

11281  
16



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

EL USO DE ALGUNOS METODOS DE REPRODUCCION  
ASISTIDA EN MONOS ARAÑA  
(*ATELES GEOFFROYI*) PARA ACELERAR EL  
TIEMPO DE SU REPRODUCCION EN CAUTIVERIO

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
PRESENTA

LEONOR ESTELA HERNANDEZ LOPEZ

Tutores:  
Dr. Horacio Merchant Larios  
Dra. Martha León Olea  
Dr. Vicente Díaz Sánchez

MEXICO. D. F.

2003

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



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.

A Ricardo, mi maestro, mi amigo, mi gran amor,  
por su infinito apoyo y comprensión.  
Por supuesto a ustedes dos pequeños, quienes  
han tenido que compartirme con la ciencia.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Agradecimientos**

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. Horacio Merchant quien a pesar de no haber estado en cada paso de este trabajo, siempre supo motivarme para alcanzar la meta... es mi ejemplo a seguir.

A Ana Lilia por su apoyo, sus consejos y sobretodo esas horas de plática que siempre fueron enriquecedoras para mi trabajo.

A Lilian, a mi mamá y a Myriam (mamá) porque en los momentos en los que yo tuve que trabajar en mi proyecto ellas estuvieron con mis hijos y lo hicieron como si fuera yo misma

A mi buen amigo Octavio quien desde un principio me brindó su apoyo y su experiencia.

A Susana y Clara de la Facultad de Veterinaria porque siempre han mostrado interés por este proyecto.

A Gerardo Cerezo quien dedicó mucho tiempo a enseñarme a hacer las espermatobioscopias.

Al Dr. Santiago Aja de la Facultad de Veterinaria por su ayuda en la disección y descripción anatómica.

A mis padres y hermanos por su cariño incondicional y la gran ayuda que nos brindaron mientras estuvimos en Alemania.

A Penny, Nicole y Andreas, por todo lo que me enseñaron durante mi estancia en el DPZ.

A Raúl del Instituto Nacional de Psiquiatría por las ilustraciones de los ciclos.

Este trabajo se llevó acabo gracias al apoyo del Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente" en particular al Departamento de Etología

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# Índice

<b>1. EL ESTUDIO DE LA FISIOLÓGIA DE LA REPRODUCCIÓN DEL MONO ARAÑA (ATELES GEOFFROY)</b>	<b>6</b>
<b>2. HEMBRAS</b>	<b>11</b>
<b>Fisiología reproductiva</b>	<b>11</b>
<i>Ciclos ováricos</i>	11
<i>Ciclos uterinos</i>	14
<i>Ciclo menstrual de la mona araña</i>	15
<i>Endocrinología de la reproducción</i>	16
<i>Objetivo general</i>	17
<i>Objetivos particulares</i>	17
Material y métodos	18
<i>Sujetos e instalaciones</i>	18
<i>Cuantificación de estrona y progesterona en heces</i>	18
<i>Colección de heces</i>	19
<i>Extracción de metabolitos hormonales a partir de heces</i>	19
Resultados	20
Discusión	23
<b>Descripción anatómica del tracto reproductor femenino de la mona araña</b>	<b>25</b>
<i>Laparoscopia</i>	25
<i>Procedimiento</i>	25
Resultados	26
<i>Descripción anatómica del tracto reproductor femenino de la mona araña</i>	26
Discusión	27
<b>Inseminación artificial</b>	<b>29</b>
<i>Procedimiento</i>	30
Resultados	31
Discusión	31
<b>3. MACHOS</b>	<b>34</b>
<b>Fisiología reproductora</b>	<b>34</b>
<i>Producción espermática</i>	34
<i>Conducta copulatoria</i>	35
<i>Inervación de los órganos sexuales</i>	36
<i>Función sexual masculina</i>	37
<i>El mono araña macho</i>	38

4

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Objetivos	39
<i>Objetivos secundarios</i>	39
Material y métodos	40
<i>Sujetos e instalaciones</i>	40
<i>Electroyaculación</i>	40
<i>Espermatobioscopia</i>	41
<i>Congelación de semen</i>	44
Resultados	44
<i>Electroyaculación y espermatobioscopia</i>	44
<i>Congelación de semen</i>	48
Discusión	49
<b>4. MARMOSETA COMÚN (CALLITHRIX JACCHUS )</b>	<b>51</b>
<b>Criopreservación del semen de la marmoseta común (<i>Callithrix jacchus</i>)</b>	<b>52</b>
Introducción	52
Material y métodos	53
<i>Sujetos</i>	53
<i>Colección de semen</i>	54
<i>Análisis computarizado (CASA)</i>	55
Resultados	55
<b>Comparación de los efectos entre el Percoll y el PureSperm en el semen de la marmoseta común (<i>Callithrix jacchus</i>)</b>	<b>56</b>
Introducción	56
Material y métodos	57
<i>Tratamientos</i>	57
<i>Análisis estadístico</i>	57
Resultados y discusión	58
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>62</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>76</b>

## 1. El estudio de la fisiología de la reproducción del mono araña (*Ateles geoffroyi*)

---

Actualmente, los estudios referentes a la biología de la reproducción, han tenido avances importantes en campos muy concretos como: la biología molecular, la bioingeniería, la biología celular y la genética, entre otros. Sin embargo, la investigación en aspectos fisiológicos generales no debe desmerecer por el desarrollo de esas otras ciencias, pues la comprensión cabal de cualquier fenómeno, parte siempre desde sus aspectos más generales.

En otra vertiente, cabe señalar que las características reproductivas de una especie dada, están íntimamente ligadas a su entorno físico y social (Emlen y Oring, 1977). Por eso, aun cuando la fisiología de la reproducción parte de los mismos mecanismos neuroendocrinos y anatómicos en todas las especies de mamíferos hasta ahora estudiadas, merece la pena ahondar en el estudio de aquellos animales que hasta el momento no se conocen bien.

Los monos araña son animales que sobreviven con facilidad en cautiverio, se adaptan favorablemente a los cambios de dieta, resisten a los parásitos y en general a las enfermedades infecciosas (observaciones personales). Sorprendentemente, estos primates son extremadamente difíciles de reproducir en cautiverio, aun cuando se les mantenga en condiciones aparentemente óptimas. No obstante, se han dado casos en que, en situaciones desfavorables (hacinamiento, mala alimentación, clima frío), estos primates se han reproducido. Ante esta evidencia la pregunta es: ¿de qué depende que estos animales se reproduzcan o no en cautiverio?

Se sabe que algunos factores ambientales, tales como la abundancia de los recursos alimenticios, afectan la reproducción de las especies estacionales (como el mono rhesus: Southwick, *et al.* 1965; el mono ardilla: Jarosz, *et al.* 1977) y en algunos casos aún la de las no estacionales (babuino hamadrias: Melnick y Pearl). Sin embargo, como señalan Ziegler y col. (2000), hasta el momento no se han lle-

vado a cabo trabajos en primates en los que se evalúe la actividad ovárica con respecto al abasto de alimento. Se ha observado que en la India, por ejemplo, los langures hanumanes (*Presbytis entellus*) que viven cerca de las poblaciones humanas y que son alimentados constantemente, presentan mayor número de nacimientos en determinadas épocas, pero se reproducen a lo largo de todo el año. Contrariamente, esa misma especie de langures, cuando habita alejada de los asentamientos humanos, limita su reproducción a solamente las épocas del año en las que los recursos alimenticios son abundantes (Ziegler, 2000).

Otro factor que está íntimamente ligado a la reproducción es el fotoperiodo, el cual ha sido estudiado exhaustivamente, especialmente en especies domésticas (Knobil y Hotchkiss, 1988). Se sabe que la proporción de horas luz/oscuridad regula la actividad hipotalámica por vía de los fotorreceptores retinales que están ligados al núcleo supraquiasmático del hipotálamo y a la glándula pineal. Aunque se ha demostrado que aun cuando la influencia del fotoperiodo es determinante para la regulación reproductiva, si se mantiene experimentalmente a los animales por periodos prolongados de luz o de oscuridad (*free running*), al cabo de un tiempo éstos vuelven a ciclar normalmente, aunque no de manera sincronizada (Knobil y Hotchkiss, 1988).

Por otra parte, el estrés provocado por el número de individuos hacinados e inclusive la proporción de hembras y machos, así como el espacio asignado, pueden ser factores que interfieran con la reproducción. El estrés promueve la liberación de péptidos opioides responsables de la supresión de la liberación de las hormonas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH), por efecto de la inhibición hipotalámica de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Dixon, 1998). Dado que la actividad ovárica está regulada por las gonadotropinas LH y FSH, la supresión de ambas hormonas evita el desarrollo folicular y la liberación de los ovocitos maduros en las hembras. En los machos la LH y la FSH son responsables de la síntesis de testosterona y ésta a su vez promueve la conducta copulatoria y la espermatogénesis en el macho, la inhibición de la GnRH disminuye ambos eventos (Dixon, 1998).



Tomando en consideración las reflexiones anteriores, el hecho de que una especie no se reproduzca obliga a los investigadores a adentrarse en el estudio de las relaciones entre el entorno social y físico, la neuroendocrinología y la conducta, pues de estos factores depende la reproducción exitosa de los individuos (Bercovich, 1987).

Este trabajo está enfocado a describir las características generales de la fisiología de la reproducción del mono araña de manos negras (*Ateles geoffroyi*), una especie popularmente conocida, pero de la que, paradójicamente, se sabe muy poco sobre sus aspectos biológicos.

En 1935 Goodman y Wisloki describieron por primera vez los sangrados periódicos, similares a los menstruales, en dos monas araña de esta especie. Después de ese trabajo, las monas araña no habían vuelto a ser estudiadas desde esa perspectiva, los estudios que se llevaron a cabo con estos animales se concentraron en sus relaciones ecológicas (véase como ejemplo la excelente y completa revisión de Van Rosemalen y Klein, 1988). Más de 60 años después, en 1998 nuestro grupo describió el ciclo menstrual de esta especie con referencia a los cambios en la citología vaginal exfoliativa y las variaciones hormonales séricas de 17  $\beta$ -estradiol y progesterona (Hernández-López *et al.* 1998).

Por otra parte, un hecho que resulta interesante señalar brevemente, es que las monas araña presentan ciclos menstruales y no estrales como se describen en muchas primates del Nuevo Mundo (Knobil y Hotchkiss, 1988; Saltiel, 1988). Asimismo, el mono araña posee un sistema de apareamiento muy peculiar, conocido como de comunidad, que solamente comparte con el chimpancé y por lo que MacFarland en 1986 y Robinson y Jonson en 1987 postularon, dada su lejanía filogenética (Fig. 1), como un paralelismo socioecológico entre ambas especies, lo que hace su estudio aún más interesante desde otras perspectivas.

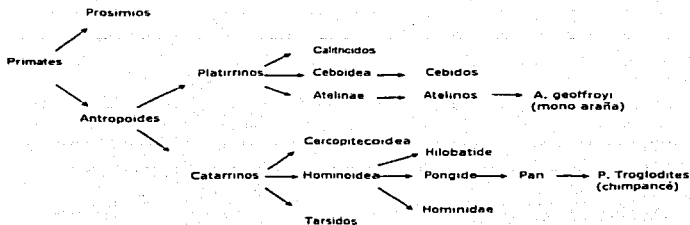


Fig. 1 Clasificación taxonómica del género primate, con énfasis en las filogenias de *A. geoffroyi* y *P. Troglodites*.

Este trabajo se divide en tres capítulos y un apéndice. El primer capítulo está dedicado a las hembras; en él se describe la anatomía del aparato reproductor por laparoscopia exploratoria y por disección. Se describen también la determinación de las concentraciones de estrona y progesterona en heces y la técnica de inseminación artificial.

El segundo capítulo incluye la obtención del eyaculado de los machos por electroeyaculación, la determinación de las características del semen y la descripción del uso de la tripsina como una técnica que facilita la evaluación del eyaculado. Asimismo, se describe la congelación del semen en pastillas (pellets).

Dado que en nuestro país no se hacen estudios sobre fisiología de la reproducción en primates, en el tercer capítulo de este trabajo se describen algunas técnicas ya establecidas en la marmoseta común (*Callithrix jacchus*), un primate Neotropical que ha sido estudiado ampliamente en cuanto a sus características reproductivas. En este capítulo se describe el uso del Percoll y del PureSperm para lavar el semen de esta especie. También se describe la vibroestimulación, un método alternativo para la obtención del semen de los primates y la evaluación del eyaculado por el método computarizado (CASA), el cual parece ser la mejor opción para la evaluación objetiva del semen. Se describe la congelación del semen

en pajillas y se mencionan las ventajas en la utilización de esta técnica. Cabe mencionar que las técnicas que se utilizan en la marmoseta quizá puedan adaptarse al mono araña.

Por último en el apéndice se incluyen los artículos hasta ahora publicados sobre la fisiología reproductiva del mono araña, que son producto de esta tesis. Para evitar ser redundante, en los capítulos donde se hace referencia a estos resultados, no los muestro en su totalidad, sino simplemente los resumo. Las descripciones detalladas pueden ser consultadas en el apéndice.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## 2. Hembras

---

### *Fisiología reproductiva*

#### *Ciclos ováricos*

Entre las primates existen dos tipos de ciclos ováricos (Fig. 2) uno es el estral y otro el menstrual. Ambos obedecen al mismo mecanismo neuroendocrino. Sin embargo, presentan algunas diferencias que a continuación se detallan.

Las primates que presentan ciclos menstruales sangran periódicamente, por ejemplo las mujeres cada 28 días (Siedlecky, 2001), las chimpancés cada 35 días (Graham, 1981), las hembras de macaca arctoides cada 29.1 días (Wilks, 1977).

El sangrado ocurre después de la fase lútea y se debe al desprendimiento del endometrio (Hrdy y Whitten, 1987) con la consecuente ruptura de las arterias espirales que lo irrigan. Ese sangrado tiene una duración que varía según la especie (Saltiel, 1988). El desprendimiento endometrial parece deberse al colapso y necrosis de los vasos sanguíneos endometriales, dado por la drástica disminución de las concentraciones de estrógenos y progesterona previa a la menstruación. De hecho, la menstruación inicia aproximadamente tres días después de que las concentraciones sanguíneas de progesterona decrecen a menos de 1 ng/ml (Monroe 1970).

Las hembras que presentan ciclo estral no sangran. Sin embargo, es importante aclarar que existen algunas especies que presentan ciclos estrales pueden apreciarse sangrados periódicos, por ejemplo, la perra que sangra durante el estro y la vaca que puede sangrar durante el metaestro (Saltiel, 1988). Ambos sangrados se presentan en lo que corresponde a la fase periovulatoria del ciclo estral, y no después de la fase lútea. De hecho, estos sangrados se deben a un efecto de diapedesis por el incremento en la circulación sanguínea y debilidad de los vasos sanguíneos que irrigan al endometrio y no al desprendimiento del mismo.

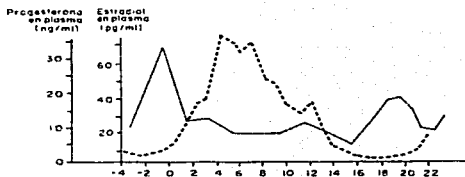
Otra diferencia importante entre los ciclos menstrual y estral, es que en el primero hay mayor flexibilidad en el tiempo de receptividad sexual (Hrdy, 1987), porque las concentraciones estrogénicas, que son responsables de la conducta sexual en las primates, se mantienen a concentraciones elevadas tanto a lo largo de la fase folicular como de la lútea. Por otra parte, las concentraciones de estrógenos son mucho más altas en los ciclos menstruales que en los estrales. Asimismo, en algunas especies de primates se presenta un segundo pico de esta hormona aproximadamente a la mitad de la fase lútea (Wilks, 1977).

Las hembras con ciclos estrales, pueden reproducirse a lo largo de todo el año (poliestricas continuas) o presentar periodos de actividad sexual interrumpidos por fases de anestro o inactividad hormonal (monoestricas o poliestricas estacionales), sin embargo en ninguno de los casos las hembras se aparean fuera de la fase de estro o proestro, es decir cercanas a la ovulación. Por otra parte, en ninguno de los casos las hembras con ciclos estrales menstrúan sino reabsorben el endometrio.

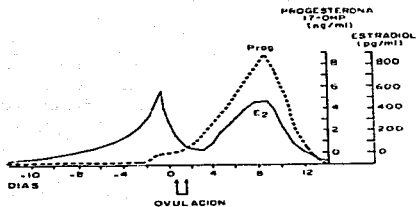
Además de los ciclos antes mencionados, Bonney y col. (1980) describieron un ciclo distinto en el *Aotus trivirgatus*, un primate Neotropical. A este ciclo lo denominaron "de transición" porque las oscilaciones hormonales no corresponden ni al ciclo estral, ni al menstrual. Sin embargo, fuera de este trabajo, en la literatura no se ha vuelto a mencionar este tipo de ciclo en ninguna otra especie de primate.

Fig. 2 Esquemas representativos de los ciclos estral y menstrual. Notese que las concentraciones de estrógenos se mantienen altas aun después de la ovulación en lo que corresponde a la fase lútea de ciclo menstrual mientras que en el ciclo estral decrecen. Además en ambos ciclos las unidades de medición de los estrógenos están expresadas en pg/ml. Sin embargo el valor máximo en la escala del ciclo estral es de 70 pg/ml, mientras que en el ciclo menstrual llega hasta 900 pg/ml. Por lo que aun cuando las oscilaciones en las concentraciones hormonales son parecidas en ambos ciclos, en los menstruales siempre son mucho más elevadas que en los estriales.

### Ciclo estral



### Ciclo Menstrual



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

### *Ciclos uterinos*

Las variaciones en la concentración de estrógenos y progesterona a lo largo de cada ciclo ovárico, se ven reflejadas en los cambios celulares del epitelio vaginal y uterino, dando lugar a lo que se conoce como *ciclo uterino* (Fig. 3).

A medida que las concentraciones estrogénicas se elevan, también aumentan los estratos celulares de los epitelios vaginal y uterino (fase folicular); al llegar los estrógenos a su máxima concentración, se observa la mayor madurez de estos epitelios, caracterizada por una gran población de células de descamación (fase periovulatoria).

Posteriormente la progesterona mantiene estos estratos celulares hasta aproximadamente la mitad de la fase lútea, en la que las concentraciones de ambas hormonas descienden por la falta de preñez. En este momento se aprecia un cambio en el patrón celular de los epitelios representado ahora por células parabasales y una gran cantidad de leucocitos (fase lútea).

Por último, ocurre la menstruación, fácilmente identificable por la presencia de los eritrocitos.

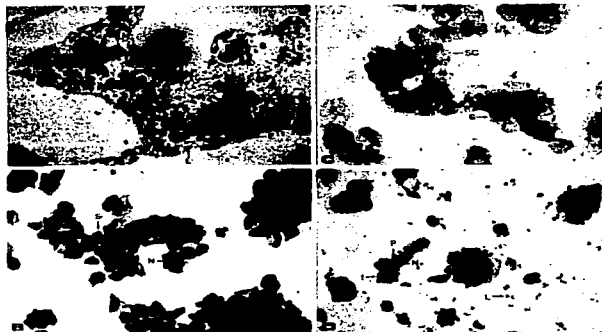


Fig. 3 Ciclo menstrual de la mona araña. En la fotografía A se muestra la fase menstrual en la que se puede apreciar una gran cantidad de eritrocitos (E) y una mezcla de células parabasales (P), superficiales (S) y leucocitos (L). En la fotografía B se muestra la fase folicular. En esta fase se aprecian básicamente células superficiales (S) nótese los núcleos pignóticos característicos de estas células. En la fotografía C se muestra la fase periovulatoria. Se aprecia una gran cantidad de moco cervical rodeando a la células que en su mayoría son escamas (SC) aunque se pueden apreciar también células superficiales. En la fotografía D la fase lútea, en esta fase se observan células parabasales (P), estas células se distinguen por su forma redonda, los núcleos de estas células son grandes. Asimismo está en la fase en la que se observa la mayor población de leucocitos.

#### Ciclo menstrual de la mona araña

Existía la creencia que el ciclo menstrual era exclusivo de las mujeres, monos del Viejo Mundo y grandes simios. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, en 1935 Goodman y Wisloki detectaron sangrados periódicos en dos monas araña. A pesar de este hallazgo, en la literatura todavía existía discrepancia en cuanto al tipo de ciclo que las hembras de esta especie presentaban.

Años más adelante, nuestro grupo llevó a cabo la caracterización del ciclo uterino de la mona araña con base en los cambios celulares del epitelio vaginal, junto con la medición de las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol y progesterona. Con los resultados que obtuvimos en este trabajo determinamos que las monas araña presentan ciclos menstruales de  $25.3 \pm 3$  días de duración total, con cuatro fases bien definidas: la folicular, que dura en promedio 8.2 días, la lútea 6, la periovulatoria 7.6, y la menstrual 3.5 días. Los porcentajes de las células epiteliales y los valores séricos de  $17\beta$ -estradiol y progesterona en cada fase del ciclo menstrual, así como el total de muestras obtenidas de cada hembra, se muestran



en el artículo anexo, titulado: *The menstrual cycle of the spider monkey (Ateles geoffroyi)* por Hernández-López y colaboradores.

### **Endocrinología de la reproducción**

Los mamíferos, como cualquier otro ser vivo, han desarrollado mecanismos propios para hacer eficiente su reproducción. Como parte de esos mecanismos las hembras responden a las hormonas sexuales de formas variadas lo que las distingue en especies de ovulación espontánea (coneja), inducida (gata) y otras más en las que la ovulación responde a procesos neuroendocrinos, que fluctúan por periodos preestablecidos (primates) (Saltiel, 1988)

Entre los primates no humanos no hay evidencia de especies que presenten ovulación inducida, ni espontánea (Dixon, 1998), así que los eventos que a continuación se describen son similares en todas las especies de primates, incluida la humana (Knobil y Hotchkiss, 1988).

Los ciclos ováricos de los primates, ya sean estrales o menstruales, dependen de la liberación de FSH y LH de la hipófisis, ambas hormonas son requeridas para inducir la ovulación. Dicha secreción obedece al factor de liberación de FSH y LH (GnRH) secretado en el hipotálamo mediobasal. La secreción en pulsos por hora de este factor, con la consecuente liberación de las gonadotropinas, es suficiente para desarrollar al folículo de Graff, y con él disparar la síntesis de estrógenos y posteriormente de progesterona.

Conforme el folículo de Graff va madurando, se aromatizan una mayor cantidad de andrógenos en las células de la teca interna y de la granulosa ovárica. Ese evento incrementa las concentraciones de estrógenos que, al sobrepasar por lo menos tres veces sus concentraciones basales y mantenerse así durante 36 horas, promueve la liberación de un pico de LH provocando la ovulación.

Conforme las concentraciones estrogénicas van aumentando, las de FSH van decreciendo, y al momento de la ovulación se libera la inhibina, una hormona de origen gonadal que actúa sobre la adenohipófisis inhibiendo la secreción de FSH (Randall *et al.* 1998). Las concentraciones disminuidas de FSH se mantienen así hasta el final del ciclo.

La primera mitad del ciclo (la fase folicular) está regida directamente por los estrógenos, particularmente por el  $17\beta$ -estradiol y la estrona, que son los esteroides foliculares más importantes, aunque el primero es diez veces más potente que el segundo (Knobil y Hotchkiss, 1988). Durante esta fase, la progesterona está prácticamente ausente. Esta primera fase del ciclo, incluye también la fase periovulatoria, ya que el pico gonadotrópico preovulatorio, acompañado por el incremento repentino de las concentraciones estrogénicas previas a la ovulación, suceden todavía dentro de la fase folicular.

Después de la ovulación la influencia hormonal está dada principalmente por la progesterona producida en el cuerpo lúteo. A esta fase se le conoce como fase lútea. Por definición, esta fase concluye cuando se presenta el primer día de sangrado menstrual.

#### **Objetivo general**

De acuerdo con el planteamiento del problema, en esta tesis se estudiaron algunos parámetros reproductivos que reflejan el funcionamiento neuroendocrino de los monos araña. Esto con la finalidad de añadir información a la ecológica y la conductual ya existentes, y así llevar a cabo las inseminaciones artificiales de estos animales con las bases fisiológicas apropiadas.

#### **Objetivos particulares**

Los objetivos particulares de este capítulo del trabajo se dividen en tres:

Hacer la determinación de las concentraciones de estrona y progesterona en heces de las monas araña. Con este método, es posible hacer un seguimiento diario de las variaciones hormonales que reflejan la actividad ovárica, inclusive en especies silvestres (Stavisky, *et al.* 1995, Strier y Ziegler, 1997, Ziegler, *et al.* 2000). Asimismo, esta técnica permite evaluar los cambios hormonales normales, ocurridos durante la preñez y el posparto (Jurke, *et al.* 1997; Jurke, *et al.* 1998).

Describir las características anatómicas del tracto reproductor de las hembras mediante laparoscopia exploratoria. Pues en tanto no se conozca su anatomo-

mía, siempre se corre el riesgo de causar algún daño físico durante la inseminación artificial.

Intentar la inseminación artificial exitosa en el mono araña, y describir el estatus fisiológico propio de la gestación de esta especie.

### **Material y métodos**

#### **Sujetos e instalaciones**

El Instituto Nacional de Psiquiatría cuenta con una población de siete monos araña, cuatro hembras y tres machos. Estos animales están alojados en una jaula con forma de sección cónica, techada con malla de alambre de las siguientes medidas: 6.20 m (lado mayor) x 1.70 m (lado menor) x 6.00 m (lados iguales) x 6.30 (altura). Los animales son alimentados diariamente con dieta comercial Monkey Diet 5038 (Lab Diet, PMI Feeds, ICN) para monos del Viejo Mundo, fruta y verduras. La dieta no cumple con los requerimientos nutricionales de los monos araña, debido a que esta especie de primate tiene un requerimiento de proteínas más alto (25%) que el que tienen los monos del Viejo Mundo (15%) (Martín, 1986). Sin embargo hasta el momento el estado físico de los animales en general es bueno, aunque debe ponerse especial cuidado en las revisiones periódicas que se les hacen, para que en caso de ser necesario se les adicionen otras fuentes proteicas. Los monos tienen libre acceso al agua, y la limpieza de las jaulas se hace diariamente a la 09:00 hrs aproximadamente.

La historia reproductiva de estos monos no se conoce, debido a que fueron incautados por la ex-SEDUE y posteriormente donados al Instituto en 1991, a partir de este año hasta la fecha no se han reproducido.

#### **Cuantificación de estrona y progesterona en heces**

Numerosos trabajos sobre la extracción de hormonas esteroides a partir de heces, han demostrado que ésta es una técnica eficaz para determinar el estatus reproductor de algunas especies de mamíferos, particularmente aquellas en las que el manejo resulta peligroso o conflictivo.

El hecho de que esta técnica sea no invasiva, ha brindado la posibilidad de hacer registros diarios de las variaciones hormonales en los primates no-humanos

(Risler, 1987; Ziegler, 1989; Shideler, 1993; Jurke, 1998; Matzumuro, 1999), pues el patrón de excreción de estas hormonas es similar al que se presenta en suero sanguíneo, aunque el tiempo de excreción puede retrasarse de 12 a más de 48 horas (Schwarzenberger, 1996).

### **Colectión de heces**

Debido a las condiciones de cautiverio en las que se mantiene a las monas en estudio, fue necesario teñir las heces de cada hembra para distinguir unas de otras. Para ello, dimos a beber 120 ml de jugo de frutas, teñido con 1 cucharada de colorante vegetal en pasta (Chefmaster gel base color), los colores utilizados fueron: rojo, negro y morado, ya que otros colores no se distinguían o no eran lo suficientemente fuertes para teñirlas.

### **Extracción de metabolitos hormonales a partir de heces**

La extracción hormonal se llevó a cabo de acuerdo a la técnica establecida por Matzumuro y colaboradores en 1999, salvo que pesamos el doble de materia fecal que la sugerida por el autor, ya que la cantidad de hormonas detectada en una prueba piloto previamente realizada fue baja. El resto del procedimiento se resume en la figura 2.

El muestreo se hizo diariamente por un periodo de tres meses consecutivos, tres de descanso, y tres meses más de muestreo.

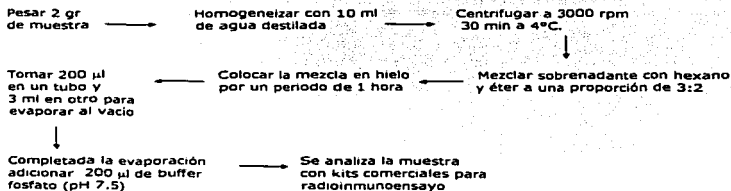


Fig. 2 Esquema de los pasos a seguir para la extracción de hormonas sexuales a partir de heces fecales

### **Resultados**

En la figura 3 se grafican 45 días de muestreo de las monas araña. Como se puede observar, las concentraciones tanto de estrona como de progesterona fluctúan drásticamente a lo largo de los ciclos; además las concentraciones de estrona en algunos casos sobrepasaron los niveles máximos detectados por el RIA. Cabe mencionar que cuando esto ocurrió tomamos el valor máximo registrado para graficarse, de otra manera, hubieran aparecido como valores faltantes, sin serlo.

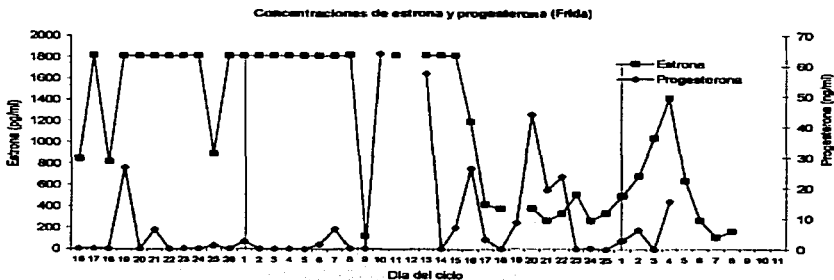
En los resultados se observa que los ciclos ováricos de las hembras en estudio tuvieron una duración promedio que entra dentro del rango normal para esta especie, salvo Canica (CA), quien presentó un ciclo de 18 días, cuando debería ser de 24 a 26 días. El de Frida (FR) fue de 26 días y el de Lola (LO) de 27 días. Cabe mencionar que aunque la duración promedio de los ciclos de estas dos hembras entra en el rango normal, las variaciones hormonales no siguen un patrón clásico de un ciclo menstrual, en adelante se detalla.

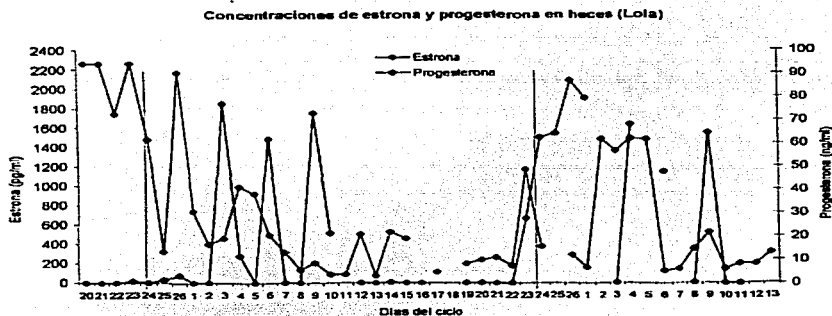
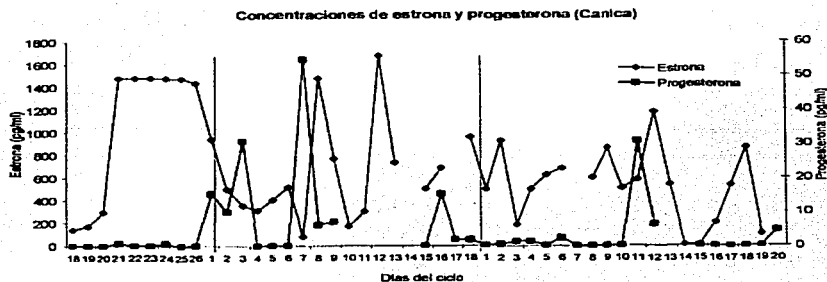
Considerando el ciclo ovárico de menstruación a menstruación, se puede observar que FR presentó concentraciones de estrona elevadas (1800 pg/ml) durante las fases folicular, periovulatoria y lútea temprana. Las concentraciones más bajas se detectaron en la fase lútea tardía y durante la menstruación (250-400 pg/ml) tal como se espera en un ciclo menstrual. La progesterona se mantuvo elevada durante las fases periovulatoria y lútea temprana (1800-1600 ng/ml), disminuyendo notablemente durante las fases lútea tardía y menstrual (600-0 ng/ml), este patrón de excreción de progesterona también corresponde al esperado en un ciclo menstrual. Después de la menstruación las concentraciones de estrona se elevaron normalmente. Sin embargo, después se observó una caída que no sucede regularmente en los ciclos menstruales. Asimismo si se observa en la gráfica el periodo que corresponde a la fase lútea tardía del ciclo anterior las concentraciones de estrona son muy elevadas.

Por otra parte, CA presentó un patrón de excreción en el que se observaron concentraciones elevadas de estrona durante las fases folicular, periovulatoria y

lútea temprana (1400-1600 pg/ml). Disminuyeron durante las fases menstrual y lútea tardía (400-420 pg/ml). Sin embargo, no se mantuvieron constantes las concentraciones, ya que fluctuaron mucho dentro de cada fase. La progesterona se incrementó durante la fase periovulatoria (1600 pg/ml) y disminuyó antes de la menstruación (20-0 pg/ml).

Finalmente, LO presentó valores muy bajos tanto de estrona (100-200 pg/ml) como de progesterona (0 ng/ml) durante la fase periovulatoria, que es cuando se esperan los valores máximos. Se detectó también, el pico de estrona durante la fase lútea tardía (1200 pg/ml), el cual se presenta normalmente en algunas especies de ciclos menstruales. Con respecto a la progesterona, durante la fase folicular temprana (1800 ng/ml) y lútea tardía (2000 ng/ml) las concentraciones de esta hormona fueron altas.





**Fig. 3** Las líneas verdes representan el día de la menstruación. Las concentraciones máximas de estrona en promedio fueron de 1980 ng/ml y las de progesterona de 69 pg/ml, cabe mencionar que nuestros resultados están de acuerdo a los valores obtenidos por Campbell y colaboradores en el 2001.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### **Discusión**

Los resultados de la extracción hormonal en heces muestran que con la técnica empleada se pueden determinar la estrona y la progesterona, pero no el 17- $\beta$  estradiol en las monas araña, a diferencia de los resultados que obtuvieron Matzumuro y colaboradores (1999), autores de la técnica, quienes detectaron valores más elevados de 17- $\beta$  estradiol que de estrona en las heces del cynomolgus (*macaca fascicularis*).

Se sabe que los estrógenos más abundantes en heces son la estrona y la estrona conjugada (Jurke, *et al.* 1997; Jurke, *et al.* 1998). El 17- $\beta$  estradiol es difícil de encontrarlo en las heces porque al pasar por el hígado se degrada prácticamente al primer minuto. Sin embargo, se puede encontrar porque una parte de esta hormona se absorbe directamente de la circulación al intestino y se excreta como tal (Schwasenberger, *et al.* 1996).

Es importante resaltar que la excreción de las hormonas en heces también depende en mucho de la dieta de los animales, se sabe que la abundancia de grasas y fibra afectan la tasa de excreción de las hormonas esteroides en las heces (Fedigan y Rose, 1995).

Es probable, que la discrepancia que hay entre los resultados obtenidos por Matzumuro y cols. y los nuestros, se deba a la diferencia en el metabolismo de las especies con las que trabajamos o simplemente a la dieta suministrada a los animales.

Los valores que nosotros detectamos de estrona fueron poco regulares, lo cual no difiere de lo descrito por Campbell y colaboradores (2001) en esta misma especie, aunque sí, la duración de la fase folicular que ellos describen de 2 a 3 días, y nosotros de  $8.2 \pm 2.8$  días (Hernández-López, *et al.* 1998). Asimismo, según sus mediciones, la menstruación ocurre al mismo tiempo que la ovulación; nosotros encontramos que la fase lútea tiene una duración de  $6 \pm 2.6$  días (Hernández-López, *et al.* 1998), es decir la menstruación ocurre después de la fase lútea por lo menos 6 días después de la fase periovulatoria.



Por otra parte, es probable que las hembras, tanto del trabajo de Campbell, que tenían 25 años al tiempo del estudio, como las nuestras, ninguna de ellas menor de catorce años, presenten un patrón de excreción hormonal irregular debido probablemente a su edad, pues se sabe que en las mujeres por ejemplo, se puede observar una reducción en la duración del ciclo debido al acortamiento, de la fase folicular o bien al alargamiento del mismo por la falta de ovulación (Vom Saal y Finch, 1988). Asimismo, en monas viejas se ha detectado una reducción de los pulsos de GnRH provocando un deterioro en el desarrollo folicular, quizá es por esto que Ziegler y colaboradores (2000), quienes trabajaron con lémures, describieron irregularidades en los patrones de excreción hormonal solamente en las hembras viejas, y en su mayoría, esos ciclos fueron anovulatorios.

Sin embargo, en contrastaste con los datos anteriores, en la literatura se menciona que las monas araña en libertad viven más de 20 años y que a esa edad pueden ser todavía activas reproductivamente (Milton, 1981). Asimismo, Jurke y colaboradores (1997) describen el patrón hormonal durante la preñez de una hembra loris (*Nycticebus pygmaeus*) de 10 años de edad, cuando la vida media de esta especie es de aproximadamente 15 años (Rowe, 1996), lo que indica que hembras viejas, cuando menos de estas dos especies, tienen ciclos ovulatorios, ya que pueden quedar gestantes y los embarazos llegar a término. No obstante, es importante mencionar, que aun cuando los ciclos de las hembras viejas tienden a ser anovulatorios este evento no ocurre de forma radical, se han dado casos en los que, mujeres después de la menopausia presentan algunos ciclos ovulatorios (Vom Saal y Finch, 1988).

Por otra parte, las concentraciones de estrona y de progesterona descritas tanto por Campbell como por nosotros en el mono araña, podrían parecer demasiado elevadas con respecto a las de otros primates. Sin embargo, Coe y colaboradores (1992) mencionan que las concentraciones más altas de estrógenos que se han descrito son en callitricidos, tal vez por su cercanía filogenética los cebidos compartan esta característica (Fig. 1). Asimismo la progesterona, el cortisol y la testosterona, siempre son más elevadas en los primates Neotropicales que en los primates del Viejo Mundo (Coe *et al.* 1992).

Finalmente, para concluir satisfactoriamente este trabajo, en adelante será necesario hacer un muestreo de hembras jóvenes, por periodos prolongados para comparar las variaciones hormonales de las hembras jóvenes con las viejas y así determinar si la irregularidad hormonal es normal en las monas araña o si verdaderamente es un efecto de la edad.

Por otra parte, deben hacerse variaciones en la dieta administrada a los animales para determinar si en esta especie, la influencia de los alimentos que consumen es relevante en su reproducción, pues quizá las monas araña se adaptan favorablemente a los cambios de dieta desde el punto de vista de la salud digestiva, pero esto no implica que la reproducción no pueda verse afectada fuertemente.

#### ***Descripción anatómica del tracto reproductor femenino de la mona araña***

La primera descripción anatómica que llevamos a cabo en este trabajo fue por laparoscopia exploratoria. Esta técnica se utiliza frecuentemente como herramienta de diagnóstico mediante la observación directa de los órganos, para obtener biopsias de tejidos e inclusive para hacer algunas cirugías menores, sin la necesidad de hacer grandes incisiones que resulten traumáticas a los individuos (Prescott, 1979). También puede ser utilizada como un auxiliar de la reproducción asistida, para inyectar semen directamente en el cuerpo del útero, lo que da buenos resultados.

#### ***Laparoscopia***

El laparoscopio es un proyector de luz conectado por medio de un haz de fibras ópticas a un telescopio. El telescopio por un extremo tiene un adaptador ocular, por el cual el operador puede observar. El otro extremo, es el que se introduce a la cavidad abdominal, a través de una pequeña incisión en la pared abdominal (Harrison, 1979).

#### ***Procedimiento***

Como entrenamiento practiqué laparoscopías en tres borregas de desecho de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, bajo la asesoría del Dr. Octavio



Mejía. Posteriormente realicé laparoscopias en las monas, el procedimiento se describe a continuación.

Anestesiámos a las hembras con clorhidrato de ketamina a una dosis de 40 mg/kg, vía IM. Una vez que entraron a un plano anestésico quirúrgico, las sujetamos por las cuatro extremidades a una mesa, en posición decúbito dorsal, para dejar libre el área abdominal. La cabeza se situó lo más cerca posible al extremo posterior de la mesa. Procedimos a rasurar, y a lavar con jabón quirúrgico desde la caja torácica media a nivel de la 6ª costilla, hasta la región púbica. Por último embrocamos con yodo diluido al 5% (Isodine). Hicimos la primera incisión aproximadamente a siete centímetros en sentido lateral con respecto a la línea media, por debajo de la cicatriz umbilical. Por esta incisión introdujimos la aguja de Verres a través del plano muscular, hasta la cavidad peritoneal. Una vez que la aguja fue situada correctamente se le sujetó la manguera para insuflar la cavidad abdominal, hasta quedar timpánica y firme al tacto. Se retiró la aguja y por esa misma incisión introdujimos el trocar, con una cánula por donde se insertó el endoscopio. La mesa se inclinó para que el animal quedara en posición Trendelenburg<sup>1</sup>, de esta manera las vísceras se sitúan hacia la región pleural, el útero se mantiene en su sitio por el ligamento ancho que lo detiene y su localización se facilita. Hicimos la segunda incisión en el lado contrario a la primera, más o menos a la misma altura. Por esta segunda incisión introdujimos una cánula, en la cual se insertó el bastón para la manipulación de las vísceras, que en este caso, sirvió como guía al laparoscopio. Una vez situado todo el equipo, procedimos a hacer las observaciones.

### **Resultados**

#### *Descripción anatómica del tracto reproductor femenino de la mona araña*

El útero se localiza a una distancia de aproximadamente 10 cm por debajo de la cicatriz umbilical. Lo observamos como estructura ovoide de aproximadamente 5 cm, los oviductos con relación al cuerpo del útero se observaron grandes, alrededor de 3 a 4 cm. Sin embargo, fue difícil calcular su dimensión, ya que se veían enrollados sobre sí mismos. Los ovarios midieron de 1 a 1.5 cm, siendo es-

<sup>1</sup> Trendelenburg, posición decúbito dorsal con una inclinación de la mesa de aproximadamente 50°

estructuras de forma ovoide. Cuando se hicieron las observaciones, una de las hembras presentaba un cuerpo lúteo de medio centímetro de diámetro aproximadamente. Otra de ellas un folículo maduro de la misma medida.

Poco tiempo después de haber llevado a cabo las laparoscopías, una de las hembras en estudio murió a causa de un traumatismo craneocefálico, por lo que fue posible hacer la disección de su aparato reproductor, bajo la asesoría del Dr. Santiago Aja. Las medidas que se tomaron fueron las siguientes:

**Útero.** Es una estructura ovoide que mide por su parte interna 5.8 cm aproximadamente desde la os externa hasta el fondo del útero. El cervix mide 2.8 cm y presenta canales longitudinales.

**Vagina.** El canal vaginal mide de 3 a 4 cm, presenta dos divertículos o sacos ciegos a los lados de la os externa del cervix.

**Ovarios.** Son dos estructuras ovoides, el derecho en este caso fue ligeramente más grande 1.6 cm de largo y 1.1 cm de ancho, mientras que el izquierdo midió 1.1 cm de largo y 0.9 cm de ancho.

**Oviductos.** Los oviductos están situados a ambos lados del cuerpo del útero en la porción media anterior, el grado de enrollamiento es muy leve a diferencia de otras especies. En cuanto al tamaño, el oviducto derecho midió 3.6 cm de longitud y el izquierdo 4.1 cm.

Cabe mencionar que se aprovechó esta disección, para introducir la cánula de inseminación, y medir hasta dónde era posible introducirla sin perforar el útero.

### **Discusión**

Hill y colaboradores (1962) describieron detalladamente la anatomía de diversas especies de primates entre ellos el mono araña.

Según sus observaciones, la mona araña presenta los ovarios inusualmente grandes con respecto a su talla, no determinan su tamaño en centímetros, pero los describen similares en forma y tamaño a los de las mujeres.

El útero, según Hill (1962), también presenta cierta peculiaridad. Se le observa una elongación al cervix hacia el segmento infravaginal, este se protruye a 1 o 1.5 cm hacia la vagina lo que da origen a los *fornices* o divertículos, que también

nosotros observamos. Cabe destacar, que esta elongación, solamente la compar-  
ten el mono araña, el gorila y el humano.

Como se puede observar en la figura 4 el útero descansa sobre el colon  
descendente. Su forma es ovoide pero, según la descripción de Hill, ligeramente  
achatado en sentido dorso-ventral. Sin embargo, de acuerdo a nuestras observa-  
ciones, si se separa el útero del colon no se aprecia dicho achatamiento, sino muy  
por el contrario se observa casi esférico (figura 4).

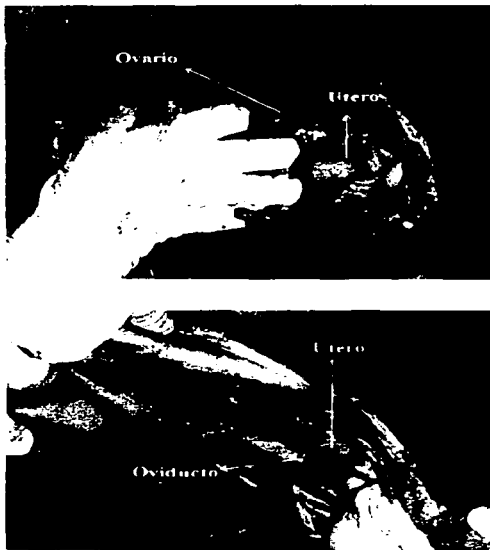


Fig. 4 En estas fotografías se muestra la disección del aparato reproductor de una mona araña hembra. En la primera fotografía se aprecia la forma ovoide del útero y el tamaño de los ovarios. En la segunda fotografía el útero no se ha movido de su lugar, nótese como descansa en el colon descendente.

A diferencia de nosotros, Hill describe que los oviductos de la mona araña están muy enrollados. Sin embargo, como se puede observar en la figura 4, cuando menos en esta hembra, los oviductos se aprecian casi rectos.

Aun cuando existen pequeñas diferencias entre la descripción de Hill y colaboradores y la nuestra, vale la pena destacar que en general se aprecia coincidencia entre nuestras observaciones. Quizá las diferencias que encontramos se deban solamente a las características individuales de las hembras, puesto que ambas descripciones corresponden a un solo animal.

### ***Inseminación artificial***

Existen tres sistemas de reproducción para las poblaciones cautivas de primates.

El primero es el sistema de semicautiverio, que consiste en dejar libre una colonia completa de monos en un área extensa limitada con barreras naturales. Los animales se aparean libremente, lo cual, simula de alguna manera su ambiente natural (Hendrickx y Kraemer, 1970). Sin embargo no en todas las instituciones que albergan primates, cuentan con el espacio suficiente para llevar a cabo este tipo de sistema.

El segundo es el sistema de reproducción de colonias, que consiste en colocar un macho con 3 a 15 hembras en una jaula diseñada para alojar ese número de animales. Las cópulas ocurren espontáneamente y sólo es necesario separar a la hembra gestante momentos antes del parto (Hendrickx y Kraemer, 1970).

Por último, el sistema de reproducción manual, consiste en tener a las hembras aisladas de los machos, solas o en pequeños grupos, y transferirlas solamente en la fase periovulatoria a la jaula del macho (Hendrickx y Kraemer, 1970).

Es de destacarse, que los sistemas de reproducción antes mencionados, en algunos casos son metodológicamente absurdos, pues los primates tienen distintos sistemas de apareamiento, que van, desde especies solitarias como los orangutanes (Dixson, 1998), hasta las que son francamente gregarias, promiscuas y sociales como los bonobos (Dixson, 1998). Quizá la mejor opción sea conocer ampliamente la biología de la especie y simular, efectivamente, su ambiente so-

cial. De otro modo, se corre el riesgo, no solo de que no se reproduzcan, sino de que la constante presión social a la que están sometidos, no les permita sobrevivir.

Si después de haber tomado en cuenta estas reflexiones, no se logra la reproducción exitosa de los primates, entonces se recomienda emplear las técnicas de reproducción asistida, inseminación artificial o cualquiera de las variantes de la fertilización *in vitro*.

Las diferentes técnicas de reproducción asistida se han desarrollado tanto por médicos veterinarios como por médicos humanos desde hace ya varias décadas. En la medicina humana se utilizan para resolver problemas de esterilidad de las parejas, y el método a utilizar depende del tipo de patología que presentan los pacientes. En la actualidad la fertilización *in vitro*, a pesar de ser un procedimiento costoso, se usa con relativa frecuencia, pues el 49% de los casos de infertilidad en humanos, se deben al bloqueo de los oviductos y un porcentaje similar a la oligospermia (concentración reducida de espermatozoides) en hombres (Potts, 1972). La inseminación artificial en ambos casos es infructuosa ya que ésta consiste en obtener el semen por masturbación o electroeyaculación e introducirlo a la hembra con una cánula de inseminación. Los oviductos bloqueados impiden el paso tanto de los ovocitos como de los espermatozoides por lo que no se puede llevar a cabo la fecundación. Por otra parte, tampoco la fertilidad baja por oligospermia se contrarresta con esta técnica.

Por el contrario, en la medicina veterinaria la inseminación artificial es aun el método a elegir para reproducir artificialmente a las especies domésticas. Aunque actualmente está tomando auge la fertilización *in vitro* y el trasplante de embriones, porque con estos procedimientos se tiene un mejor control genético de los animales y de esta forma puede aumentarse la calidad de los productos destinados para el consumo humano.

#### *Procedimiento*

El primer paso para llevar a cabo la inseminación artificial, fue evaluar el estatus reproductor de las hembras, mediante la observación diaria de los cambios en la citología vaginal (Fig. 3). Así, se detectó la fase periovulatoria y se procedió a realizar la inseminación.

La hembra se anestesió con clorhidrato de ketamina a una dosis de 40 mg/kg, para llevarla a un plano anestésico profundo. Una vez anestesiada se colocó en posición decúbito ventral, lo mas cercanamente posible al borde de la mesa, la cual se inclinó para que el animal quedara en posición Trendelenburg. Se lavó el área perineal con agua y jabón quirúrgico.

Posteriormente se introdujo la punta de una pipeta que sirvió para abrir el canal vaginal y facilitar tanto la visibilidad como la introducción de la cánula de inseminación. La cánula se introdujo hasta pasar tanto la os externa como la interna del cervix, para depositar el semen directamente en el útero. La hembra se mantuvo en posición Trendelenburg por un lapso de 10 a 15 minutos postinseminación, para evitar que el semen se escurriera al exterior.

El semen se obtuvo de uno de los machos del grupo, por electroeyaculación, se evaluó para asegurar que la concentración y motilidad fueran adecuadas. Posteriormente se diluyó con leche a una proporción 1:1, y se mantuvo en baño María a 30°C hasta ser inyectado en la hembra.

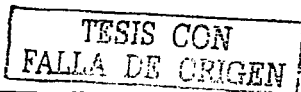
### **Resultados**

La primera inseminación artificial que se llevó a cabo, fue un experimento piloto en el que se probó la eficacia de la cánula de inseminación de uso humano en una hembra viva, ya que el tono muscular sobre todo del cervix, podía dificultar su uso. Una vez probada la cánula se procedió a hacer las inseminaciones de manera sistemática como se detalló anteriormente.

Se logró la inseminación exitosa de una de las hembras (FR); se comprobó determinando anticuerpos contra gonadotropina coriónica, dando positivo el resultado. Posteriormente se continuó la evaluación de las citologías vaginales, en los siguientes dos ciclos no se detectaron sangrados menstruales. Al tercer ciclo desgraciadamente la hembra empezó a sangrar, probablemente reabsorbió al embrión, ya que no había rastros de sangre en la jaula.

### **Discusión**

Por ahora, la descripción anatómica y del ciclo uterino, sirvieron para realizar los primeros intentos de inseminación artificial (IA) en el mono araña. Aunque,





los resultados no han sido del todo exitosos, pues, de 16 intentos solamente uno fue positivo. La razón no se sabe con certeza, sin embargo se puede mencionar que el reducido número de animales con el que trabajamos, limitó el número de intentos llevados a cabo y con esto la probabilidad de éxito.

Asimismo, como ya se discutió, la edad de las hembras puede ser una limitante en el éxito de la inseminación artificial.

Otro problema fue la detección exacta del día de la ovulación; se sabe que la citología vaginal exfoliativa es un método muy usado en animales domésticos y de laboratorio, para describir los ciclos uterinos. Sin embargo, dicho método es poco preciso para detectar el momento justo de la ovulación porque la evaluación es solamente cualitativa.

Otro método para detectar la ovulación, es el seguimiento diario de las hormonas esteroides séricas, esta técnica es quizá la más confiable. Aunque, la desventaja es que en animales con temperamento agresivo como es el mono araña no es factible obtener muestras sanguíneas sin recurrir a algún método de contención químico, lo cual puede causar el desajuste del ciclo uterino, por efecto de estrés al manejo.

Asimismo el seguimiento diario de hormonas sexuales en orina o en heces, disminuye el estrés al manejo, pero es un proceso laborioso y tardado, lo que hace a esta técnica, no ser útil para determinar la ovulación inmediatamente y llevar a cabo la inseminación artificial.

La ultrasonografía permite evaluar directamente los ovarios y determinar la ovulación. La desventaja de esta técnica, al igual que la obtención de muestras sanguíneas, es que se necesita anestesiarse diariamente a los animales. Según algunos autores, esta práctica modifica la actividad ovárica cuando menos de los mangabys, (Stabenfeld y Hendrix, 1973; Aidara *et al.* 1981); los macacos cola de cerdo (Eaton y Resko, 1974); los macacos cola de muñón (Wilks, 1977) y los monos rhesus (Hotchkiss *et al.* 1971; Hess y Resko, 1973).

Otro aspecto importante a considerar es la técnica de inseminación que se utilizó. La inseminación intrauterina ha dado buenos resultados en monos rhesus, 20.6 % (Valerio, *et al.* 1971) y 39.9% (Czaja *et al.* 1975); en comparación con la

TIPO DE  
FALLA DE ORIGEN

inseminación intravaginal, que en la misma especie, ha dado porcentajes menores de éxito 12.5% (Dedle y Plentl, 1966); 4.03% (Valerio, *et al.* 1971) y 21.3% (Settlage *et al.* 1973).

Cabe señalar, que aun cuando se utilice cualquiera de las dos técnicas antes mencionadas, en primates no humanos los porcentajes de éxito son bajos.

No obstante, la inseminación artificial ha podido llevarse a cabo eficazmente por ejemplo en los animales domésticos, ya que la necesidad de aumentar la producción animal para el consumo humano ha llevado a optimizar las técnicas de reproducción asistida mediante la repetición sucesiva de diversas técnicas, hasta encontrar la más adecuada para cada especie.

Por otra parte, de acuerdo a los resultados que obtuvimos concernientes al semen de los machos (Hernández-López *et al.* 2002), las inseminaciones deben llevarse a cabo preferentemente en la época de sequía, pues la calidad del semen aumenta (Fig. 4). Asimismo, hemos encontrado datos que nos hacen suponer que las hembras también presentan variaciones en su eficiencia reproductiva a lo largo del año. En adelante pretendemos estudiarlas sistemáticamente para hacer las inseminaciones en la época más adecuada.

**Fig. 4** Variaciones de la concentración, motilidad y viabilidad espermáticas en el eyaculado de tres monos araña (*Ateles geoffroyi*) (Media  $\pm$  E.S.) en relación a las estaciones de secas y lluvias.

Estación	Volume (ml)	Espmatozooides (millones/ml semen)	Motilidad lineal rápida %	Motilidad lineal lenta %	Motilidad lineal %	Inmóviles %	Espmatozooides vivos %	Células anormales %
<b>Lluvias</b>								
Media	4.0	44.0	13.1	37.1	7.7	43.8	70.8	50.3
E.S.	0.6	11.2	6.4	5.6	1.1	8.1	3.3	6.0
Rango	1-8	6-156	0-57	0-57	1-12	6-90	56-90	24-75
<b>Secas</b>								
Media	3.0	63.0	30.1	40.1	3.8	26.8	84.1	27.0
E.S.	0.3	11.3	4.8	5.5	1.1	3.8	2.9	3.2
Rango	1.6-5.2	12-126	9-55	20-66	0-10	12-41	68-93	16-40
T	10	11	1	17	1.5	8.5	2	0
P	N.S.	N.S.	<0.01	N.S.	<0.01	N.S.	0.01	<0.01

\* Contraste entre estaciones (Wilcoxon's T; N=9).

### 3. Machos

---

#### *Fisiología reproductora*

Dado que los mecanismos nervioso y endocrino involucrados en el funcionamiento reproductivo normal del macho no varían sustancialmente entre los mamíferos, vale la pena partir del conocimiento general de los que ya se han estudiado, para empezar a conocer las peculiaridades de una especie dada. A continuación se describen algunas características de la fisiología de la reproducción de los primates.

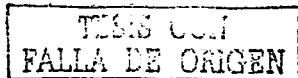
#### *Producción espermática*

Las principales funciones de las hormonas sexuales masculinas en los primates, así como en otras especies de mamíferos, radican en prolongar la vida media de los espermatozoides epididimarios, promover la maduración de éstos así como la actividad de las glándulas accesorias y la producción espermática; mantener las características sexuales secundarias dependientes de andrógenos (Randall, *et al.* 1998) y suscitar la conducta sexual normal de los individuos.

En la espermatogénesis, las hormonas que intervienen principalmente son los andrógenos testiculares, en especial la testosterona y las hormonas hipofisarias LH y FSH (Graham, 1981).

El hipotálamo produce el factor liberador de FSH y LH. Esta última estimula a las células de Leydig para producir testosterona, la cual es transportada por las proteínas transportadoras de andrógenos (androgen-binding protein ABP) hasta el interior de los túbulos seminíferos, donde promueve la división mitótica de las espermatogonias (Randall, *et al.* 1998).

Una vez que la espermatogonia ha completado la segunda división mitótica, entonces la FSH liberada por la hipófisis estimula las dos divisiones meióticas de los espermatocitos primario y secundario y la diferenciación hasta espermatozoides (Oko y Clevermont 1998).



Al diferenciarse completamente los espermatozoides se liberan a la luz de los túbulos seminíferos perdiendo parte del citoplasma, a ese remanente del citoplasma se le conoce como cuerpo residual.

Los cuerpos residuales de cada espermatozoide son fagocitados por las células de Sertoli, algunos autores postulan que este evento (Smith, 1959), es el factor disparador de la liberación de la inhibina por las células de Sertoli, la cual suprime la producción de FSH y estimula la liberación de LH, para iniciar nuevamente la espermatogénesis.

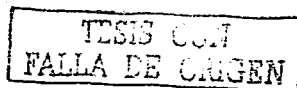
Cabe mencionar, que en otras especies, la FSH parece no tener un papel tan fundamental en la espermatogénesis, pues se han llevado a cabo algunos experimentos en los que se ha administrado antisuero para FSH en ratas adultas y no ha habido disminución en la producción espermática (Zirkin, 1998).

#### *Conducta copulatoria*

Las áreas del cerebro que están directamente relacionadas con el control de la conducta copulatoria son el hipotálamo (hipotálamo medio basal y el área preóptica media), la amígdala y la corteza cerebral (Dixson, 1998).

En los machos, el hipotálamo modula la eficacia para copular con las hembras, pero no afecta la libido, ni la posibilidad de eyacular. Así, se ha observado que aun cuando se produzcan lesiones experimentales, ya sea en el hipotálamo medio basal, en el área preóptica media o en ambas, los primates pueden seguir masturbándose y eyaculando, inclusive tratan de ganar el acceso a las hembras de su grupo, aunque de lograrlo, no pueden copular adecuadamente con ellas (Dixson, 1998). Así que la respuesta adecuada del macho ante los estímulos ya sean visuales, auditivos o sensoriales generados por las hembras para incitarlos a la cópula, depende de la estrecha conexión que existe entre el hipotálamo, la amígdala y la corteza y no de ninguna de estas estructuras por separado (Dixson, 1998).

Asimismo, los neurotransmisores mantienen una estrecha relación con las hormonas sexuales gonadales, activando o inhibiendo la conducta copulatoria.



Básicamente son la noradrenalina, la dopamina, la serotonina, la acetilcolina, el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y los opioides endógenos los neurotransmisores que modulan la cópula (Dixson, 1998; Meisel, 1998).

Solo por mencionar algunos ejemplos: la  $\beta$ -endorfina, inhibe la liberación de las gonadotropinas, y con ellas la testosterona y la conducta copulatoria (Dixson, 1998). La dopamina tiene un efecto contrario al de la  $\beta$ -endorfina, es decir, promueve la libido del macho y la erección peneana (Pomerantz, 1990). La noradrenalina junto con el sistema nervioso simpático, promueven la erección peneana y la libido de los machos (Dixson, 1998). Y la serotonina, tiene un efecto opuesto al de la noradrenalina, pues inhibe el interés sexual de los machos (Dixson, 1998).

#### *Inervación de los órganos sexuales masculinos*

De manera concisa la inervación de los órganos reproductores masculinos de los primates en general se divide en tres grupos de fibras nerviosas (Netter, 1986).

El grupo superior, proveniente de los plexos renal e intermesentérico, que se comunica con el nervio uretérico superior, el cual se divide en tres pequeñas ramas que migran adyacentes a la arteria testicular, hasta el testículo (Netter, 1986).

Un grupo medio que proviene del plexo hipogástrico superior, éste se comunica con los nervios uretéricos medios y los genitofemorales a través del nervio hipogástrico. Los nervios genitofemorales se ramifican e inervan al epidídimo y parte del conducto deferente (Netter, 1986).

Los nervios uretéricos, que corresponden al grupo inferior, son pequeños nervios que salen del plexo hipogástrico e inervan la parte inferior del ureter. Este tercer grupo se acompaña de los nervios que salen del plexo pélvico, que emite ramas a la vesícula seminal, la próstata, los conductos deferentes y la base de la vejiga urinaria (Netter, 1986).

Las fibras prostática y uretral se comunican con ramas del nervio pudiendo, que inervan a los cuerpos cavernosos y el cuerpo esponjoso del pene, parte de la uretra y las glándulas bulbouretrales. Los nervios que inervan los cuerpos cavernosos se conocen como nervios cavernosos (Fig.4) (Netter, 1986).

La inervación somática del pene, esta dada por el nervio pudendo, que proviene, al igual que las fibras parasimpáticas, de los segmentos sacros ( $S_{2-4}$ ) de la médula espinal. Este nervio acompaña a la arteria y vena pudendas a lo largo de la pared lateral de la fosa isquiática, inerva al pene en su porción dorsal, proveyendo sensibilidad en esa zona (Fig. 4).

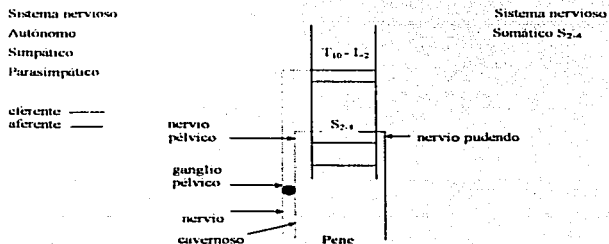


Fig. 4 Inervación peneana (Knobil, 1988)

### *Función sexual masculina*

Los mecanismos reflejos sexuales masculinos son la erección y la eyaculación; ambos están regulados por fibras nerviosas periféricas y centrales tanto del sistema nervioso autonómico (simpático y parasimpático ambos con fibras aferentes y eferentes), como del somático.

**Eyaculación.** Es el paso del fluido seminal a través de la uretra hasta su expulsión por el meato urinario (Sachs y Meisel, 1988).

Actualmente se ha descrito la existencia de una población de neuronas lumbares espino-talámicas que se ha propuesto pudieran formar parte de un generador central para la eyaculación, pues se activan únicamente durante la eyaculación. Estas células se distribuyen alrededor de los canales lumbares 3 y 4, y se proyectan a las neuronas simpáticas de la médula espinal así como al núcleo central autonómico, ambas estructuras están íntimamente ligadas a la emisión del semen. Estas neuronas también están involucradas en la secreción prostática y el

control del esfínter urinario, por medio del núcleo parasimpático sacro al cual también se proyectan. Cabe señalar, que esas neuronas no parecen estar involucradas en ningún otro aspecto de la conducta sexual (Truitt y Coolen, 2002).

Además de la vía antes descrita, el control simpático de la eyaculación está también mediado por fibras provenientes de la región torácica (T<sub>10-12</sub>) que se comunican con los nervios hipogástrico, pélvico, pudendo y cavernoso del pene.

Por otra parte, el sistema nervioso somático contribuye a la eyaculación promoviendo la contracción clónica de la musculatura estriada perineal, mediante el nervio pudendo que se origina de la región sacra (S<sub>2-4</sub>).

Erección. Rigidez o tumescencia peneana, debida al incremento del flujo sanguíneo arterial (hasta 250% más, Sachs y Meisel, 1988) y el decremento del flujo venoso, dentro de los cuerpos cavernosos y esponjoso del pene.

La erección puede originarse por estímulos visuales, olfativos, auditivos o imaginarios, que se procesan en el cerebro. El estímulo pasa del cerebro a los nervios parasimpáticos eferentes, proyectándose al segmento sacro (S<sub>2-4</sub>). Estos nervios viajan como los nervios pélvicos al plexo pélvico y de este al pene como nervio cavernoso del pene (Netter, 1986).

Se sabe que las fibras aferentes siguen la misma ruta de regreso, solamente que unas de ellas continúan hasta el cerebro y otras forman sinapsis con las neuronas laterales cornuales de la médula espinal sin llegar al cerebro, por lo que se considera que la influencia que ejercen sobre el pene es por arco reflejo (Netter, 1986).

### *El mono araña macho*

Los monos araña, como se ha comentado a lo largo de este trabajo no se reproducen fácilmente en cautiverio, uno de los objetivos de esta tesis, es determinar cuales son los factores que impiden su reproducción.

En el caso de los machos, en los que la reproducción se limita fundamentalmente a la producción espermática y a la capacidad para copular adecuadamente, detectar a un macho estéril resulta relativamente sencillo. Sin embargo, cuando los animales solamente presentan una tasa reproductiva baja, se complica la de-

tección de este problema; si a esto le aunamos, como es en el caso del mono araña, la completa ignorancia de los parámetros reproductivos normales de la especie, la evaluación de la capacidad reproductiva se vuelve prácticamente imposible.

Dado que son muchos los mecanismos involucrados en la reproducción masculina, quizá la primera aproximación al estudio de la fisiología reproductiva del mono araña macho sea la evaluación de las características del eyaculado, así como la observación conductual para determinar el interés sexual de los machos por las hembras y su capacidad para aparearse.

### **Objetivos**

El principal objetivo de este capítulo, fue el estudio de las características del eyaculado del mono araña, puesto que la producción espermática, así como la viabilidad y capacidad fecundante de los espermatozoides son algunos de los factores funcionales masculinos más importantes de evaluar para decidir si un animal es apto para la reproducción.

Por otra parte, se describieron las características de los espermatozoides del mono araña, y se compararon con las de otros primates.

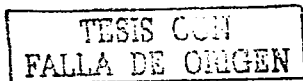
Se llevó a cabo la congelación del semen del mono araña, con la finalidad de determinar la resistencia de los espermatozoides de esta especie a la congelación y descongelación.

Se intentó la inseminación artificial (la descripción se detalla en el capítulo 1) con el semen de los machos obtenidos mediante electroeyaculación.

### **Objetivos secundarios**

Los objetivos secundarios fueron tres. El primero, debido a que anteriormente a este trabajo no se había intentado la electroeyaculación en esta especie de primate, fue determinar los parámetros de tiempo, voltaje y amperaje, para obtener las muestras de semen por esta técnica.

El segundo objetivo fue determinar cual es el tratamiento más adecuado para mantener la viabilidad del semen de esta especie una vez obtenida la muestra, ya que como se describirá más adelante los espermatozoides de esta especie son altamente susceptibles a los cambios de temperatura. Además de presentar un





coágulo que tiene algunas características que lo distinguen del resto de las especies de primates hasta ahora estudiadas.

Por último, el tercer objetivo fue probar la técnica de congelación de semen en comprimidos, pues es una técnica que se ha utilizado con eficacia en otras especies, con la finalidad de llevar a cabo el almacenaje de las muestras obtenidas, para crear un banco de semen y evitar el manejo continuo de los machos.

## **Material y métodos**

### *Sujetos e instalaciones*

Las instalaciones son las mismas que se describieron en el capítulo anterior. Los sujetos de estudio fueron tres machos de edades desconocidas, sin embargo, por el tiempo que llevan alojados en las instalaciones del Instituto, además de sus características físicas, se sabe que todos ellos son adultos.

Los animales son alimentados diariamente con dieta comercial Monkey Diet 5038 (Lab Diet, PMI Feeds, ICN) para monos del Viejo Mundo, fruta y verduras, tienen libre acceso al agua, y la limpieza de las jaulas se hace diariamente a las 09:00 hrs aproximadamente.

### *Electroeyaculación*

La electroeyaculación es la técnica de elección en primates no-humanos para la colección de semen, ya que el temperamento agresivo de estos animales dificulta en gran medida la utilización de otras opciones como: la estimulación manual o el uso de la vagina artificial.

Gould y Martin (1978) establecieron los parámetros necesarios para electroeyacular a una gran variedad de primates sin incluir al mono araña, por lo que se tomó ese trabajo como base para determinar las constantes de estimulación.

Aparatos. Se utilizó un amplificador Pioneer para audio con una amplitud de frecuencia de 55 hz, que amplifica la señal emitida por un generador de funciones, el cual genera ondas sinusoidales indispensables para lograr una buena estimulación, sin correr el riesgo de dañar los tejidos del animal. Dichas ondas son simuladas en un osciloscopio Hewlett Packard de cuatro canales, asegurando así, que no se deformen conforme aumenta la corriente de estímulo.



La corriente y el voltaje aplicados se registraron en dos multímetros.

Finalmente, como medida de seguridad, se utilizó un transformador que evitó que las posibles variaciones de la corriente alterna, dañaran los aparatos o peor aun a los animales.

El electrodo se fabricó con acrílico dental y dos barras de cobre de 15 cm<sup>2</sup> de área cada una, conectadas a un cable coaxial blindado que a su vez se conectó al amplificador.

**Procedimiento.** Para llevar a cabo las electroeyaculaciones, los monos se anestesiaron con clorhidrato de ketamina a una dosis de 20 mg/kg de peso, vía IM.

Una vez anestesiado el animal se colocó en la mesa en posición decúbito lateral para facilitar la introducción del electrodo por el recto. El electrodo se lubricó con jabón quirúrgico, pues este es un buen conductor de estímulos eléctricos.

La corriente de estimulación se aplicó en trenes de cinco estímulos incrementando la corriente de 10 en 10 mA con cada tren y no sobrepasando los 75 mA. Cada estímulo duró 6 seg. con intervalos de 3 seg. El voltaje máximo no fue mayor a 4.5 v.

Pudo observarse erección peneana antes de la eyaculación, en la mayoría de los casos, pero cuando esto no sucedió fue necesario protruir el pene de manera que no se obstruyera la salida del eyaculado.

El semen se colectó en tubos cónicos de Nalgene sumergidos en agua a 40°C para que al concluir la eyaculación el agua no estuviera a menos de 30°C.

El volumen total del eyaculado se midió directamente en los tubos de recolección, así como las características de coloración y viscosidad. Posteriormente se llevó a cabo la evaluación microscópica del semen.

#### ***Espematobioscopia***

Esta evaluación se hace para determinar la concentración espermática, el grado y tipo de motilidad de los espermatozoides, la presencia de otras células diferentes a los espermatozoides, como son: eritrocitos, bacterias, células epiteliales, leucocitos y células inmaduras. La proporción de espermatozoides normales y

anormales, la presencia de espermatozoides aglutinados y la proporción de espermatozoides vivos y muertos para estimar la viabilidad del semen.

Se utilizó el criterio propuesto por el manual de laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1992) para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical, a continuación se detalla.

**Concentración espermática.** Una vez que se obtiene el eyaculado se homogeneiza para evitar que los espermatozoides no se distribuyan equitativamente y la concentración difiera entre campos.

Se obtiene una alícuota de 10  $\mu$ l de semen en un portaobjetos y se cubre con un cubreobjetos de 22 x 22 mm. Siempre debe ser el mismo volumen y el mismo tamaño de cubreobjetos para evitar que el espesor de las muestras difiera entre sí y los resultados varíen por esta razón.

Se coloca la muestra en el microscopio y se empiezan a contar los espermatozoides en forma de zigzag de arriba abajo evitando contar dos veces el mismo lugar. Se cuentan tres campos diferentes y se obtiene el promedio. Cuando la cuenta de alguno de los campos difiere de los otros de manera notable, entonces debe desecharse esa muestra, homogeneizar nuevamente el eyaculado y tomar una alícuota nueva.

**Motilidad.** Se clasifica en cuatro categorías: progresión lineal rápida, lenta, motilidad no lineal e inmovilidad (Fig. 5).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Fig. 5 En este cuadro se definen las 4 categorías de movimiento que se evaluaron en las espermatobioscopias del mono araña

Variable	Definición
Motilidad lineal rápida	Porcentaje de espermatozoides que cualitativamente muestran movimiento en forma recta, progresiva y rápida a través del campo microscópico
Motilidad lineal lenta	Porcentaje de espermatozoides que muestran movimiento en forma recta y progresiva pero evidentemente lento en comparación con los anteriores
Motilidad no lineal	Porcentaje de espermatozoides que se mueven en zigzag, en círculos o de manera vibrante sin mostrar ningún avance neto a lo largo del campo microscópico
Inmovilidad	Porcentaje de espermatozoides que no se mueven independientemente de si están vivos o muertos

La evaluación se hace contando en dos preparaciones diferentes cien células, clasificando el tipo de movimiento que presenta cada espermatozoide y sacando el promedio de cada categoría en ambas preparaciones.

Presencia de otras células diferentes a los espermatozoides. Se hace una cuenta de barrido, para cada uno de los tipos celulares (teucocitos, eritrocitos, células inmaduras, bacterias).

Morfología. Se pone una gota de aceite de inmersión en una preparación de  $10 \mu\text{l}$  de semen para observarla al microscopio. Se cuentan cien células indicando normales y anormales. Posteriormente se hace otra nueva cuenta cambiando el campo microscópico, para obtener el valor promedio de ambas.

Aglutinación. La aglutinación espermática puede indicar un proceso inmunológico. Se califica de manera cualitativa, es decir se observa si la muestra presenta espermatozoides aglutinados o no, en caso de haber, debe describirse el sitio por donde están unidas las células (cabeza, cola, o parte media).

Viabilidad. Se evalúa la proporción de espermatozoides vivos y muertos, tomando una alícuota de  $10 \mu\text{l}$  de semen y se tiñe con  $10 \mu\text{l}$  de eosina. Las células muertas se tiñen por que la membrana pierde la permeabilidad y el colorante penetra la célula. Se cuentan cien células diferenciando las vivas de las muertas. Este parámetro puede compararse con el porcentaje de células inmóviles, si el número de espermatozoides muertos es mayor a los inmóviles hay un error en la evaluación.

### *Congelación de semen*

Debido a que en el Instituto contamos únicamente con tres machos, conseguimos muestras de semen de tres animales más, alojados en el Zoológico de Zacango en el Estado de México. El procedimiento que a continuación se describe fue el mismo para los seis animales.

#### *Material*

Lactosa 5.5 g. agua tridestilada 50 ml, glicerol, yema de huevo, estreptomicina y penicilina.

#### *Procedimiento*

Se mezcló el agua tridestilada con 5.5 g de lactosa. Posteriormente se agregaron: 10.5 ml de glicerol, 2 ml de yema de huevo, 0.005 g de estreptomicina y 0.006 g de penicilina por cada 7.5 ml de la mezcla. Esta mezcla se mantuvo en baño María hasta que alcanzó una temperatura de 27°C.

Se obtuvo el semen del animal mediante electroeyacuación, se mezcló con la preparación anterior y se refrigeró a 4°C por un período de 4 horas.

Por otra parte, en un bloque de hielo seco se hicieron pequeñas perforaciones para depositar 0.1 ml de la mezcla después de transcurridas las 4 horas. Se mantuvo en el hielo seco por 15 minutos y posteriormente se depositó cada gota en un tanque de nitrógeno líquido para almacenarlo.

### **Resultados**

#### *Electroeyacuación y espermatobioscopia*

El presente trabajo se inició estableciendo los parámetros de estimulación para electroeyacular a los monos araña. Este proceso tomó aproximadamente cuatro meses en dar resultado, debido a algunas particularidades tanto del eyaculado, como del esquema de estimulación para el mono araña; a continuación se detallan.

De acuerdo al trabajo publicado por Gould y col. (1978), un primate del peso de un mono araña (7 kg), debía eyacular con 30 o 35 mA de corriente y 16 V (Fig. 6). Sin embargo, esas constantes de estimulación en este caso no fueron efectivas. Resultaron en una hiperestimulación, evidente por las fuertes contracciones del animal y la emisión de orina, aun cuando el electrodo estaba colocado ade-



cuadamente. Por tal motivo fue necesario hacer diversas pruebas, hasta que con 75 mA de corriente como máximo y menos de 5 V, se consiguió que el mono eyaculara.

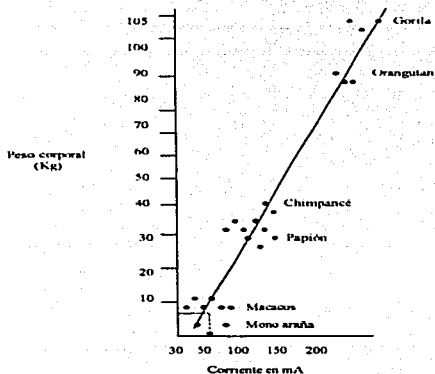


Fig. 6 Parámetros (miliamperos) requeridos para electroeyacular diferentes especies de primates (Gould, et al. 1978). En verde se muestra la corriente que se requiere para un mono araña que pesa aproximadamente 7-7.5 Kg.

Obtuvimos un volumen promedio de  $3.3 \pm 1.6$  ml de semen, este volumen comparado con el de otras especies parece adecuado (Fig.7). No obstante, las primeras muestras emitidas por los machos, presentaban una cuenta espermática muy baja. Se aumentó el periodo de estimulación hasta 16 minutos que fue el tiempo en el que apreciamos un incremento en la viscosidad del semen, lo que se relaciona con una alta concentración espermática; al observar las muestras al microscopio constatamos que el conteo espermático había aumentado, la concentración promedio que obtuvimos fue de  $48 \times 10^6$  espermatozoides por ml de semen.

Fig. 7 Cuadro comparativo de los valores obtenidos del volumen eyaculado, motilidad y concentración espermática en trece especies de primates. Todos los datos fueron tomados de *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals* (Balez, 1970), excepto el mono araña. La motilidad espermática que se muestra en la tabla para el mono araña es solamente la línea rápida.

Especies	Volumen eyaculado (ml)		Motilidad espermática (%)		Concentración espermática por ml ( $\times 10^6$ )	
	Media	Rango	Media	Rango	Media	Rango
Mono verde	0.9	0.3-2.0	39	15-70	440	166-811
Capuchino	0.6	0.3-1.0	24	10-50	161	56-740
Chimpancé	1.9	0.5-6.2	30	10-60	609	231-1269
M. congolesero	1.2	0.6-3.0	57	25-75	458	160-830
Gelada	1.0	0.5-2.0	21	5-30	503	351-651
Gibón	1.3	0.5-4.0	9	0-20	152	51-350
Mangabey	1.3	1.1-1.5	60	55-65	576	542-609
Patás	0.6	0.4-1.0	45	10-70	1,153	251-3600
M. Rhesus	1.1	0.2-4.5	58	10-85	350	100-600
Mono ardilla	0.4	0.2-1.5	52	40-80	206	81-311
M. cola de muñón	1.6	0.4-4.0	49	10-80	468	214-268
Mono araña	1.9	1.0-3.0	30	9-55	48	12-126

Una vez obtenidas las muestras de semen llevamos a cabo las espermato-bioscopías, basándonos en el protocolo establecido por OMS para la evaluación de muestras seminales de humano.

Ese proceso inicia manteniendo el semen a temperatura ambiente durante un lapso de 15 a 30 minutos, para que las muestras se licuen y su observación microscópica sea más sencilla.

En el caso del semen del mono araña, sucedió justamente lo contrario, conforme más tiempo se mantuvo a temperatura ambiente el semen mas se solidificó al grado de no quedar fracción líquida. Por supuesto, no era posible su evaluación. Se evitó dejar reposar la muestra, iniciando las evaluaciones antes de que se solidificara. Pero, se presentó otro problema, la alta termolabilidad de los espermatozoides, pues al momento de hacer las observaciones al microscopio, todos estaban muertos o inmóviles, aun cuando había pasado muy poco tiempo entre la obtención de la muestra y su observación. Con objeto de evitar el choque térmico se mantuvo el eyaculado en baño María a 30°C.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los resultados empezaron a mejorar notablemente en cuanto al volumen del eyaculado, cuenta y motilidad espermáticas. Sin embargo, el coágulo seminal de los monos araña es abundante y excesivamente sólido. Dado que, según algunos autores (Weisbroth, 1965; Graham, 1981; Gago, 1999), la mayoría de los espermatozoides viables, pueden estar inmersos en esos coágulos, decidimos hacer un nuevo muestreo y adicionar tripsina, para disolver la porción sólida del semen.

Como se puede observar en la siguiente figura (Fig. 8) tanto la motilidad rápida, como la lenta aumentan adicionando tripsina al eyaculado, el conteo espermático aumentó de 48.6 a 61.7 millones de espermatozoides por mililitro de semen. No obstante, parece que la tripsina tiene un efecto deletéreo sobre los espermatozoides, ya que se observó un incremento, aunque no significativo, de los espermatozoides anormales. Esto refleja que los espermatozoides inmersos en el coágulo seminal son viables y abundantes.

Fig. 8 Comparación de la concentración espermática, motilidad, viabilidad y presencia de espermatozoides anormales del semen de tres monos araña (*Ateles geoffroyi*) digerido con tripsina y agitado manualmente.

Animal	Espermatozoides (millones/ml de semen)		Motilidad lineal rápida (%)		Motilidad lineal lenta (%)		Motilidad no lineal (%)		Inmóviles (%)		Espermatozoides vivos (%)		Espermatozoides anormales (%)	
	Agitado	Tripsina	Agitado	Tripsina	Agitado	Tripsina	Agitado	Tripsina	Agitado	Tripsina	Agitado	Tripsina	Agitado	Tripsina
AD														
Media	32.1	39.8	6.3	11.3	10.1	44.1	2.5	3.6	83.8	41.3	61.7	74.7	39.4	38.3
E.S.	14.7	13.6	4.1	3.8	8.4	7.8	1.6	1.5	9.5	8.8	9.9	9.2	4.4	4.1
K1														
Media	40.5	52.6	15.9	35.2	19.6	32.5	3.1	7.1	47.9	27.9	68.9	83.8	38.4	38.0
E.S.	12.0	15.3	3.4	4.3	6.9	8.7	1.3	1.7	7.8	9.9	8.1	10.3	3.9	4.6
L.K.														
Media	73.2	92.8	11.9	16.0	16.1	42.0	12.6	7.7	61.9	35.0	50.7	79.3	28.6	39.4
E.S.	14.7	13.6	4.1	3.8	8.4	7.8	1.6	1.5	9.5	8.5	9.9	9.2	4.4	4.1
Media														
Total	48.6	61.7	11.3	20.8	15.3	39.5	6.1	6.1	64.5	34.7	60.4	79.3	35.5	38.6
E.S.	8.2	8.2	2.3	2.3	4.7	4.7	0.9	0.9	5.3	5.3	5.5	5.5	2.5	2.5
F*	9.90K		7.059		27.391		0.000		35.049		22.306		1.212	
P	0.034		0.056		0.006		N.S.		0.004		0.01		N.S.	

\* Entre tratamientos F-ratios, g.l. (calculados por el método de Satterwaite's) = 1/4.025.

Por último, evaluamos las características del semen en las diferentes épocas del año y determinamos que la motilidad lineal rápida y el porcentaje de espermatozoides vivos aumentan significativamente en la época de secas. Además la motilidad no lineal así como el porcentaje de espermatozoides anormales disminuyen



también en esa misma época. Cabe mencionar, que el conteo espermático, el volumen del eyaculado, el porcentaje de espermatozoides inmóviles y el porcentaje de espermatozoides con motilidad lineal lenta no variaron significativamente.

En el apéndice se incluyen los trabajos titulados: *Sperm quality differences between the rainy and dry seasons in captive black handed spider monkeys (Ateles geoffroyi)*, y *Digestion by trypsin enhances assessment of sperm parameters in the black-handed spider monkey (Ateles geoffroyi)* por Hernández López y colaboradores, donde se muestran los resultados.

#### *Congelación de semen*

Los resultados de la congelación del semen en pastillas (pellets), mostraron después de hacer las espermobioscopías, que con esta técnica se pueden recuperar algunos espermatozoides vivos y móviles. Sin embargo, se pueden obtener mejores resultados utilizando otras técnicas como la congelación en pajillas, ya sean abiertas o cerradas. De hecho la congelación en pastillas está cayendo en desuso por ser un método en el que no se pueden controlar algunas variables como: la contaminación de las muestras, tanto en el hielo seco como en el nitrógeno líquido; la identificación adecuada de las muestras, sobre todo cuando se trata de un número muy grande de animales; la eficiencia de la congelación porque ésta no se puede hacer de manera homogénea, entre otras.

Por esas razones es que en este trabajo no se continuó el banco de semen con ese método pero, como entrenamiento se llevó a cabo la criopreservación de semen de otras especies (marmosetas comunes, *Callithrix jacchus* y monos rhesus, *Macaca mulatta*) utilizando pajillas francesas y congelación no automatizada (los detalles se muestran en el capítulo 3 de esta tesis). En adelante ese método se empleará para la congelación del semen del mono araña.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Discusión

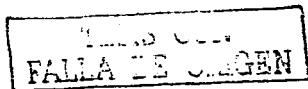
Una parte importante de este trabajo fue la determinación de los parámetros del eyaculado del mono araña, pues como se mencionó anteriormente, este hecho nos permite determinar si un individuo es apto para la reproducción.

Los resultados mostraron que las diferencias en el conteo espermático entre los individuos varía significativamente y esta diferencia está relacionada con el rango social de estos animales. Adrián, quien es el macho omega (es decir el subordinado), presentó una concentración espermática que varió en un rango de 18 a 52 millones de espermatozoides por mililitro, mientras que en Kifir el rango varió de 68 a 225 y en Lekey de 40 a 198 millones de espermatozoides por mililitro, cabe hacer notar que estos dos últimos animales son dominantes dentro del grupo.

El efecto de la testosterona en la espermatogénesis es fundamental. Se sabe que los animales con menor rango social tienden a presentar menores concentraciones de testosterona que los dominantes (Mazur y Booth, 1998; Kraus, et al. 1999) y quizá es esta la razón por la que encontramos menor concentración espermática en los individuos subordinados. Sin embargo, valdría la pena llevar a cabo un muestreo en el que se compararan las concentraciones hormonales de testosterona, cortisol y la cuenta espermática, para determinar la relación que existe entre el estrés al que están sometidos los animales subordinados con la disminución de la concentración de testosterona y la cuenta espermática.

Por otra parte, encontramos que existen diferencias en la calidad espermática durante la época de lluvias y de secas de la ciudad de México. Los resultados nos indican que ni la cuenta espermática ni el volumen del eyaculado varían significativamente entre las dos épocas. Sin embargo, la motilidad lineal rápida y el porcentaje de espermatozoides vivos aumentan significativamente durante la época de secas. Asimismo, el porcentaje de espermatozoides anormales así como la motilidad no lineal disminuyen en la misma época. Estas características, indican una mejor calidad espermática en la época de secas.

Nuestros resultados apoyan los descritos por Milton (1981), quien refiere que los monos araña tienen un pico de nacimientos alrededor de julio.



Con estos datos no pretendemos decir que los monos araña son estrictamente estacionales, pero sí suponemos que los nacimientos de las crías tienden a aumentar en la época de lluvias, lo cual conviene mucho tanto a las hembras como a las crías, pues la calidad y abasto de alimento son mejores en esta época (Van Roosmalen y Klain 1988).

Asimismo, con nuestros resultados sugerimos que se deben llevar a cabo las inseminaciones artificiales escogiendo a los animales de mayor rango social por una parte y por la otra preferentemente en la época de secas (otoño o invierno) pues la calidad del semen mejora significativamente con respecto a la de verano.

Por último, el mono araña presenta un coágulo seminal grande, el cual se solidifica al grado de no quedar ninguna parte cuantificable al microscopio. Por esta razón decidimos digerir este coágulo con tripsina, el resultado fue que la cuenta espermática se incrementó con el uso de la tripsina y no disminuyeron los parámetros indicativos de la capacidad fecundante de los espermatozoides en los primeros minutos. No obstante, se sabe que la exposición prolongada de los espermatozoides a la tripsina tiene efectos deletéreos irreversibles en los espermatozoides, por esta razón no se utiliza como un tratamiento rutinario en los procedimientos de reproducción asistida (Hendrickx y Kramer, 1970). Cabe mencionar, que aun no se sabe cual es la función del coágulo seminal de los primates y si los espermatozoides que están inmersos en él compiten en el proceso de fertilización. Esta duda hace cuestionable que el aumento en la cuenta espermática por efecto de la tripsina, deba tomarse como parte del conteo espermático basal del mono araña.



#### 4. Marmoseta común (*Callithrix jacchus*)

La marmoseta común (*Callithrix jacchus*) es un primate del Nuevo Mundo, filogenéticamente cercano al mono araña (Figura 9).

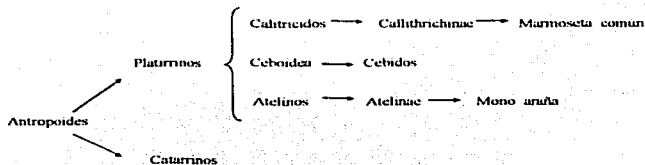


Figura 9. Clasificación de los primates

Habita en el centro y la costa este del Brasil (Miranda, *et al.* 1982). De acuerdo a los estudios en libertad y cautiverio se sabe que es un primate no estacional (Ingram, 1975; Stevenson, 1978), aunque los nacimientos ocurren con mayor frecuencia en los meses de agosto, septiembre, octubre y noviembre (Stevenson, 1978). Tienen ciclos estrales de 27.7 días con una duración promedio por fase de: 8.7 días la folicular, 3-4 días la periovulatoria, y la lútea de 19 días (Kendrick y Dixon, 1983). El periodo de gestación se describe de  $148 \pm 4.3$  días (Hearn y Lunn, 1975), los partos son gemelares (Dixson y Lunn, 1987) y en algunos casos triples.

Por otra parte, estudios recientes de fisiología reproductiva de marmosetas incluyen: la inseminación artificial (Morrell *et al.* 1998), la maduración *in vitro* de espermatozoides epididimales (Yeung, *et al.* 1996), la determinación de la concentración espermática (Kuederling, *et al.* 2000), así como otras características del eyaculado, como la determinación de algunas proteínas presentes en el fluido seminal y de los genes que promueven su producción (Marjaana, *et al.* 1999) y la criopreservación del semen (Morrell, 1998).

La mayoría de esos trabajos se han hecho en el Centro Alemán de Primates en Göttingen, Alemania. Este Centro goza de muy buena reputación, por la alta calidad de los trabajos que de ahí surgen, especialmente en reproducción. Por esa razón, solicité hacer una estancia en dicho Centro; recibí una respuesta favorable y participé en un proyecto de investigación que a la vez me era útil para continuar con mi trabajo con los monos araña.

El objetivo principal de esa estancia fue hacer la criopreservación del semen de las marmosetas, poniendo en práctica un método diferente al probado anteriormente por Morrell que, aparentemente podía dar mejores resultados. Posteriormente, se pretendía usar ese semen para llevar a cabo la fertilización *in vitro*.

Dados los resultados que obtuvimos en el primer trabajo, fue necesario hacer un segundo, el cual consistió primero en probar la toxicidad del Percoll (un medio para centrifugar células con gradientes de densidad) para los espermatozoides de las marmosetas. Posteriormente comparar si variaba la efectividad del Percoll con respecto a la del Pure Sperm, ambos productos utilizados para remover los espermatozoides lentos e inmóviles, bacterias y *destritus* celulares del eyaculado (Srisombut, 1998; De Vos, 1997; Carrell, 1998).

Las características de los espermatozoides se evaluaron en ambos casos mediante el método computerizado (CASA por sus siglas en inglés computer-aided sperm analysis).

## ***Criopreservación del semen de la marmoseta común (Callithrix jacchus)***

### **Introducción**

Como se mencionó en el capítulo anterior, la congelación en pastillas (pelets), actualmente está cayendo en desuso por el poco control que se tiene en la identificación de las muestras y la contaminación de las mismas (Nayudu, comunicación personal).

Asimismo, se sabe que entre más homogénea es la congelación del eyaculado la formación de cristales intra y extra celulares se aminora (Gao, *et al.* 1994). Por esa razón, es que la congelación en pajillas, las cuales son de un calibre muy

pequeño, da mejores resultados que los pellets. Actualmente, se utilizan dos tipos de pajillas las cerradas y las abiertas, estas últimas de fabricación muy reciente y su eficacia aun se está probando

Además del método de almacenamiento, otros factores a considerar para congelar el semen adecuadamente son: los diluyentes (deben evitarse los que contengan proteínas de origen animal como, yema de huevo, suero o albúmina), los criopreservadores (glicerol, DMSO, propanediol), el periodo de equilibrio (antes o después de adicionar el medio glicerado, el tiempo y la temperatura), la tasa de enfriamiento. Y después, la descongelación (rápida o lenta) y los métodos para probar la función espermática posterior a la criopreservación (CASA, inseminación artificial, etc).

Quizá está de más hacer mención de lo complejo que es probar cada una de las variables antes descritas. Sin embargo, de esto depende encontrar el método más adecuado para cada especie. Por lo tanto, la finalidad de llevar a cabo nuevamente la criopreservación del semen de las marmosetas, radicó en probar algunas variables, las cuales se describirán en el apartado de métodos, que podrí-an hacer más eficiente dicho procedimiento. Además, dado que durante la realización de esta tesis solamente se había congelado el semen en pastillas, el conocimiento de otras técnicas de congelación así como su aplicación, aunque sea en otra especie, redundan en la posibilidad de utilizarlo también en el mono araña.

## **Material y métodos**

### **Sujetos**

Este trabajo se llevó a cabo con 9 marmosetas comunes machos (*Callithrix jacchus*) de los cuales 7 se alojaban en parejas cada uno con una hembra y 2 solos.

Las condiciones ambientales de los encierros se mantuvieron constantes a lo largo del experimento a una temperatura de 24°C, 12 hrs de luz por 12 de oscuridad y una humedad relativa del 55%.

Los animales se alimentaron diariamente con frutas frescas, pastas y otros cereales, además de alimento comercial especial para marmosetas (Ssniff, Soest,

Alemania) y una o dos veces por semana tenebrios (gusanos de harina) como suplemento proteico; el acceso al agua fue libre.

#### *Colección de semen*

Se eligió un par de machos por día para obtener los eyaculados. Los animales se capturaron en una pequeña jaula para aislarlos de sus parejas 12 horas antes de la obtención de la muestra. Al día siguiente se sacaron de su jaula y se llevaron a un cuarto aislado de ruido y donde la luz era tenue para evitar distracciones y estrés.

El semen se obtuvo con un vibroestimulador FertilCare utilizando un rango de frecuencia de 80 a 90 Hz y una amplitud de 0.5 a 2.5 mm.

El semen se colectó en un tubo de vidrio de 22 mm de diámetro conectado directamente al vibroestimulador. Dicho tubo contenía 50 $\mu$ l de TALP (un medio que se utiliza para mantener a los espermatozoides viables) a 37°C de temperatura.

Los animales se recargaban de la cintura para arriba en un pequeño banco de tela y las extremidades inferiores quedaban colgando dejando libre la región genital para facilitar la colección del semen.

Se estimuló a los animales por periodos de 20 segundos iniciando con 80 Hz de frecuencia y 0.5 mm de amplitud. Posteriormente se aumentaba la amplitud a 1.0 mm y después a 1.5 mm, todavía con la misma frecuencia.

El siguiente estímulo se mantuvo en 1.5 mm de amplitud pero la frecuencia se aumentó a 90 Hz. Sucesivamente se elevó la frecuencia de 0.5 en 0.5 mm hasta llegar al máximo que fue de 2.5 mm, manteniendo la frecuencia en 90 Hz.

Si el animal no eyaculaba entonces se le daban 2 minutos de descanso y se reanudaba la estimulación comenzando en 80 Hz de frecuencia y 1.5 mm de amplitud.

Una vez colectado el semen se mantuvo a 37°C durante su transporte al laboratorio, así como durante su análisis.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### *Análisis computarizado (CASA)*

En el laboratorio, se hacía una evaluación subjetiva del eyaculado, para decidir si la concentración y motilidad espermáticas eran adecuadas para ser medidas en la computadora.

Se utilizó una cámara Helber para conteo bacteriano (Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Alemania) en la que se vertieron 5  $\mu$ l del eyaculado y se cubrieron con un cubreobjetos. Dicha cámara se colocó sobre una platina con temperatura regulada a 37°C. Posteriormente se observó la muestra en un microscopio Olympus BH-2, el cual incluía una cámara Panasonic modelo 1460B, conectada a un monitor Philips y a una videocassetera Panasonic. Ese equipo, a su vez, se enlazaba a una computadora que incluía el programa de análisis para muestras seminales: Hobson Sperm Tracker (Hobson Tracking System); y los datos que se obtuvieron se imprimieron en una impresora Hewlett Packard Laserjet. Los parámetros evaluados por el CASA se resumen en la figura 10.

### **Resultados**

El semen, después de pasar por un proceso de criopreservación, pierde viabilidad y funcionalidad; cuando esta pérdida no excede el 40 o hasta el 50% el semen se considera clínicamente funcional (Gao, *et al.* 1997).

En este trabajo, obtuvimos una pérdida de aproximadamente el 30% de acuerdo a los resultados obtenidos por el CASA.

Sin embargo, cuando el semen se utilizó para la fertilización in vitro, se detectó una alta contaminación bacteriana de los embriones. Inmediatamente, se mandaron a patología muestras de los medios de cultivo, del agua que se utilizó para disolver algunos de los medios, del nitrógeno líquido y de otras posibles fuentes de contaminación. Los resultados apuntaron a que dicha contaminación provenía de la piel del pene de los animales, que aunque se lava rutinariamente antes de la toma de las muestras, no se logra una total asepsia.

Dadas las circunstancias se suspendió la criopreservación del semen y se inició con el segundo trabajo enfocado básicamente a limpiar el semen de cualquier posible contaminante.

TESIS CON  
FALLA DE CENGEN



Se tomó esa decisión, por el momento y hasta que los resultados fueran los adecuados, porque no vale la pena invertir tiempo y dinero en programas de fertilización *in vitro* cuando aun no se han logrado superar los problemas más básicos de la metodología.

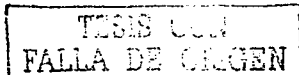
Fig. 10 Modificaciones al metodo de criopreservación de Morrell et. al. (1998)

	Morrell et. al	Hernández y Nusse
Metodo de coleccion	Lavado vaginal	Vibroestimulacion
Medio de coleccion	220µl de Test yolk con glicerol al 5%	Talpínques 50µl
Metodo de evaluacion del semen	Subjetivo	Subjetivo
Crioprotector	Alicuotas de semen con 5, 10, 15 y 20% de glicerol	Total del semen con 100µl de Test yolk y 5 minutos más tarde 100µl de Test yolk con glicerol al 4%
Periodo de equilibrio	5, 10 y 15 minutos a temperatura ambiente	2 horas a 4°C en cámara de agua
Almacenamiento	50µl de semen en pajilla francesa	125µl de semen en ½ pajilla francesa
Congelacion	A 4 cm de la superficie del nitrógeno líquido o en hielo seco	A -120 °C por 5 minutos en nitrógeno líquido
Descongelacion	A temperatura ambiente	Sumergido en agua a 37°C por 3 segundos
Evaluacion	CASA	CASA y Fertilización <i>in vitro</i>

### **Comparación de los efectos entre el Percoll y el PureSperm en el semen de la marmoseta común (*Callithrix jacchus*)**

#### **Introducción**

Cuando el semen de cualquier especie es colectado por métodos artificiales como electroeyaculación, vibroestimulación o vagina artificial, la probabilidad de que éste se contamine, es muy alta. Uno de los métodos más eficaces para evitar esa contaminación es lavar el semen con gradientes de productos fabricados, la mayoría de ellos, con cristales de silica y PVP (Percoll, PureSperm). Además, otra ventaja de utilizar esos productos, como ya se mencionó, es que los espermato-



zoides muertos, inmóviles y con motilidad no progresiva, también pueden ser removidos.

Sin embargo, se sabe que el Percoll puede estar contaminado con una alta concentración de endotoxinas dañinas para los espermatozoides (Mortimer, 1996); como alternativa Tanphaichitr propone el uso del PureSperm, a pesar de su alto costo (Tanphaichitr, 2000; Ranganathan, 2002), que, cabe señalar, excede por diez veces el precio del Percoll.

El objetivo de este trabajo fue determinar si el Percoll y el PureSperm, por se, resultaban tóxicos para el semen de las marmosetas, pues en un ensayo previo todos los espermatozoides murieron después de la centrifugación con Percoll (Pudritz, 1997).

En el mono araña no se ha probado el lavado de los espermatozoides con ningún producto, e indudablemente, representaría una gran ventaja para aumentar la probabilidad de éxito de la reproducción asistida.

#### **Material y métodos**

Los sujetos y las instalaciones, así como la colección de semen y el análisis computarizado para el semen son los mismos que se describieron anteriormente.

#### **Tratamientos**

El semen de cada animal se dividió y se mezcló con dos lotes distintos de Percoll, ambos al 50 y 100%, un solo lote de Pure sperm al 40 y 80%, y una parte más, se dejó como control sin ninguno de los tratamientos anteriores.

El análisis computarizado del semen se llevó a cabo a los 30 y 60 minutos después de obtener la muestra, tanto para el control como para los diferentes tratamientos.

#### **Análisis estadístico**

Se utilizó un análisis de varianza para muestras repetidas. En las variables del CASA en las que se obtuvieron efectos significativos se compararon las medias utilizando una ANOVA de una vía, seguida por la prueba de Bonferroni para comparaciones post hoc entre medias.



### Resultados y discusión

Los resultados que se obtuvieron mostraron que no hay diferencias significativas de los parámetros del CASA entre ambos lotes de Percoll y el Pure sperm, pero sí con respecto al tiempo (a los 30 y 60 minutos) (Tabla 1).

La media total de la motilidad espermática disminuyó significativamente de 69.1 a 58.9% entre los 30 y 60 minutos. Sin embargo el patrón de linealidad y rectitud de los espermatozoides no varió significativamente. Dado que la viabilidad espermática disminuyó con respecto al tiempo (de los 30 a los 60 minutos) casi en la misma proporción que la motilidad (de 46.7 a 34.4%), es posible que la disminución en la motilidad simplemente sea el reflejo de la muerte de los espermatozoides.

Otros parámetros como el desplazamiento angular medio (MAD), la amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza (ALH) y la danza media (DMN), también disminuyeron significativamente. Estos parámetros están estrechamente relacionados con la ruta que siguen los espermatozoides. Es decir, si estos parámetros disminuyen, entonces el movimiento de los espermatozoides tiende a ser más recto. De acuerdo a la literatura, cuando los espermatozoides se están capacitando tienden a desplazarse de dos maneras, primero en línea recta y después en un movimiento muy característico en forma de " $\infty$ " el cual es poco progresivo (Yanagimachi, 1988). El tiempo en el que la capacitación, se inicia depende tanto de la especie como del medio en el que los espermatozoides estén inmersos (Yanagimachi, 1988).

Esto puede sugerir que los espermatozoides de las marmosetas no iniciaron su capacitación a los 30 minutos, pero sí a los 60, reflejándose en el continuo movimiento lineal e inclusive en la disminución de los parámetros que describen un movimiento angular de los espermatozoides.

Contrario a lo que se esperaba, se observó la disminución de la velocidad curvilínea VCL (de 90.3 a 79.6) y de la velocidad promedio de la ruta VAP (de 68.2 a 60.6). De acuerdo a Motimer y Mortimer (1990), ambos parámetros tienden a aumentar conforme se inicia la capacitación de los espermatozoides, dado que ambos parámetros se refieren a la velocidad y no al patrón de movimiento de los



espermatozoides, es probable que la ausencia de las secreciones vaginales, que promueven la capacitación de los espermatozoides (Hafez, 1996), disminuya la velocidad de desplazamiento de éstos, pero no así, la forma en que tienden a desplazarse durante la capacitación.

Cabe señalar, que aun cuando algunos autores (De Vos, *et al.* 1997) probaron que no hay diferencias importantes entre usar o no los gradientes de Percoll para obtener espermatozoides viables, para la fertilización in vitro en mujeres, otros autores refieren justo lo contrario (Carrell, *et al.* 1998). De hecho en la actualidad, no solo no han caído en desuso los métodos para lavar el semen, sino continúan buscándose nuevas alternativas para mejorar dichos procedimientos.

En primates no humanos, en especial en aquellas especies en las que se presenta un coágulo seminal muy denso, la centrifugación con gradientes de silica permite separar la fracción líquida del eyaculado, con lo cual los espermatozoides quedan libres y se pueden utilizar con mayor facilidad.

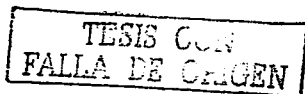
Por otra parte, como anteriormente se mencionó, en muchos casos a pesar de hacer una limpieza minuciosa del pene de los machos, algunas muestras pueden contaminarse con bacterias al momento de la colección. La centrifugación con gradientes de silica así como otras técnicas como el swim-up, el swim-down o inclusive la combinación de dos métodos de lavado puede ser útil para evitar esos contaminantes.

En conclusión dados los resultados obtenidos en este trabajo, se recomienda indistintamente el uso del PureSperm y del Percoll como productos no tóxicos para el semen de la marmoseta común. Aunque se recomienda que el tiempo de exposición de los espermatozoides a cualquiera de estos productos no sea por más de 30 min.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Tabla 1.** Definición de los parámetros medidos por el CASA (Hobson's sperm tracker, Hobson Tracking Systems)

Parámetro	Abreviatura	Definición
Desplazamiento angular medio	MAD	Es el promedio del cambio en la dirección de la cabeza en cada cuadro muestreado
Velocidad promedio del trayecto	VAP	Se calcula ajustando a una línea suavizada y se divide entre el tiempo que dura la traza
Amplitud del desplazamiento lateral de la cabeza	ALH	Es la desviación promedio de la línea suavizada obtenida como la diferencia en linealidad entre la línea suavizada y la ruta muestreada
Rectitud	STR	Es el cociente de la distancia en línea recta recorrida entre el punto de inicio y el punto final dividido entre la distancia a lo largo de una línea suavizada
Velocidad en línea recta	VSL	Es el cociente de la distancia recorrida en línea recta entre el punto de inicio y el final dividido entre el tiempo de duración de la traza
Danza media	DMN	Es el cociente de la ALH entre la LIN
Linealidad	LIN	Es el cociente de la distancia recorrida en línea recta entre el punto inicial y el final de la traza dividido entre el incremento de las distancias a lo largo de la ruta actual multiplicado por 100.
Viabilidad	VIA	Es el número de espermatozoides vivos observados en el campo de análisis dividido entre la suma de los espermatozoides vivos y muertos en el campo multiplicado por 100
Velocidad curvilínea	VCL	Es la suma del incremento de las distancias por cuadro a lo largo de una ruta medida dividido entre el total del tiempo de la traza.
Motilidad	MOT	Es el número de espermatozoides motiles observados en el campo de análisis dividido entre la suma de espermatozoides motiles y no motiles observados multiplicado por 100



**Tabla 2.** Comparación de los parámetros obtenidos mediante el método computarizado de evaluación del semen en la marmoseta común (*Callitrix jacchus*) a los 30 y 60 minutos de ser mezclado con tres tratamientos diferentes.

Parámetros del CASA	Control		50% Percoll (1)		100% Percoll (1)		50% Percoll (2)		100% Percoll (2)		40% Pure sperm		80% Pure sperm		Total	
	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.	Media	D.E.
<b>BCF</b>																
30 mn	4.3	0.8	4.3	1.3	2.1	1.4	2.0	1.4	2.8	1.6	5.5	1.3	4.2	1.3	3.6	0.5
60 mn	3.6	0.6	2.6	0.9	2.0	1.0	1.6	1.2	4.4	1.2	4.7	0.9	3.3	0.9	3.1	0.3
<b>WAD</b>																
30 mn	61.1	3.3	57.7	5.2	61.7	5.5	66.8	6.6	59.4	6.6	54.6	5.2	57.2	5.2	59.8*	2.0
60 mn	54.4	5.0	48.3	7.7	50.1	8.2	60.4	9.3	46.8	9.8	51.8	7.7	49.0	7.7	51.5	3.0
<b>VAP</b>																
30 mn	68.7	4.5	72.0	7.0	66.1	7.5	58.8	8.9	61.8	8.9	78.5	7.0	71.5	7.0	68.2*	2.8
60 mn	67.0	6.3	60.1	9.7	48.5	10.4	43.8	12.3	53.8	12.3	67.3	9.7	67.3	9.7	60.6	3.8
<b>ALH</b>																
30 mn	6.2	0.7	5.0	1.1	5.5	1.2	4.4	1.4	4.2	1.4	1.5	6.7	1.2	4.3	5.1*	0.4
60 mn	5.0	0.8	3.2	1.2	3.2	1.3	4.0	1.5	4.2	5.7	1.1	4.6	1.1	1.2	4.4	0.4
<b>STR</b>																
30 mn	40.0	4.4	42.6	6.8	32.4	7.2	32.8	8.6	36.4	8.6	45.3	6.8	38.0	6.8	38.2	2.7
60 mn	34.5	5.2	31.5	8.1	30.7	8.7	25.4	10.3	39.2	10.3	46.2	8.1	39.5	8.1	35.3	3.2
<b>VSL</b>																
30 mn	31.8	5.9	35.0	9.1	25.2	9.8	20.4	11.6	22.8	11.6	43.8	9.1	34.8	9.1	30.5	3.8
60 mn	30.1	6.1	25.3	9.5	17.0	10.2	10.2	12.0	29.4	12.0	46.8	9.5	37.8	9.5	28.1	3.7
<b>DWRN</b>																
30 mn	62.0	11.2	54.5	17.2	76.0	18.4	49.6	21.8	32.8	21.8	45.0	17.2	33.5	17.2	50.4*	6.8
60 mn	39.5	9.6	29.3	14.8	27.7	15.8	48.0	18.7	29.2	18.7	61.0	14.8	60.7	14.8	42.3	5.9
<b>PFT</b>																
30 mn	5.4	0.7	6.1	1.1	3.5	1.2	3.6	1.5	3.0	1.5	6.5	1.1	6.2	1.1	4.9	0.4
60 mn	5.5	0.9	3.1	1.5	3.1	1.6	3.0	1.9	3.6	1.9	9.0	1.5	6.6	1.5	4.8	0.6
<b>LIN</b>																
30 mn	23.0	3.4	26.2	5.3	18.8	5.7	18.0	6.8	21.4	6.8	29.6	5.3	24.6	5.3	23.1	2.1
60 mn	22.1	4.0	19.8	6.2	16.4	6.6	11.0	7.8	24.8	7.8	32.0	6.2	26.8	6.2	21.8	2.4
<b>VIA</b>																
30 mn	68.6	5.1	43.1	7.6	—	—	—	—	—	—	44.8	7.0	35.2	7.0	46.7*	3.0
60 mn	59.0	6.3	23.6	9.3	—	—	—	—	—	—	33.8	8.6	22.2	8.6	34.4	3.7
<b>VCL</b>																
30 mn	96.0	6.0	96.6	9.5	85.8	9.8	77.4	11.7	80.0	11.7	104.1	11.2	93.2	9.2	90.3*	3.6
60 mn	86.0	8.1	72.5	12.5	64.7	13.3	62.4	15.8	72.2	15.8	92	12.5	86.3	12.5	79.6	4.9
<b>MOT</b>																
30 mn	78.2	4.3	72.0	6.7	64.0	7.1	63.0	7.1	59.0	7.1	76.0	6.7	71.7	6.7	69.1*	2.5
60 mn	61.8	6.4	54.3	9.9	52.8	9.9	58.2	10.8	52.4	10.6	58.2	10.6	61.2	9.9	58.9	3.7

\*Parámetros del CASA que cambian significativamente con respecto al control a lo largo del tiempo.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Conclusiones generales

Las conclusiones de este trabajo se pueden recapitular en tres aspectos:

- 1) La aplicación de diversas técnicas para el estudio de la fisiología de la reproducción.
- 2) La información que se obtuvo sobre las características reproductivas del mono araña.
- 3) Por último, la visión futura en cuanto al estudio de la fisiología reproductiva del mono araña de manos negras.

Como se ha mencionado repetidas veces a lo largo de este trabajo, el mono araña no había sido estudiado desde una perspectiva fisiológica, por lo tanto la aplicación de las técnicas como la electroeyaculación, la criopreservación de semen, la laparoscopia exploratoria, la medición hormonal en heces y la inseminación artificial, aun cuando son técnicas que se utilizan rutinariamente en diversas especies tanto silvestres como domésticas, en el mono araña fueron implementadas en este trabajo por primera vez.

Es importante señalar que nuestros resultados mostraron que las técnicas descritas anteriormente no necesariamente se pueden aplicar de igual manera a todas las especies. Por lo tanto, la relevancia de este trabajo radica en que hemos encontrado la forma de estudiar algunos aspectos de la fisiología reproductiva de una especie mexicana a la que hasta ahora se le está dando importancia.

Puntualmente, a partir de los datos obtenidos podemos concluir que el modelo de estimulación para electroeyacular al mono araña, que nosotros adecuamos, es el que puede usarse rutinariamente sin poner en riesgo a los animales o al equipo utilizado, ya que en este trabajo probamos otras constantes de estimulación de acuerdo al trabajo publicado por Gould y colaboradores (1981), sin obtener resultados positivos.

Por otra parte, el análisis microscópico del semen nos sirvió para determinar tres aspectos importantes; el primero es, la diferencia que hay en cuanto a la calidad del semen en las diferentes épocas del año, que como se mencionó en este trabajo en la época de lluvias disminuye con respecto a la época de secas.

El segundo es, la calidad del semen con respecto a la posición jerárquica de los individuos, también difiere siendo los animales dominantes los que presentan mayor posibilidades de reproducirse exitosamente.

Y por último el coágulo seminal, en este trabajo determinamos las características de éste, dando a conocer que el mono araña presenta un coágulo seminal que lejos de licuarse a temperatura ambiente como sucede por ejemplo, en humanos o en chimpancés, se solidifica en un grado excesivo. Hasta el momento no hay información del semen de otro primate que presente estas características.

Resultó interesante poner en práctica la criopreservación del semen del mono araña utilizando la técnica de pellets, ya que es una técnica económica y que se lleva acabo con relativa facilidad. Sin embargo, los resultados obtenidos con la marmoseta común sugieren que probablemente sea mejor utilizar otras técnicas como la congelación en pajillas, ya que a pesar de ser más costosa los resultados son mejores.

La medición hormonal es la técnica que se usa actualmente para describir las concentraciones hormonales de estrógenos y progesterógenos en primates. Utilizamos la técnica propuesta por Matzumuro y colaboradores (1999), la cual resultó adecuada para medir estrona y progesterona en el mono araña, pero no 17 $\beta$ -estradiol como los autores proponen. En este trabajo los resultados del RIA para 17 $\beta$ -estradiol nos dieron valores no detectables.

Finalmente, dado que este trabajo se titula "*El uso de algunos métodos de reproducción asistida en monos araña (Ateles geoffroyi) para acelerar el tiempo de su reproducción en cautiverio*" es importante resaltar que la inseminación artificial fue un intento por promover, más que acelerar la reproducción del mono araña, ya que el hecho de que no se reproduzca espontáneamente en cautiverio nos lleva a poner en práctica estos procedimientos. Sin embargo, es importante considerar que mientras no se tengan bien determinados tanto los parámetros reproductivos de la especie, como las técnicas a utilizar para medirlos, la inseminación artificial así como cualquier otra técnica de reproducción asistida no pueden dar buenos resultados. Por otra parte, es importante reconocer que aun cuando se logró la fecundación de una hembra el embarazo no progresó. De manera que para obte-



ner resultados claramente exitosos, aun se requiere hacer más estudios con respecto a la fisiología reproductora de esta especie. Por mencionar algunos, sabemos que los machos de acuerdo a nuestros resultados presentan diferencias estacionales en la calidad del semen, de igual forma, es muy probable que las hembras también presenten diferencias en su actividad ovárica también estacionales, entonces las inseminaciones deben llevarse acabo preferentemente en la época de secas cuando las características del semen son mejores y seguramente las ovulaciones de las hembras suceden con mayor regularidad.

Por otra parte, el coagulo seminal que en este primate resulta tan evidente, es probable que tenga una función importante en la fertilización adecuada de la hembra, quizá no debemos intentar diluir el coágulo sino primero averiguar cual es su función.

Asimismo, las variaciones hormonales que obtuvimos de las hembras en este trabajo, deben compararse con las de hembras más jóvenes para asegurar que los animales en estudio no están perdiendo su capacidad reproductiva.

Además de estos ejemplos, existen muchas dudas más por resolver para lograr la inseminación artificial de estos animales de manera rutinaria.

## Referencias bibliográficas

Aidara, D.; Badawi, M.; Tahiri-Zagret, C.; Robyn, C.: Changes in concentrations of serum prolactin, FSH, oestradiol and progesterone and of sex skin during the menstrual cycle in the mangabey monkey (*Cebus atys lunulatus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 62:475-481, 1981.

Blaffer-Hrdy, B.S.; Whitten, P.L.: Patterning of sexual activity. En: *Primate Societies*. (B.B. Smuts; D.L. Cheney; R.M. Seyfarth; R.W. Wrangham; T.T. Struhsker, eds.), pp 370-386, Chicago University Press, 1987.

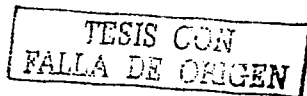
Bercovich, F.B.: Female weight and reproductive condition in a population of olive baboons (*Papio cynocephalus anubis*), *American Journal of Primatology*, 12:189-195, 1987.

Bonney, R.C.; Dixon, A.F.; Fleming, D.: Plasma concentrations of oestradiol 17-beta, oestrone, progesterone and testosterone during the ovarian cycle of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *Journal of Reproduction and Fertility* 60:101-107, 1980.

Campbell, C.J.; Shideler, S.E.; Todd, H.E. and Lasley, B.L.: Fecal analysis of ovarian cycle in female black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *American Journal of Primatology*, 54:79-89, 2001.

Carrell, D.T.; Kuneck, P.H.; Peterson, C.M.; Hatasaka, H.H.; Jones, K.P.; Campbell, B.F.: A randomized, prospective analysis of five sperm preparation techniques before intrauterine insemination of husband sperm. *Fertility and Sterility*, 69(1):122-126, 1998.

Coe, C.; Savage, A. and Bromley, L.: Phylogenetic influences on hormone levels across the primate order. *American Journal of Primatology*, 28:81-100, 1992.



Czaja, J.A.; Eisele, S.G.; Goy, R.W.: Cyclical changes in the sexual skin of female rhesus: relationships to mating behavior and successful artificial insemination. Federation Proceedings 34:1680-1684, 1975.

Dedle, J.A.; Plentl, A.A.: Induced ovulation and artificial insemination in a rhesus colony. Journal of fertility and sterility 17:757-764, 1966.

De Vos, A.; Nagy, Z.P.; Van Velde, H.; Joris, H.; Bocken, G.; Van Steirteghem, A.: Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. Human Reproduction, 12(9):1980-1984, 1997.

Dixson, A.F.: Sexual selection and genetic evolution. En: Primate Sexuality comparative studies of the prosimians, monkeys, apes and human beings. (Dixon, A.F. ed.), pp 244-273. Oxford University Press, 1998.

Dixson, A.F. and Lunn, S.F.: Postpartum changes in hormones and sexual behavior in captive marmoset groups. Physiology and behavior, 41:577-583, 1987.

Eaton, G.G.; Resko, J.A.: Ovarian hormones and sexual behavior in *macaca nemestrina*. Journal of Comparative Physiological Psychology 86:919-925, 1974.

Emlen, S.T.; Oring, L.W.: Ecology, sexual selection and the evolution of mating systems. Science, 197:215-223, 1977.

Fedigan, L.M. y Rose, L.M.: Interbirth interval variation in three sympatric species of Neotropical monkey. American Journal of Primatology, 37(1):9-24, 1995.

Gago, C.; Pérez-Sánchez, F.; Yeung, CH.; Tablado, L.; Cooper, T.G. and Soler, C.: Morphological characterization of ejaculate cynomolgous monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. American Journal of Primatology, 19:537-551, 1999.

Gao, D. Y.; Liu, C.; Mazur, P.; Crister, E.S. y Crister, J.K.: Effects of supercooling and potential intracellular ice formation on cryosurvival of human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 15:25, 1994.

Goodman, L; Wislocki, B.G.: Cyclical uterine bleeding in a new world monkey (*Ateles geoffroyi*). *Anatomical Record*, 61:379-387, 1935.

Gould, K.G., Warner, H. and Martin, D.E.: Rectal probe electroejaculation of primatology. *American Journal of Primatology* 7:213-222, 1978.

Graham, E.C.: Menstrual cycle of the great apes. En: *Reproductive biology of the great apes*. (Graham, E.C. ed.), pp. 1-43. Academic press, Nuevo Mexico University, Nuevo Mexico. 1981.

Hafez, E.S.E. Técnicas para mejorar la eficiencia reproductiva. En: *Reproducción e inseminación artificial en animales*. (Hafez, E.S.E. ed.), pp. 379-472. The McGraw-Hill Companies, Ltd., New York, 1996.

Harrison, R.M.: Historical development of laparoscopy in animals. En: *Animal Laparoscopy*. (Harrison, R.M. y Wildt, D.E. eds.), pp. 1-14. 1979.

Hearn, J.P. y Lunn, S.F.: The reproductive biology of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Laboratory Animal Handbook*: 6:191-202, 1975.

Hendrickox, A.G. y Kraemer, D.C.: Primates. En: *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. (Hafez, E.S.E. ed.), pp.316-334. Lea & Febiger, Philadelphia, 1970.

Hernández-López, L., Mayagoitia, L., Esquivel-Lacroix, C., Rojas-Maya, S., Mondragón-Ceballos, R.: The menstrual cycle of the black handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*). *American Journal of Primatology*, 44:183-195. 1998.

Hess, D.L.; Resko, R.A.: The effects of progesterone on the patterns of testosterone and estradiol concentrations in the systemic plasma of the female rhesus monkey during the intermenstrual period. *Endocrinology*, 92:446-453, 1973.

Hill O.W.C.: *Cebidae: Genus Ateles*. En: *Primates, comparative anatomy and taxonomy*. (Hill O.W.C ed.), pp.463-495. Edinburgh at the University press, 1962.

Hotchkiss, J.; Atkinson, L.E., Knobil, E.: Time course of serum estrogen and luteinizing hormone (LH) concentrations during the menstrual cycle of the rhesus monkey. *Endocrinology*, 89:177-183, 1971.

Ingram, J.C.: Husbandry and observation methods of a breeding colony of marmosets (*Callithrix jacchus*) for behavioral research. *Laboratory Animal*, 9:249-259, 1975.

Jarosz, S.J.; Kuehl, T.J.; Dukelow, R.W.: Vaginal cytology, induced ovulation and gestation in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Biology of Reproduction*, 16:97-103, 1977.

Jurke, M.H.; Czekala, N.M. and Fitch-Snyder, H.: Non-invasive detection and monitoring of estrus, pregnancy and the postpartum period in pygmy loris (*Nycticebus pygmaeus*) using fecal estrogen metabolites. *American Journal of Primatology*, 41:103-115, 1997.

Jurke, M.H., Czekala, N. M.; Jurke, S.; Hagey, L.R.; Lance, V. A.; Conley, A. A.; and Fitch-Snyder, H.: Monitoring pregnancy in twinning pygmy loris (*Nycticebus pygmaeus*) using fecal estrogen metabolites. *American Journal of Primatology* 46:173-183, 1998.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Kendrick, K.M. and Dixon, A.F.: The effect of the ovarian cycle on the sexual behavior of the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Physiology of Behavior*, 30:735-742, 1983.

Knobil, E. y Hotchkiss, J.: The menstrual cycle and its neuroendocrine control. En: *The Physiology of Reproduction*. (Knobil, E.; Neill, J.D.; Ewing, L.L; Greenwald, G.S.; Markert, C.L.; Pfaff, D.W. eds.), pp. 1971-1994, Raven press, New York, 1988.

Kraus, C.; Heistermann, M.; Kappeler, P.M.: Physiological suppression of sexual function of subordinate males: a subtle form of intrasexual competition among male sifakas (*Propithecus verreauxi*)? *Physiology and behavior* 66:855-861, 1999.

Kuedeling, I.; Schneider, A.; Sonken, J.; Nayudu, P.L. and Hodges, K.: Non-invasive collection of ejaculates from the common marmoset (*Callithrix jacchus*) using penile vibrostimulation. *American Journal of Primatology*, 52:149-154, 2000.

MacFarland, M.J.: Ecological determinations of fission-fusion in Ateles and Pan. En: *Primate ecology and conservation*. (Else, J.G. y Lee, P.C. eds.), pp. 181-190 Cambridge University press. Cambridge, 1986.

Marjaana, M. Valtonen-André, C. and Lundwall, A.: New world but not old world monkeys carry several genes encoding  $\beta$ -microseminoprotein. *European Journal of Biochemistry*, 264:407-414, 1999.

Martin D.P.: Feeding and nutrition. En: *Zoo and Wild Animal Medicine* (Fowler, M.E. ed.), pp: 661-663, Saunders, Philadelphia, USA, 1986.

Matzumuro M.; Tadashi S.; Fumiaki C.; Yasuhiro Y. y Takashi Y.: A two-steps extraction method to measure fecal hormones in female Cynomolgus Monkey (*macaca fascicularis*). *American Journal of Primatology*, 48:291-298, 1999.

Mazur, A. y Booth, A.: Testosterone and dominance in men. Behavioral and brain science, 21:353-397, 1998.

Meisel, R.L.: Copulation, mammals. En: Encyclopedia of Reproduction, (Knobil E. y Neill J. eds.), pp. 675-680, 1998.

Melnick D.J. y Pearl, M.C.: Cercopithecines in multimale groups: Genetic diversity and population structure. En: Primate Societies. (B.B. Smuts; D.L. Cheney; R.M. Seyfarth; R.W. Wrangham; T.T. Struhsler, eds.), pp 121-134, Chicago University Press, 1987.

Milton, K.: Estimates of Reproduction Parameters for free-ranging *Ateles geoffroyi*. Primates, 22:574-579, 1981.

Miranda F. Stevenson and Anthony B. Rylands: The marmosets, Genus *Callithrix*. In: Ecology and behavior of Neotropical primates. (Mittermeier, R; Rynolds, B.A.; Cohimbra-Filho, A. y Fonseca, G. eds.), pp 131-222. World Wild Life Found, Washington, D.C., 1988.

Monroe, S.E.; Atkinson, L.E. and Knobil, E.: Patterns of circulating luteinizing hormone and their relation to plasma progesterone levels during the menstrual cycle of the rhesus monkey. Endocrinology, 87:453-455, 1970.

Morrell, J.M.; Nubbemeyer, R.; Heistermann, M.; Rosenbusch, J.; Küderling, I.; Holt, W.; Hodges, J.K.: Animal Reproduction Science, 52:165-174, 1998.

Mortimer, S.T. y Mortimer, D.: Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. Journal of Andrology, 11(3):195-203, 1990.

Mortimer, D.: Percoll. <http://wwwvet.murdoch.edu.au/spermatology/percoll.html>, 1996.

Netter, Frank H.: Autonomic nervous system. En: The CIBA collection of Medical Illustrations; Nervous System. Alister Brass; Regina V. Dingle eds. CIBA, 1986.

Oko, R. y Clermont, Y.: Spermatogenesis. En: Encyclopedia of Reproduction, (Knobil E. y Neill J. eds.), pp. 602-609, 1998.

World Health Organization: Laboratory Manual for the examination of human semen and sperm cervical mucus interaction. 3° ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.

Potts, D.M.: Limiting Human Reproduction. En: Reproduction in mammals; libro 5: Artificial control of Reproduction. (Austin, C.R. y Shor, R.V., eds.) Cambridge University Press, Cambridge, pp 32-66, 1972.

Prescott, R.: Optical Principles of Laparoscopy. En: Animal Laparoscopy. (Richard M. Harrison y David E. Wilt, eds.) pp.15-30, 1979.

Pudritz, S. y Nayudu, P.L.: Extracellular calcium is not needed for capacitation of marmoset monkey sperm in vitro. Journal of Reproduction and Fertility, Abstract 23:10, 1999.

Randall, D.; Burggren, W.; French, K.: Hormonas: regulación y acción. En: Fisiología Animal, mecanismos y adaptaciones. (Randall, D., Burggren, W.; French, K., eds.), pp.329-380, McGrawHill Interamericana de España. 1998.

Ranganathan, P. y Agarwal, A.: Pure sperm is superior to isolate density gradient or spermprocessing. <http://www.ivfonline.com/HTML/Newsstand/ResPapers/puresperm.htm>, 2002.

Risler, L.; Wasser, S.K.; Sackett, G.O.: Measurement of excreted steroid in macaca nemestrina. American Journal of Primatology 12:91-100, 1987.



Robinson, J.G. y Janson, C.H.: Capuchins, squirrel monkeys, and atelines: Socio-ecological convergence with old world primates. En: *Primate Societies*. (Smuts, BB., Cheney, DL.; Seyfarth, RM.; Wrangham, RW.; Struhsaker, TT. eds.), pp. 69-83, University of Chicago press, Chicago, 1987.

Rowe, N.: Prosimians. En: *The pictorial guide to living primates*. (Rowe, N. ed.), pp. 13-56, Pogonias press, East Hampton, New York, 1996.

Tanphaichitr, N., Percoll and sperm motility,  
[www.psi.barc.usda.gov/embriomail/embryomail/htm](http://www.psi.barc.usda.gov/embriomail/embryomail/htm) 2000.

Truitt, W.A. y Coolen, L.M.: Identification of potential ejaculation generator in the spinal cord. *Science*, 297:1566-1569, 2002.

Sachs, D.B. y Meisel, R.L.: *The Physiology of Male Sexual Behavior*. En: *The physiology of Reproduction*. (Knobil, E.; Neill, J.D.; Ewing, L.L; Greenwald, G.S.; Markert, C.L.; Pfaff, D.W. eds.), pp 1393-1487, Raven press, New York, pp. 1988.

Saltiel, A.: Actividad reproductiva de la hembra I. En: *Reproducción de Animales Domésticos*. (Galina, C.; Saltiel, A.; Valencia, J.; Becerril, J.; Bustamante, G.; Calderón, A.; Duchateau, A.; Fernández, S.; Olguín, A.; Páramo, R.; Zarco, L. Eds.), pp.77-88, Limusa, México, D.F., 1988.

Schwasenberger F.; Möstl E.; Palme R.; Bamber E.: Faecal steroid analysis for non-invasive monitoring of reproductive system in farm, wild and zoo animals. *Animal Reproduction Science* 42:515-526, 1996.

Settlage, D.S.F.; Swan, S. Hendrickx, A.G.: Comparison of artificial insemination with natural mating technique in mhesus monkey, *macaca mulatta*. *Journal of Reproduction and Fertility* 32:129-132, 1973.

Shideler, SE.; Czekala, NM.; Kasman, LH.; Lindburg, DG.; Lasley, BL.: Monitoring luteal function in the lion-tailed macaque (*Macaca silenus*) through urinary estrone conjugate evaluations. *Biology of Reproduction* 29:905-911. 1993.

Siedlecky, S.: Concepts and definitions. En: *Regulating menstruation, beliefs, practices, interpretations.* (Van de Walle, E. y Renne, E.P. eds.), pp. Xxxix, The University of Chicago press, 2001.

Smith, B.V.; Lancy, D.: Residual bodies of somniferous tubules of the rat. *Nature* 184:249, 1959.

Southwick, C.H.; Beg, M.A.; Siddiqi, M.R.: Rhesus monkey in North India. En: *Primate behavior : field studies of monkeys and apes.* (De Vore I, ed.) New York: Holt, Rinehart & Winstone, pp 111-159, 1965.

Srisombut, C.; Morshedi, M.; Lin, M.H.; Nassar, A.; Oehninger, S.: Comparison of various methods of processing human cryopreserved-thowed semen samples. *Human Reproduction*, 13(8):2151-2157. 1998.

Stabenfeldt, GH.; Hendrickx, AG.: Progesterone levels in the sooty magabey (*Cercocebus atys*) during the menstrual cycle, pregnancy and parturition. *Journal of Medical Primatology* 2:1-10, 1973.

Stavinsky, R.; Russell, E.; Stallings, J.; Smith, E.O.; Worthman, C.; Whitten, P.L.: Fecal steroid analysis of ovarian cycles in free-ranging. *American Journal of Primatology*, 36:285-297, 1995.

Stevenson, M.F.: Maintenance of breeding groups of the common marmoset (*Callithrix jacchus jacchus*) with notes on hand-rearing. *International Zoo Year book*, 16:110-116, 1976.

Stevenson, M.F. & Sutcliffe, A.G.: Breeding a second generation of common marmosets, *Callithrix jacchus jacchus*. International Zoo Yearbook, 18:109-114, 1978.

Strier, K.B.; Ziegler, T.E.: Behavioral and endocrine characteristics of the ovarian cycle in wild muriqui monkeys, *Brachyteles arachnoides*. American Journal of Primatology, 32:31-40, 1997.

Valerio, DA.; Leverage, WE.; Bensenhaver, LV.; Thronett, HD.: The analysis of male fertility, artificial insemination and natural mating in the laboratory breeding of macaques. En: Medical Primatology. (E.I. Goldsmith and J. Moor-Jankowski, eds.) Basel, Karger, 1971.

Van Rosemalen, M.G.M. y Klein, L.L.: The spider monkeys, genus *Ateles*. En: Ecology and behavior of Neotropical Primates. (Russell A. Mittermeier, Anthony B. Rylands, eds), pp 455-537, 1988.

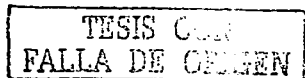
Vom Saal Frederick, S. y Finch Caleb E.: Reproductive Senescence: Phenomena and mechanisms in mammals and selected vertebrates: En Physiology of reproduction, (Knobil E. y Neill J. eds.), pp. 2351-2413, 1988.

Weisbroth, Steven; Young A. Francis: The collection of primate semen by electroejaculation. Fertility and Sterility 16:229-235, 1965.

Wilks, J.W.: Endocrine characterization of the menstrual cycle of the Stumptailed Monkey (*Macaca arctoides*). Biology of Reproduction, 16:474-478. 1977.

Yanagimachi, R., Mammalian fertilization. En: The Physiology of Reproduction (Knobil, E. y Neill, J. eds.), pp. 135-186, Raven press, 1988.

Yeung, C.H.; Morrell, J.M.; Cooper, G.; Weinbauer, J.K. and Neishlag, E.: Maturation of sperm motility in the epididimis of the common marmoset (*Callithrix jacchus*)

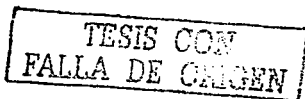


and the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). International Journal of Andrology, 19:113-121, 1996.

Zigler, T.E.; Scheffler, G.; Wittwer, D.J.; Schultz-Darken, N.; Snowdon, C.T. Abbott, D.H.: Metabolism of reproductive steroids during the ovarian cycle in two species of Callitrichids, *Saguinus oedipus* and *Callitrix jacchus*, and estimation of the ovulatory period from fecal steroids. Biology of Reproduction 54:91-99, 1989.

Ziegler, T.E.; Hodges, K.; Winkler, P. and Heistermann, M. : Hormonal correlates of reproductive seasonality in wild female hanuman langurs (*Presbytis entellus*). American Journal of Primatology 51:119-134, 2000.

Zirkin, B.R.: Hormonal control of spermatogenesis. En: Encyclopedia of Reproduction, (Knobil E. y Neill J. eds.), pp.556-562, 1998.



## Apéndice

---

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

RESEARCH ARTICLE

The Menstrual Cycle of the Spider Monkey  
(*Ateles geoffroyi*)

LEONOR HERNÁNDEZ-LOPEZ,<sup>1,2</sup> LILIAN MAYAGOITIA,<sup>1,3\*</sup> CARLOS ESQUIVEL-LACROIX,<sup>2</sup> SUSANA ROJAS-MAYA,<sup>2</sup> and RICARDO MONDRAGON-CEBALLOS<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Ethology Department, Mexican Institute of Psychiatry, Tlalpan, Mexico

<sup>2</sup>Psychobiology and Behavior Unit, National Autonomous University of Mexico, Mexico

<sup>3</sup>Reproduction Department, Veterinary Medicine and Zootechnics Faculty, National Autonomous University of Mexico, Mexico

The ovarian cycles of four adult female spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) were followed daily throughout 30 days by means of vaginal swabs and blood samplings. Cytological analyses of the vaginal swabs and radioimmunoassay determination of the daily levels of estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) and progesterone (P<sub>4</sub>) were done in order to classify the kind of ovarian cycle of this species. Our results show that *Ateles geoffroyi* females display menstrual cycles of about 24 days on average. By comparison with the well-known menstrual cycles of women, apes, and Old World monkeys, the four distinctive cytological phases (bleeding, follicular, periovulatory, and luteal) could be recognized; mid-cycle E<sub>2</sub> peaks followed by mid-luteal increases of the same hormone were present in all four females. P<sub>4</sub> levels were higher after the E<sub>2</sub> peak, although both hormones were present throughout the cycles. Also, age-dependent features, hormone profiles, and changes in menstrual phases lengths were detected. *Am. J. Primatol.* 44:183-195, 1998. © 1998 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** menstrual cycle; estradiol-17 $\beta$ ; progesterone; *Ateles geoffroyi*; Neotropical primates; vaginal cytology

INTRODUCTION

The accurate classification of the ovarian cycles of nonhuman primates is of importance to a number of disciplines, constituting the cornerstone of a wide variety of studies ranging from evolutionary studies [e.g., Profet, 1993; Strassmann, 1996], physiology [e.g., Gordon et al., 1995], chronobiology [Harter & Erkert, 1993], to in vivo [e.g., Morrell et al., 1997] and in vitro fertilization [e.g., Alak & Wolf, 1994; Wolf et al., 1996].

Although the ovarian cycles of Old World monkeys and apes have been determined endocrinologically and cytologically for a large number of species, the same has not been done in many prosimian and Neotropical primates species. In

\*Correspondence to: Lilian Mayagoitia, Instituto Mexicano de Psiquiatría, Unidad Neurociencias, Camino de Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan, México, D.F. 14370, México. E-mail: mayagoitia@cecidis.iss.gob.mx

Received for publication 26 May 1997; revision accepted 3 October 1997.

their excellent review of patterning of sexual activity, Blaffer Hrdy and Whitten [1987] refer to the menstrual cycle as typical of apes and Old World monkeys (p. 371), based mainly on the presence of overt cyclical bleeding. Strassmann [1996] more accurately states that bleeding might be a side consequence of endometrial microvasculature and litter mass/body mass ratio, more closely related to phylogeny than to socioecological adaptations, thus being relatively unimportant in the classification of primates ovarian cycles, where other more accurate measures such as those mentioned above or endocrine blood values, duration of ovarian phases, or duration of uterine endometrial shed/resorb rate might prove more efficient. Yet Blaffer Hrdy and Whitten's exhaustive table [1987:372-378], as well as the more recent evidence presented by Profet [1993:384-386], clearly shows how little is still known about the ovarian cycles of the Primate order, particularly concerning prosimians and Neotropical monkeys. The comparison of the data provided by the authors mentioned above shows that Profet's more recent review includes updated information of only five Neotropical primates species: *Saguinus oedipus*, *Ateles geoffroyi*, *Lagothrix lagothricha*, *Cebus albifrons*, and *Aotus triuirgatus*. This compelled some authors [e.g., Profet, 1993; Strassmann, 1996] to perform comparative analyses and support evolutionary assumptions on the quite abundant Cercopitheoidea and Hominoidea literature, being forced to neglect the great Platyrrhini diversity. Fortunately, knowledge concerning the Neotropical primates reproductive parameters is rapidly growing [e.g., *Brachyteles arachnoides*: Strier & Ziegler, 1994; *Pithecia pithecia*: Shideler et al., 1994].

The Atelinae subfamily is characterized as being one of the least known among nonhuman primates, primarily where physiology and behavior is concerned. In relation to the ovarian cycle of black-handed spider monkeys, one early study by Goodman and Wislocki [1935] reported a periodical bleeding, occurring between 24 and 27 days, in a pair of female *A. geoffroyi* housed at the London Zoo. More recently, McDaniel et al. [1993] described in the same species *in vivo* morphological changes of the ovaries, accounting for a cycle length between 23 and 25 days, while Hodges et al. [1981], measuring levels of urinary estrogens, showed that the cycle length of *A. fusciceps* is around 20-22 days. The present work was done in order to 1) assess the fluctuations of estradiol-17 $\beta$  (E<sub>2</sub>) and progesterone (P<sub>4</sub>) throughout the cycle, 2) characterize the changes in the vaginal epithelium, and 3) provide overall and per phase mean serum values of the above mentioned hormones in female *A. geoffroyi*.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

The subjects were four female spider monkeys (*Ateles geoffroyi*), whose approximate ages at the time of the study were as follows: Celina and Pilar, 17; Lola, 15; and Frida, 7 years old. These animals were housed along with five adult males and another adult female (which refused to cooperate in the samplings and so could not be assessed) in the Department of Ethology at the Mexican Institute of Psychiatry in Mexico City. As the study of the monkeys' behavior is the main concern of the monkey colony, none of them were on contraceptives, drugs, or any other kind of intrusive manipulation. The spider monkeys live in a large outdoor cage, provided with various long ropes hanging from the wire mesh ceiling to facilitate natural locomotion [for a more accurate description of the housing conditions and history of the spider monkey group see López-Luján et al., 1989; Anaya-Huertas et al., 1994]. The monkeys were fed fruits and Monkey Diet 5038 from Lab Diet (PMI Feeds, Inc., St. Louis, MO) and had ad libitum access to fresh

tap water. The animals were seldom disturbed by human intrusions, except when the cage was washed (daily around 0900 h) or, in this particular study, when vaginal swabs and blood samples were collected (daily around 1800–1900 h).

### Blood Sampling

During a previous study carried out in 1993–1994, the females were trained using positive reinforcement to enter a small wire mesh cage (1.5 × 1 × 1 m) attached to the door of their home cage, present hindquarters to the human trainer, and allow a cotton swab to be introduced in the vagina. For cooperation, the animals were rewarded with a piece of mango or a small candy. This procedure was slightly modified, and the animals were trained to be injected with ketamine i.m. (Imalgén, Mexico) at 3 mg/kg body weight. This seemingly small dose of tranquilizer prevented the animals from getting deeply anesthetized and allowed recovery 10–15 min following injection.

In the previous 13 month study the median interval between bleedings was found to be 24 (range: 19–34; mean: 24.3; SD: 3.6) days. In order to ensure the sampling of an entire cycle per female, we chose a one month daily sampling. Blood (3 ml) was collected from the femoral veins or arteries daily from April 8 to May 8, 1996. Blood samples were centrifugated at 3,000 rpm for 15 min, and sera were separated from the packed cell volumes and were frozen at -20°C. Blood levels of E<sub>2</sub> and P, were determined by radioimmunoassay (ICN Pharmaceuticals, Inc., Iztapalapa, Mexico) [Abraham et al., 1972].

### Cytological Analyses

Vaginal swabs were begun 8 days before blood collecting. These were not used in smears, as they were done only to restrain females to the procedure. Nevertheless, these swabs, which came out stained with blood during menses, helped us to calculate the intermenses length for Celina, as she and Pilar were in the second half of the cycle when blood sampling began.

Immediately after finishing collecting the blood, we took a vaginal smear using a cotton swab while the females were still tranquilized. The vaginal smears were fixed in 96% alcohol and were later stained by means of Shorr's Trichromic technique. The number of epithelial cells (parabasals, intermediate, superficial, squamous), leucocytes, and erythrocytes were counted in a 10× field. Using the criteria proposed by Fox and Laird [1970] and Graham [1981], we examined the smear features, along with the hormonal background, to determine the following phases: follicular, periovulatory, luteal, and menses.

### Statistical Analyses

Nonparametric tests were performed, as much of the data included frequencies (cell counts) and the serum values were not normally distributed and highly heteroscedastic. A Wald-Wolfowitz runs test was used to search for significant daily variations in hormonal values and cell counts, using the median value of each series as the cutpoint; Kendall's coefficient of concordance W was used to search for synchronization of cycles between females; finally, being between females independent measures, Kruskal-Wallis one-way ANOVA was performed to search for differences in overall hormonal serum values and cell counts, followed by multiple comparisons tests specifically devised for this nonparametric ANOVA [Siegel & Castellan, 1988]. When necessary, probabilities were pooled according to the method proposed by Sokal and Rohlf [1969].

TESIS GUAN  
PALLA DE ORIGEN



**RESULTS****Endocrine and Cytological Daily and Between-Females Variations**

Cycles lengths differed between females. The number of days elapsed between onsets of bleeding were 22 days for Lola, 26 for Frida, and 28 for Celina, while Pilar must have stopped bleeding a few days before we started retraining the animals, as none of the vaginal swabs taken throughout that week was stained with blood.

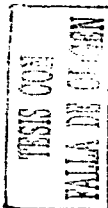
Figures 1-4 show the day-by-day variations of hormonal serum values and of the percentage of epithelial cells for each female. Ovarian cycles were not synchronized among females ( $E_2$ :  $W = 0.257$ ,  $\chi^2 = 27.756$ , d.f. = 27,  $P > 0.05$ ;  $P_4$ :  $W = 0.261$ ,  $\chi^2 = 28.08$ , d.f. = 27,  $P > 0.05$ ). Table I shows Wald-Wolfowitz runs tests results. Pooled probabilities were all significant, accounting for significant variations throughout the cycle.

Frida (Fig. 1) and Lola (Fig. 2) showed  $E_2$  peaks at 10 and 11 days, respectively, after the onset of bleeding. Pilar (Fig. 3) and Celina (Fig. 4) showed  $E_2$  peaks at 13 and 18 days, respectively, before the onset of bleeding. Secondary  $E_2$  peaks appeared in all females at varying intervals. The younger females, Frida and Lola, showed a second  $E_2$  peak 216 h (9 days) after the first one. Pilar showed this peak 72 h after the first one and Celina 96 h after the first one. The first  $P_4$  peaks were observed on days 10 and 12 in Frida and Lola, respectively. In both females these  $P_4$  peaks occurred 24 h after the  $E_2$  peaks. The same  $P_4$  peaks were observed in days 14 and 22 before the onset of bleeding in Pilar and Celina; that is 24 and 36 h prior to the  $E_2$  peaks, respectively.

Hormonal levels varied from one cycle to another. In both Frida and Lola (Figs. 1, 2),  $E_2$  and  $P_4$  levels were higher in the second cycle (whose values are reported here), than in the previous one. On the other hand, hormonal levels in Pilar (Fig. 3) were lower throughout her second cycle. No data were available for Celina (Fig. 4) to compare changes from cycle to cycle, as hers was a rather long cycle with a lengthy menstruation (8 days). Overall hormonal levels ( $E_2$ : Kruskal-Wallis test = 48.801, d.f. = 3,  $P < 0.0001$ ;  $P_4$ : Kruskal-Wallis test = 11.58, d.f. = 3,  $P = 0.009$ ), as well as some cell occurrences (% of superficial: Kruskal-Wallis test = 15.018, d.f. = 3,  $P = 0.002$ ; % of parabasal: Kruskal-Wallis test = 21.544, d.f. = 3,  $P < 0.0001$ ; leucocytes frequency: Kruskal-Wallis test = 36.641, d.f. = 3,  $P < 0.0001$ ) were significantly different between females (see Table II, last column). Hormonal serum values were higher in younger than in older females: Frida showed the highest values, followed by Lola, Pilar, and Celina. Paired comparisons showed that  $E_2$  serum values were significantly higher ( $P < 0.05$ ) in Frida and Lola than in Pilar and Celina, while  $P_4$  values were only significantly higher ( $P < 0.05$ ) for Frida when compared to Celina. Concerning cell counts, differences were not so clearly related to age. Frida showed a significantly ( $P < 0.05$ ) higher percentage of superficial cells than Celina. Lola showed significantly ( $P < 0.05$ ) lower percentages of intermediate cells than Celina and Pilar. Finally, both Celina and Pilar showed a significantly ( $P < 0.05$ ) greater number of leucocytes than Frida and Lola. No significant differences were found for percentage of squamous and intermediate cells and number of erythrocytes.

**Cell Counts and Hormonal Levels in the Different Menstrual Phases**

As we did not have luteinizing hormone measures to accurately place the ovulation day, and to ease recognition of the menstrual phases by means of vagi-



Menstrual Cycle in *Ateles geoffroyi* / 187

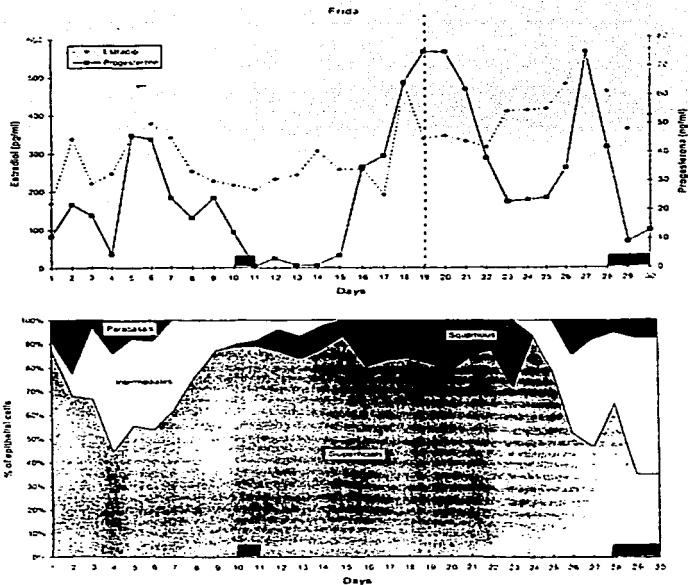


Fig. 1. Frida's daily serum values of estradiol-17 $\beta$  and progesterone (upper graph), and the percentages of epithelial cells (lower graph) throughout the 30 day study. The vertical plotted line marks the first E<sub>2</sub> peak. The black horizontal bars account for menses.

nal smears, phases were divided into menses, follicular, periovulatory and luteal. Figure 5 shows the most representative cellular patterns of each phase. Table II shows the mean values of percent of epithelial cell, number of blood cells and hormonal serum figures per female per phase. Superficial cells were present all throughout the cycle, being rather abundant in the follicular and periovulatory periods. Squamous cells were most conspicuous in the periovulatory phase, disappearing (or almost) in the luteal and menses phases. On the other hand, intermediate cells were abundant in the luteal and menses phases, decreased in the follicular phase, and disappeared (in the younger females) or were scarce (in the older animals) during the periovulatory period. Parabasal cells seldom appeared in the younger females but were present throughout the cycle in older females

TESIS CON  
 FALLA DE COPIEN

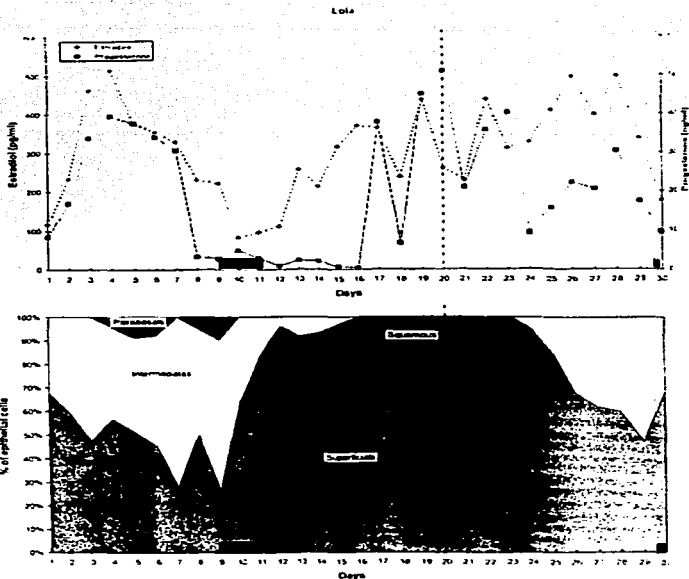


Fig. 2. Lolita's data. Same as in Fig. 1.

(Pilar and Celina). In these latter females, parabasal cells were at their lowest during the periovulatory period and at their highest during menses. Leucocytes were present during menses in all four females but disappeared in the younger females during the follicular phase and for the rest of the cycle, while in the older females they were present, although in lesser quantities, in all remaining phases. Finally, erythrocytes appeared only during menses in all females.

$E_2$  was present throughout the cycle phases in all females. The periovulatory period accounted for higher serum values of this hormone than menses and follicular phases. Yet, in the younger females, due to bigger secondary  $E_2$  peaks during the luteal phase, mean values were above the periovulatory ones. In the older females, these  $E_2$  luteal peaks were not so conspicuous, and mean values were above those from menses and follicular phases but not from periovulatory

TESIS CIA  
 PAUTA DE

Menstrual Cycle in *Ateles geoffroyi* / 189

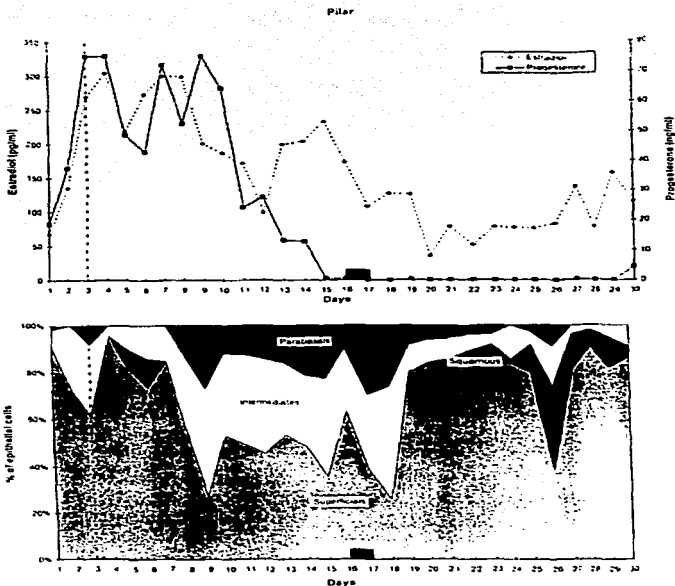


Fig. 3. Pilar's data. Same as in Fig. 1.

ones. P, serum values were highest during the periovulatory period, decreasing throughout the luteal, menses, and follicular phases.

**DISCUSSION**

Our results, despite the small sample and variability among animals, show that female *A. geoffroyi* hormonal and cellular profiles more closely resemble that of chimpanzees, gorillas, and orangutans [Graham, 1981; gorillas: Astrid et al., 1995], gibbons [Nader et al., 1993], stump-tail macaques [Wilks, 1977], black mangabeys [Calle et al., 1990], vervet monkeys [Seier et al., 1991], or the large Neotropical muriquis [Strier & Ziegler, 1994] than the cycles of white-faced sakis [Shideler et al., 1994], capuchins [Wright & Bush, 1977], squirrel monkeys [Hodges

TESIS CON  
 FALLA DE CUBRIR

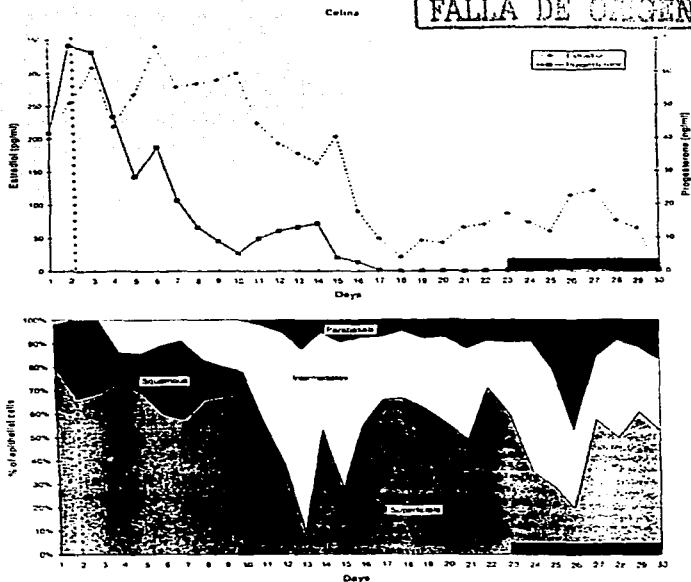


Fig. 4. Celina's data. Same as in Fig. 1.

et al., 1981), owl monkeys [Bonney et al., 1980], and the common marmosets [Hearn et al., 1978].

Bleeding, although inconspicuous, occurs cyclically in our black-handed spider monkeys, except for a 3 month annual period (unpublished data), being true menses, because, as our data and McDaniel et al. (1993) ovarian laparoscopies show, these occur following the late luteal phase, and not around the periovulatory phase (proestrus and estrus), as has been reported in nonprimate mammals [Galina et al., 1988]. The quite small number of erythrocytes present in the vaginal smears accounts for the covert menses, a fact most certainly due to the presence of straight rather than spiral arterioles in the platyrrhines [Strassmann, 1996]. Yet bleeding was present, unlike the case in other smaller New World monkeys, where it is absent [squirrel monkey: Jarosz et al., 1977; common mar-

**TABLE I. Probabilities of Univariate Wald-Wolfowitz Runs Tests Results Performed on Daily Hormonal Serum Values and Cell Counts per Female**

Dependent variable	$\chi^2$ for pooled probability*	Run tests probability			
		Celina	Frida	Lola	Pilar
Estradiol	74.2421*	0.000	0.014	0.054	0.001
Progesterone	114.4563*	0.000	0.002	0.007	0.000
Parabasals	70.5706*	0.158	0.000	0.003	0.010
Superficial	32.9968*	0.027	0.003	0.001	0.844
Intermediate	115.3399*	0.001	0.000	0.000	0.009
Squamous	184.2068*	0.000	0.000	0.000	0.000
Erythrocytes	83.9147*	0.000	0.001	0.002	0.003
Leucocytes	153.7343*	0.010	0.003	0.000	0.230

\*Degrees of freedom = 4

\* $P < 0.001$ .

moset; Hearn et al., 1978; owl monkeys: Bonney et al., 1980). The menses period lasted from 2-8 days, but present data are inconclusive because a single cycle per female was sampled, so additional research would be necessary to assess accurate mean length.

The mean duration of luteal ( $6 \pm 2.6$  days) and follicular ( $8.2 \pm 2.8$  days) phases were not strikingly different, as they are in the tufted capuchin (Wright & Bush, 1977), the owl monkey (Bonney et al., 1980) and the common marmoset (Hearn & Lunn, 1975), whose follicular phases are shorter than the luteal phases, or in the great apes, who show much longer follicular periods than luteal ones (Graham, 1981). Instead, it seems that, as in some Old World monkeys [stumptail and rhesus macaques: Wilks, 1977; black mangabeys: Calle et al., 1990; vervet monkeys: Seier et al., 1991], the lar gibbon (Nadler et al., 1993), and the muriqui (Strier & Ziegler, 1994), both periods are, on average, of the same length in the spider monkeys. A conservative explanation to this is the fact that spider monkeys (as well as muriquis) are middle-sized primates, about the size of a rhesus, a stumptail macaque (although much more gracile), or a gibbon. Moreover, female spider monkeys show around the same litter mass/body mass ratio and are within the body weight range of black mangabeys (Calle et al., 1990), rhesus and stumptail macaques, vervets, and gibbons (see appendix in Strassmann, 1996); thus, the mean duration of luteal and follicular periods must obey the metabolic constraints shared by all these medium-sized species. When the average length of the menstrual cycle ( $25.3 \pm 3$  days,  $n = 3$ ; Pilar's data were excluded, as we did not have the chance to sample an entire menses-to-menses cycle) from the present work, is considered the periovulatory period was a rather lengthy one ( $7.6 \pm 2.1$  days), as it accounted, on average, for 30.2% (SD = 6.5%) of the entire cycle length.

A mid-luteal E<sub>2</sub> peak was observed in all four spider females, just as has been described in women and great apes (Graham, 1981), gibbons (Nadler et al., 1993), stumptail and rhesus monkeys (Wilks, 1977), vervets (Seier et al., 1991), white-fronted capuchins (Hodges et al., 1981), and sakis (Shideler et al., 1994), but it is not apparent in black mangabeys (Calle et al., 1990), owl monkeys (Bonney et al., 1980), squirrel monkeys and white-lipped tamarins (Hodges et al., 1981), or the common marmoset (Hearn & Lunn, 1975). These mid-luteal E<sub>2</sub> peaks were greater than the periovulatory ones in the younger females (Frida and Lola) but not in the older animals (Pilar and Celina), yet they appeared earlier in the older females than in the younger ones. Moreover, both hormones E<sub>2</sub> and P<sub>4</sub> were more abundant in younger than in older females (see Table II), as

TABLE II. Mean  $\pm$  SD of Epithelial Cell Percentages, Estradiol-17 $\beta$  (pg/ml), and Progesterone (ng/ml) Serum Values of the Menstrual Phases and of the Total Sample of Each Female

	Menses	Follicular	Periovulatory	Luteal	Total
<b>Frida</b>					
Superficial	89.0 $\pm$ 0.2	84.0 $\pm$ 10.2	82.0 $\pm$ 2.2	72.0 $\pm$ 18.8	72.5 $\pm$ 17.2
Squamous	2.0 $\pm$ 0.9	8.0 $\pm$ 1.7	18.0 $\pm$ 7.2	7.0 $\pm$ 11.5	6.1 $\pm$ 8.3
Intermediate	9.0 $\pm$ 1.1	3.0 $\pm$ 2.8	0.0 $\pm$ 0.0	18.0 $\pm$ 18.7	17.2 $\pm$ 8.7
Parabasal	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	4.0 $\pm$ 6.2	3.6 $\pm$ 5.8
Leucocytes	17.0 $\pm$ 8.5	2.0 $\pm$ 2.4	0.0 $\pm$ 0.0	49.7 $\pm$ 70.3	29.1 $\pm$ 47.4
Erythrocytes	23.0 $\pm$ 11.3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	3.7 $\pm$ 7.3
Estradiol-17 $\beta$	211.0 $\pm$ 8.3	259.7 $\pm$ 32.4	322.0 $\pm$ 93.4	561.16 $\pm$ 82.4	329.0 $\pm$ 95.2
Progesterone	6.47 $\pm$ 8.5	2.3 $\pm$ 1.7	58.5 $\pm$ 17.4	36.4 $\pm$ 19.9	29.2 $\pm$ 23.5
Days	2	4	6	6	30
<b>Lola</b>					
Superficial	57.0 $\pm$ 28.0	84.0 $\pm$ 7.0	78.0 $\pm$ 9.0	67.0 $\pm$ 14.0	67.0 $\pm$ 17.7
Squamous	1.0 $\pm$ 1.0	12.0 $\pm$ 7.0	22.0 $\pm$ 9.0	2.0 $\pm$ 3.0	7.6 $\pm$ 10.1
Intermediate	39.0 $\pm$ 24.0	5.0 $\pm$ 3.0	0.0 $\pm$ 0.0	31.0 $\pm$ 17.1	24.3 $\pm$ 22.6
Parabasal	3.0 $\pm$ 6.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 2.9
Leucocytes	19.3 $\pm$ 9.3	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	50.0 $\pm$ 108.0	15.8 $\pm$ 49.8
Erythrocytes	112.7 $\pm$ 103.2	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	12.2 $\pm$ 45.2
Estradiol-17 $\beta$	133.5 $\pm$ 76.3	253.3 $\pm$ 99.4	325.8 $\pm$ 89.7	411.1 $\pm$ 74.2	315.9 $\pm$ 121.0
Progesterone	3.6 $\pm$ 1.2	19.5 $\pm$ 40.5	34.1 $\pm$ 15.2	19.3 $\pm$ 7.0	19.5 $\pm$ 16.4
Days	3	5	7	6	30
<b>Pilar*</b>					
Superficial	51.0 $\pm$ 18.0	71.0 $\pm$ 22.0	79.0 $\pm$ 13.0	50.0 $\pm$ 16.0	66.8 $\pm$ 20.9
Squamous	0.0 $\pm$ 0.0	8.0 $\pm$ 11.0	3.0 $\pm$ 5.0	0.0 $\pm$ 0.0	4.3 $\pm$ 7.5
Intermediate	30.0 $\pm$ 4.0	14.0 $\pm$ 13.0	16.0 $\pm$ 11.0	35.0 $\pm$ 9.0	20.4 $\pm$ 14.5
Parabasal	20.0 $\pm$ 44.0	7.0 $\pm$ 8.0	2.0 $\pm$ 3.0	15.0 $\pm$ 8.0	8.4 $\pm$ 9.1
Leucocytes	158.0 $\pm$ 67.9	62.4 $\pm$ 82.5	13.5 $\pm$ 9.5	79.3 $\pm$ 66.4	50.5 $\pm$ 68.9
Erythrocytes	65.5 $\pm$ 84.1	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	4.4 $\pm$ 22.8
Estradiol-17 $\beta$	140.5 $\pm$ 46.0	80.9 $\pm$ 29.7	266.8 $\pm$ 35.4	210.3 $\pm$ 62.5	158.7 $\pm$ 81.4
Progesterone	0.5 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.1	60.6 $\pm$ 17.1	38.5 $\pm$ 28.7	20.8 $\pm$ 28.8
Days	2	9	4	9	29
<b>Celina</b>					
Superficial	44.0 $\pm$ 16.0	—	68.0 $\pm$ 7.0	50.0 $\pm$ 18.0	54.7 $\pm$ 16.9
Squamous	0.0 $\pm$ 0.0	—	21.0 $\pm$ 9.0	1.0 $\pm$ 1.8	7.5 $\pm$ 11.2
Intermediate	38.0 $\pm$ 11.0	—	11.0 $\pm$ 7.0	42.0 $\pm$ 17.0	30.2 $\pm$ 18.6
Parabasal	18.0 $\pm$ 13.0	—	0.0 $\pm$ 0.0	7.0 $\pm$ 3.0	7.5 $\pm$ 9.4
Leucocytes	92.1 $\pm$ 67.1	—	15.1 $\pm$ 13.0	55.1 $\pm$ 13.0	51.6 $\pm$ 44.1
Erythrocytes	64.7 $\pm$ 71.8	—	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	17.3 $\pm$ 45.7
Estradiol-17 $\beta$	74.2 $\pm$ 36.9	—	273.9 $\pm$ 41.2	112.3 $\pm$ 73.4	155.4 $\pm$ 101.7
Progesterone	0.5 $\pm$ 0.4	—	33.7 $\pm$ 22.4	4.8 $\pm$ 6.0	12.9 $\pm$ 19.7
Days	8	—	10	12	30

\*Pilar's values for each phase were not calculated from an entire cycle but from the latter and first halves of two contiguous cycles.

†Celina's cycle was so large (>30 days) that values for this phase were not collected.

has been described in women, rhesus monkeys, and chimpanzees [vom Saal & Finch, 1988]. Unfortunately, our spider monkeys have not bred, so we cannot correlate our data with reproductive success to lend assurance to the above mentioned idea.

Finally, the four main menstrual phases can be recognized in vaginal smears by assessment of the percentages of epithelial cellular patterns and the presence or absence of erythrocytes. Summarizing, menses are characterized by the pres-



Fig. 6. Characteristic cellular patterns of the menstrual cycle phases in female spider monkeys, as seen in a 10x field. A: Menax. B: Follicular. C: Perioviatory. D: Luteal. E: erythrocyte, I: intermediate, L: leucocyte, N: nucleus, P: paracellul, S: superficial, SC: squamous.



ence of erythrocytes and rather abundant intermediate (and sometime parabasal) cells. During the follicular period, superficial cells increase in number and squamous ones appear, while intermediate and parabasals decrease or even disappear and erythrocytes become completely absent. Superficial and squamous cells predominate all throughout the periovulatory period, the other epithelial ones being scarce or absent. Finally, during the luteal phase superficial and squamous cells decrease in number; intermediate and, to a lesser extent, parabasal cells increase significantly.

### CONCLUSIONS

1. Spider monkey (*Ateles geoffroyi*) ovarian and hormonal cycles are those of a real menstrual cycle, rather than an estral or a transitional one including a well-defined period of bleeding, following the late luteal phase, and a second mid-luteal estradiol-17 $\beta$  peak.
2. The luteal and follicular phases are not strikingly different in duration, such as occurs in great apes or smaller Neotropical monkeys, while the periovulatory period, proportionately, is rather long.
3. It is possible to recognize the menses, follicular, periovulatory, and luteal phases just by means of vaginal smears.

### REFERENCES

- Abraham, G.E.; Odell, W.D.; Swerdloff, R.S.; Hopper, K. Simultaneous radioimmunoassay of plasma FSH, LH, progesterone, 17-hydroxyprogesterone and estradiol-17 $\beta$  during the menstrual cycle. *JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM* 34:312-320, 1972.
- Alak, B.M.; Wolf, D.P. Rhesus monkey oocyte maturation and fertilization in vitro: Roles of the menstrual cycle phase and of exogenous progesterone. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* 51:879-887, 1994.
- Anaya-Huertas, C.; Arenas-Frias, V.; Mayagoitia, L.; Mondragón-Ceballos, R. Socialization patterns in a group of hand-reared spider monkey. Pp. 303-307 in *CURRENT PRIMATOLOGY*, J.J. Roeder; B. Thierry; J.R. Anderson; N. Herrenshmidt, eds. Strasbourg, Université Louis Pasteur Press, 1994.
- Astrid, C.B.; Steven, L.; Goodrowe, L. Monitoring reproductive development, menstrual cyclicity, and pregnancy in the low gorilla (*Gorilla gorilla*) by enzyme immunoassay. *JOURNAL OF ZOO AND WILD-LIFE MEDICINE* 26:24-31, 1995.
- Blaffer Hrdy S.; Whitten, P.L. Patterning of sexual activity. Pp. 370-386 in *PRIMATE SOCIETIES*. B.B. Smuts; D.L. Cheney; R.M. Seyfarth; R.W. Wrangham; T.T. Struhsaker, eds. Chicago, The University of Chicago Press, 1987.
- Bonney, R.C.; Wixon, A.F.; Fleming, D. Plasma concentrations of oestradiol-17 $\beta$ , oestrone, progesterone and testosterone during the ovarian cycle of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY* 60: 101-107, 1980.
- Callie, P.F.; Chaudhuri, M.; Bowen, R. Menstrual cycles characterization and artificial insemination in the black mangabey (*Cercocebus aethiops*). *ZOO BIOLOGY* 9:11-24, 1990.
- Fox, R.R.; Laird, C.W. Sexual cycles. Pp. 107-122 in *REPRODUCTION AND BREEDING TECHNIQUES FOR LABORATORY ANIMALS*. E.S.E. Hafez, ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1970.
- Galina, C.; Saltiel, A.; Valencia, J.; Becerril, J.; Bustamante, G.; Calderón, A.; Duchateau, A.; Fernández, S.; Olguin, A.; Páramo, F.; Zazo, L. *REPRODUCCION DE ANIMALES DOMESTICOS*. México, D.F., Limusa, 1988.
- Goodman, L.; Wislocki, B.G. Cyclical uterine bleeding in a new world monkey (*Ateles geoffroyi*). *ANATOMICAL RECORD* 61:379-387, 1935.
- Gordon, K.; Aso, T.; Williams, R.F. Lactational anovulation in non-human primates: Restriction of nursing inhibits Prl secretion without precipitating the return of ovulatory menstrual cyclicity in cynomolgus monkeys. *CONTRACEPTION* 51:265-272, 1995.
- Graham, E.C. Menstrual cycles of the great apes. Pp. 1-44 in *REPRODUCTIVE BIOLOGY OF THE GREAT APES, COMPARATIVE AND BIOMEDICAL*, E.C. Graham, ed. New York, Academic Press, 1981.

## Menstrual Cycle in *Ateles geoffroyi* / 195

- Harter, L.; Erkert, H.G. Alteration of circadian period length does not influence the ovarian cycle length in common marmosets, *Callithrix j. jacchus*. CHRONOBIOLOGY INTERNATIONAL 10:165-175, 1993.
- Hearn, J.P.; Lunn, S.F. The reproductive biology of the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. Pp. 191-202 in THE BREEDING OF SIMIANS AND THEIR USES IN DEVELOPMENTAL BIOLOGY. FT. Perkins; F.N. O'Donoghue, eds. London, Laboratory Animals Ltd, 1975.
- Hearn, J.P.; Abbott, D.H.; Chambers, P.C.; Hodges, J.K.; Lunn, S.F. Use of common marmoset *Callithrix jacchus* in reproductive research. Pp. 40-49 in PRIMATES IN MEDICINE 10. E.J. Goldsmith; J. Moor-Janowski, eds. Basel, Karger, 1978.
- Hodges, J.K., Gulick, B.A., Czekala, N.M.; Lasley, B.L. Comparison of urinary oestrogen excretion in South American primates. JOURNAL OF REPRODUCTION AND FERTILITY 61:83-90, 1981.
- Jarosz, S.J.; Kuehl, T.J.; Dukelow, W.R. Vaginal cytology, induced ovulation and gestation in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). BIOLOGY OF REPRODUCTION 18:97-103, 1977.
- López-Luján, X.A.; Ramirez-Ochoa, I.; Mayagotia, L.; Mondragón-Ceballos, R. Sex difference in intra-group spacing behaviour in stump-tailed macaques (*Macaca arctoides*). VOLA PRIMATOLOGICA 52:102-108, 1989.
- McDaniel, P.S., Janzow, F.T., Porton, I.; Ass, C.S. The reproductive and social dynamics of captive *Ateles geoffroyi* (black-handed spider monkeys). AMERICAN ZOOLOGIST 33:173-179, 1993.
- Marrill, J.M.; Nowshari, M.; Rosenbusch, P.L.; Hodches, J.K.. Birth of offspring following artificial insemination in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). AMERICAN JOURNAL OF PRIMATOLOGY 41:37-43, 1997.
- Nadler, R.D.; Dahal, J.F.; Collins, D.C. Serum and urinary concentrations of sex hormones and genital swelling during the menstrual cycle of the gibbon. JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 136:447-455, 1993.
- Proft, M. Menstruation as a defense against pathogens transported by sperm. QUARTERLY REVIEW OF BIOLOGY 68:335-386, 1993.
- Seier, J.V.; Vente, F.S.; Fincham, J.E.; Taljaard, J.J.F. Hormonal vaginal cytology of vervet monkeys. JOURNAL OF MEDICAL PRIMATOLOGY 20:1-5, 1991.
- Shideler, S.E., Savage, A., Ortuña, A.M., Moorman, E.A.; Lasley, B.L. Monitoring female reproductive function by measurement of fecal estrogen and progesterone metabolites in the white-faced saki (*Pithecia pithecia*). AMERICAN JOURNAL OF PRIMATOLOGY 32:95-108, 1994.
- Siegel, S.; Castellán, N.J., Jr. NONPARAMETRIC STATISTICS FOR THE BEHAVIORAL SCIENCES. New York, McGraw-Hill, 1988.
- Sokal, R.R.; Rohlf, J.F. BIOMETRY. San Francisco, W.H. Freedman and Company, 1969.
- Straussman, B.I. The evolution of endometrial cycles and menstruation. QUARTERLY REVIEW OF BIOLOGY 71:181-220, 1996.
- Strier, K.B.; Ziegler, T.E. Insights into ovarian function in wild muraqui monkeys (*Brachyteles arachnoides*). AMERICAN JOURNAL OF PRIMATOLOGY 32:31-40, 1994.
- von Saal, F.S.; Finch, C.E. Reproductive senescence: Phenomena and mechanisms in mammals and selected vertebrates. Pp. 2351-2413 in THE PHYSIOLOGY OF REPRODUCTION, VOL. 2. E. Knobil; J.D. Neill, eds. New York, Raven Press, 1988.
- Wilks, J.W. Endocrine characterization of the menstrual cycle of the stump-tailed monkey (*Macaca arctoides*). BIOLOGY OF REPRODUCTION 16:474-478, 1977.
- Wolf, D.P.; Alexander, M.; Zelinski-Wooten, M.; Souffer, R.L. Maturity and fertility of rhesus monkey oocytes collected at different intervals after ovulatory stimulus (human chorionic gonadotropin) in vitro fertilization cycles. MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT 43:76-81, 1996.
- Wright, E.M.; Bush, D.E. The reproductive cycle of the capuchin (*Cebus apella*). LABORATORY ANIMAL SCIENCE 27:651-654, 1977.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ARTÍCULO  
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Sperm Quality Differences Between the Rainy and Dry Seasons in Captive Black-Handed Spider Monkeys (*Ateles geoffroyi*)

LEONOR HERNANDEZ-LOPEZ<sup>1\*</sup>, GERARDO CERESO PARRA<sup>2</sup>, ANA LILIA CERDA-MOLINA<sup>3</sup>, STEPHANELLA C. PEREZ-BOLAÑOS<sup>1</sup>, VICENTE DIAZ SANCHEZ<sup>1</sup>, and RICARDO MONDRAGON-CEBALLOS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Etología, División de Neurociencias, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente y Unidad de Psicobiología y Conducta, Programa Universitario de Investigación en Salud, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

<sup>2</sup>Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubiran, México D.F., México

The present work provides an assessment of sperm measures (concentration, motility, viability, etc.) of three black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) during the rainy and dry seasons in Mexico City, as well as an evaluation of the between-subjects variability of sperm quality. Twenty samples obtained by rectal electroejaculation and digested with trypsin were evaluated. The results showed that during the dry season ( $n = 9$ ) the semen samples were of better quality than those obtained during the rainy season ( $n = 11$ ). The individual animals showed differences in sperm concentration, although there were no differences in sperm quality. *Am. J. Primatol.* 57:35–41, 2002. © 2002 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** *Ateles geoffroyi*; sperm assessment; seasonal breeding; individual variability

### INTRODUCTION

Little is known about the reproductive physiology of male black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). It has been suggested that individuals of this species might be seasonal breeders, as free-ranging animals on Barro Colorado Island, Panama, show a birth peak throughout the second half of the year (July–December), during the dry season [Milton, 1981]. Yet, captive groups of this species seemingly do not show any breeding seasonality [e.g., Klein, 1971]. As males of some seasonally breeding species show low sperm production throughout the nonmating season [reviewed in Dixson, 1998], we searched for changes in sperm measures (concentration, viability, etc.) during the Mexico City rainy (May–September) and dry (October–April) seasons, to gather data that would support either Milton's [1981] or Klein's [1971] assumptions.

Contract grant sponsor: Universidad Nacional Autónoma de México.

\*Correspondence to: Leonor Hernandez Lopez, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, Calzada México-Xochimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpan 14370, México, D.F., México. E-mail: leonorh@hotmail.com

Received 28 March 2000; revision accepted 7 February 2002

DOI 10.1002/ajp.1066

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Data came from repeatedly sampling only three males; therefore, we also looked for differences among subjects in sperm parameters to assess individual baselines. For that reason, we tested whether the collected sperm values were randomly distributed among animals or each animal showed a distinctive range of sperm values. However, coming from such a small sample, the results presented here are suggestive, rather than conclusive. Even so, these data may be of interest to socioecologists, sociobiologists, veterinarians, and researchers in the biology of reproduction.

## METHODS

### Subjects

The subjects were three adult male black-handed spider monkeys (LK, KI, and AD). They form part of a social group (four females and three males, at the time of the study) kept in a large outdoor facility at the Ethology Department of the Instituto Nacional de Psiquiatría, Mexico City, where there is always ongoing research on their behavior by other members of the department and staff. Food is given twice a day: an early meal consisting of processed food, and a midday meal consisting of fruit and vegetables. All animals are unrelated to each other; details concerning their origins have been published elsewhere [Anaya-Huertas and Mondragón-Ceballos, 1998], while the housing conditions of the institute's monkey colony can be found in López-Luján et al. [1989].

The three adult males in the group could be clearly distinguished as two dominant males (LK and KI) and one subordinate male (AD) from the outcome of 57 dyadic encounters, partaking in eight coalitions, and the within-group distribution of 53 dyadic allogrooming bouts (unpublished data).

### Sperm Collection

It is possible to collect semen samples by electroejaculation from anesthetized spider monkeys [Long et al., 1997] (personal observations). Following the design of Gould et al. [1978], we constructed electroejaculation equipment consisting of a stereo amplifier (Pioneer A-205, Pioneer Electronics Corp., Kuala-Lumpur, Malaysia) with 55 W output per channel and a 10,000 Hz DC bandpass; two digital multimeters (PROAM 602-040, PROAM, Beijing, China) to measure the driving voltage and the total mA electrode current; a waveform generator (GoldStar FG-8002, GoldStar Precision Co. Ltd., Seoul, Korea); an electrostatic shielded isolation transformer (1:1 line isolation, 90 W of power capability); and an oscilloscope (Hewlett-Packard 54601A; Hewlett-Packard, Corvallis, OR). An electroejaculation probe made of dental acrylic (125 mm diameter  $\times$  9 cm long) with a rounded tip, and two 160  $\times$  1,100 mm longitudinal copper strips placed on either side were used [Hafez, 1993]. Output to the electrode was fused (150 mA) to prevent delivering electric shocks to the animal. Based upon results from Gould et al. [1978] we estimated the voltage, intensity, and stimuli durations, in relation to the size and weight of spider monkeys. Stimuli (20 Hz sine waves) were given in 5-sec trains followed by a 3-sec resting period, starting at 1 V and 10 mA, and successively increasing electrical input in 1 V steps every two to three successive trains until reaching 7 V and/or 100 mA. This was accompanied by manual stimulation of the penis. Sperm was collected in Elkay polypropylene graduated tubes immersed in water kept at around 37–40°C. Surgical soap was used both as a lubricant and to improve conductance.

Twenty successful electroejaculations were done from January to Septem-

ber 2000. Electroejaculations were interrupted if after 10 min of stimulation the animal did not ejaculate or if he urinated (even a few drops). The number of samples per animal was seven for LK, seven for AD, and six for KI. Semen evaluation of the black-handed spider monkey is hindered by the presence of a rapid-forming coagulum [Long et al., 1997] (personal observations), but trypsin digestion improves readings significantly (unpublished data). Therefore, we dissolved the coagulum by adding a phosphate-buffer solution containing 0.25% of trypsin (Sigma T4799; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) at a 2:3 (trypsin solution : sperm) proportion, while keeping it immersed in a 37°C water bath for 10 min.

#### Ethical Note Concerning the Use of Surgical Soap

Prior to the above-mentioned sampling, we tried a water-soluble lubricant (LubriGel Ointment, Sheffield Laboratories, Inc., New London, CT) and a vaginal and rectal lubricant gel (Gleit-Gel, Singer-Kosmetic, Heidelberg, Germany) in electroejaculations. These proved to be poor electric conductors, and it was necessary to surpass 7 V and 100 mA to elicit ejaculation. Besides producing strong and continuous myoclonus of the hind legs, this stimulation sometimes damaged the rectal epithelium, as several times the probe came out bloodied. We ventured to use surgical soap, knowing it has good conductor properties, but being aware of its potential for irritation. We maintained careful monitoring, and did not observe any noxious effects. Animals did not show signs of diarrhea (feces were not more fluid than usual in this species), the number of daily evacuations did not increase, nor was dehydration apparent (animals did not lose weight or drink more water than normal). We observed no behavioral signs of discomfort, such as scratching the anus, lassitude, irritability, fear of researchers, apathy, or reluctance to enter the capture cage, immediately after recovering from anesthesia and in the days following electroejaculations. Therefore, it did not upset the animals' evacuation physiology or behavior unethically or inhumanely.

#### Animal Handling

To perform electroejaculations the animals were trained to enter into the restraining cages (1 × 1 × 1 m), which was followed by physical restraint. After the animals became accustomed to physical restraint, testing began. Ketamine (10 mg/kg i.m.; Imalgen 1000; Rhône Mérieux de México, S.A. de C.V., Mexico, D.F., Mexico) was administered following physical restraint. Once anesthetized, each animal was weighed and placed on the surgical bed. The perineum was washed with surgical soap and dried thoroughly. The electroejaculation probe was gently introduced into the rectum and positioned near the prostate (= 5 cm deep). Upon finishing semen collection, the animal's rectum was rinsed with saline solution, and the animal was returned to the restraining cage until awakening completely. Subsequently we rewarded him with cookies and fruit. Following eating, the animal was returned to his home cage.

#### Sperm Evaluation

Sperm analysis was done following the criteria of the World Health Organization [1992] for the assessment of human semen, as these criteria have been successfully used in other nonhuman primate species (e.g., *Mavaca fascicularis* [Gago et al., 1999]). Volume was measured directly from the graduated Elkay

tubes ( $\pm 0.5$  ml of accuracy); 0-10 pH test strips (Mexico de Mexico, Mexico, 1977). Mexico) were used to measure the sperm's pH. Table I shows the sperm parameters assessed in the present work. Eosin B (Merck de Mexico) staining was used to estimate the percentages of live and dead spermatozoa [Martin & Gould, 1981]. Each sperm measure was obtained by averaging the counts of five different fields from a 10- $\mu$ l sample per animal. A different 10- $\mu$ l sample was used to assess each one of the seven sperm parameters analyzed. A single person (G.C.P.) did all the microscope evaluations. Readings from the trypsin-digested samples were corrected for volume prior to analyses.

### Analyses

The Wilcoxon signed-ranks T-test was used in contrasting the rainy and dry seasons. This was done randomly, pairing three samples from the rainy ( $n = 11$ ) and dry ( $n = 9$ ) seasons per animal, leaving out of the analysis the remaining unpaired values. Differences in sperm values among animals were assessed by means of the Kruskal-Wallis test. The Mann-Whitney U-test was used in post-hoc paired comparisons between animals. As a single set of eight variables was used in multiple independent statistic tests, the significance level was set at  $\alpha \leq 0.01$  to reduce the likelihood of error type I. P-values were obtained from tables provided in Siegel and Castellan [1988], instead of relying on asymptotic testing [Mundry and Fischer, 1998]. All tests were two-tailed.

### RESULTS

Table II shows the mean values of sperm during the dry and rainy seasons, and the Wilcoxon's T-test results. Contrasts of the rainy and dry seasons revealed that percentages of fast linear progression sperm and live sperm were significantly higher during the dry than during the rainy season. On the other hand, the percent of nonlinear moving and abnormal spermatozoa was significantly higher during the rainy season.

Table III shows the mean sperm parameters values per subject, as well as the Kruskal-Wallis test results. Only sperm concentration was significantly different among animals. AD had significantly lower concentrations of spermatozoa than KI ( $U = 0.0$ ,  $n_1 = 7$ ,  $n_2 = 6$ ,  $P = 0.001$ ) and LK ( $U = 3$ ,  $n_1 = n_2 = 7$ ,  $P = 0.004$ ).

**TABLE I. Semen Parameters Assessed in the Present Work**

Variable	Definition
Ejaculate volume	Milliliters of semen yield by electroejaculation
Sperm concentration	Number of spermatozoa per ml of ejaculate
Fast linear motility	Percentage of sperm cells showing a qualitatively fast straightforward progression throughout the microscope field
Slow linear motility	Percentage of sperm cells moving slowly and straightforward throughout the microscope field
Non-linear motility	Percentage of sperm cells moving in circles, in zigzag or vibrating, without going far throughout the microscope field
Immobile cells	Percentage of cells not moving at all
Live cells	Percentage of live cells recognized by eosin dyeing*
Abnormal cells	Percentage of spermatozoa showing some structural piece defect such as a bend flagellum, two heads, etc.

\*Immobile spermatozoa are not necessarily dead ones; dead sperm cells were identified by their ability to incorporate eosin.

**TABLE II. Variations of Sperm Concentration, Motility, and Variability in Ejaculates From Three *Ateles Geoffroyi* Monkeys (Mean  $\pm$  S.E.) in Relation to the Dry and Rainy Seasons**

Season	Volume (ml)	Sperm (millions/ml semen)	% fast linear movement	% slow linear movement	% non-linear movement	% immobile	% live sperm	% abnormal cells
<b>Rainy</b>								
Mean	4.0	44.0	13.1	37.1	7.7	43.8	70.8	50.3
S.E.	0.6	11.2	6.4	5.6	1.1	8.1	3.3	6.0
Range	1-8	6-156	0-57	0-57	1-12	6-90	56-90	24-75
<b>Dry</b>								
Mean	3.0	63.0	30.1	40.1	3.8	26.8	84.1	27.0
S.E.	0.3	11.3	4.8	5.5	1.1	3.3	2.9	3.2
Range	1.6-5.2	12-126	9-55	20-66	0-10	12-41	68-93	16-40
T	10	11	1	17	1.5	8.5	2	0
P	N.S.	N.S.	<0.01	N.S.	<0.01	N.S.	0.01	<0.01

\*Between seasons contrasts (Wilcoxon's T; N=9).

### DISCUSSION

Although volume ejaculated and sperm concentration did not differ between seasons, the dry season samples were of somewhat better quality than the rainy season ones. Improvements included higher proportions of fast linear progression and live sperm, and lower rates of nonlinear-moving and abnormal sperm. If high rates of linear-moving spermatozoa and a higher percentage of living sperm are correlated with increased fertility, as has been found in human beings [World Health Organization, 1992], then black-handed spider monkey males show an increased fertility potential throughout the dry

**TABLE III. Between and Within Subjects Values of Sperm Concentration, Motility, Viability, and Presence of Abnormal Spermatozoa in Three *Ateles geoffroyi* Monkeys**

Animal	Volume (ml)	Sperm (millions/ml semen)	% fast linear movement	% slow linear movement	% non-linear movement	% immobile	% live sperm	% abnormal cells
<b>AD</b>								
Mean	3.6	32.8	11.3	44.1	3.7	41.3	74.7	63.7
S.D.	1.5	13.7	11.1	20.2	3.7	24.5	10.0	18.0
Range	1.5-5.2	18-52	0-28	0-58	0-10	14-90	56-89	32-81
<b>KI</b>								
Mean	3.9	127.7	35.5	30.2	7.0	29.8	82.8	58.7
S.D.	2.1	63.5	21.2	10.5	3.3	20.1	10.4	20.0
Range	2.5-8	68-225	0-57	20-49	3-12	6-62	69-87	29-76
<b>LK</b>								
Mean	2.4	115.9	16.0	42.0	7.7	35.0	79.3	68.1
S.D.	1.0	51.5	14.9	12.3	3.1	15.1	13.8	12.5
Range	1-4	40-198	1-43	32-66	2-10	12-52	60-93	44-84
<b>Total</b>								
Means	3.3	62.5	20.2	39.2	6.0	35.6	78.5	39.4
S.D.	1.6	42.8	18.3	15.6	3.7	19.7	11.5	17.7
H*	3.37	11.39*	4.19	5.28	4.52	0.83	1.33	0.49
P	NS	0.003	NS	NS	NS	NS	NS	NS

\*Between subjects comparisons (Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA; N=20, k=3).

**PAGINACIÓN  
DISCONTINUA**



season. On the other hand, semen concentration remained the same between seasons, instead of showing the variations reported for well-known seasonal breeders [Dixon, 1998; although see Mahone & Dukelow, 1979]. As such, it is not possible to conclude whether or not *A. Geoffroyi* is a seasonal breeder. Nonetheless, our results partially support Milton's [1981] findings that the black-handed spider monkey may be a seasonal breeder. If females are more prone to get pregnant due to being inseminated with higher-quality semen during the winter, births would start occurring around July of the next year, just as Milton's results show.

This difference among animals seems somewhat related to social rank, as both dominant males (LK and KI) showed the highest concentrations, and the omega male (AD) showed the lowest. Otherwise, the sperm quality was the same for all three animals. As such, our results do not provide any evidence as to whether the low sperm values of the omega male are a consequence of reproductive suppression or they are idiosyncratic characteristics of this animal (e.g., low-testosterone production, high cortisol levels, coyness, etc.) that themselves may have helped to place him in the subordinate role. Much more research is required to discern whether these findings hold for other black-handed spider monkey populations, as has been described for endocrine values in other primates [Abbott, 1993; Kraus et al., 1999], supporting the idea that reproductive suppression between males occurs in this species.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the two anonymous reviewers for their kind suggestions and support. In addition, we would like to acknowledge E.E. Antonio Hernández López for helping us build the electroejaculation equipment.

#### REFERENCES

- Abbott DH. 1993. Social conflict and reproductive suppression in marmoset and tamarin monkeys. In: WA Mason, SP Mendoza, editors. Primate social conflict. New York: State University of New York Press, p 331-372.
- Anaya-Huertás C, Mondragón-Ceballos R. 1998. Social behavior of black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) reared as home pets. *Int J Primatol* 19:767-784.
- Dixon AF. 1998. Primate sexuality. Comparative studies of the prosimians, monkeys, apes, and human beings. Oxford: Oxford University Press.
- Gago C, Perez-Sanchez F, Yeung CH, Tablado L, Cooper TG, Soler C. 1999. Morphological characterization of ejaculated cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. *Am J Primatol* 47:105-115.
- Gould KG, Warner H, Martin DE. 1978. Rectal probe electroejaculation of primates. *J Med Primatol* 7:213-222.
- Hafez ESE. 1993. Artificial insemination. In: Hafez ESE, editor. Reproduction in farm animals. New York: McGraw-Hill Companies, Ltd. p 396-417.
- Klein LL. 1971. Observations on copulation and seasonal reproduction of two species of spider monkeys, *Ateles belzebuth* and *A. geoffroyi*. *Folia Primatol* 15:233-248.
- Kraus C, Heistermann M, Kappeler PM. 1999. Physiological suppression of sexual function of subordinate males: a subtle form of intrasexual competition among male sifakas (*Propithecus verreauxi*)? *Physiol Behav* 66:855-861.
- Long JA, Lambeski N, Shoemaker AH. 1997. Ejaculate characteristics of the black handed spider, southern black howler and Diana monkeys. *J Androl Suppl*, p 41.
- Lopez-Lujan AX, Ramirez I, Mayagoitia L, Mondragon-Ceballos R. 1989. Sex differences in intra-group spacing behavior in stumptailed macaques (*Macaca arctoides*). *Folia Primatol* 52:102-108.
- Mahone JP, Dukelow RW. 1979. Seasonal variations of reproductive parameters in the laboratory-housed male cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J Med Primatol* 8:179-183.
- Martin DE, Gould KG. 1981. The male ape genital tract and its secretions. In: Graham CE, editor. Reproductive biology of the great apes. New York: Academic Press. p 127-162.
- Milton K. 1981. Estimates of reproductive

Ejaculate Features of *Ateles geoffroyi* / 41

parameters for free-ranging *Ateles geoffroyi*. *Primates* 22:574-579.

Mundry R, Fischer J. 1993. Use of statistical programs for nonparametric tests of small sample values often leads to incorrect *P* values: examples from *Animal Behaviour*. *Anim Behav* 36:256-259.

Siegel S, Castellan NJ. 1937. Nonparamet-

ric statistics for the behavioral sciences. 2nd ed. New York: McGraw-Hill.

World Health Organization. 1992. World Health Organization laboratory manual for the examination of human sperm and sperm-cervical mucus interaction. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press.

TESIS COMPLETA  
FALLA DE CALIFICACION

# LABORATORY PRIMATE NEWSLETTER

Vol. 41, No. 3

July 2002



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**JUDITH E. SCHRIER, EDITOR**  
**JAMES S. HARPER AND GORDON J. HANKINSON, ASSOCIATE EDITORS**  
**MORRIS L. POVAR, CONSULTING EDITOR**  
**ELVA MATHIESEN, ASSISTANT EDITOR**

**ALLAN M. SCHRIER, FOUNDING EDITOR, 1962-1987**

**Published Quarterly by the Schrier Research Laboratory**  
**Psychology Department, Brown University**  
**Providence, Rhode Island**

ISSN 0023-6861

## Digestion by Trypsin Enhances Assessment of Sperm Parameters in the Black-handed Spider Monkey (*Ateles geoffroyi*)

Leonor Hernández-López,<sup>1</sup> Gerardo Cerezo Parra,<sup>2</sup> Ana Lilla Cerda-Molina,<sup>1</sup> Stephanela C. Pérez-Bolaños,<sup>1</sup> and Ricardo Mondragón-Ceballos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz and Universidad Nacional Autónoma de México; <sup>2</sup> Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán

### Introduction

In many nonhuman primate species, including the black-handed spider monkey (*Ateles geoffroyi*), sperm coagulates almost entirely shortly after ejaculation. (For a list of species in which this coagulation occurs, see Dixon, 1998; for *A. geoffroyi*, Goodman & Wisco, 1935; Long et al., 1997; Hernández-López et al., 2002.) This relatively large and nearly solid clot presumably acts as a physical barrier that impedes or obstructs impregnation by other males. Another theory views the coagulum as a tightly packed sperm reservoir (Dixon, 1998, p. 236).

In some species the coagulum is mainly composed of seminal plasma proteins (semenogelin I, semenogelin II, B-microseminoprotein, etc.) and sugars (fructose) (Lundwall, 1998; Dixon, 1998). Moreover, in species such as cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*), baboons (*Papio cynocephalus*), rhesus monkeys (*Macaca mulatta*), and marmosets (*Callithrix jacchus*), the genes that code for the proteins that form the seminal plasma as well as the coagulum are known (Magaña et al., 1999). In practice, the presence of the coagulum hinders assessment of sperm parameters. Analysis of the liquid portion yields poor sperm counts compared to species which are related or of equivalent body size (see Long et al., 1997); this makes interspecies comparisons, medical evaluations, and assessment of sperm quality in assisted reproduction techniques all difficult.

Digestion of the coagulum with proteases, such as trypsin, has been tried (Hendrick & Cremer, 1970), but the practice has been mostly abandoned because trypsin digests the membranes of spermatozoa (P. Nayudu, personal communication), which is very undesirable for either assisted reproduction or precise assessment of sperm quality. Nonetheless, lacking other nonharmful liquefying techniques, enzymatic digestion is still a tool to unravel the cellular composition of the coagulum.

As stated above, black-handed spider monkey ejaculation is characterized by the presence of a very large coagulum (ca. 90% of the volume). Coagulation starts almost as soon as the epididymal fluid joins the prostate gland and seminal fluids, occurring both naturally (e.g., when males masturbate) or during electroejaculation (Long et

al., 1997; Hernández-López et al., 2002). Assessment of the remaining liquid yields low sperm concentration values, as well as low motility measures and a rather large number of dead sperm (personal observations). Therefore, the purpose of this study was to reevaluate the effects of trypsin digestion on sperm quality in the coagulum of the spider monkey.

### Methods

The subjects were three adult male black-handed spider monkeys (L.K., KI and AD). They form part of a social group (four females and three males at the time of the study) kept in a large outdoor facility at the Ethology Department of the Instituto Nacional de Psiquiatría, in Mexico City. All animals are unrelated to each other; details concerning their origins and housing conditions have been published elsewhere (Anaya-Hurtas & Mondragón-Ceballos, 1998). Seventy-five semen samples were collected by electroejaculation from anesthetized spider monkeys (Long et al., 1997; Hernández-López et al., 2002) from January 1999 to August 2000. Of these, 44 samples included both the solid and liquid phases, unpolluted by urine. We tried two methods to retard coagulation. The first (8 samples from AD, 9 from KI, 7 from LK) was stirring the sperm manually and continually for 10 min, keeping it immersed in a 37°C water-bath. The second method (7 samples from AD, 6 from KI, 4 from LK) was to add a phosphate buffered saline containing 0.25% trypsin (Sigma T4799; Sigma Inc., U.S.A.), at a 2:3 (trypsin solution:sperm) proportion, while keeping it immersed in a 37°C water-bath for 10 min. In both methods, samples were evaluated immediately afterwards.

Sperm analysis was done following the criteria of the World Health Organization (1992) for the assessment of human semen, because it has been successfully used in other nonhuman primate species (e.g., *Macaca fascicularis*; Gago, et al., 1999). Volume was measured directly from graduated Elkay tubes ( $\pm 0.5$  ml of accuracy). Motility was divided into four categories: fast linear, slow linear, nonlinear, and immobile (definitions are given in Hernández-López et al., 2002). Abnormal spermatozoa were considered those having only the lower half of the head, two heads, a bent mid-piece, or a looped or coiled flagellum. Eosin B staining was used to estimate the percentages of live and dead spermatozoa (Martin & Gould, 1981). Each sperm measure was obtained by averaging the counts of five different fields from a 10 $\mu$ l sample/animal. A different 10 $\mu$ l sample was used to assess each of the seven sperm parameters analyzed. One person

First author's address: Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente, Subdirección Neurociencias, Calzada México Xihuimilco 101, Col. San Lorenzo Huipulco, Tlalpam 14370, México, D.F., México [e-mail: leonorh@hotmail.com]

TESIS DE GRADUACIÓN  
FALLA DE CALLEN

Animal	Spermatozoa (millions/ml of semen)		% Fast linear movement		% Slow linear movement		% Nonlinear movement		% Immobile		% Live sperm		% Abnormal sperm	
	Stirring	Trypsin	Stirring	Trypsin	Stirring	Trypsin	Stirring	Trypsin	Stirring	Trypsin	Stirring	Trypsin	Stirring	Trypsin
AD														
Mean	32.1	39.8	6.3	11.3	10.1	44.1	2.5	3.6	83.8	41.3	61.7	74.7	39.4	38.3
S.E.	14.7	13.6	4.1	3.8	8.4	7.8	1.6	1.5	9.5	8.8	9.9	9.2	4.4	4.1
KJ														
Mean	40.5	52.6	15.9	35.2	19.6	32.5	3.1	7.1	47.9	27.9	68.9	83.8	38.4	38.0
S.E.	12.0	15.3	3.4	4.3	6.9	8.7	1.3	1.7	7.8	9.9	8.1	10.3	3.9	4.6
LK														
Mean	73.2	92.8	11.9	16.0	16.1	42.0	12.6	7.7	61.9	35.0	60.7	79.3	28.6	19.4
S.E.	14.7	13.6	4.1	3.8	8.4	7.8	1.6	1.5	9.5	8.8	9.9	9.2	4.4	4.1
Total mean	48.6	61.7	11.3	20.8	15.1	39.5	6.1	6.1	64.5	44.7	60.4	79.3	35.5	38.6
S.E.	8.2	8.2	2.3	2.3	4.7	4.7	0.9	0.9	5.3	5.3	5.5	5.5	2.5	2.5
F*	9.908		7.059		27.391		0.000		35.049		22.106		1.212	
P	0.014		0.056		0.006		N.S.		0.004		0.01		N.S.	

Table 1. Comparisons of manual stirring and trypsin digestion of sperm on concentration, motility, viability, and presence of abnormal spermatozoa in ejaculates from three *Aotus Geoffroyi* monkeys. S.E. = Standard Error. \* Between-treatments F-ratios; p.f. (calculated by Satterwaite's method) = 4.

(G.C.P.) did all the microscope evaluations. Readings from the trypsin-digested samples were corrected for volume prior to analyses. The sperm treatment effects were assessed by means of split-plot ANOVAs, because the subjects sampled were too few for repeated-measures ANOVAs. Subjects (animals) were a random-effects factor, treatments per animal, a fixed-effects factor, and readings within treatments, the repeated measures.

#### Results

Table 1 displays the sperm parameters and statistical analyses. Trypsin digestion significantly increased the concentration of spermatozoa, as well as the percentages of slow-moving and live spermatozoa, while significantly decreasing the percentage of immobile sperm. The percentage of fast-moving sperm showed a tendency to increase due to trypsin digestion. The proportion of nonlinear moving and abnormal sperm were unaffected by trypsin treatment.

#### Discussion

Despite within- and between-individual variability, readings from trypsin-digested samples showed an overall improvement over stirred samples. We assume that trypsin proved useful because we did not wait until the coagulum was completely digested, but only until the sample was liquefied enough to allow a convenient assessment. Therefore, most likely we did not give the trypsin time to start digesting the spermatozoa membranes.

The sperm concentration of hand-stirred samples was on average lower than values reported for other primate species (Hendricks & Kraemer, 1970; Mann & Gould, 1981; Gould & Mann, 1988; Gould et al., 1993), including smaller animals like the capuchin and the squirrel monkey (Hendricks & Kraemer, 1970). Trypsin digestion significantly increased the sperm concentrations (see Table 1) to the ranges of species with naturally low sperm concentrations such as the capuchin, squirrel monkey, gibbon (Hendricks & Kraemer, 1970), and gorilla (when urethral massage was added to the electroejaculation procedure; Schaffer et al., 1991). The additional sperm cells were undoubtedly released from the coagulum by the trypsin, as occurs in other primate species (Wildt, 1986). Therefore, these values are viewed as more representative of the true sperm concentration for this species.

The coagulum most certainly is the vaginal plug reported by Goodman and Wlotzki (1935), in the pioneering research on the sexual biology of the black-handed spider monkey. It most surely serves to prevent backflow of sperm and to obstruct sperm transport of another male (Dixon, 1998). Nonetheless, taking in account the peculiar anatomy of the spider monkey *glans penis* (Hill, 1962; Dixon, 1998) and the clamped cervix that protrudes into the vaginal lumen (Hill, 1962; Hernández-López & Aja, personal communication), the coagulum might also serve as a vehicle to deliver a tight, rich package of spermatozooids into the female's cervix.

The improvements over stirring in other trypsin-treated sperm measures, such as the measures of motility and percentage of live cells, were possibly due to the capacitating properties of phosphate-buffered saline, but, as stated above, we ought not to discount the fact that these cells were released from the coagulum. The summed fast and slow linear motility values fall within motility measures reported in other primate species (Hendricks & Kraemer, 1970; Martin & Gould, 1981; Gould & Mann, 1988; Gould, 1990; Gould et al., 1993; Schaffer et al., 1991), showing that neither the electroejaculation procedure nor trypsin digestion yield greater than expected adverse effects on the spider monkeys' ejaculates (Gould & Mann, 1988). Likewise, as it usual with rectal electroejaculation, our samples seemingly have a poorer viability than those obtained by penile electrical stimulation (Gould & Mann, 1988) or vibratory stimulation (Yeoman et al., 1998). However, the percentage of live spermatozooids ejaculated, whether motile or not, was similar to those of great apes (Yeoman et al., 1998) and reproductively healthy humans (World Health Organisation, 1992), and above required values for artificial insemination in nonhuman primates (Hendricks & Kraemer, 1970) and humans (Karabinus & Gelety, 1997).

#### References

- Anaya-Huertas, C., & Mondragón-Ceballos, R. (1998). Social behavior of black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*) reared as home pets. *International Journal of Primatology*, 19, 767-783.
- Dixon, A. F. (1998). *Primate sexuality: Comparative studies of the primates, monkeys, apes, and human beings*. Oxford: Oxford University Press.
- Gago, C., Pérez-Sánchez, F., Yeung, C. H., Tablado, L., Cooper, T. G., & Soler, C. (1999). Morphological characterization of ejaculated cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. *American Journal of Primatology*, 47, 105-115.
- Goodman, L., & Wislocki, G. (1935). Cyclical uterine bleeding in a New World monkey (*Ateles geoffroyi*). *The Anatomical Record*, 61, 379-387.
- Gould, K. G. (1990). Techniques and significance of gamete collection and storage in the great apes. *Journal of Medical Primatology*, 19, 537-551.
- Gould, K. G., & Mann, D. R. (1988). Comparison of electrostimulation methods for semen recovery in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Journal of Medical Primatology*, 17, 95-103.
- Jould, K. G., Young, L. G., Smithwick, E. B., & Pithayan, S. R. (1993). Semen characteristics of the adult male chimpanzee (*Pan troglodytes*). *American Journal of Primatology*, 29, 221-232.
- Hendricks, A. G., & Kraemer, D. C. (1970). Primates. In E. S. E. Hafez (Ed.), *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals* (pp. 317-335). Philadelphia: Lea & Febiger.
- Hernández-López, L., Cerezo Parra, G., Cerda-Molina, A. L., Pérez-Bolaños, S. C., Díaz-Sánchez, V., & Mondragón-Ceballos, R. (2002). Sperm quality differences between the rainy and dry seasons in captive black-handed spider monkeys (*Ateles geoffroyi*). *American Journal of Primatology*, 57, 35-41.
- Hill, O. W. C. (1962). *Ateles geoffroyi*. In O. W. C. Hill (Ed.), *Comparative anatomy and taxonomy. Vol. V. Cebidae, part B* (pp. 465-475). Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Karabinus, D. S., & Gelety, T. J. (1997). The impact of sperm morphology evaluated by strict criteria on intrauterine insemination success. *Fertility and Sterility*, 67, 536-541.
- Long, J. A., Lambeski, N., & Shoemaker, A. H. (1997). Ejaculate characteristics of the black handed spider, southern black howler and Diana monkey. *Journal of Andrology (Suppl.)*, 17, 117.
- Lundwall, A. (1998). The cotton-top tamarin carries an extended semenogelin 1 gene, but not semenogelin II gene. *European Journal of Biochemistry*, 255, 45-51.
- Marjaana, M., Valtonen-André, C., & Lundwall, A. (1999). New World, but not Old World, monkeys carry several genes encoding  $\beta$ -microseminoprotein. *European Journal of Biochemistry*, 264, 407-414.
- Martin, D. E., & Gould, K. G. (1981). The male ape genital tract and its secretions. In C. E. Graham (Ed.), *Reproductive biology of the great apes* (pp. 127-162). New York: Academic Press.
- Schaffer, N., Jeyendran, R. S., & Beeher, B. (1991). Improved sperm collection from the lowland gorilla: Recovery of sperm from bladder and urethra following electroejaculation. *American Journal of Primatology*, 24, 265-271.
- Wildt, D. E. (1986). Spermatozoa: Collection, evaluation, metabolism, freezing, and artificial insemination. In: W. R. Dukelow & J. Erwan, (Eds.), *Comparative Primate Biology* (pp. 171-193). New York: Alan R. Liss.
- Yeoman, R. R., Sonkesen, J., Gibson, S. V., Rizk, B. M., & Abec, C. R. (1998). Penile vibrostimulation yields increased spermatozoa and accessory gland production compared with rectal electroejaculation in a neurologically intact primate (*Saimiri boliviensis*). *Human Reproduction*, 13, 2527-2531.

