

Obtención seminal mediante condicionamiento operante en *Tursiops truncatus* (Mammalia: Cetacea) en cautiverio en un ambiente marino

José A Herrera B.^{1*}, Gustavo Calderón C.¹, Roberto Sánchez O.²,
Jaime A Bernal V.², Alfonso López A.², Renato Lenzi.²

Resumen

El cautiverio de animales de origen silvestre, puede representar una oportunidad para apoyar la conservación de las diferentes especies, a través de diversas herramientas incluyendo la reproducción asistida, mediante el estudio de su conducta y biología reproductiva, es posible desarrollar técnicas especie específicas que permitan su propagación en cautiverio. Una de estas técnicas es la obtención de semen mediante el condicionamiento operante, lo cual ha permitido protocolos seguros para garantizar la integridad del personal y de los ejemplares, así mismo el condicionamiento operante disminuye o evita situaciones de estrés en los animales. Sin embargo es necesario adecuar los procedimientos a las diferentes condiciones de alojamiento. El objetivo de este trabajo fue describir el uso del condicionamiento operante, para lograr la obtención de eyaculados de ejemplares en cautiverio, alojados en condiciones marinas, expuestos a mareas y oleaje, así como la presencia de otros animales y/o distractores del ambiente. Se utilizaron tres machos adultos con edad mayor de 12 años, alojados en locaciones del Caribe Mexicano. Se estableció un protocolo de condicionamiento operante basado en refuerzos positivos en el cual los criterios de avance se estimaron en porcentajes hasta el cumplimiento del objetivo. El condicionamiento de los tres ejemplares para la obtención voluntaria de los eyaculados se logró de manera efectiva. Se recolectaron 18 eyaculados, con volumen promedio de 8 ml y concentración promedio de 383×10^6 espermatozoides/ml. En conclusión, la obtención de semen mediante el condiciona-

Abstract

The maintenance of wild animals in captivity may represent an opportunity to support the conservation of different species through various tools including assisted reproduction; by studying their behavior and reproductive biology, it is possible to develop species-specific techniques that allow captive propagation. One of these techniques is to obtain semen by operant conditioning, which has enabled secure protocols to guarantee staff and animal safety and integrity; operant conditioning diminishes or prevents stress situations in animals. However it is necessary to adapt these methods to different housing conditions. The aim of this study was to describe the process of operant conditioning used to obtain ejaculate samples from captive dolphins housed in marine conditions, exposed to tides and waves, and to the presence of other animals and / or distracting environment. Three captive adult males over 12 years old, held in Mexican Caribbean locations were used. Operant conditioning protocol was based on positive reinforcement; the criteria to register the progress included estimated percentages till the objective was met. The conditioning of the three dolphins for the voluntary production of ejaculates was effectively achieved. 18 ejaculates were collected, with an average volume of 8 ml and average sperm concentration of 383×10^6 / ml. In conclusion, obtaining semen by operant conditioning is an efficient technique that also allows the development of other purposes such as the evaluation of individual breeders, artificial insemination and semen cryopreservation. Also through operant conditioning,

¹ Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Xochimilco Departamento de Producción Agrícola y Animal, Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud, Coyoacán, 04960, México, D.F.

² Dolphin Discovery México, Lote 8., Mz. 1., SM3. Cancún Quintana Roo 77500; México.

*Autor para correspondencia: jherrerab@correo.xoc.uam.mx

miento operante es un procedimiento eficiente que además permite el desarrollo de otros propósitos como la evaluación de reproductores, inseminación artificial y criopreservación seminal. También mediante el condicionamiento operante se evitan conductas de comunicación que manifiestan estrés en los ejemplares tales como vocalizaciones y otros comportamientos que pudieran afectar a los demás ejemplares alojados en el mismo albergue cuando se trabaja en las condiciones descritas en este estudio.

Palabras clave: Cautiverio, delfín, entrenamiento, espermatozoide, eyaculado, reproducción asistida.

communication behaviors that manifest stress in the specimens such as vocalizations and secretion of pheromones are avoided; when working under conditions described in this study, these behaviours may affect other dolphins held in nearby enclosures.

Key words: Assisted reproduction, captivity, dolphin, spermatozoa, ejaculate, training

Introducción

Los zoológicos y acuarios contribuyen a la conservación *in situ* y *ex situ* de especies silvestres apoyando investigaciones, unificando disciplinas científicas como, la ecología, genética, fisiología, anatomía y biología del comportamiento y forman la base de muchos programas de reproducción en cautiverio. Para algunas especies, el manejo de grupos socialmente cohesionados se realiza mejor cuando los animales son alojados en grupos que imitan interacciones sociales y sexuales que ocurren en la naturaleza (O'Brien *et al.* 2009).

Uno de los procedimientos utilizados en apoyo a la reproducción asistida, es la recolección de semen, para la cual se han adecuados los procedimientos a las características y eventos fisiológicos naturales de cada especie, como lo es entrenamiento para la monta sobre hembras en celo o maniqués en cerdos (Wolf & Smital 2009), bovinos (Henney *et al.* 1990) y caninos (Kutzler 2005). Sin embargo, son especies domésticas habituadas al manejo rutinario por parte del humano. En ejemplares de fauna silvestre en muchos casos, el simple contacto con el humano no es suficiente, requiere de otros factores para la improntación y/o entrenamiento de lo que se ha llamado conductas médicas, por ejemplo la extracción de sangre en grandes felinos (Vera *et al.* 2004); se sabe que el refuerzo de un comportamiento calmado y cooperativo entre el animal y el personal

de entrenamiento, utilizando el condicionamiento operante con refuerzo positivo reduce significativamente la conducta agresiva dirigida al humano (Miniera *et al.* 2011). Uno de los procedimientos utilizados para apoyar programas de reproducción asistida en mamíferos domésticos y silvestres es la electro eyaculación (Seager *et al.* 1981, Van deVoort 2004, Martínez *et al.* 2008), sin embargo requiere la contención física y química.

En mamíferos marinos se utiliza la obtención seminal para la utilización de semen fresco y criopreservado durante la inseminación artificial (IA) ésta técnica se ha descrito en delfín nariz de botella (*Tursiops truncatus*), desde la década de los 50^s (Holt 2000). A pesar de las ventajas de estabilidad reproductiva y social de los programas de IA utilizando semen sexado, y la eficacia demostrada de estas tecnologías en *T. truncatus*, en varios acuarios, la falta de experiencia en IA y los gastos asociados con el proceso de clasificación ha frenado una aplicación más amplia (O'Brien & Roobeck 2006, O'Brien *et al.* 2009). Existen diferentes estudios, en los cuales se ha utilizado técnica de electro eyaculación (Seager *et al.* 1981, Martínez *et al.* 2008). En *T. truncatus* este procedimiento fue descrito por Seager *et al.* (1981). En la actualidad, en la mayoría de trabajos para la recolección de semen en cetáceos, incluyendo el *T. truncatus*, se ha utilizado la técnica del condicionamiento operante (CO), de los ejemplares para

la eyaculación voluntaria. Sin embargo estos trabajos describen resultados en condiciones de cautiverio en albergues fuera del mar o aún con los ejemplares completamente fuera del agua (Robeck *et al.* 2004, Robeck & O'Brien 2004, Yuen *et al.* 2009). Con el condicionamiento apropiado, la recolección de semen y la obtención de otras muestras como orina y sangre, además de revisiones físicas incluyendo la utilización de equipo para la ecografía, se pueden realizar de forma voluntaria (Schapiro *et al.* 2003, Robeck *et al.* 2004, Clay *et al.* 2009, O'Brien *et al.* 2009).

El CO descrito por Skinner, quien afirmó que si una conducta tiene consecuencias positivas, habrá una mayor probabilidad de que suceda nuevamente y se incremente su frecuencia y se llama operante porque es el organismo quien manipula, y opera sobre el ambiente de forma activa para lograr o inhibir consecuencias (Ernststein 1980).

En *T. truncatus*, el condicionamiento operante, ha sido estudiado desde 1972 (Beach *et al.* 1972) y se ha observado que, las técnicas para la obtención y conservación seminal *in vitro* en fresco o mediante criopreservación espermática reportadas en cada estudio muestran variaciones obteniendo diferente éxito reproductivo al utilizar distintos protocolos de reproducción asistida incluyendo los métodos de recolección seminal (Holt 2000, Robeck *et al.* 2001, Robeck & O'Brien 2004). Se sabe que los eyaculados obtenidos por electro eyaculación, pueden mostrar menos concentración en comparación con los obtenidos mediante un eyaculado obtenido con vagina artificial.

Debido a lo anterior, se hace importante definir protocolos adecuados para las condiciones de trabajo en cada lugar y que muestren resultados constantes y predecibles, que permitan cumplir con los objetivos de los proyectos a realizar. Es por lo anterior, que el objetivo de este trabajo, fue establecer un procedimiento mediante CO que proporcione seguridad para el manejo de los ejemplares y del personal que lo realicé, para lograr la obtención de eyaculados de buena calidad, para los procedimientos reproductivos que se pretende realizar con los animales en

cautiverio, alojados en condiciones marinas, expuestos a mareas y oleaje, así como la presencia de otros animales y/o distractores del ambiente.

Material y métodos

El trabajo, se realizó con tres machos mayores de 12 años, alojados en dos diferentes locaciones del Caribe Mexicano, con coordenadas geográficas 20° 16' 45" N, 87° 23' 30" W y 20° 29' N, 86° 54' W respectivamente. En ambos casos, los ejemplares se alojaron en condiciones marinas, con exposición a eventos naturales persistentes como la elevación de la marea y la presencia permanente de oleaje con diferente intensidad, así también a la presencia de 10 hembras, las cuales se encontraban en anestro inducido por la administración de altrenogest (Regumate® Intervet) (Katsumata 2010). La dieta de los ejemplares fue integrada con pescado descongelado: Arenque (*Clupea harengus*, Linnaeus, 1758), Capelín (*Mallotus villosus*, Müller, 1776), Menidia menidia, Linnaeus, 1766), consumiendo aproximadamente 60 a 80 kcal/kg de peso vivo por día.

Entrenamiento

Para el inicio del trabajo, se establecieron los siguientes procedimientos: Las sesiones de trabajo, se realizaron siempre con la intención de evitar al máximo que los ejemplares las relacionaran con los horarios, actividades y personas interactuantes en las funciones recreativas de los delfines. Se definió en cada locación un área física para la extracción del semen, la cual se ubicó lejos de las zonas de actividad turística. Las sesiones de entrenamiento, se realizaron al menos cinco veces por semana, sin establecer horarios ni frecuencia, para que esta conducta no se relacionara con algún otro evento casual concurrente. En la tabla I, se describe el protocolo de entrenamiento utilizado, estableciendo los criterios para evaluar el avance en la conducta y una estimación en porcentaje del avance para lograr el objetivo.

El condicionamiento de las conductas, fue reforzado de manera positiva, durante cada

sesión y según el criterio de avance, utilizando como refuerzo positivo el alimento que integraba su dieta diaria.

La recolección del semen se realizó manteniendo a los ejemplares en posición de cubito dorsal, manteniendo la región ventral fuera del agua y siempre en una misma estación de trabajo. Los ejemplares recibieron primeramente estímulos sonoros para el inicio de

la sesión seguido de indicaciones visuales para obtener la posición y posteriormente estímulos táctiles, para lograr la exposición y erección del pene fuera del conducto genital. Enseguida utilizando un guante estéril se realizó la estimulación manual desde la punta hacia la base del pene, frotando con un solo movimiento para introducir el pene dentro de una "vagina artificial"

Tabla I. Criterios de avance para el entrenamiento y obtención de semen de *Tursiops truncatus*.

Conducta	Criterio conductual	Evento fisiológico	Avance
Posición	Posición decúbito supino y desensibilización al contacto del músculo retractor del pene.	Relajación y mantenimiento de la estación.	10 %
Desensibilización	Ejemplar en Posición ventral, con tolerancia al contacto físico del área genital y del músculo retractor.	Tolerancia a la estimulación genital por contacto físico	20 %
Contracción muscular.	Actividad del músculo retractor, en respuesta a la estimulación física.	Contracciones musculares	30 %
Contracción repetida	Actividad repetida del músculo retractor, en respuesta al contacto físico del área genital.	Contracciones musculares repetidas	50 %
Contracción con erección	Contracción con erección breve sin estimulación de área genital.	Exposición del pene, con contracciones musculares repetidas.	55 %
Erección completa	Erección completa	Erección del pene, con actividad constante del músculo retractor.	60 %
Posición para recolección	Posición decúbito supino, con área genital fuera del agua, y erección completa	Expulsión de fluidos (No seminales) con erección mantenida	80 %
Obtención seminal	Eyacuación en vagina artificial.	Eyacuación.	100 %

La descripción del músculo retractor del pene en *T. truncatus*, ha sido realizada por varios autores (Robeck *et al.* 1994, Brook *et al.* 2000).

Diseño de vagina artificial

La vagina artificial (Fig.1), consistió en la colocación de un cono de látex (AgTech Cat. N° AV 7100) de 31 cm de longitud, dentro de un cono de plástico rígido con una longitud de 15 cm, diámetro mayor de 8.5 cm y diámetro menor de 6.5 cm. Los primeros 5 cm de la parte más ancha del cono de látex, se distendieron sobre la cara externa del cono rígido en su parte más ancha, el resto del látex, se introdujo dentro del cono rígido, buscando mantener su estructura centrada y simétrica. Al final del cono de látex, se colocó un tubo graduado para recibir el eyaculado y proceder de manera inmediata a su evaluación. La intención fue diseñar una estructura que fuera de fácil manipulación y permitiera un "sellado" al estar en contacto el pene erecto del ejemplar, con el cono de látex, produciendo además un estímulo táctil de intromisión, semejante a la vagina de la hembra, además de evitar la contaminación del semen recolectado, con agua marina, ya que el proceso de recolección seminal, se realizó en un ambiente marino natural, con la presencia de oleaje.

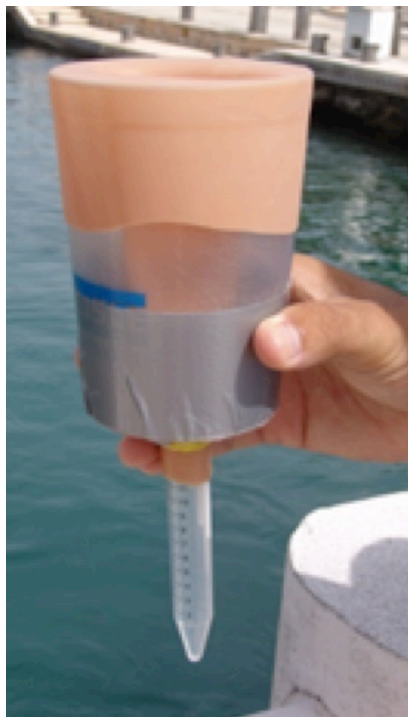


Figura 1.- Vagina artificial con tubo graduado

Resultados

Condicionamiento de ejemplares

El condicionamiento de los ejemplares para la obtención voluntaria de los eyaculados utilizando el mismo procedimiento, se logró de manera efectiva con el protocolo propuesto y mostró un avance de cada ejemplar acorde a su propia capacidad de aprendizaje, logrando el objetivo entre 15 a 20 semanas. Obtenido el primer eyaculado, fue reforzada la conducta y mantenida, aun cuando los eyaculados obtenidos no se utilizaran.

Utilización de la vagina artificial

Con respecto al diseño y uso de la vagina artificial, se encontró una alta eficacia, por las siguientes razones: Las dimensiones establecidas, mostraron proporcionalidad con el tamaño y forma del pene de los ejemplares, acoplándose adecuadamente a cada uno, favoreciendo la fricción del pene, lo cual impidió la contaminación con agua del eyaculado.



Figura 2.- Recolección seminal

Indicadores seminales obtenidos

Para efectos comparativos, se recolectaron en total 18 eyaculados, seis de cada ejemplar. Los parámetros seminales obtenidos, mostraron un volumen promedio de 8 ml, con una concentración espermática promedio, de 383×10^6 espermatozoides/ml.



Figura 3.- Espermatozoides de *Tursiops truncatus*

Discusión y conclusiones

Con el procedimiento realizado para obtener y recolectar el semen, se lograron obtener eyaculados con indicadores seminales adecuados, similares a otros estudios (Yuen *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2015), que permiten su utilización en la evaluación de reproductores, criopreservación y procedimientos de reproducción asistida en cautiverio. Logrando obtener las conductas deseadas, con los ejemplares en condiciones marinas, expuestos a oleaje con diferente intensidad y la presencia de otros ejemplares que pudieron ser hembras o machos, además de otras especies marinas. Lo anterior, evidencia la relevancia de este

trabajo, ya que otros trabajos describen procedimientos en condiciones de delfinarios con alberca sin oleaje.

Destacando además, que es un procedimiento correcto y eficiente que no expone a ningún riesgo la integridad de los ejemplares o entrenadores, además de ser una técnica no invasiva como la electro eyaculación (Fleming 1981).

Utilizado las técnicas de reproducción asistida, se evita el traslado de ejemplares con propósitos de reproducción, que implica riesgos para la integridad del ejemplar y costos de maniobras. Así también puede contribuir a programas de reproducción asistida entre instituciones o empresas en las cuales no se cuenta con ejemplares o estos no cuenten con el desarrollo fisiológico reproductivo apto para lograr este propósito. Además en México, La Ley general de vida silvestre prohíbe la importación, exportación y re exportación de mamíferos marinos (artículo 55 bis).

Adicionalmente con el CO para ésta y otras conductas en cetáceos y en muchos otros casos, también ha permitido realizar diferentes tratamientos clínicos veterinarios sin tener que recurrir a la contención química o física, logrando una considerable disminución de estrés en los animales e incrementando la seguridad tanto de los operadores como de los ejemplares involucrados en los procedimientos, ya que con los procedimientos de CO se evitan conductas de comunicación que manifiestan estrés en los ejemplares tales como vocalizaciones y secreciones de feromonas (Butterworth *et al.* 2013), lo cual puede afectar a los demás ejemplares alojados en el mismo albergue cuando se trabaja en las condiciones descritas en este estudio.

El procedimiento utilizado en este trabajo, demuestra ser una herramienta útil en las técnicas de reproducción asistida y que además que puede ser considerado como un refuerzo positivo más para los ejemplares (O'Brien & Robeck, 2006, O'Brien *et al.* 2009), con otras intenciones como puede ser el manejo de los machos para su movilización dentro de instalaciones en cautiverio.

Por lo anterior, es que se hace evidente desarrollar y mantener las técnicas de condicionamiento de los ejemplares asociadas a su manipulación para lograr la IA, ya que esta es una herramienta indispensable para conservar la variabilidad genética de las poblaciones en cautiverio.

Referencias

- Beach, F.A & R.L. Pepper.1972. Operant responding in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Journal of the Experimental Analysis of Behavior 17(2): 159-160. DOI: 10.1901/jeab.1972.17-159.
- Butterworth, A., P. Brakes, C.S. Vail & D. Reiss. 2013. A veterinary and behavioral analysis of dolphin killing methods currently used in the "Drive Hunt" in Taiji, Japan. Journal of Applied Animal Welfare Science 16 (2): 184-204. DOI: 10.1080/10888705.2013.768925
- Clay, A.W., M.A. Bloomsmith, M.J. Marr & T.J. Maple. 2009. Habituation and desensitization as methods for reducing fearful behavior in singly housed rhesus macaques. American Journal of Primatology 71 (1): 30-39. DOI: 10.1002/ajp.20622.
- Ernststein, R.S. 1980. La evolución del conductismo. *Estudios de psicología* 1:46-63. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=65792>
- Fleming, A.D., R. Yanagimachi & R. Yanagimachi. 1981. Spermatozoa of the bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*. Journal of Reproduction & Infertility 63 (63):509-514. DOI: 10.1530/jrf.0.0630509
- Henney, S.R., G.J. Killan & D.R. Deaver. 1990. Libido, hormone concentrations in blood plasma and semen characteristics in holstein bulls. Journal of Animal Science 68(9):2787-2792. DOI: /1990.6892784x
- Holt, W.V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. Animal Reproduction Science 62(1):3-22. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00152-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00152-4)
- Katsumata, E. 2010. Study on reproduction of captive marine mammals. Journal of Reproduction and Development 56 (1): 1-8. DOI: [org/10.1262/jrd.09-212E](http://dx.doi.org/10.1262/jrd.09-212E)
- Kutzler, M.A. 2005. Semen collection in the dog. Theriogenology 64(3):747-754. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.05.023>
- Ley General de Vida Silvestre. México. Última reforma publicada DOF 26-01-2015. Artículo 55 bis. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.
- Martínez, A.F., F. Martínez-Pastor., M. Alvarez., M.R. Fernández-Santos., M.C. Esteso., P. de Paz., J.J. Garde & L. Anel. 2008. Sperm parameters on Iberian red deer: electro ejaculation and post-mortem collection. Theriogenology 70(2):216-26. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.001.
- Miniera, D.E., L. Tatum., D.H. Gottlieb., A. Cameron., J. Snarra., R. Elliot., A. Cooka., K. Elliot., K. Bantaa., A. Heagerty & B. McCowana. 2011. Human-directed contra-aggression training using positive reinforcement with single and multiple trainers for indoor-housed Rhesus macaques. Applied Animal Behaviour Science 132(3): 178-186. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.applanim.2011.04.009>
- O'Brien, J.K. & T.R. Robeck. 2006. Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex pre selection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). Reproduction Fertility and Development 18(3): 319-329. DOI: [org/10.1071/RD05108](http://dx.doi.org/10.1071/RD05108)
- O'Brien, J.K., K. Steinman & T. Robeck. 2009. Application of sperm sorting and associated reproductive technology for wildlife management and conservation. Theriogenology 71(1): 98-107. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.052
- Robeck, T.R., K.C. Atkinson & F. Brook. 2001. Reproduction. In: CRC, Handbook of marine mammal medicine. Ed. CRC, Press LLC. USA. 193-235.
- Robeck, T.R., B.E. Curry., J. Mc Bain & D.C. Kraemer. 1994. Reproductive biology of the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and the potential application of advanced reproductive technologies. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 25(3):321-336. DOI: <http://www.jstor.org/stable/20095385>
- Robeck, T.R., J.K. O'Brien. 2004. Effect of cryopreservation methods and pre cryopreservation storage on bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa. Biology of Reproduction 70(5):1340-1348. DOI: 10.1095/biolreprod.103.025304
- Robeck, T.R., K.J. Steinman., S. Gearhart., T.R. Reidarson., J.F. Mc Bain., S.L. Monfort. 2004. Reproductive physiology and development of artificial insemination technology in killer whales (*Orcinus orca*). Biology of Reproduction 71(2): 650-660. DOI: 10.1095/biolreprod.104.027961
- Sánchez-Calabuig MJ, de la Fuente J, Laguna-Barraza R, Beltrán-Breña P, Martínez-Nevaldo E, Johnston SD, Rizos D, Gutiérrez-Adán A, Pérez-Gutiérrez JF. 2015. Heterologous murine and bovine IVF using bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) spermatozoa. Theriogenology. 1;84(6):983-94. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.06.001. Epub 2015 Jun 12.
- Schapiro, S.J., M.A. Bloomsmith & G.E. Laule. 2003. Positive reinforcement training as a technique to alter nonhuman primate behavior: quantitative assessments of effectiveness. Journal of Applied Animal Welfare Science 6 (3), 175-187.

- Seager, S., W. Gilmartin., L. Moore., C. Platz & V. Kirvy. 1981. Semen collection (electro ejaculation), evaluation and freezing in the Atlantic bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*). Proceedings of Annual Meeting American Association of Zoological Veterinarians. p. 136 (Abstr).
- Van de Voort C. 2004. A. High quality sperm for non-human primate ART: Production and assessment. Reproductive Biology and Endocrinology 2(33):1-5. DOI: 10.1186/1477-7827-2-33
- Vera, M., L. Olivera & G. Torres. 2004. Condicionamiento operante para extracción de sangre de tigres de bengala (*Panthera tigris*). Coordinación de entrenamiento animal. Fundación Temaiken. Argentina.
- Wolf, J& J. Smital. 2009. Quantification of factors affecting semen traits in artificial Insemination boars from animal model analyses. Journal of Animal Science 87(5):1620-7. DOI: 10.2527/jas.2008-1373
- Yuen, Q., F. Brook., R. Kinoshina & M. Ying. 2009. Semen collection and ejaculate characteristics in the Indo-Pacific bottlenose dolphin (*Tursiops aduncus*). Journal of Andrology 30(4):432-439. DOI: 10.2164/jandrol.108.006692

Recibido: 19 de enero de 2016

Aceptado: 04 de abril de 2016