina de cada tratamiento (\* $p=0.05$ , \*\* $p=0.01$ ).

## 6.5 Características del eyaculado

### 6.5.1 Volumen

No fue posible obtener el volumen de las muestras debido a que, al ser sólido no se puede medir en mililitros.

Con la muestra ya en forma líquida se midieron los mililitros de cada una de las fracciones de coágulo evaluadas, se realizó una diferencia con la tripsina y el PBS añadido a cada una de las fracciones y este se tomó como volumen por fracción.

Existieron 8 fracciones (6 del grupo control y 2 del tratamiento con 0.1% de tripsina) que no se diluyeron en las 30 horas posteriores a la eyaculación y se desecharon, debido a esto no se pudo obtener el volumen total de 6 eyaculados.

Cabe señalar que el volumen que se obtuvo de fracción líquida fue de 30-60 $\mu$ l, cantidad suficiente para evaluar solamente el pH y realizar el frotis para morfología y viabilidad.

### **6.5.2 Potencial de Hidrógeno (pH)**

Se evaluó el potencial hidrógeno (pH) de los eyaculados sólo con la fracción líquida de los mismos, obteniendo un valor promedio de  $7.97 \pm 0.54$  (n= 16).

### **6.5.3 Motilidad espermática**

La motilidad obtenida para la fracción líquida fue de  $55.6 \pm 36.06\%$ , para el grupo control fue de  $10.1 \pm 26.54\%$  y para los tratamientos con tripsina (0.1, 1.0 y 5.0%) fue de  $15.29 \pm 21.52\%$ ,  $40.12 \pm 30.27\%$  y  $30.44 \pm 19.36 \%$  respectivamente (Cuadro 9).

### **6.5.4 Concentración espermática**

La concentración obtenida para el grupo control fue de  $57.73 \pm 32.55$  millones/ml, para el tratamiento con 0.1% de tripsina fue de  $69.54 \pm 68.91$  millones/ml, para el tratamiento con 1.0% de tripsina fue de  $33.29 \pm 25.02$  millones/ml y para el tratamiento con 5% de tripsina fue de  $33.32 \pm 26.77$  millones/ml. (Cuadro 9).

### **6.5.5 Viabilidad espermática**

La evaluación de la viabilidad finalmente se realizó con la tinción eosina-nigrosina (Figura 4, ver anexos). Para la fracción líquida la viabilidad fue de  $47.88 \pm 36.77\%$ , para el grupo control fue de  $29.1 \pm 37.6\%$ , para el tratamiento con 0.1% de tripsina fue de  $46.5 \pm 27.84\%$ , para el tratamiento con 1.0% de tripsina fue de  $70.78 \pm 17.27\%$  y para el tratamiento con 5.0% de tripsina fue de  $72.5 \pm 17.62\%$ . (Cuadro 9).

### 6.5.6 Morfología espermática

Se detectó que existía una cantidad de espermatozoides incompletos en las muestras ya que se encontraron las cabezas separadas de las colas, por lo que se calculó el porcentaje de espermatozoides completos en cada muestra. El porcentaje de espermatozoides completos para la fracción líquida fue de  $97.46 \pm 2.75\%$ , para el grupo control fue de  $85.45 \pm 10.15\%$ , para el tratamiento con 0.1% de tripsina fue de  $72.4 \pm 21.76\%$ , para el tratamiento con 1.0% de tripsina de  $55.81 \pm 15.73\%$  y para el de 5.0% de tripsina de  $55.91 \pm 18.17\%$  de espermatozoides completos entre si (Cuadro 9).

**Cuadro 9. Determinación del tiempo de dilución, porcentaje de motilidad, concentración, viabilidad e integridad espermática después de la incubación a diferentes tratamientos de tripsina.**

	FL	% Tripsina			
		0 (n=11)	0.1 (n=15)	1.0 (n=16)	5.0 (n=16)
Tiempo de dilución (min)	-	994.18±844.08	507.07±564.33*	32.25±13.95**	21.25±10.58**
Motilidad (%)	(n=5) 55.6±36.06**	(n=10) 10.1±26.54	(n=14) 15.29±21.52	(n=16) 40.12±30.27*	(n=16) 30.44±19.36
Concentración (millones/ml)	-	(n=10) 57.73±32.55	(n=15) 69.54±68.91	(n=16) 33.29±25.02	(n=16) 33.32±26.77
Viabilidad (%)	(n=13) 47.88±36.77	(n=11) 29.09±37.6	(n=15) 46.5±27.84	(n=16) 70.78±17.27**	(n=16) 72.5±17.62**
Integridad (%)	(n=12) 97.46±2.75	(n=11) 85.45±10.15	(n=15) 72.4±21.76	(n=16) 55.81±15.73**	(n=16) 55.91±18.17**

Fracción Líquida (FL). Número de muestras obtenidas por cada ensayo (n). Los datos en cada caso están representados como la media  $\pm$  DE / Anova con Dunnett contra 0%, \*p<0.05, \*\*p<0.01.

#### 6.5.6.1 Defectos de cabeza

Los porcentajes para los defectos de cabeza fueron los siguientes: para la fracción líquida fue de  $0.62 \pm 0.98\%$ , para el grupo control fue de  $1.82 \pm 5.08\%$ , para el tratamiento con 0.1% de tripsina fue de  $1 \pm 2.37\%$ , para el tratamiento con 1.0%

de tripsina fue de  $0.44 \pm 1.28\%$  y para el tratamiento con 5.0% de tripsina fue de  $0.91 \pm 1.52\%$  (Cuadro 10) (Figura 5 A, ver anexos).

#### **6.5.6.2 Defectos de pieza media**

Los porcentajes para los defectos de pieza media fueron los siguientes: para la fracción líquida fue de  $3.87 \pm 4.04\%$ , para el grupo control fue de  $3.59 \pm 2.08\%$ , para el tratamiento con 0.1% de tripsina fue de  $3.2 \pm 2.24\%$ , para el tratamiento con 1.0% de tripsina fue de  $2.91 \pm 2.23$  y para el tratamiento con 5.0% de tripsina fue de  $2.78 \pm 2.53\%$  (Cuadro 10) (Figura 5 B, ver anexos).

#### **6.5.6.3 Defectos de flagelo**

Los porcentajes para los defectos de flagelo fueron los siguientes: para la fracción líquida fue de  $25.75 \pm 22.35$ , para el grupo control fue de  $40.45 \pm 16.57$ , para el tratamiento con 0.1% de tripsina fue de  $38.83 \pm 12.60$ , para el tratamiento con 1.0% de tripsina fue de  $40.06 \pm 15.87$  y para el tratamiento con 5.0% de tripsina fue de  $34.59 \pm 14.81$  (Cuadro 10) (Figura 5 C, ver anexos).

#### **6.5.6.4 Presencia de gota citoplasmática**

Los porcentajes para la presencia de gota citoplasmática fueron los siguientes: para la fracción líquida fue de  $0.17 \pm 0.32\%$ , para el grupo control fue de  $0.09 \pm 0.2\%$ , para el tratamiento con 0.1% de tripsina fue de  $0.7 \pm 0.99\%$ , para el tratamiento con 1.0% de tripsina fue de  $1.03 \pm 1.53\%$  y para el tratamiento con 5.0% de tripsina fue de  $1.75 \pm 2.09\%$  (Cuadro 10) (Figura 5 D, ver anexos).

#### **6.5.6.5 Espermatozoides normales**

Los porcentajes para los espermatozoides normales fueron los siguientes: para la fracción líquida fue de  $69.58 \pm 23.46\%$ , para el grupo control fue de  $54.04 \pm 19.05\%$ , para el tratamiento con 0.1% de tripsina fue de  $56.27 \pm 14.84\%$ , para el

tratamiento con 1.0% de tripsina fue de  $55.56 \pm 16.53\%$  y para el tratamiento con 5.0% de tripsina fue de  $59.97 \pm 16.45\%$  (Cuadro 10) (Figura 5 E, ver anexos).

**Cuadro 10. Efecto de la tripsina sobre las características morfológicas de los espermatozoides.**

Clasificación Morfológica	FL (n=12)	% Tripsina			
		0 (n=11)	0.1 (n=15)	1.0 (n=16)	5.0 (n=16)
Problemas cabeza	$0.62 \pm 0.91$	$1.82 \pm 5.08$	$1 \pm 2.37$	$0.44 \pm 1.28$	$0.91 \pm 1.52$
Problemas pieza media	$3.87 \pm 4.04$	$3.59 \pm 2.08$	$3.2 \pm 2.24$	$2.91 \pm 2.23$	$2.78 \pm 2.53$
Problemas flagelo	$25.75 \pm 22.35$	$40.45 \pm 16.57$	$38.83 \pm 12.60$	$40.06 \pm 15.87$	$34.59 \pm 14.81$
Gota citoplasmática	$0.17 \pm 0.33$	$0.09 \pm 0.20$	$0.7 \pm 0.99$	$1.03 \pm 1.53$	$1.75 \pm 2.09^{**}$
Espermatozoides Normales	$69.58 \pm 23.46$	$54.04 \pm 19.04$	$56.27 \pm 14.84$	$55.56 \pm 16.53$	$59.97 \pm 16.45$

Fración líquida (FL). Número de muestras obtenidas para cada ensayo (n). Los datos en cada caso están representados como la media  $\pm$  DE. / Anova con Dunnett \*\*  $p \leq 0.01$

### 6.5.7 Reacción acrosomal y viabilidad espermática por fluorescencia

Con el fin de estandarizar la prueba de reacción acrosomal con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y optimizar recursos, se realizaron tinciones (anteriores a las de mono araña) con espermatozoides de humano (*Homo sapiens*) y de chimpancé (*Pan troglodytes*). En el humano se muestran diferentes categorías del acrosoma (Figura 6 B, ver anexos), podemos observar un acrosoma intacto y una línea ecuatorial (categoría I y III), esta última categoría la observamos también en la muestra de chimpancé.

Al evaluar las muestras de mono araña con la tinción de isotiocianato de fluoresceína (FITC) se observó una pérdida de fluorescencia de manera rápida, esto impidió la correcta evaluación del acrosoma. Se logró obtener imágenes representativas de la tinción espermática en donde se pueden observar las diferentes etapas de la reacción acrosomal (Figura 7 y 8, ver anexos).

Al evaluar las laminillas teñidas con Hoechst se tuvieron problemas para observar la tinción ya que no se logró obtener una imagen teñida de los núcleos de las células espermáticas por lo que no se pudo evaluar por este método la viabilidad.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Electroeyaculación

La colección de semen por medio de electroeyaculación ha sido utilizada de manera exitosa en el mono araña por <sup>[34, 35]</sup> y por Rodas <sup>[36, 40]</sup>. Estos autores han obtenido muestras normales y aspérmicas, así como la contaminación con orina de algunas de las muestras, (como ocurrió sólo con uno de los eyaculados de este estudio) las cuales se obtuvieron con voltajes menores a 10 volts al igual que en el presente trabajo. A diferencia de los reportes anteriores, todos los eyaculados obtenidos en este estudio presentaron espermatozoides. En este caso el método de electroeyaculación que fue utilizado es considerado exitoso.

### 7.2 Características seminales de la población

La formación de un coágulo posterior a la eyaculación ha sido descrito en diversas especies de primates del viejo y nuevo mundo como el mono ardilla, mono capuchino de cuernos y mono araña <sup>[2, 12, 24-26, 32, 34, 36]</sup>. En el presente estudio se presentó una fracción líquida que acompaña al coágulo en casi la totalidad de las muestras (94.44%), la cantidad obtenida fue pequeña (40-60  $\mu$ l), también se presentó un eyaculado con fracción líquida sin coágulo. Sin embargo es importante mencionar que este individuo presentó dos muestras anteriores un mes y tres meses antes en donde si existió la presencia de un coágulo. La ausencia del coágulo en algunos eyaculados de mono araña en la Ciudad de México, ya ha sido descrita por Hernández-López y cols. en 2008 <sup>[46]</sup>, en donde se menciona incluso que existe una asociación entre la frecuencia de emisión del coágulo seminal y la época del año, señalando que durante la época seca (Noviembre-Mayo) el coágulo seminal se presenta con mayor frecuencia que en la época de lluvias (Junio-Octubre) siendo que en época de lluvias la frecuencia de eyaculados con y sin coágulo seminal es similar. Cabe señalar que la época de secas también se relacionó con mayor concentración espermática y fertilidad en las hembras, la cual se evaluó con citología vaginal exfoliativa.

Todas las muestras del presente estudio se obtuvieron en la época de lluvias, y a pesar de que se asocia la época del año con un incremento en la emisión de coágulos, esto no quiere decir que no exista la posibilidad de obtener semen líquido sin coágulo en las dos épocas del año, lo que indica que obtener una muestra líquida es normal para los monos araña en la Ciudad de México.

A pesar de lo anteriormente descrito no se descarta que la ausencia de coágulo sea un artefacto de las electroeyaculaciones, además hay que tomar en cuenta las condiciones en las que se tienen a los animales estudiados ya que no se encuentran en la misma temperatura, altitud, etc., como estarían si los animales se encontraran en libertad.

### **7.3 Tiempo de dilución**

La concentración de tripsina añadida es directamente proporcional al tiempo de dilución del coágulo seminal ya que a mayores concentraciones de tripsina se obtuvo una velocidad de dilución más rápida, lo que beneficia las características de motilidad y viabilidad. El no añadir tripsina a las muestras ocasionó incluso que muestras del grupo control no se diluyeran, impidiendo la evaluación de sus características espermáticas.

Los tiempos de dilución obtenidos en el presente estudio para los tratamientos con 1.0% y 5.0% de tripsina son mayores al reportado por Hernández-López y cols. [34] y por Rodas <sup>[36]</sup>. Hay que mencionar que, en el caso de Hernández-López y cols. [34], añadió una dilución de 0.25% de tripsina al coágulo seminal, el cual no se diluyó completamente y en el caso de Rodas <sup>[36]</sup> se obtuvo una dilución total más rápida aunque añadió una concentración de 10% de tripsina a sus muestras.

Hay que aclarar que si bien ambas autoras reportan utilizar la tripsina a esas concentraciones (0.25 y 10%) pudiera esperarse que la concentración final de tripsina al semen sea menor a la que reportan debido a la dilución de una cantidad fija de tripsina (200  $\mu$ l) <sup>[36]</sup> sobre un volumen de semen que pudo ser mayor o menor en la muestra obtenida. En el presente estudio se duplicó desde el stock la concentración de tripsina (0.2%, 2.0% y 10.0%) ya que se quería obtener una

dilución en la muestra final de 0.1, 1.0 y 5.0% una vez realizada la dilución de una parte del semen con una parte del stock de tripsina.

Desafortunadamente no se pudo obtener una dilución exacta 1:1 de semen con tripsina debido a que el volumen de la muestra no se obtuvo de manera líquida sino que se obtuvo de un coágulo que se tuvo que partir en fracciones similares para llegar a poner una parte de coágulo con una de tripsina, sin embargo fue lo más aproximado posible para obtener una dilución final del stock de 1:1 de tripsina con el semen.

Otro aspecto que pudo influir en el tiempo de dilución es que, en el presente estudio no se llevó a cabo una agitación permanente de la muestra cuando se encontraba en el baño María, ésta sólo se realizó cada 5 minutos, a diferencia de lo reportado por Hernández-López y cols. en 2002 <sup>[34]</sup> donde si se llevó a cabo una agitación permanente de la muestra cuando estaba en el baño María lo cual puede suponer una acción más efectiva sobre las cadenas polipeptídicas específicas donde la tripsina rompe estos enlaces (grupo Carboxilo con Arginina y Lisina).

Incluso la agitación ha sido descrita como un método útil para la dilución del coágulo seminal <sup>[24, 34]</sup>.

Con base en los resultados de este trabajo se puede asegurar que los tratamientos con 1.0% y 5.0% de tripsina son buenas opciones para llevar a cabo la dilución del coágulo seminal en periodos de tiempo que permitan mantener una buena motilidad y viabilidad espermática.

## **7.4 Características del eyaculado**

### **7.4.1 Volumen**

Como se mencionó anteriormente, el volumen en mililitros (ml) de las muestras evaluadas no pudo reportarse debido a dos circunstancias, la primera fue que algunas fracciones se desecharon al no lograrse la dilución total del coágulo, por esto no se tuvo un registro completo del volumen de cada una de las fracciones de cada uno de los eyaculados, la segunda es que, como la mayor parte del eyaculado es un coágulo, el fraccionar la muestra para los diferentes tratamientos

impidió evaluar satisfactoriamente su volumen por lo que una opción sería el obtener el volumen en  $\text{cm}^3$  y no en ml. a través de pesar y medir las muestras.

Otra opción para reportar el volumen del semen de mono araña es la utilizada por Rodas <sup>[36]</sup> en la cual se necesita esperar la completa dilución de la muestra con enzimas proteolíticas y ya diluida la muestra, restar la cantidad de enzima añadida para obtener el volumen de la muestra seminal.

Para estudios posteriores sugerimos que, si se quiere la dilución total del coágulo, se almacenen las fracciones que tardan más de 30 horas en diluirse para poder obtener el volumen total de todas las partes del coágulo. Sin embargo esto impactará la motilidad y viabilidad de manera importante como ya se mencionó anteriormente.

#### **7.4.2 Potencial de Hidrógeno (pH)**

Las muestras presentaron un pH ligeramente alcalino, no obstante, el valor es menor al reportado por Rodas con semen de la misma especie <sup>[36]</sup> ( $8.68 \pm 0.57$ ). Sin embargo es parecido al pH reportado para otras especies de primate de nuevo mundo como el mono aullador (*Alouatta caraya*) por Valle y cols. <sup>[47]</sup> el cual fue de  $8.1 \pm 0.5$  con un rango de 6.5 a 9.0. En varias especies de primates, incluidos los de nuevo mundo, algunas situaciones de estrés y la intensidad y frecuencia de los estímulos eléctricos se han reportado como que pueden influir sobre la composición del eyaculado al afectar las secreciones de las glándulas accesorias <sup>[48]</sup>. Se conoce que las secreciones de estas glándulas amortiguan entre sí el pH del semen a través de la producción de fructosa, ácido cítrico, prostaglandinas, fibrinógeno, ion citrato, calcio, ion fosfato, profibrinolisisina, etc. y probablemente se puede asociar a la estimulación eléctrica con una mayor secreción de alguna de las glándulas accesorias debido a la profundidad y/o posición de la sonda rectal con la que se llevó a cabo la electroeyaculación <sup>[47, 49]</sup>.

#### **7.4.3 Motilidad espermática**

Los porcentajes de motilidad obtenidos en el presente estudio fueron más bajos que los reportados por Hernández-López y cols. <sup>[34, 35]</sup> y por Rodas <sup>[36, 40]</sup> sin

embargo hay que tomar en cuenta que el criterio que se maneja en esta investigación para evaluar la motilidad solo incluyó las categorías de motilidad progresiva rápida y progresiva lenta, excluyendo la motilidad no progresiva. La fracción líquida presentó el mejor porcentaje de motilidad que los tratamientos, obteniendo valores cercanos al 80% en algunos individuos, similares a los reportados por Hernández-López y cols. [34, 35]. La motilidad del grupo control fue baja ya que las muestras tardaron varias horas en diluirse y las muestras se mantuvieron por un tiempo prolongado en baño María. Si comparamos los tratamientos y el grupo control con la fracción líquida, la motilidad disminuyó en todos los casos. Es importante tomar en cuenta que las desviaciones estándar que presentan todos los tratamientos son altas lo que indica gran variación en la población, esto podría deberse a la edad de los ejemplares. Más del 50% de los monos evaluados son mayores de 20 años y se encuentran en el último tercio de su vida, lo que da como resultado que probablemente haya habido coágulos con características espermáticas de menor calidad que otras. En la fracción líquida y el tratamiento con 1.0% de tripsina existe una diferencia estadística significativa en relación con el grupo control, esto se debe al incremento de la motilidad que presentan estos dos tratamientos. El bajo porcentaje de motilidad no se puede relacionar solo con la tripsina, probablemente se deba al tiempo prolongado que pasa la muestra en el baño María lo que afecta la viabilidad y motilidad de los espermatozoides. Por todo esto podemos decir que el tratamiento con 1.0% es una opción factible para obtener el semen diluido afectando lo menos posible la motilidad. No podemos tomar como opción a la fracción líquida porque la cantidad es muy reducida.

#### **7.4.4 Concentración espermática**

En el presente estudio no se obtuvo la concentración de la fracción líquida debido a la poca cantidad de la muestra, sin embargo es un reservorio de espermatozoides y al diluirse habrá la posibilidad de hacer una evaluación objetiva de la concentración espermática del mismo [10].

Las concentraciones que se obtuvieron en el grupo control y en el tratamiento con 0.1% de tripsina son parecidas a las reportadas por Hernández-López [34, 50] pero

menores a la obtenida por Rodas <sup>[36]</sup>. No obstante la concentración obtenida puede ser suficiente para realizar un inseminación artificial en primates, tal y como lo reportan <sup>[51]</sup> con marmosetas orejas de algodón cuyas suspensiones contenían de 39 a 73 millones de espermatozoides por ml.

Las concentraciones obtenidas en los tratamientos con 1.0% y 5.0% de tripsina fueron menores a las concentraciones del grupo control y del tratamiento con 0.1% de tripsina. No existen diferencias estadísticas en ninguno de los tratamientos.

#### **7.4.5 Viabilidad espermática**

Los porcentajes que presentan mas espermatozoides vivos son los que contienen mayor cantidad de tripsina (1.0% y 5.0%), estos porcentajes son similares a los encontrados por Hernández-López y cols. <sup>[34, 35]</sup> en especímenes de la misma especie, también con Smithwick y cols. <sup>[52]</sup> en chimpancés y con Valle y cols. <sup>[47]</sup> con monos aulladores. Esto podría ser un indicativo de que el tiempo de exposición a la tripsina en estos dos tratamientos no altera la viabilidad de las células, las cuales se expusieron a menor concentración de enzima comparado con Rodas <sup>[36]</sup> y que se obtuvo una dilución completa del coágulo y no una dilución parcial comparado con Hernández-López <sup>[34, 35]</sup>.

Podemos asegurar que el tiempo que tarda el coágulo en diluirse tiene un impacto directo sobre la viabilidad y la motilidad.

Por otra parte, el adicionar la tripsina en concentraciones de 1.0 y 5.0% tuvo un resultado estadísticamente significativo mejorando la viabilidad en comparación con el grupo control. Una explicación puede ser el tiempo que pasó el grupo control en el baño María (hasta 24 horas) comparado con el que pasaron los tratamientos con 1.0% y 5.0% de tripsina (media hora en promedio), la prolongada permanencia del grupo control disminuyó la viabilidad de los espermatozoides.

Otra opción aplicable para el incremento significativo de la viabilidad con 1.0 y 5.0% de tripsina tiene que ver con los criterios de evaluación de las muestras ya que siempre se contaron 100 células completas por duplicado teñidas y no teñidas, nunca se contaron cabezas sueltas (las cuales incrementaron en el

tratamiento con 5.0% de tripsina). Suponemos que la tripsina causó la ruptura de los espermatozoides de manera indiscriminada <sup>[24, 31]</sup>, sin embargo pudo ser mayor la cantidad de espermatozoides muertos a los que haya atacado la tripsina en comparación con los espermatozoides vivos y esto ocasionó que, al evaluar la viabilidad se incrementara el porcentaje de espermatozoides vivos teniendo diferencias significativas entre este tratamiento y el grupo control.

#### **7.4.6 Morfología espermática**

Los tratamientos que tenían mayor cantidad de tripsina (1.0% y 5.0%) presentaron menor cantidad de espermatozoides completos. Lo cual se puede asociar al daño que la enzima hace a las células tal y como lo reportan Marson y cols. en 1988 y 1989 <sup>[24, 31]</sup> se presenta una ruptura entre la cabeza y el flagelo de los espermatozoides de chimpancé por la adición de tripsina. La fracción líquida fue la que presentó la mayor cantidad de espermatozoides completos (no se expuso a la enzima ni al tiempo de incubación). Existe una diferencia estadísticamente significativa de los tratamientos con 1.0% y 5.0% en relación con el grupo control lo cual nos conduce a pensar lo siguiente: 1) si se compara al grupo control (al cual no se le añadió tripsina) con los tratamientos con tripsina se asume que esta última está causando la ruptura de los espermatozoides y, por esto se presenta una diferencia significativa. 2) Aunque el grupo control no se expuso a la enzima presento un porcentaje menor al de la fracción líquida, con lo que asumimos que en el tiempo prolongado que permanece la muestra en el baño María también está causando la ruptura de las células.

Las anormalidades morfológicas encontradas en las fracciones líquidas de semen de mono capuchino de cuernos (*Cebus apella*) duplican, en porcentaje, a las anormalidades de las fracción líquida evaluadas en este estudio (30%) <sup>[49]</sup>. Sin embargo son muy parecidos a los reportados por Barnabe y cols. (2003) para el semen no coagulado de mono aullador (*Alouatta caraya*) en el que reportan un 33% de anormalidades. Rodas <sup>[36]</sup> reporta, en fracción líquida de *Ateles geoffroyi* un 60% de anormalidades morfológicas.

En relación con las anomalías morfológicas reportadas de coágulos diluidos con tripsina podemos observar que, en el presente estudio, no hubo diferencia estadística significativa con ninguno de los tratamientos en lo que respecta a anomalías en cabeza, pieza media y flagelo. No así para la presencia de gota citoplasmática en la cual se reporta una diferencia estadística significativa entre el grupo control y el tratamiento con 5.0% de tripsina ( $p=0.016$ ). La gota citoplasmática es un remanente del citoplasma germinal, mucho del cual fagocitan las células de Sertoli, este remanente se adhiere a la región del cuello de la espermátide cuando se encuentra en el testículo durante la espermatogénesis normal. En muchas ocasiones la presencia de gota citoplasmática se asocia con problemas de fertilidad en humanos y ratones <sup>[53]</sup>. Investigadores como, Kato S y cols. <sup>[53]</sup>, reportan que la gota citoplasmática puede eliminarse de los espermatozoides de verraco y cabra si se centrifuga la muestra. Probablemente la diferencia estadística observada para el tratamiento con 5.0% de tripsina en semen de monos araña se debió a la rápida dilución del coágulo seminal, lo cual promovió que parte del citoplasma que formaba parte del coágulo queda adherido a la parte anterior de las células.

Los porcentajes de anomalías totales encontradas en el presente estudio (40-45%) para muestras diluidas con tripsina son menores a los que reporta Rodas en 2005 <sup>[36]</sup> para animales de la misma especie (63%) y Hernández-López y cols. <sup>[35]</sup>, pero parecidos a los que reporta también Hernández-López y cols. <sup>[34]</sup> (35%) en individuos de la misma especie. Es importante señalar que los espermatozoides descabezados se contabilizaron independientemente de las anomalías comúnmente observadas por considerarse un efecto secundario a la adición de tripsina al coágulo seminal.

La causa de la morfología anormal de la cabeza, pieza media y cola no está clara. Se ha sugerido que esto pueda ocurrir durante la espermatogénesis (anomalías primarias) o que puedan aparecer durante la maduración post testicular (anomalías secundarias) <sup>[54]</sup>. Independientemente de esto también se pueden ocasionar problemas morfológicos durante el manejo y manipulación de los espermatozoides (elaboración de laminillas, incubación, exposición a

enzimas proteolíticas -tripsina-). La presencia de espermatozoides con cola corta puede deberse a la ruptura de las células espermáticas pero, en lugar de desprenderse la cabeza de la pieza media y cola, se desprendió la cola permaneciendo unidas la pieza media y la cabeza.

Se sugiere hacer estudios posteriores para evaluar el daño a nivel molecular que está causando la tripsina sobre los espermatozoides. El realizar un estudio que incluya la evaluación ultraestructural de la célula nos da una visión más amplia del daño que realmente provoca la enzima. Dentro de este estudio posterior puede evaluarse también el tamaño de las cabezas de los espermatozoides para saber si hay algún cambio significativo que a simple vista no pueda ser evaluado.

#### **7.4.7 Reacción acrosomal y viabilidad por fluorescencia**

El no haber obtenido resultados satisfactorios en la evaluación de la viabilidad con la tinción de Hoechst no significa que esta forma de evaluar no funcione para los espermatozoides de mono araña. Las evaluaciones de la viabilidad con la tinción de Hoechst no se llevaron a cabo en este estudio debido a la falta de una estandarización de la dilución y al uso de filtros inadecuados.

La evaluación de la reacción acrosomal con isotiocianato de fluoresceína no se realizó de la mejor manera, ya que es una de las tinciones más sensibles al desgaste con luz normal, aparte el lugar donde se debe llevar a cabo la evaluación debe ser oscuro y frío. Se sugiere realizar en estudios posteriores tinciones con Clortetraciclina para evaluar la reacción acrosomal.

## 8. CONCLUSIONES

El método de electroeyaculación utilizado en el presente estudio resultó exitoso para la especie *Ateles geoffroyi*. Se recomienda su utilización para futuros manejos en los cuales no se pueda llevar a cabo una colecta de semen con condicionamiento operante y/o vagina artificial y comparar la calidad seminal y espermática de las muestras obtenidas con estos métodos y con electroeyaculación.

Los tratamientos con mayor concentración de tripsina (1.0 y 5.0%) fueron inversamente proporcionales al tiempo de dilución, esto quiere decir que tardaron menos tiempo en diluir el coágulo seminal. Exponer menos tiempo los espermatozoides a la tripsina disminuye de manera considerable los problemas la mortalidad espermática, además de mejorar la motilidad. En contraste, la inclusión de concentraciones altas de tripsina (1.0 y 5.0%) incrementan la ruptura celular que se da a nivel de cabeza y flagelo. Se sugiere, en estudios posteriores llevar a cabo la dilución del coágulo con 1.0 y 5.0% de tripsina y agitar las muestras de manera continua, evaluar el tiempo de dilución y la morfología para saber si se puede evitar o disminuir la ruptura de las células.

Es probable que la presencia de gota citoplasmática sea un artefacto provocado por las adherencias del plasma seminal al momento de diluir la muestra de manera rápida. Para evitar esto se sugiere centrifugar las muestras cuando éstas terminaron de diluirse.

Los tratamientos que sugerimos para llevar a cabo la dilución total del coágulo seminal del mono araña (*Ateles geoffroyi*) son los que contienen 1.0 y 5.0% de tripsina ya que el coágulo tarda menos de 40 minutos en diluirse.

No podemos afirmar que la presencia del coágulo seminal difiera de una estación a otra del año ya que las condiciones medio ambientales que imperan en el distrito federal son diferentes a las observadas en las selvas a las cuales pertenecen los monos araña. Se necesitaría realizar un estudio más amplio para observar las diferentes características seminales de los monos araña durante todo el año.

## 9. LITERATURA CITADA

1. Rodríguez, L.E., O.L. Cortés, and C.J. Martínez, *Estudios Primatológicos en México Vol II*. La contracción y fragmentos de las selvas y las poblaciones de primates silvestres: el caso de los Tuxtlas, Veracruz, ed. A. Estrada and E.R. Coates. 1993, México: Universidad Veracruzana. 25-59.
2. Morrell, J.M. and J.K. Hodges, *Cryopreservation of non-human primate sperm: priorities for future research*. Anim Reprod Sci, 1998. 53(1-4): p. 43-63.
3. SEMARNAT. *Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales*. <http://www.semarnat.gob.mx> [cited Marzo 2006].
4. IUCN. *International Union for Conservation of Nature and Natural Resources* www.iucn.org [cited Enero 2006].
5. CITES. *Especies CITES* www.cites.org [cited Enero 2006].
6. Mittermeier, A.R., et al., *Ecology and Behavior of Neotropical Primates*. The spider monkeys, Genus *Ateles*, ed. van Roosmalen, G.M. Marc, and L.L. Klein. Vol. 2. 1988, Washington, DC: World Wildlife Fund (WWF). 455-537.
7. Gonzáles, S.E., R. Dirzo, and R.C. Vogt, *Historia Natural de los Tuxtlas. Ateles geoffroyi* (mono araña, chango), ed. O. Cortés and L. Rodríguez. 1997, México: UNAM. 616-622.
8. Hernández-López, L., *¿Los monos araña hembra (Ateles geoffroyi) presentan ciclos menstruales o estrales? Elucidación mediante citología vaginal (Tesis de Licenciatura)*, in *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 1995, Universidad Nacional Autónoma de México: México.
9. Silva-López, G., F. García-Orduña, and E. Rodríguez-Luna, *The status of Ateles geoffroyi y Alouatta palliata in disturbed forest areas of Sierra de Santa Marta, México*. Primate Conservation, 1988. 9: p. 53-61.
10. Dixson, A.F., *Primate sexuality: comparative studies of the prosimians, monkeys, apes, and human beings*. 1998: Oxford University Press.
11. Klein, L.L., *Observations on copulation and seasonal reproduction of two species of spider monkeys, Ateles belzebuth and A. geoffroyi*. Folia Primatol (Basel), 1971. 15(3): p. 232-48.

12. Dixson, A.L. and M.J. Anderson, *Sexual selection, seminal coagulation and copulatory plug formation in primates*. *Folia Primatol (Basel)*, 2002. 73(2-3): p. 63-9.
13. Dorus, S., et al., *Rate of molecular evolution of the seminal protein gene SEMG2 correlates with levels of female promiscuity*. *Nat Genet*, 2004. 36(12): p. 1326-9.
14. Ganong, W.F., *Fisiología Médica*. 2005, México: Manual Moderno.
15. Hill, W.C.O., *Primates comparative anatomy and taxonomy*. Vol. 4 Cebidae, Part A. 1960, Edimburgh: University Press.
16. Hill, W.C.O., *Primates comparative anatomy and taxonomy*. Vol. 5, Cebidae, Part B. 1962, Edimburgh: University Press.
17. Tresguerres, J.A.F., et al., *Fisiología Humana*. 2ª ed. Reproducción en el varón, ed. B.G.M.D. Carmen. 1999, España: McGraw-Hill Interamericana.
18. Robert, M. and C. Gagnon, *Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein*. *Cell Mol Life Sci*, 1999. 55(6-7): p. 944-60.
19. Morrow, D.A., *Current therapy in theriogenology*. Semen collection, analysis and cryopreservation in nondomestic mammals, ed. J. Howard, M. Bush, and D.E. Wildt. Vol. 2. 1986, Philadelphia: Saunders.
20. Martínez del Castillo, G. (2006) *Obtención de semen de rinoceronte blanco (Ceratotherium simum simum) mediante condicionamiento operante*. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET ISSN Volume*,
21. VandeVoort, C.A., et al., *Noninvasive semen collection from an adult orangutan*. *Zoo Biology* 1993. 12: p. 257-265.
22. Brown, C.S. and N.M. Loskutoff, *A training program for noninvasive semen collection in captive western lowland gorillas (Gorilla gorilla gorilla)*. *Zoo Biology*, 1998. 17: p. 143-151.
23. Mastroianni, L., Jr. and W.A. Manson, Jr., *Collection of monkey semen by electroejaculation*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1963. 112: p. 1025-7.

24. Marson, J., et al., *Cellular and biochemical characteristics of semen obtained from pubertal chimpanzees by masturbation*. J Reprod Fertil, 1988. 82(1): p. 199-207.
25. Roussel, J.D. and C.R. Austin, *Enzymic liquefaction of primate semen*. Int J Fertil, 1967. 12(3): p. 288-90.
26. Kraemer, D.C. and N.C. Vera Cruz, *Collection, gross characteristics and freezing of baboon semen*. J. Reprod. Fertil, 1969. 20: p. 345-348.
27. Darnell, J., J. Lodish, and D. Baltimore, *Biología Celular y Molecular*. 1993, Barcelona: Omega.
28. Lehninger, A.L., *Bioquímica, las bases moleculares de la estructura y función celular*. 2ª Edición ed. 1978, España Ediciones Omega.
29. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of the Cell*. 3rd edition ed. Garland Publishing. 1994.
30. Denis, L.T., et al., *Freeze preservation of squirrel monkey sperm for use in timed fertilization studies*. Fertil Steril, 1976. 27(6): p. 723-9.
31. Marson, J., et al., *Influence of ejaculation frequency on semen characteristics in chimpanzees (Pan troglodytes)*. J Reprod Fertil, 1989. 85(1): p. 43-50.
32. Hoskins, D.D. and D.L. Patterson, *Prevention of coagulum formation with recovery of motile spermatozoa from rhesus monkey semen*. J Reprod Fertil, 1967. 13(2): p. 337-40.
33. Roussel, J.D. and C.R. Austin, *Preservation of primate spermatozoa by freezing*. J Reprod Fertil, 1967. 13(2): p. 333-5.
34. Hernández-López, L., et al., *Digestion by trypsin enhances assessment of sperm parameters in the black-handed spider monkey (Ateles geoffroyi)*. Lab. Primate Newsletter, 2002. 41(3): p. 4-6.
35. Hernandez-Lopez, L., et al., *Sperm quality differences between the rainy and dry seasons in captive black-handed spider monkeys (Ateles geoffroyi)*. Am J Primatol, 2002. 57(1): p. 35-41.
36. Rodas, M.A.Z., *Estacionalidad en la función testicular de monos araña (Ateles geoffroyi) en condiciones en cautiverio en Catemaco Veracruz*

- México. (Tesis de maestría), in *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2005, Universidad Nacional Autónoma de México México.
37. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática INEGI 1998. *Cuaderno Estadístico Delegación Miguel Hidalgo*.
  38. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática INEGI 1998. *Cuaderno Estadístico Delegación Gustavo A. Madero*.
  39. Kleiman, D.G., et al., *Wild Mammals in Captivity: principles and techniques*. Male Reproduction: Assessment, management and control of fertility, ed. D.E. Wildt. 1996: The University of Chicago Press 429-450.
  40. Rodas, M.A.Z., *Evaluación de la función testicular en mono araña (Ateles geoffroyi) en condiciones de cautiverio en Catemaco Veracruz (Tesis de licenciatura)*, in *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia*. 2002, Universidad Nacional Autónoma de México: México.
  41. Barr, A.B., *Timing of spermatogenesis in four nonhuman primate species*. *Fertility and Sterility*, 1973. 24(5): p. 381-389.
  42. Salud, O.M.d.I., *Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical*. 4<sup>a</sup> ed. 2001: Cambridge: Panamericana
  43. Hector, F.H., et al., *Inhibition of the acrosome reaction (AR) and fertilization capacity of mouse spermatozoa by norethisterone A-ring reduced metabolite (5alpha-NET)*. *Andrologia*, 2005. 37(4): p. 135-42.
  44. Mortimer, D., E.F. Curtis, and R.G. Miller, *Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoon*. *J Reprod Fertil*, 1987. 81(1): p. 127-35.
  45. Mendoza, C., et al., *Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin*. *J Reprod Fertil*, 1992. 95(3): p. 755-63.
  46. Hernandez-Lopez, L., et al., *Seasonal emission of seminal coagulum and in vivo sperm dynamics in the black-handed spider monkey (Ateles geoffroyi)*. *Theriogenology*, 2008. 69(4): p. 466-72.

47. Valle, R.R., et al., *Collection and evaluation of semen from captive howler monkeys (Alouatta caraya)*. Theriogenology, 2004. 62(1-2): p. 131-8.
48. Morrell, J.M., I. Kuderling, and J.K. Hodges, *Influence of semen collection method on ejaculate characteristics in the common marmoset, Callithrix jacchus*. J Androl, 1996. 17(2): p. 164-72.
49. Barnabe, R.C., et al., *Analysis of some normal parameters of the spermogram of captive capuchin monkeys (Cebus apella Linnaeus, 1758)*. Braz. J. vet. Res. Anim. Sci, 2002. 39(6): p. 3311-333.
50. Hernandez-Lopez, L., et al., *Artificial insemination in black-handed spider monkey (Ateles geoffroyi)*. Theriogenology, 2007. 67(2): p. 399-406.
51. Morrell, J.M., et al., *Artificial insemination in Callithrix jacchus using fresh or cryopreserved sperm*. Anim Reprod Sci, 1998. 52(2): p. 165-74.
52. Smithwick, E.B., K.G. Gould, and L.G. Young, *Estimate of epididymal transit time in the chimpanzee*. Tissue Cell, 1996. 28(4): p. 485-93.
53. Kato, S., et al., *Timing of shedding and desintegration of cytoplasmic droplets from boar and goat spermatozoa*. J Reprod Develop, 1996. 42: p. 237-241.
54. Hafez, E.S.E. and B. Hafez, *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7ª Edición ed. 2000, México D.F: McGraw-Hill Interamericana.

## 10. ANEXOS

**Cuadro 1. Identificación y localización de 7 ejemplares de mono araña (*Ateles geoffroyi*) estudiados.**

Identificación de los Individuos	Número Microchip (Avid®)	Localización (Zoológico)	Edad aprox.	Fechas de muestreos
I	024*366*079	Chapultepec	> 10 años	29-Jun-06 18-Sep-06 16-Oct-06 <sup>#</sup>
II	021*290*834	Chapultepec	> 10 años	29-Jun-06 18-Sep-06 16-Oct-06
III	068*068*790	San Juan de Aragón	> 20 años	10-Jul-06 25-Sep-06 23-Oct-06
IV	061*606*316	San Juan de Aragón	> 20 años	10-Jul-06 25-Sep-06 23-Oct-06
V	021*028*797	San Juan de Aragón	> 10 años	11-Sep-06 <sup>†</sup> 10-Oct-06
VI	061*573*111	San Juan de Aragón	> 20 años	11-Sep-06 10-Oct-06
VII	061*544*789	San Juan de Aragón	> 10 años	11-Sep-06 10-Oct-06

<sup>#</sup> El eyaculado que se obtuvo fue completamente líquido; <sup>†</sup> El eyaculado se desechó por estar contaminado con orina.

## Cuadro 2. Registro utilizado en los muestreos

### MUESTRAS PROYECTO TRIPSINA

- DATOS PRELIMINARES

Fecha \_\_\_\_\_  
 Zoológico \_\_\_\_\_  
 Nombre \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_ Peso \_\_\_\_\_ Microchip: \_\_\_\_\_  
 Antecedentes de salud u otros importantes \_\_\_\_\_

- ANESTESIA

Tiletamina-zolacepam dosis de inducción \_\_\_\_\_ Hr. Aplicación \_\_\_\_\_  
 Muestra de sangre \_\_\_\_\_  
 Observaciones \_\_\_\_\_

- ELECTROEYACULACIÓN

Hora de recolección: Inicio \_\_\_\_\_ Fin \_\_\_\_\_. Se dejan 3 minutos entre cada serie y 3 segundos entre cada voltaje.

SERIE I	Estímulo	Voltaje	SERIE II	Estímulo	Voltaje	SERIE III	Estímulo	Voltaje	SERIE IV	Estímulo	Voltaje
1__	1	—	—	1	—	—	1	—	—	—	—
2__	2	—	—	2	—	—	2	—	—	—	—
3__	3	—	—	3	—	—	3	—	—	—	—
4__	4	—	—	4	—	—	4	—	—	—	—
5__	5	—	—	5	—	—	5	—	—	—	—
6__	6	—	—	6	—	—	6	—	—	—	—
7__	7	—	—	7	—	—	7	—	—	—	—
8__	8	—	—	8	—	—	8	—	—	—	—
9__	9	—	—	9	—	—	9	—	—	—	—
10__	10	—	—	10	—	—	10	—	—	—	—
11__	11	—	—	11	—	—	11	—	—	—	—
12__	12	—	—	12	—	—	12	—	—	—	—
13__	13	—	—	13	—	—	13	—	—	—	—
14__	14	—	—	14	—	—	14	—	—	—	—
15__	15	—	—	15	—	—	15	—	—	—	—
16__	16	—	—	16	—	—	16	—	—	—	—
17__	17	—	—	17	—	—	17	—	—	—	—
18__	18	—	—	18	—	—	18	—	—	—	—
19__	19	—	—	19	—	—	19	—	—	—	—
20__	20	—	—	20	—	—	20	—	—	—	—

Observaciones \_\_\_\_\_

EXAMEN MACROSCÓPICO: Vol. del eyaculado \_\_\_\_\_ Vol. tripsina \_\_\_\_\_  
 Fracc. Liq. \_\_\_\_\_ pH \_\_\_\_\_ Morfología I \_\_\_\_\_

• TRIPSINA CONCENTRACIÓN-TIEMPO

Concentraciones de tripsina (%)				
Tiempo licuefacción (min)	0 I	0.1 II	1.0 III	5.0 IV
0				
3				
5				
10				
15				
20				
25				
30				

• ESPERMATOBIOSCOPIA Fracción I (0%)

Densidad (millones/ml) \_\_\_\_\_ Cuenta total (millones) \_\_\_\_\_

MOVILIDAD (%) a) Progresiva rápida \_\_\_ b) Progresiva lenta \_\_\_ c) No progresiva \_\_\_ d) Inmóviles \_\_\_ Índice de movilidad (%) \_\_\_\_\_

MORFOLOGÍA II (%): a) Defecto de cabeza \_\_\_ b) Defecto de pieza media \_\_\_  
 c) Defecto de flagelo \_\_\_ d) Gota citoplasmática \_\_\_ e) Formas normales \_\_\_.

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_

• ESPERMATOBIOSCOPIA Fracción II (0.1%)

Densidad (millones/ml) \_\_\_\_\_ Cuenta total (millones) \_\_\_\_\_

MOVILIDAD (%) a) Progresiva rápida \_\_\_ b) Progresiva lenta \_\_\_ c) No progresiva \_\_\_ d) Inmóviles \_\_\_ Índice de movilidad (%) \_\_\_\_\_

MORFOLOGÍA II (%): a) Defecto de cabeza \_\_\_ b) Defecto de pieza media \_\_\_  
 c) Defecto de flagelo \_\_\_ d) Gota citoplasmática \_\_\_ e) Formas normales \_\_\_.

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_

- ESPERMATOBIOSCOPÍA Fracción III (1%)

Densidad (millones/ml) \_\_\_\_\_ Cuenta total (millones) \_\_\_\_\_

MOVILIDAD (%) a) Progresiva rápida \_\_\_ b) Progresiva lenta \_\_\_ c) No progresiva \_\_\_ d) Inmóviles \_\_\_ Índice de movilidad (%) \_\_\_\_\_

MORFOLOGÍA II (%): a) Defecto de cabeza \_\_\_ b) Defecto de pieza media \_\_\_ c) Defecto de flagelo \_\_\_ d) Gota citoplasmática \_\_\_ e) Formas normales \_\_\_.

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_

- ESPERMATOBIOSCOPÍA Fracción IV (5%)

Densidad (millones/ml) \_\_\_\_\_ Cuenta total (millones) \_\_\_\_\_

MOVILIDAD (%) a) Progresiva rápida \_\_\_ b) Progresiva lenta \_\_\_ c) No progresiva \_\_\_ d) Inmóviles \_\_\_ Índice de movilidad (%) \_\_\_\_\_

MORFOLOGÍA II (%): a) Defecto de cabeza \_\_\_ b) Defecto de pieza media \_\_\_ c) Defecto de flagelo \_\_\_ d) Gota citoplasmática \_\_\_ e) Formas normales \_\_\_.

OBSERVACIONES \_\_\_\_\_

## CARACTERÍSTICAS SEMINALES DE LA POBLACIÓN

### Cuadro 4. Fracción Líquida

INDIVIDUO	No. DE MUESTRAS POR INDIVIDUO	pH	VIABILIDAD % (promedio)		CONCENTRACIÓN	MOTILIDAD				INTEGRIDAD		MORFOLOGÍA				
			Vivos	Muertos		mill/ml	Progresiva rápida	Progresiva lenta	No progresiva	Inmóviles	Completos	Incompletos	Normales	Problemas cabeza	Problemas pieza media	Problemas flagelo
I	2	7,83	75,00	25,00	NE	84,00	2,50	4,50	9,00	99,50	0,50	81,00	0,00	8,50	9,75	0,75
II	3	7,70	0,50	99,50	NE	NE	NE	NE	NE	97,50	2,50	39,00	2,00	5,00	53,50	0,50
III	3	8,30	51,25	48,75	NE	NE	NE	NE	NE	94,50	5,50	73,00	2,00	2,75	22,25	0,00
IV	3	8,23	87,67	12,33	NE	10,00	33,00	44,00	13,00	97,17	2,83	92,50	0,00	1,67	5,83	0,00
V	1	8,10	1,50	98,50	NE	NE	NE	NE	NE	99,50	0,50	48,50	1,00	0,50	50,00	0,00
VI	2	7,65	53,00	47,00	NE	40,00	22,00	26,00	12,00	99,50	0,50	87,00	0,00	2,50	10,50	0,00
VII	2	8,05	26,00	74,00	NE	0,00	0,00	52,00	48,00	96,75	3,25	37,50	0,25	5,50	56,75	0,00
PROMEDIO TOTAL	-	7,98	42,13	57,87	NE	33,50	14,38	31,63	20,50	97,77	2,23	65,50	0,75	3,77	29,80	0,18
DESVEST	-	0,26	34,16	34,16	NE	37,71	15,84	21,10	18,41	1,88	1,88	23,32	0,92	2,73	22,74	0,31

NE: No evaluado. Para cada una de las evaluaciones se contaron 100 células por duplicado.

**Cuadro 5. Grupo Control / 0% de Tripsina**

INDIVIDUO	No. DE MUESTRAS POR INDIVIDUO	pH	VIABILIDAD %		CONCENTRACIÓN	MOTILIDAD				INTEGRIDAD		MORFOLOGÍA				
			Vivos	Muertos		mill/ml	Progresiva rápida	Progresiva lenta	No progresiva	Inmóviles	Completos	Incompletos	Normales	Problemas cabeza	Problemas pieza media	Problemas flagelo
I	2	7,83	2,50	97,50	56,73	0,00	0,00	0,00	100,00	85,00	15,00	43,00	0,00	4,00	52,50	0,50
II	3	7,70	0,00	100,00	6,78	0,00	0,00	0,00	100,00	91,50	8,50	44,50	2,00	6,50	47,00	0,00
II	3	8,30	32,50	67,50	50,80	0,00	5,50	13,00	81,50	71,25	28,75	65,75	0,00	5,25	28,75	0,25
IV	3	8,23	11,50	88,50	92,76	0,00	0,67	17,67	81,67	85,83	14,17	57,33	0,33	3,33	39,00	0,00
V	1	8,10	49,75	99,25	51,93	12,00	73,00	4,00	11,00	98,50	1,50	51,50	0,00	4,00	44,50	0,00
VI	2	7,65	86,00	14,00	54,00	0,00	0,00	61,00	36,00	97,50	2,50	79,00	0,00	0,00	21,00	0,00
VII	2	8,05	32,50	67,50	28,00	0,00	0,00	0,00	100,00	92,00	8,00	43,50	0,00	4,00	52,50	0,00
PROMEDIO TOTAL	-	7,98	30,68	76,32	48,71	1,71	11,31	13,67	72,88	88,80	11,20	54,94	0,33	3,87	40,75	0,11
DESVEST	-	0,26	30,37	30,88	26,57	4,54	27,28	22,03	35,47	9,30	9,30	13,51	0,75	2,01	12,02	0,20

NE: No evaluado. Para cada una de las evaluaciones se contaron 100 células por duplicado.

**Cuadro 6. Tratamiento con 0.1% de Tripsina**

INDIVIDUO	No. DE MUESTRAS POR INDIVIDUO	pH	VIABILIDAD %		CONCENTRACIÓN	MOTILIDAD				INTEGRIDAD		MORFOLOGÍA				
			Vivos	Muertos		mill/ml	Progresiva rápida	Progresiva lenta	No progresiva	Inmóviles	Completos	Incompletos	Normales	Problemas cabeza	Problemas pieza media	Problemas flagelo
I	2	7,83	36,25	63,75	38,07	0,00	0,00	0,00	100,00	86,50	13,50	42,50	0,00	8,00	49,50	0,00
II	3	7,70	30,17	69,83	6,49	0,00	0,00	3,33	96,67	85,67	14,33	47,83	4,67	3,83	42,83	0,83
III	3	8,30	54,00	46,00	39,59	19,50	16,50	27,50	36,50	49,75	41,75	57,25	0,00	1,50	40,00	1,25
IV	3	8,23	61,83	38,17	180,00	0,00	4,67	34,33	61,00	74,83	25,17	73,83	0,17	1,50	24,00	0,50
V	1	8,10	96,00	4,00	144,00	23,00	39,00	4,00	34,00	95,50	4,50	43,00	0,00	3,00	54,00	0,00
VI	2	7,65	35,25	64,75	47,91	0,00	10,50	32,00	57,50	71,25	28,75	65,25	0,00	3,50	31,25	0,00
VII	2	8,05	37,25	62,75	44,01	0,50	22,00	14,00	63,50	56,00	44,00	49,00	0,25	3,00	47,25	0,50
PROMEDIO TOTAL	-	7,98	50,11	49,89	71,44	6,14	13,24	16,45	64,17	74,21	24,57	54,10	0,73	3,48	41,26	0,44
DESVEST	-	0,26	23,22	23,22	64,17	10,37	14,04	14,65	26,05	16,71	14,84	11,88	1,74	2,19	10,55	0,48

NE: No evaluado. Para cada una de las evaluaciones se contaron 100 células por duplicado.

### Cuadro 7. Tratamiento con 1.0% de Tripsina

INDIVIDUO	No. DE MUESTRAS POR INDIVIDUO	pH	VIABILIDAD %		CONCENTRACIÓN	MOTILIDAD				INTEGRIDAD		MORFOLOGÍA				
			Vivos	Muertos		mill/ml	Progresiva rápida	Progresiva lenta	No progresiva	Inmóviles	Completos	Incompletos	Normales	Problemas cabeza	Problemas pieza media	Problemas flagelo
I	2	7,83	56,75	43,25	20,71	35,00	6,50	30,50	28,00	55,50	44,50	59,50	0,00	4,50	33,75	2,25
II	3	7,70	63,33	36,67	5,61	15,00	11,67	18,00	55,33	63,67	36,33	46,33	2,17	5,17	45,67	0,67
III	3	8,30	60,50	39,50	46,31	22,33	9,67	23,67	44,33	47,33	52,67	54,50	0,00	2,67	42,83	0,00
IV	3	8,23	78,50	21,50	53,45	19,67	25,67	23,67	31,00	69,50	30,50	72,17	0,00	1,33	29,00	1,50
V	1	8,10	100,00	0,00	57,00	84,00	0,00	4,00	12,00	77,00	23,00	52,00	0,00	2,00	46,00	0,00
VI	2	7,65	89,25	10,75	55,22	51,83	12,83	13,83	21,50	73,25	26,75	62,08	0,00	1,67	37,50	0,75
VII	2	8,05	83,75	16,25	26,43	4,00	18,00	25,00	53,00	32,75	67,25	30,75	0,00	3,25	66,00	0,00
PROMEDIO TOTAL	-	7,98	76,01	23,99	37,82	33,12	12,05	19,81	35,02	59,86	40,14	53,90	0,31	2,94	42,96	0,74
DESVEST	-	0,26	16,27	16,27	20,19	27,13	8,20	8,76	16,33	15,77	15,77	13,10	0,82	1,45	11,95	0,87

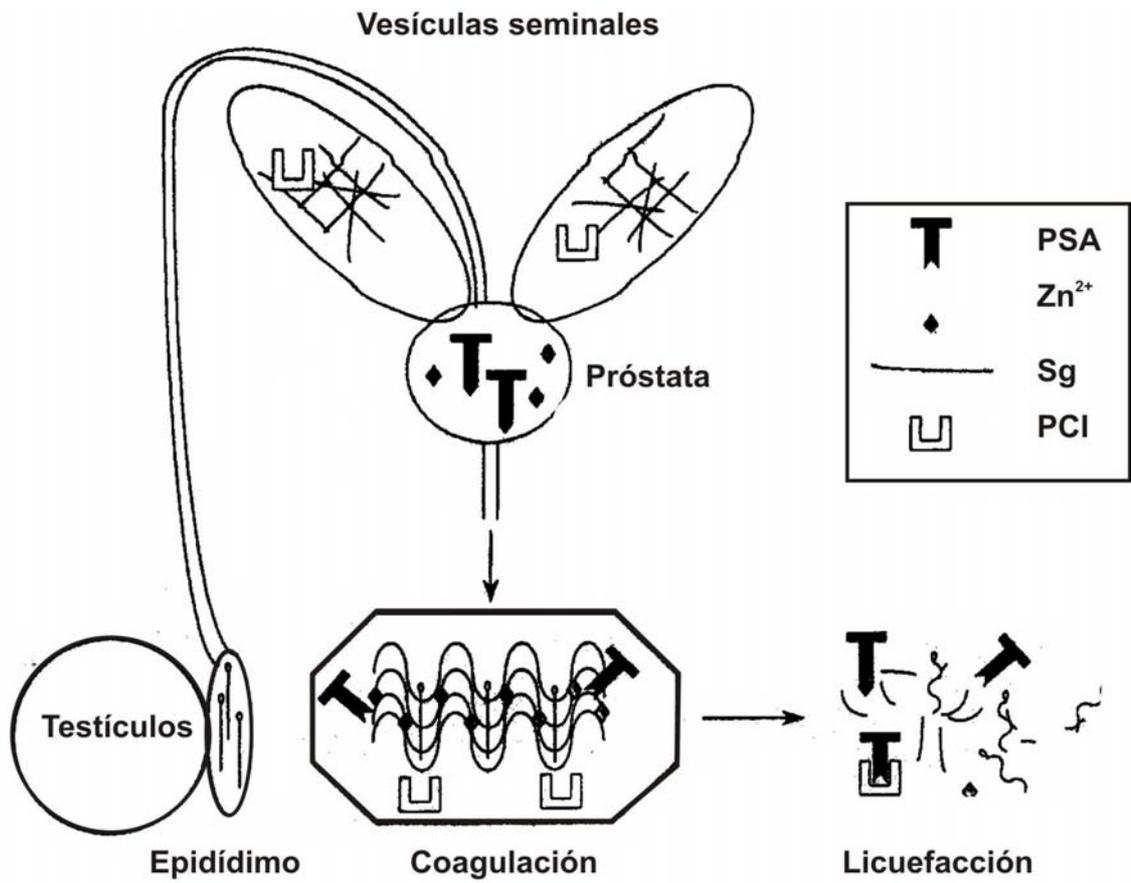
NE: No evaluado. Para cada una de las evaluaciones se contaron 100 células por duplicado.

### Cuadro 8. Tratamiento con 5.0% de Tripsina

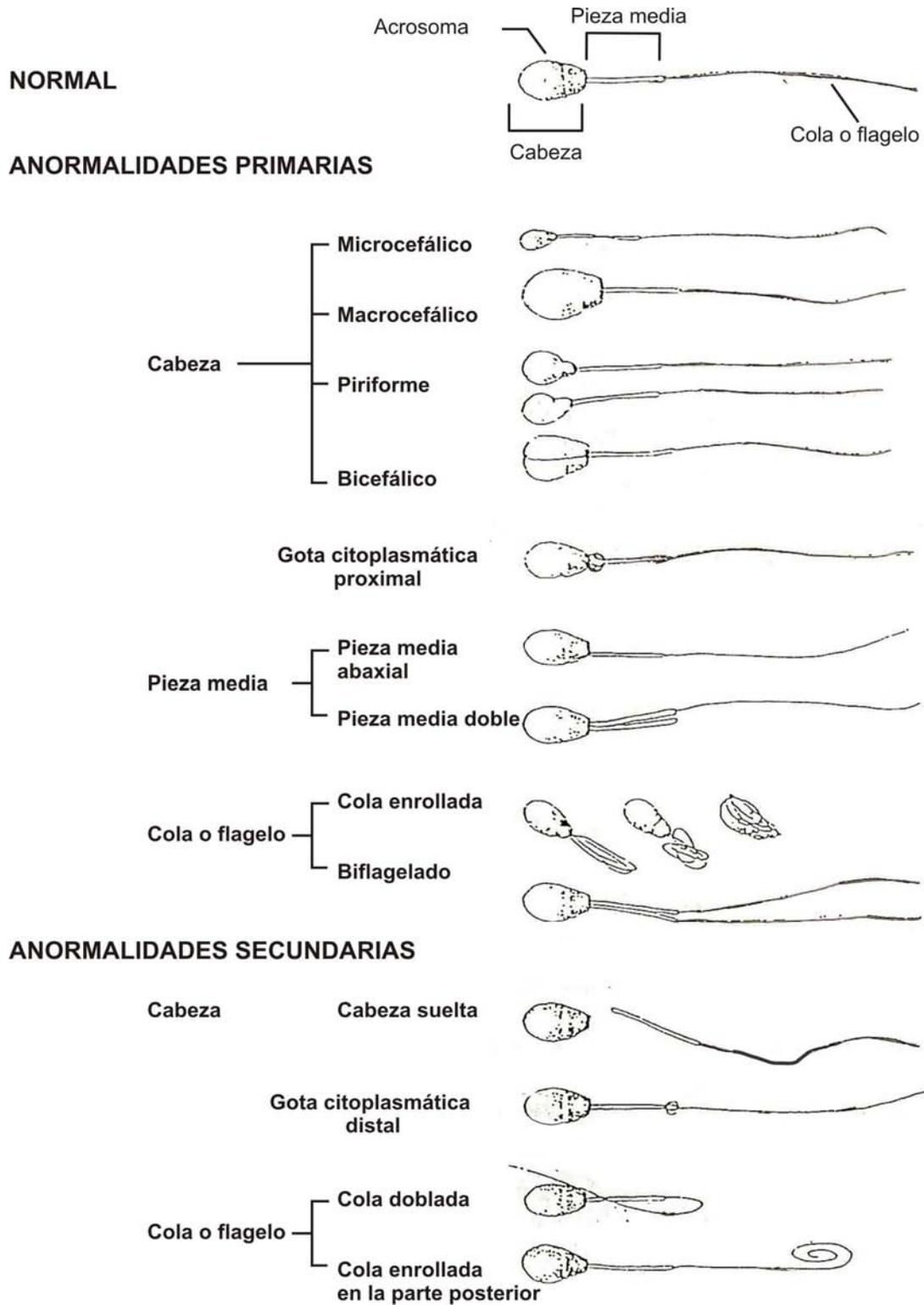
INDIVIDUO	No. DE MUESTRAS POR INDIVIDUO	pH	VIABILIDAD %		CONCENTRACIÓN	MOTILIDAD				INTEGRIDAD		MORFOLOGÍA				
			Vivos	Muertos		mill/ml	Progresiva rápida	Progresiva lenta	No progresiva	Inmóviles	Completos	Incompletos	Normales	Problemas cabeza	Problemas pieza media	Problemas flagelo
I	2	7,83	79,25	20,75	41,62	1,50	18,00	36,00	54,50	59,00	41,00	59,50	0,00	3,75	32,00	4,75
II	3	7,70	78,33	21,67	4,28	1,67	21,33	23,33	53,67	66,67	33,33	57,17	3,33	5,00	32,67	1,83
III	3	8,30	56,17	43,83	33,03	6,00	13,33	23,00	57,67	47,50	52,50	50,83	0,33	2,67	45,17	1,00
IV	3	8,23	62,17	37,83	49,54	12,00	27,33	26,00	35,00	68,17	31,83	78,67	0,33	1,17	17,83	1,50
V	1	8,10	98,00	2,00	73,89	53,00	9,00	23,00	16,00	74,00	26,50	54,50	1,00	1,00	43,50	0,00
VI	2	7,65	92,00	8,00	41,63	2,00	37,50	29,50	31,00	38,25	61,75	58,75	0,50	1,00	38,00	1,75
VII	2	8,05	73,25	26,75	16,09	5,00	26,00	24,00	45,00	39,50	60,50	54,25	0,25	3,75	41,50	0,25
PROMEDIO TOTAL	-	7,98	77,02	22,98	37,15	11,60	21,79	26,40	41,83	56,15	43,92	59,10	0,82	2,62	35,81	1,58
DESVEST	-	0,26	14,95	14,95	22,67	18,63	9,53	4,83	15,23	14,46	14,36	9,13	1,15	1,61	9,41	1,57

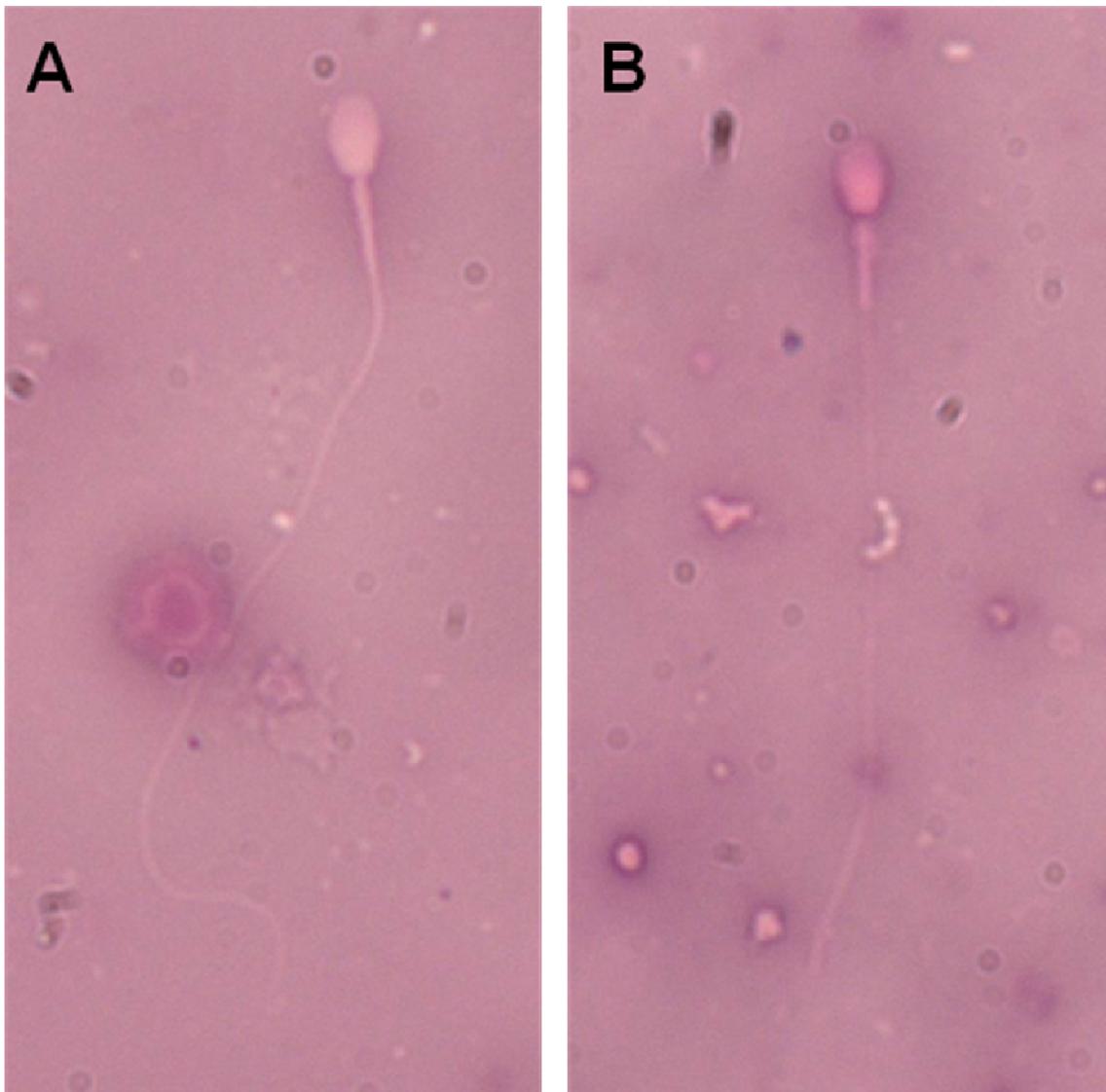
NE: No evaluado. Para cada una de las evaluaciones se contaron 100 células por duplicado.

**Figura 1 Modelo de coagulación y licuefacción del coágulo**  
(Robert M. y Gagnon C. 1999)

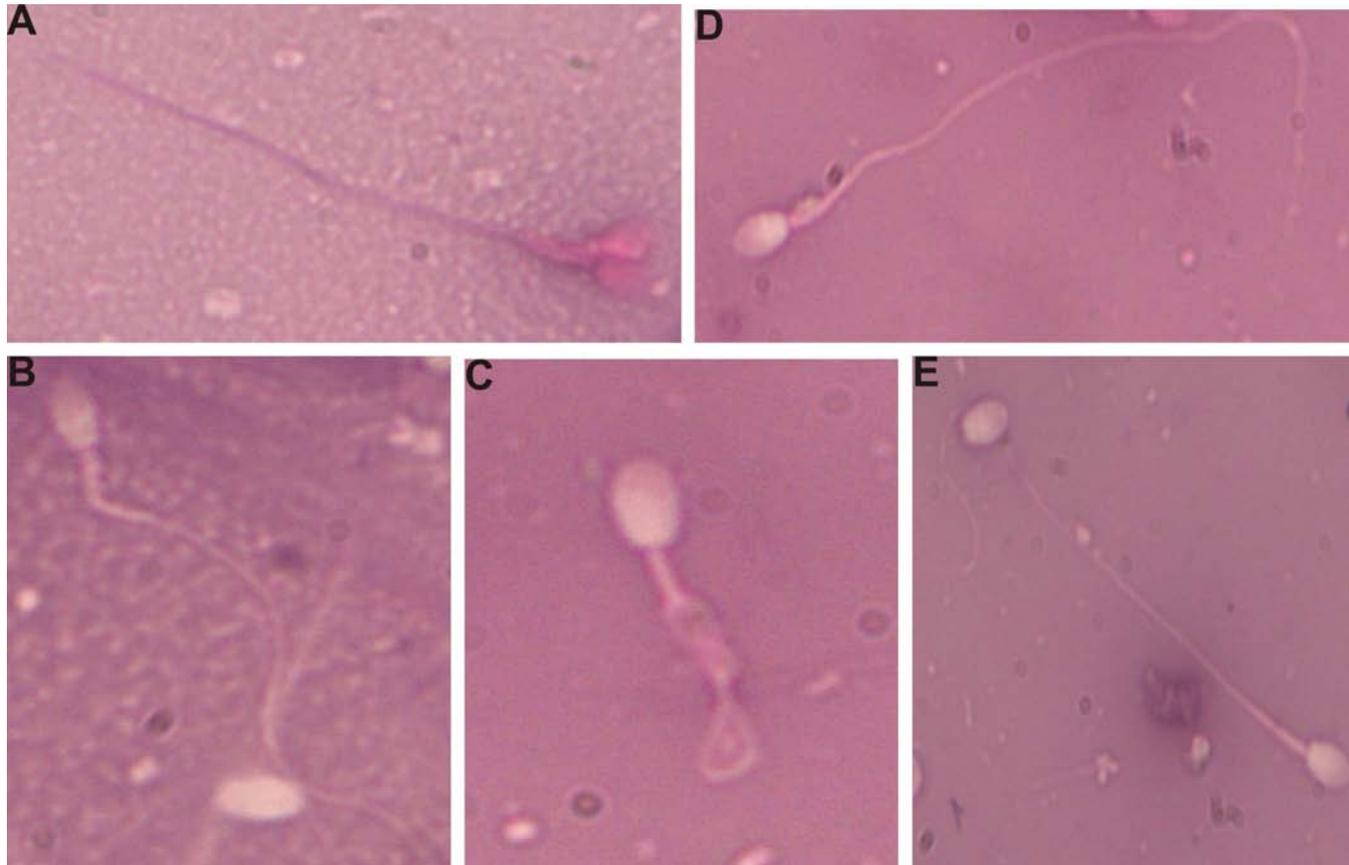


**Figura 2 Clasificación de morfología espermática.**

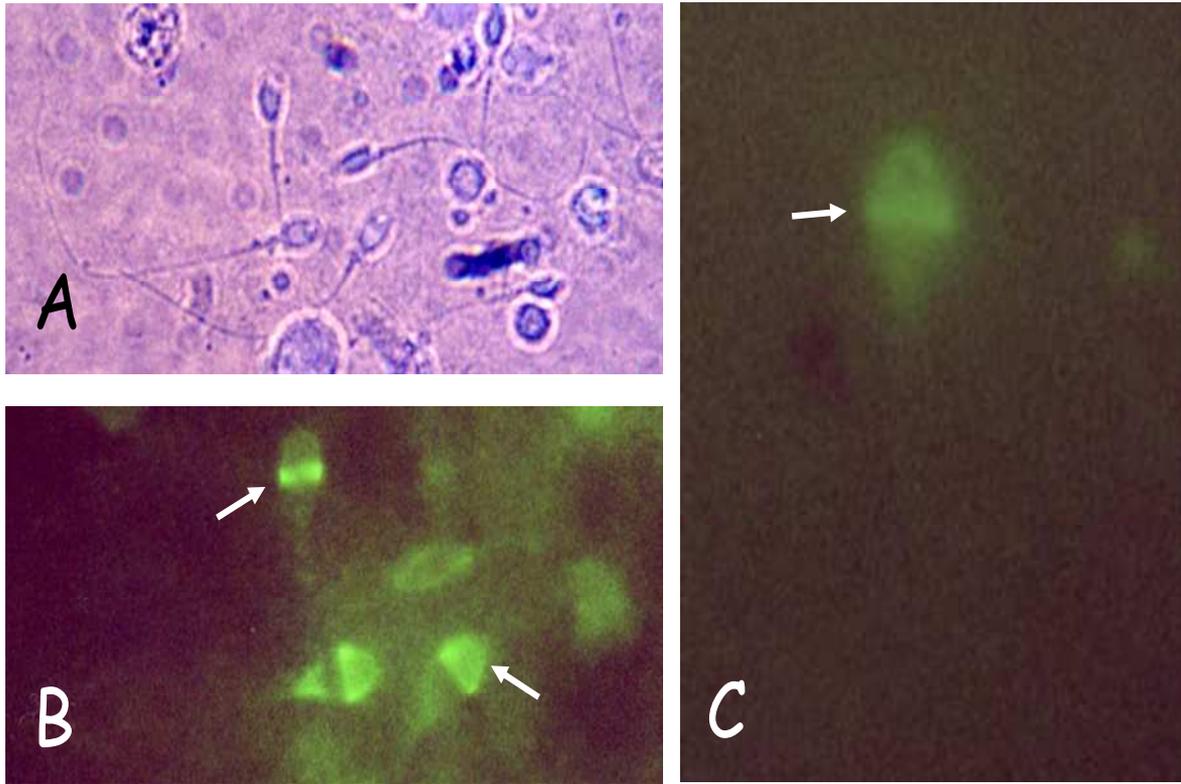




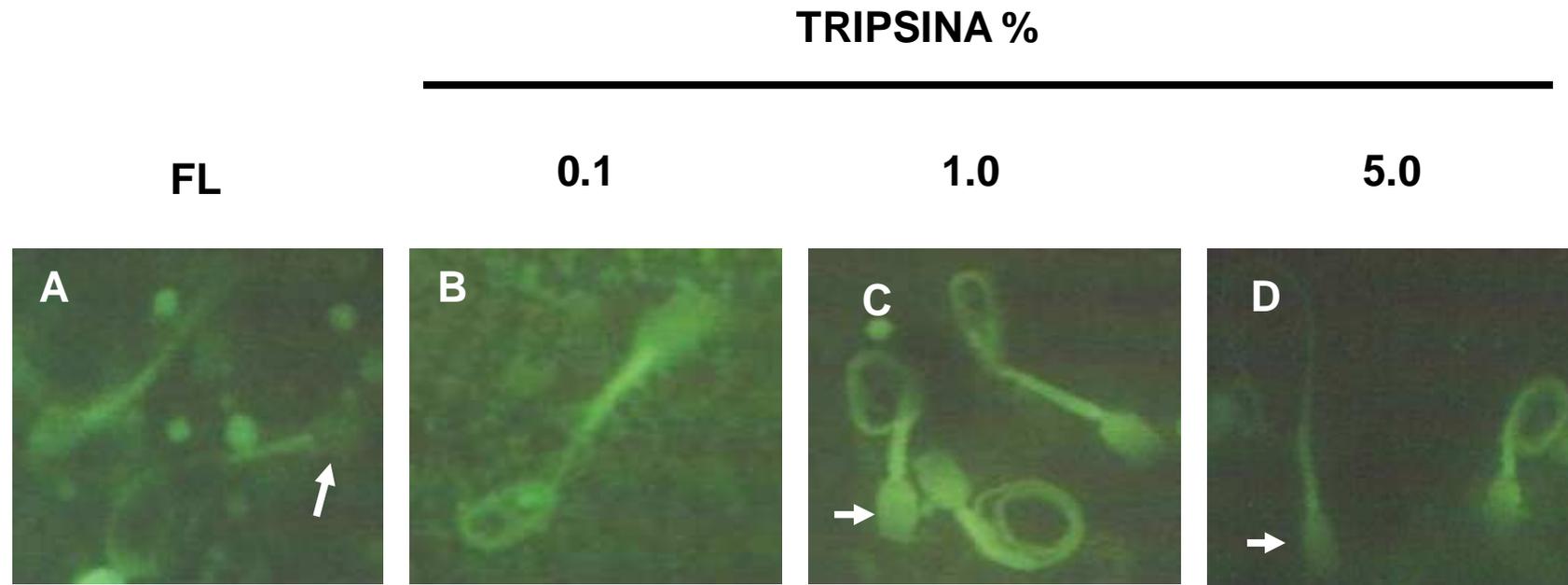
**Figura 4 Espermatozoides vivos y muertos teñidos con Eosina-Nigrosina. A) Espermatozoides vivos, B) Espermatozoides muertos (característica tinción en rosa).**



**Figura 5 Morfología espermática: A) Espermatozoide con doble cabeza; B) Fractura de pieza media; C) Cola enrollada; D) Presencia de gota citoplasmática; E) Espermatozoide normal.**



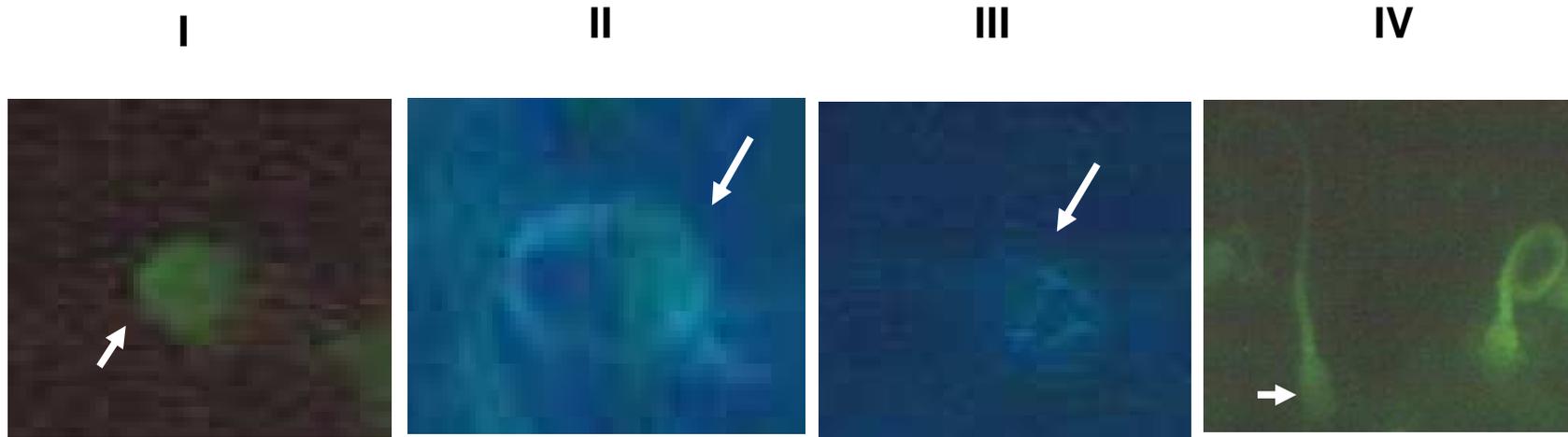
**Figura 6 Estandarización de la tinción FITC-Hoescht en dos espermatozoides de humano y chimpancé.** Espermatozoides de humano en campo claro (A), con tinción FITC-Hoescht (B) y espermatozoides de chimpancé (C), imagen representativa de la reacción acrosomal espermática característica en la porción ecuatorial (flecha).



**Figura 7** Espermatozoides teñidos con FITC de la fracción líquida FL (A) y de los diferentes tratamientos con tripsina: 0.1% (B) 1.0% (C) y con 5.0% (D). Las flechas muestran la ausencia fluorescencia indicando el final de la reacción acrosomal (espermatozoides reaccionados).

## CATEGORIAS DE REACCIÓN ACROSOMAL

---



**Figura 8** Imágenes representativas de espermatozoides de mono araña en fluorescencia con FITC con diferente tipo de reacción acrosomal. Las flechas de las imágenes I y II muestran la presencia de acrosoma teñido (no reaccionados), la flecha de la imagen III presenta una reacción ecuatorial (reaccionado) y la flecha de la imagen IV muestra una ausencia de acrosoma (reaccionado).

**EXPOSICIONES REALIZADAS CON EL PRESENTE TRABAJO**



Parque Xcaret, Quintana Roo, México

**XXIV**   
**congreso AZCARM**  
XCARET - QUINTANA ROO 2007



La Asociación de Zoológicos, Criaderos y Acuarios de México A.C.  
Ogala Presente

# Constancia

*M. PMZ Beyanira C. Acuña*

Por su participación como CONFERENCISTA  
En el XXIV Congreso AZCARM 2007  
Parque Xcaret, Quintana Roo  
15 al 18 de Octubre de 2007

  
Fernando Gual Sill  
Presidente  
AZCARM

  
Eduardo Briones Moch  
Gerente General  
Parque Xcaret



Asociación Mexicana de Primatología, AC.  
 Instituto de Investigaciones Antropológicas  
 Universidad Nacional Autónoma de México



Acuña Hernández D. G.

Coautores: Rodas Martínez A. Z., Flores Herrera H. y Rivera Rebolledo A.

Por este medio me permito agradecerle su invaluable participación como ponente en el Tercer Congreso Mexicano de Primatología, llevado a cabo en el Instituto de Investigaciones Antropológicas (IIA) de la Universidad Nacional Autónoma de México, del 24 al 26 de octubre del 2007.

Con la ponencia titulada:

Evaluación de la *tripsina* en la *dilución* del coagulo *seminal* y sus *efectos* sobre los *espermatozoides* en el mono araña (*Ateles geoffroyi*)

Sin otro particular y esperando contar con su participación en eventos futuros organiza dos con la Asociación Mexicana de Primatología, A.C. - por el Instituto de Investigaciones Antropológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Atentamente,

Dra. CELINA  
 ANAYA HUERTAS

Presidenta de la AMPAC

Dra. ROSALÍA  
 PASTOR-NIETO

Secretaria de la AMPAC

Mtra. DIANA  
 PUTAS NERI

Tesora de la AMPAC

Dr. CARLOS  
 SERRANO SÁNCHEZ

Director del IIA-UNAM



Extienden la presente

# Constancia

a: **Deyanira Acuña Hernández**

Por su participación como **Ponente** en el Taller

***'Evaluación de la Conducta Socio-sexual y Fisiología Reproductiva del Mono Araña de Manos Negras (Ateles geoffroyi) en cautiverio mediante métodos no invasivos'***

México, D.F., a 9 de noviembre del 2007.

Lic. Martha Delgado Pechta

Presidenta del Subcomité Mado de Capacitación en la Secretaría del Medio Ambiente



MVZ M.Sc. Fernando Guad Sill

Director General de Zoológicos y Vida Silvestre