

**MANUAL DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA DE PANDA GIGANTE
(*Ailuropoda melanoleuca*) EN CAUTIVERIO**

ANEXO TÉCNICO

Periodo de realización: 22 de agosto al 11 de diciembre de 2010

(Pekín y Chengdú, China)

Realizador: MVZ Saúl Soto Mendoza

Diciembre 2010

INDICE

I.	INTRODUCCIÓN	3
II.	MONITOREO REPRODUCTIVO	4
	a. Monitoreo hormonal	4
	b. Citología vaginal	5
	c. Evaluación conductual	6
III.	COLECCIÓN, MANEJO Y CONSERVACIÓN DE SEMEN	6
	a. Colección de semen	6
	b. Evaluación seminal	7
	c. Criopreservación de semen	8
	d. Recuperación espermática post-congelación	10
IV.	INSEMINACIÓN ARTIFICIAL (IA)	12
	a. Inseminación uterina con catéter escandinavo	12
	b. Inseminación intra-uterina con laparoscopia	13
V.	INDUCCIÓN DEL CELO Y SUPEROVULACIÓN	14
VI.	COLECCIÓN DE OVOCITOS	16
	a. Aspiración de ovocitos por laparoscopia	16
	b. Colección de ovocitos postmortem	17
VII.	VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS/EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO	17
	a. Vitrificación de ovocitos/embriones	17
	b. Vitrificación de tejido ovárico	18
VIII.	FERTILIZACIÓN <i>in Vitro</i> (FIV)	19
IX.	INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA	19
X.	BIBLIOGRAFÍA CITADA	21
XI.	APÉNDICES	25

APÉNDICE I. Equipo y Material necesario que se necesita adquirir para la implementación de técnicas de reproducción de alta complejidad.

I. INTRODUCCIÓN.

Los pandas gigantes son un reto para reproducirlos en cautiverio debido a sus características reproductivas muy particulares. Las hembras alcanzan la madurez reproductiva hasta los 5-6 años de edad, son consideradas monoestricas estacionales con un periodo fértil de solo 24 a 72 horas, la gestación puede durar de 85 a 185 días, regularmente tienen una cría y rara vez dos con un intervalo entre partos de 18 meses. Así mismo los machos alcanzan la madurez reproductiva un poco más tarde, a los 6- 7 años de edad (Nowak, 1999; McGeehan et al, 2002). En las hembras de esta especie la amplitud observada en la gestación es debido al fenómeno llamado implantación retardada, que es el intervalo de tiempo entre la formación del conceptus hasta su implantación en el útero y el comienzo del desarrollo fetal que en esta especie es variable. Los factores endócrinos y parácrinos que dirigen esta característica aún se desconocen. Además las pandas gigantes manifiestan pseudogestación, con la cual exhibe conductas y cambios fisiológicos y hormonales similares a una gestación verdadera (Steinman et al, 1998).

Durante la estación sexual la hembra y el macho sincronizan las conductas proceptivas y receptivas de la hembra usando comunicación química (por medio de hormonas “marcando” y “orinando”) y vocal (“borregueo”). Las conductas proceptivas incluyen el acercamiento o proximidad y el contacto aumentando la atractividad de la hembra hacia el macho, posteriormente las conductas receptivas como la presencia de lordosis y el levantamiento de la cola preceden a los intentos de monta por el macho. Finalmente el clímax de las conductas receptivas facilitan la cópula, la intromisión y la transferencia del esperma durante el periodo más probable para la fertilización (McGeehan et al, 2002).

Para establecer las técnicas de reproducción asistida en los pandas gigantes que se usan en la actualidad, ha sido necesario describir con detalle eventos reproductivos tales como la duración de la estación sexual y anestro, gestación o el ciclo estral. Para ello, se desarrollaron métodos no invasivos, que permiten monitorear en cautiverio, con observaciones de la conducta, la cuantificación de hormonas en orina utilizando inmunoensayos y la citología vaginal. Así mismo la inseminación artificial ha sido realizada con semen fresco (obtenido por electroeyaculación) o congelado y la combinación de ambos, dentro de las primeras 36 horas después de la ovulación.

La utilización de técnicas de alta complejidad, como la vitrificación de ovocitos y la fertilización in vitro, así como la conservación de embriones es un campo muy poco explorado en esta especie.

El presente manual ha sido redactado mediante una revisión bibliográfica de la información publicada hasta el momento y la información obtenida de primera mano de especialistas en reproducción asistida de panda gigante durante la realización de dos estancias en la R.P. China, una en el Centro de Investigación sobre Panda Gigante del Zoológico de Pekín y otra en el Centro de Reproducción e Investigación del Panda Gigante de Chengdu (CRIPG). Este manual es parte fundamental del “Plan Estratégico de Conservación del Panda Gigante” de la DGZVS-GDF que se ha venido desarrollando en los últimos años y en donde a través de la participación del personal médico en el Programa de Becas del Centro de Estudios China-México se ha fortalecido.

II. MONITOREO REPRODUCTIVO.

A) Hormonas reproductivas.

La cuantificación de hormonas reproductivas en orina en el Zoológico de Chapultepec al igual que en el Centro de Reproducción e Investigación en Panda Gigante (CRIPG) en Chengdú se realiza mediante un ensayo inmunoenzimático (EIA, por sus siglas en inglés), específico a estrógenos (estróna conjugada, E1G, Davis California) y progestágenos (pregnandiol conjugado, PdG, Davis California), a partir de anticuerpos (Ab) monoclonales Ab-R522-2 y Ab-P13904 respectivamente según el método de Czekala et al., (2000) y McGeehan (2004).

En el Zoológico de Chapultepec monitoreo hormonal estrogénico comienza a partir del mes de enero hasta el mes de abril de cada año. El perfil estrogénico denota que una vez que la hembra comienza a aumentar los niveles basales (>20 ng/mg Cr) tarda alrededor de 8 días (± 2 días) en llegar al pico coincidiendo con la mayor frecuencia de conductas proceptivas, considerándose el día del pico estrogénico (400-900 ng/mgCr) el día 0 (probable día de ovulación). Una vez llegado al máximo de los niveles estrogénicos se observa un descenso súbito de la concentración hormonal llegando a valores menores a 20 ng/mgCr en 24-36 hrs aproximadamente y mantenerse en valores basales nuevamente

a partir del día +2 que coincide con el mayor índice de receptividad. Por otro lado la presencia de un aumento de los progestágenos en orina después del nivel máximo de estrógenos es un indicador de la presencia de un cuerpo lúteo. La concentración hormonal es indexada con la concentración de creatinina (ya que su excreción en la orina es constante), las determinaciones hormonales de E1G y PdG se expresan en ng/mg de creatinina.

Además de la cuantificación de estrógenos en orina para la determinación del estro, el equipo de investigación de la Dra. Hou Rong, Directora del Centro de Reproducción, CRIPG de Chengdu, está estandarizando una técnica de ELISA para la cuantificación de LH (hormona luteinizante) en orina para aumentar la precisión en la determinación del momento de ovulación.

Esta prueba es una alternativa factible para implementarse en el Laboratorio de Reproducción y Endocrinología de la DGZVS, como herramienta para la determinación de la ovulación de las hembras de panda gigante que sean estimuladas hormonalmente con métodos ratificiales. Se trata de un kit de ELISA comercial de tipo inmunométrico para la cuantificación de LH sérica para cánidos domésticos. Según el equipo de la Dra Rong se realiza el ensayo siguiendo las instrucciones del fabricante sin ninguna modificación. Usando orina completa. La concentración de LH obtenida se indexa con la concentración de creatinina de la misma muestra y los resultados se correlacionan con la concentración de estrógenos urinarios.

B) Citología vaginal.

El análisis de la citología exfoliativa vaginal representa un método rápido y práctico para realizar el monitoreo del estro de las hembras, ya que las modificaciones del epitelio vaginal correlacionan con los niveles estrogénicos. En el panda gigante se realiza la toma de muestras por condicionamiento conductual a través de refuerzos positivos, desde principios de febrero diariamente si el temperamento de los ejemplares lo permite, a medida que las hembras van aproximándose a su pico estral permiten un mayor manejo, facilitando la colecta. La técnica de tinción empleada en el Zoológico de Chapultepec es la de Papanicolau (PAP, modificada por Durrant, et al 2000, 2002, 2003) ya que con esta tinción tricrómica se ha podido observar y evaluar además de la morfología celular, los cambios cromáticos en las células con cierta regularidad en la especie. Apreciándose un primer viraje cromático de basofílico (azul) a acidofílico (rosa) 8 días (+/- 2) previos a la

ovulación, generalmente acompañado de un incremento gradual de células superficiales. Y un segundo viraje cromático 2 días previos a la ovulación cuando se observa un incremento de superficiales anucleadas de color naranja, (denominadas queratinizadas) reemplazando a las acidofílicas. Dado que las variaciones en la morfología celular, los valores máximos por individuos son bastante variables, se ha considerado en el caso de panda gigante las variaciones cromáticas tan importantes como la morfología, siendo un parámetro más para ayudar a determinar el momento probable de la ovulación. A diferencia del Zoológico de Chapultepec, en ambos centros de investigación chinos donde se realizaron estancias esta práctica la hacen con tinción Diff-Quick siguiendo un protocolo para canidos, que según comentaron les ha dado muy buenos resultados.

C) Evaluación conductual.

Las evaluaciones del comportamiento se basan, en determinar las proporciones y frecuencias de presentación de las diversas conductas que pueden presentar los animales en la estación sexual. Clasificándose y cuantificándose en eventos reproductivos y estados de comportamiento durante el día para ser relacionados con el perfil hormonal estrogénico.

Se determinan la presencia y frecuencia de conductas sexuales características de la especie como son: “marcaje anogenital” (frotamiento de la región contra alguna superficie), incremento de actividad (locomoción, juego, etc.), frecuencia, intensidad y tipo de vocalizaciones (“borregueo”, ladrado, chillido, gemido, etc.), aumento en la respuesta a otros ejemplares y/o incremento de receptividad, disminución del apetito, masturbación, etc. En el celo la hembra emite el llamado “chirrido sexual” (una especie de gemido), mostrando lordosis con la cola levantada y si es compatible con el macho le presentará el tren posterior e incluso puede retroceder hacia él. Todas estas conductas van en aumento en relación directamente proporcional a los niveles estrogénicos detectados (McGeehan., 2004).

III. COLECCIÓN, MANEJO Y CONSERVACIÓN DE SEMEN.

A) Colección de semen.

1. Por electroeyaculación.

En los machos de esta especie el semen se obtiene mediante electroeyaculación, en animales anestesiados, usando una sonda rectal de 2.6 cm de diámetro con tres electrodos, conectada a un estimulador eléctrico (60-Hz), el eyaculado (0.5-1ml) se obtiene mediante tres series de 30 estímulos eléctricos con un voltaje variable (2-8V), este proceso requiere aproximadamente 20 min (Platz et al, 1983; Howard et al., 2006).

La electroeyaculación consiste en la estimulación eléctrica y por vía rectal de las glándulas accesorias del aparato reproductor del macho, como son las vesículas seminales y la próstata, pero principalmente el centro eyaculatorio que se encuentra en las ramificaciones nerviosas de la columna vertebral, entre las últimas vértebras lumbares y las dos primeras vértebras sacras (Hafez y Hafez, 2000)

2. Postmortem.

En machos que fallecen se puede recolectar semen antes de 4 horas postmortem, mediante la disección de la cola del epidídimo testicular. En cada cola del epidídimo se hacen cortes en diferentes direcciones con una navaja de bisturí y cada corte se enjuaga con pequeñas cantidades de medio de cultivo celular a base de HEPES, hasta completar un volumen de 12 ml (Pérez et al., 2004).

B) Evaluación seminal.

Se basa en los criterios de normalidad del Manual de laboratorio de la OMS para el examen del semen humano y de la interacción entre el semen y el moco cervical (2007). Brevemente:

Examen macroscópico: En este examen se estudia el volumen, color, consistencia, viscosidad, olor, etc, mediante la observación directa de la muestra en un tubo.

Examen microscópico: En el examen microscópico se observan y se miden mediante microscopio de contraste de fases determinadas características de los espermatozoides como:

- **Motilidad:** Con ayuda del contador digital de células se cuentan 100 células evaluando el tipo de motilidad individual y se reporta en porcentaje.
- **Concentración:** Se realiza una dilución de 1:200, posteriormente se coloca una gota en cada extremo de la cámara de Neubauer, permitiendo que el líquido se desplace por debajo del cubre objetos. El conteo se realiza únicamente en los 4

cuadros grandes de las esquinas y el del centro, asegurándose que el espermatozoide este dentro de los límites del cuadro.

- Viabilidad: En un portaobjetos precalentado a 37°C se colocan 10µl de muestra espermática y 10 µl de colorante eosina-negrosina, se hace un frotis delgado. Los espermatozoides vivos resisten los colorantes, mientras que los muertos los absorben por lo que es fácil de identificar el porcentaje de vivos y muertos.
- Morfología: La misma muestra utilizada para evaluar viabilidad se observa en el microscopio, se identifican anomalías de cabeza, pieza media y cola. Se contarán 100 células por duplicado.
- Maduros e inmaduros: El mismo frotis teñido se observa al microscopio, se cuantifican los espermatozoides que tienen gota citoplasmática y los que no hasta completar 100 células, la diferencia de las cuentas es el porcentaje.
- Integridad del acrosoma: Es evaluada usando un frotis teñido con tinción de Pope, contando 100 células para sacar el porcentaje.

C) Criopreservación de semen.

La conservación de semen es una práctica de manejo valiosa, ya que con el procedimiento se hace uso eficaz de la dotación de espermatozoides disponibles de un macho y de manera general, el semen congelado dentro de un programa de inseminación artificial, permite incrementar el progreso genético y mejorar la eficiencia de la reproducción. También puede emplearse como una herramienta para la conservación y multiplicación de especies silvestres, favoreciendo la preservación de la biodiversidad genética (Hafez y Hafez, 2000; Olson et al., 2003; Howard et al., 2006).

Gracias al conocimiento de las características y funciones del plasma seminal que forma junto con los espermatozoides al eyaculado, se han podido hacer los diluyentes para el semen que se utilizan en la inseminación artificial.

El plasma seminal está constituido por las secreciones de las glándulas bulbouretrales, la próstata, las vesículas seminales, el epidídimo y los conductos deferentes, siendo un vehículo isotónico, nutritivo y protector al permanecer tamponado, tendiendo hacia un pH normalmente neutro (5.9 - 7.3). Contiene también agentes antimicrobianos como la seminalplasma e inmunoglobulinas, principalmente IgA y una gran variedad de hormonas como andrógenos, estrógenos, FSH, LH, sustancias similares a la

gonadotropina coriónica, hormona del crecimiento, insulina, glucagon, prolactina, relaxina, destacando entre ellas las prostaglandinas (Hafez y Hafez, 2000; Olson et al., 2003).

1. Proceso de congelación.

Para el semen de panda gigante se han usado históricamente dos diluyentes: a) TEST, preparado combinando Freezing Medium-TEST Yolk Buffer (20% yema de huevo y 12% glicerol) con Refrigeration Medium-TEST Yolk Buffer (5% glicerol) y b) FSF (Sperm Freezing Solution) que contiene 20% de yema de huevo y 5% de glicerol como crioprotector (Olson et al., 2003; Howard et al., 2006).

Una vez colectado el semen se diluye en una proporción 1:3 con diluyente (TEST o SFS) a 37°C, entonces se lleva a una temperatura de equilibrio (4°C) en refrigeración por 4 horas. La congelación se puede realizar en dos formas diferentes: a) Pellets, colocando la muestra seminal en hielo seco (-78°C) por 10 o 15 minutos y después se pasan al nitrógeno líquido a -196 °C y, b) Pajillas y viales, que después de la temperatura de equilibrio se colocan en vapores de nitrógeno líquido a -70°C por 10 o 15 minutos y después se pasan a nitrógeno líquido (Howard et al., 2006).

Se ha comprobado que mientras mayor concentración espermática por volumen contengan los pellets o las pajillas, la motilidad post-descongelamiento disminuirá, ya que posiblemente los ingredientes que se encuentran en el diluyente no son suficientes para proporcionar un adecuado aporte nutricional y de protección al espermatozoide durante la congelación, por lo que esto habrá de considerarse al calcular el número de dosis a obtener de cada eyaculado (Olson et al., 2003).

2. Descongelación de las muestras.

Tradicionalmente se utilizan dos medios de cultivo para descongelar el semen: a) Ham's F10 y b) TCM199 que contienen HEPES 25-mM para mantener en equilibrio el pH.

Los pellets se descongelan sacándolos del nitrógeno líquido y manteniéndolos 10 segundos a temperatura ambiente y colocándolos en un tubo conteniendo 0.5 ml de medio de cultivo a 37°C manteniéndolo así por máximo 90 minutos.

Las pajillas y los viales se descongelan extrayéndolos cuidadosamente del tanque con nitrógeno líquido y son expuestas durante 10 segundos a temperatura ambiente (25 +/- 2°C), y se ponen a baño María a temperatura de 37°C durante 30- 60 seg, luego se pasan

a un tubo con 0.5 ml de medio de cultivo a base de HEPES a 37°C manteniéndolos ahí por máximo 90 minutos (Howard et al., 2006).

D) Recuperación espermática post-congelación.

Mediante la recuperación espermática se elimina el plasma seminal y el medio de criopreservación y se seleccionan los espermatozoides con mejor movilidad. Son muchas las técnicas empleadas para tal efecto basadas en las más diversas hipótesis de conducta de los espermatozoides frente a ellas (Hafez y Hafez, 2000). En este apartado solo se comentarán las que mejor resultado han dado en el Centro de Reproducción e Investigación. CRIPG de Chengdu para realizar fertilización in vitro e inyección intracitoplasmática de ovocitos recuperados postmortem de panda gigante.

1. Selección de espermatozoides mediante “Swim-UP”.

Esta técnica se basa en la capacidad que tienen los espermatozoides con motilidad progresiva de avanzar en un medio de cultivo adecuado, Brevemente:

Se coloca la muestra seminal en un tubo Falcon de 10 ml y se añade medio IVF (Medicult, Denmark) en proporción 1:2 ó 1:3. Se centrifuga 10 minutos a 600 g y se decanta con cuidado. Una vez decantado, se añade al pellet (botón celular) entre 0.3-0.5 ml de medio, dejando resbalar cuidadosamente por las paredes. Se coloca en el incubador 45 minutos a 37°C, permitiendo a los espermatozoides móviles migrar desde el pellet gracias a su propia movilidad en el medio de cultivo. Por último, se aspira cuidadosamente el sobrenadante que contiene los espermatozoides móviles que han ascendido.

2. Método de centrifugación por gradientes continuos.

En el CRIPG de Chengdu utilizan el sistema “Pure Sperm System” (Scandinavian IVF, Gothenburg, Sweden). Se compone de partículas de sílice coloidales especialmente tratadas para mantener la viabilidad de los espermatozoides. Se trata de un sistema diseñado para sustituir al Percoll, manteniendo el principio de separación por gradientes de densidad.

Usando gradientes de 90%, 75% y 45%. Dependiendo de la calidad de la muestra espermática, varía el volumen de cada uno de los gradientes: a) si hay $>15 \times 10^6$ espermatozoides móviles progresivos/ml se colocan 1.5 ml de cada uno de los

gradientes, b) $6-15 \times 10^6$ espermatozoides móviles progresivos/ml se colocan 1.0 ml de cada uno de los gradientes, c) $0.6-5 \times 10^6$ espermatozoides móviles progresivos/ml se preparan minicolumnas con 0.5 ml de cada gradiente y d) $0.2-0.5 \times 10^6$ espermatozoides móviles progresivos/ml, se pueden preparar gradientes de un volumen inferior a 0.5 o simplemente concentrar la muestra por centrifugación con medio de cultivo.

La columna de gradientes de densidad se monta en un tubo cónico. Primero se coloca el gradiente de 90%, dejando resbalar suavemente por las paredes del tubo, asegurando que éstas estén bien mojadas. A continuación se coloca el gradiente de 45%, dejando también resbalar por las paredes. Por último se coloca entre 0.5-1ml del semen en la parte superior de la columna. Las columnas se centrifugan durante 20 minutos a 300 g. Con pipeta Pasteur se recupera el pellet del fondo del tubo cónico y se re-suspende con 3-5 ml de medio IVF.

Si es necesario el lavado se centrifuga 5 minutos a 600 g y se elimina el sobrenadante, se re-suspende el pellet en 1 ml de medio IVF y se mantiene en el incubador hasta el momento de su uso.

Nota: siempre re-suspender en 1 ml de medio IVF, independientemente de la calidad de la muestra, con ello evitamos que se apelmace la muestra lo cual dificulta su posterior manejo.

3. Concentración de espermatozoides por centrifugación.

Este es el método de elección en muchos casos, cuando la concentración es inferior a 100, 000 de espermatozoides móviles progresivos/ml o cuando la movilidad es muy reducida.

Al igual que en el Swim Up, se centrifuga el total del semen entre 5-10 minutos a 600g, con medio IVF en proporción 1:2 ó 1:3. Se elimina el sobrenadante y se re-suspenden los espermatozoides sedimentados en un pequeño volumen de medio de cultivo Ham's F10 o TCM 199.

4. Capacitación y Reacción acrosómica.

El fin de la capacitación espermática es, por definición, la preparación del espermatozoide para sufrir la reacción acrosómica. Se han desarrollado métodos indirectos que utilizan lecitinas marcadas con fluorescencia, anticuerpos monoclonales y

técnicas de teñido, para visualizar la presencia o ausencia del acrosoma (Hafez y Hafez, 2000). El acrosoma reacciona fisiológicamente cuando se une a la zona pelúcida, siendo esta el inductor natural del proceso, por lo que parece más interesante el estudio de la capacidad de reacción que presenta el acrosoma de una muestra determinada, ya que si no es capaz de reaccionar aunque esté presente, no tendrá ninguna utilidad el estudio de su presencia (Splinder et al., 2004).

Así para realizar el estudio de la reacción del acrosoma se debe utilizar un activador de esta lo más fisiológico posible. Por el momento, se han utilizado el 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) y AMP cíclico-dibutil, ionoforo de calcio (CI-A283187) como aceleradores químicos, pero también se han utilizado zonas pelúcidas de ovocitos de gato doméstico y úrsidos silvestres solubilizadas en el caso de los espermatozoides del panda gigante (Splinder et al., 2004; Howard et al., 2006).

Otros de los aspectos importantes a tener en cuenta cuando se realiza este tipo de estudio, según la Dra Rong, es la vitalidad celular ya que un espermatozoide muerto puede haber perdido el acrosoma, con lo que parecería que ha reaccionado frente al estímulo, dando falsos positivos. Para solucionar este problema se debe añadir al estudio una prueba de vitalidad, siendo la más efectiva el Test Osmótico como el descrito por Chen et al. (1989) o Matson et al. (2008). Se considera que la función espermática es normal si la capacidad de experimentar la reacción acrosomal es inferior al 10%.

IV. INSEMINACION ARTIFICIAL (IA).

En el caso del panda gigante, la correspondencia entre todos los factores evaluados en el monitoreo durante la estación sexual, hormonas, conducta y la citología vaginal, es fundamental para decidir el mejor momento para realizar la inseminación artificial.

A) Inseminación artificial (IA) con catéter escandinavo.

Es el método de inseminación usado hasta ahora en panda gigante aumentando su éxito cuando se realiza intercalándolo con la monta natural, éste método es el que se utiliza en el Zoológico de Pekín y el CRPG de Chengdu. Con la diferencia que Mr Liu Xuefeng, experto en reproducción de panda gigante del Centro de Reproducción del Zoológico de Pekín, combina y/o alterna semen fresco o descongelado en cada IA

después de la monta natural y así obtiene una fertilidad superior al 90% y le sirve para saber, cuál de las muestras seminales fertilizaron al óvulo y en qué día del celo, por medio pruebas de paternidad a los cachorros obtenidos.

En el caso del Zoológico de Chapultepec se realizaban de una a tres IA, en los días +2 y +5 con respecto del pico hormonal estrogénico (día 0), con un intervalo de 24 hrs y una cantidad mínima de 50×10^6 espermatozoides móviles por dosis, con semen fresco (Gual y Pulido, 1997) y congelado del mismo macho, hasta la temporada reproductiva 2009, sin provocar alguna gestación con cría.

La IA intra-vaginal con el catéter escandinavo se realiza bajo sedación de la hembra. El catéter interno de acero de 1 - 2 mm de grosor con 30 cm longitud, es introducido en la vagina con la ayuda de un vaginoscopio. Se debe tomar en cuenta que existe un vestíbulo inmediatamente después de la vulva, en el fondo de éste se encuentra el "falso cérvix" que contiene la abertura de la vagina, el himen y la abertura de la uretra, generalmente la vagina se encuentra dorsal y muy cerca de la salida de la uretra, la vagina contiene pliegues longitudinales y transversales antes de llegar al verdadero cérvix donde se deposita el semen (Gual y Pulido, 1997).

B) Inseminación intra-uterina usando laparoscopia.

No existen reportes de inseminaciones intrauterinas en panda gigante, tampoco se ha ensayado en los centros de investigación en reproducción de esta especie en China, han optado por realizar inseminación intra-vaginal con catéter escandinavo alternadas con monta natural por la disposición de machos y, usando solo la IA en aquellos casos donde el acoplamiento de parejas no fructifico y/o existen agresiones entre congéneres.

Sin embargo la laparoscopia abdominal es una alternativa tomando en cuenta la baja calidad del semen congelado en la DGZVS y a la falta de machos de esta especie. Ya que en la inseminación intra-vaginal con semen congelado, es necesaria una concentración mínima de 100 millones de espermatozoides móviles (<60%) en un volumen de 0.25 ml, mientras que para la inseminación intrauterina por laparoscopia se pueden utilizar solo 20 millones de espermatozoides móviles (>60%) en el mismo volumen.

La Cirugía Laparoscópica (CL) utiliza una microcámara de televisión compuesta de un telescopio, que se denomina Laparoscopio, con el cual visualiza el interior del abdomen. Como el interior del abdomen es oscuro, se tiene que agregar luz a través del mismo

laparoscopia utilizando una fuente de luz fría, transmitida a través de fibra óptica. A esto se agrega un Insuflador, que es un dispositivo que insufla CO² por una aguja (aguja de Verres) previamente colocada en la pared abdominal (Hafez y Hafez, 2000).

Una vez visualizada la cavidad abdominal por un circuito cerrado de TV. Es necesario introducir la pistola de inseminación y pinza de toma Babcock a la cavidad para manipular el útero, y se deposita el semen en el cuerno uterino ipsilateral al ovario con cuerpo lúteo. Los dispositivos que permiten la entrada y salida de los diversos instrumentos quirúrgicos son los trócares, cuya longitud es de 33-40 cm y su diámetro entre 10 y 5 mm. Los trócares constan de dos partes: el trócar que es un punzón que atraviesa la pared abdominal, y la camiseta o funda que queda para la parte operativa; esta funda permite la introducción de los instrumentos sin perder la presión de CO² del Neumoperitoneo. Terminado el procedimiento se aspira el neumoperitoneo y se suturan las puertas de entrada de los trócares. Es un procedimiento que es menos doloroso por el hecho de no haber una gran incisión en la pared abdominal (Ramírez-Molina et al., 2005).

V. INDUCCION DEL CELO Y SUPEROVULACION.

Durante décadas se ha trabajado intensamente en protocolos de inducción de celos y superovulación con eCG (Gonadotropina Sérica Equina, por sus siglas en inglés) y hCG (Gonadotropina Coriónica Humana, por sus siglas en inglés) en animales domésticos. En panda gigante el primer reporte data de 1999, donde una hembra (SB 414) que había expresado anovulación y carencia de conducta reproductiva un año antes, por lo que en la temporada reproductiva de 1999, en un intento para inducir el estro e incrementar las posibilidades de monta se le administró FSH y hCG, la FSH fue administrada desde el día -8, incrementándose la dosis a partir del día -6 y el día de la monta (día 0) se administró hCG, incluso se inseminó en el día +2, se pudo regular el perfil hormonal estrogénico y progestágeno e incrementar la conducta reproductiva sin mostrar gran interés por el macho, ese año no se obtuvo cría. Un año después se observaron parámetros normales en cuanto a los perfiles hormonales y conductuales de estro, la monta ocurrió en el día +1 y se inseminó artificialmente el día +4, se obtuvo una cría después de 121 de gestación a partir del día de la primera cópula (Steinman et al., 2006).

Este tema se abordó con los expertos en reproducción de panda gigante en ambas instituciones donde se realizaron las estancias, considerando dos métodos de estimulación hormonal (Deslorelina-GnRH-antagonista vs eCG/hCG) y de acuerdo a su experiencia y conocimiento se llegó a la conclusión que la segunda opción era la mejor alternativa en el caso de las pandas gigantes en México, debido a su edad, historial reproductivo y a la ausencia de macho.

La hCG es una proteína que consta de dos cadenas peptídicas (α y β) y que contiene galactosa y hexosamina, su peso molecular es de 30.000 y posee una vida media de 8 a 12 horas. Es químicamente diferente de la hormona luteinizante pero su acción biológica es muy semejante, teniendo también cierta actividad semejante a FSH. La hCG se forma en los citotrofoblastos de las vellosidades coriónicas de la placenta humana y aparece en la orina a las pocas semanas de la concepción (Yen et al., 2001). Desde el punto de vista farmacológico la hCG es un producto que causa ovulación en la hembra. Su uso en medicina veterinaria es amplio, para provocar ovulación en la hembra en el momento de ser servida, como agente terapéutico para inducir luteinización y posible ovulación en quistes ováricos. La administración de hCG puede estimular los ovarios de cualquier especie animal (Stornelli et al., 2006).

La eCG es una glicoproteína, con un peso molecular de 68.000 y una vida media de aproximadamente 26 horas. Se forma en las copas endometriales del útero de yegua gestante. En la mayoría de las especies la actividad biológica de la eCG es similar a la de FSH incluso cuando es administrada a hembras de otras especies. Su período de acción es largo debido a que no pasa el filtro renal. Esta hormona causará un marcado desarrollo folicular en la mayoría de las especies y es utilizada para inducir superovulación. La eCG es utilizada para inducir el desarrollo folicular en los ovarios inactivos de animales sexualmente maduros. Por otra parte, esta hormona posee suficiente actividad LH para provocar ovulación en la mayoría de los casos. Los ovarios inactivos que por cualquier causa se encuentran en estado quiescente pueden entrar en actividad luego de la administración de eCG. Con dosis elevadas se puede producir super-ovulación. (Stabenfeldt, 1993; Stornelli et al., 2006).

VI. COLECCIÓN DE OVOCITOS.

La colección de ovocitos y su maduración ofrece una importante alternativa para preservar los recursos genéticos, de animales silvestres amenazados o en peligro de extinción.

A) Aspiración de ovocitos por laparoscopia.

Aunque en los Centros de Reproducción e Investigación de Pekín y Chengdu no se haya practicado esta técnica debido a las condiciones existentes para la reproducción del panda gigante en ese país, es factible realizarla en el Zoológico de Chapultepec con la ayuda de especialistas integrantes del Grupo de Especialistas Médicos Asesores (GAME) de la DGZVS.

Brevemente: La aspiración de ovocitos por laparoscopia (AOL) se realiza bajo anestesia general. Afeitando y desinfectando la zona abdominal y, colocado el ejemplar en la cama de cirugía decúbito dorsal en un ángulo aproximado de 45° respecto de la horizontal, de tal modo que los órganos digestivos y omento se deslicen hacia el diafragma y permitan visualizar el tracto reproductivo de la hembra. Para incrementar la capacidad de visualización vía laparoscópica se realiza un pneumoperitoneo, insuflando la cavidad abdominal con aire filtrado o con CO². Una vez que los tres trócares han sido debidamente insertados y se ha introducido a través de ellos el endoscopio, la pinza de sujeción atraumática y la pipeta de aspiración, se procede a la punción folicular y aspiración de medio/ovocitos a una velocidad de 50-70 gotas por minuto. A los efectos de poder visualizar y punzar todos los folículos de más de 2 mm presentes, el ovario es descubierto levantando la fimbria con la pinza atraumática y tirando en diferentes direcciones, como para exponer las distintas áreas en su superficie. El procedimiento se repite en ambos ovarios, y antes de quitar el equipo se procede a lavar ambos ovarios con solución fisiológica heparinizada, a los efectos de eliminar cualquier resto de sangre y así minimizar los riesgos de secuelas (adherencias). El medio de aspiración está compuesto por medio T199 suplementado con 0.05 mg/ml de heparina y 1 % de suero fetal bovino (Baldassarre, 2007).

B) Colección de ovocitos postmortem.

Los ovarios se recuperan dentro de 4 horas después de la muerte del ejemplar. Son puestos en buffer salino fosfatado (D-PBS) suplementado con 100 UI/ de penicilina sódica y 50 ug/ml de estreptomicina para su transporte a 39°C. Una vez en el laboratorio los ovarios se pesan y se miden y se colocan en cajas Petri con medio de cultivo a base de HEPES-TL para su disección. La superficie de los ovarios se corta con bisturí varias veces y se agita generosamente. Los ovocitos recuperados se clasifican como normales (medianamente pigmentados –oscuros- y completamente o parcialmente rodeados por células del cúmulus o con una delgada corona radiata) o como anormales (pálidos de color, o carentes de células de cumulus o corona radiata) (Yin et al., 2007) y se colocan en medio TCM199 enriquecido con FSH (10 ug/ml) y LH (20 ug/ml) para su maduración por alrededor de 20-22 horas en atmósfera húmeda con 5% CO² (Zhang et al., 1998), posterior a esto los ovocitos están listos para su vitrificación o su utilización en procedimiento como FIV o ICSI.

VII. VITRIFICACIÓN DE OVOCITOS/EMBRIONES Y TEJIDO OVÁRICO

La criopreservación, es un procedimiento que nos permite mantener a temperaturas de -196°C por tiempo indefinido este material biológico, para ser utilizado en el momento más oportuno. El método de criopreservación por vitrificación forma parte de los procedimientos no equilibrados, ya que las células no están en equilibrio con las altas concentraciones de crioprotectores permeables y no permeables antes de un enfriamiento rápido, constituyendo el desarrollo y la aplicación de la vitrificación, una alternativa factible para la criopreservación de embriones (Cabrera et al., 2008).

Este procedimiento solo se está ensayando en el Centro de Reproducción e Investigación en Panda Gigante en Chengdu por el equipo de la Dra. Rong. En el Centro de Reproducción del Panda Gigante del Zoológico de Pekín no se realiza por no contar con las instalaciones y el equipo adecuados.

A) Vitrificación de ovocitos/embriones.

La vitrificación es un método de criopreservación extremadamente rápido, en el cual los embriones son incluidos en una solución altamente concentrada de crioprotectores,

solidificándose durante el enfriamiento sin la formación de cristales de hielo. El fenómeno requiere de tasas rápidas de enfriamiento, lográndose en condiciones prácticas, mediante la inmersión directa en nitrógeno líquido, representando una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 2.500°C/min, y demorándose así, pocos segundos en criopreservarse. La solución no se cristaliza, se vitrifica, es decir, aumenta abruptamente su viscosidad y se transforma a un estado sólido no estructurado similar al vidrio, de donde el método toma su denominación, conservando la distribución normal tanto molecular como iónica del estado líquido (Ruiz y Correa, 2008; Cabrera et al., 2008).

En el Laboratorio de Reproducción de la DGZVS se puede realizar esta técnica usando un kit comercial: Vitrification Kit (CT401-TOP Cryotop Safety kit) Kitazato BioPharma. Co., Ltd. para la vitrificación de ovocitos/embriones de humanos, es una técnica versátil que se puede usar en otras especies como el panda gigante.

B) Vitrificación de tejido ovárico.

El propósito de este procedimiento es tener tejido ovárico disponible para ser utilizado luego de descongelado. En la actualidad este es un procedimiento experimental y su aplicación clínica es muy limitada. Sin embargo la congelación de tejido ovárico con sus folículos primordiales se está considerando como una seria alternativa de preservación del potencial reproductivo en vista de que más del 90% de los ovocitos se encuentran almacenados en esta forma (Ávila et al., 2006; Maribet-Lis et al., 2007).

Los ovocitos contenidos en los folículos primordiales son menos diferenciados, y por lo tanto más resistentes a la criopreservación. Finalmente, con frecuencia la criopreservación de tejido ovárico es la única opción de fertilidad futura disponible (Steta et al., 2010). Aunque no todos los folículos sobreviven el proceso de congelación - descongelación y puede ocurrir que muy pocos o ninguno sobreviva para ser utilizado posteriormente.

Hasta que se logre el adecuado desarrollo de la tecnología de cultivo y maduración en el laboratorio de los folículos y ovocitos inmaduros, parece ser que el mejor prospecto de utilizar el tejido ovárico criopreservado con fines reproductivos lo ofrece el autotrasplante del mismo en el pedículo ovárico o áreas alternativas. En este último caso se requeriría hacer captación oocitaria y FIV para lograr una gestación (Steta et al., 2010).

VIII. FERTILIZACIÓN IN VITRO.

La fertilización in vitro (FIV) es una técnica por la cual la fecundación de los ovocitos por los espermatozoides se realiza fuera del cuerpo de la hembra. La FIV es el principal tratamiento para la esterilidad cuando otros métodos de reproducción asistida no han tenido éxito como la inseminación artificial (Aller et al., 1986).

El espermatozoides y el ovocito se incuban juntos (en una relación aproximada 75 000:1) en el medio de cultivo a base de HEPES durante unas 18 horas. Para entonces la fecundación debería haber ocurrido y el ovocito fecundado debería mostrar dos pronúcleos. El óvulo fecundado se pasa a un medio de cultivo KSOM y se mantiene durante alrededor de 48 h hasta que alcanza el estadio de 6-8 células (Mucci et al., 2006).

Una vez ocurrido esto se promueve su división celular y crecimiento para dar lugar a un embrión. Este cultivo dura entre 2 y 5 días, y es muy importante que se lleve a cabo en las condiciones óptimas para el embrión, ya que de ello dependerá su calidad y la tasa de implantación. Para que el crecimiento del embrión se lleve a cabo en las mejores condiciones posibles se utilizan distintos tipos de medio de cultivo (Mucci et al., 2006).

Aparte de esto, también es muy importante controlar las condiciones de temperatura (37°C), ausencia de luz, anaerobiosis y pH del medio de cultivo.

IX. INYECCIÓN INTRACITOPLASMÁTICA (ICSI).

Desde su introducción en la medicina reproductiva en 1978, la fertilización in vitro se ha considerado un método exitoso de tratamiento de la esterilidad. Casi una década después, las técnicas de micromanipulación se aplicaron por primera vez con éxito para el tratamiento de la infertilidad de factor masculino. ICSI obtiene ovocitos a través de la aspiración folicular, la eliminación de las células del cúmulo y la corona radiada y la preparación de semen de acuerdo con el proceso de Swim-Up o de otro tipo. Posteriormente, un espermatozoide es inyectado en el ovocito a través de un capilar de vidrio delgado (pipeta). Si ocurre la fertilización, el embrión se puede transferir al útero 48 horas después de la microinyección o se puede vitrificar (Fleming y Rey, 1993; Steirteghem Van et al., 1993; Ogonuki et al., 2003).

Esta técnica se está implementando en el CRIPG de Chengdu a nivel experimental, utilizando modelos de murinos y lagomorfos, en conjunto con el Departamento de Genómica de la misma institución, estudiando fragmentación de DNA, la generación de microsatélites para DNA nuclear de blastocitos de panda gigante y DNA mitocondrial.

X. BIBLIOGRAFÍA CITADA

Aller J., Del Giudice M., Barany A., Vianello F., Faro, I. 1986. Fertilización in-vitro y transferencia de embriones: primera experiencia nacional / Fertilization in vitro and embryo transfer: first national experience. Rev. obstet. ginecol. Venezuela; 46(2):51-7

Ávila-Portillo L M., Madero J I., López C., León M F., Acosta L., Gómez C., Delgado L G., Gómez C., Lozano J M., Reguero M T. 2006. Fundamentos de criopreservación. Rev Colomb Obstet Ginecol. 57 (4) 291-300

Baldassarre H. 2007. Aplicaciones prácticas de la producción de embriones in vitro en la especie caprina. Rev Bras reprod Anim. 31 (2): 261-267

Cabrera P., Fernández A., Bastidas P., Perozo E., Molina M., Bethencourt A., Vivas I., Reyes Y. y Díaz T. 2008. Efecto de la vitrificación sobre la viabilidad morfológica de embriones murinos (*Mus musculus*). Zootecnia Trop., 26(1): 27-34

Chen D Y., Song X F., Zhao X K., Duan C W., Ye Z Y., He G X., Zhang A J., Feng W H. 1989. Study on in vitro sperm capacitation and egg-penetration of giant panda. Sci China B. Apr; 32 (4): 435-41

Czekala N., Steinman K., McGeehan L., Xuebing L., Gual-Sill F. and Pengyan W. 2000. Steroid Hormone Monitoring as a Tool for the Reproductive Management of the Giant Panda. Panda 2000: Conservation Priorities for the new millennium. Proceedings of an International Conference. Edited by Donald Lindburg and Karen Baragona. San Diego, California. October 15-18

Durrant B., Czekala N., Olson M.A., Anderson A., Amodeo D., Campos M.R., Gual S.F., Ramos G.J. 2002. Papanicolau staining of exfoliated vaginal epithelial cells facilitates the prediction of ovulation in the giant panda. Theriogenology 57 1855-1864.

Durrant B., Olson M.A., Amodeo D., Anderson A., Anderson A., Russ K.D., Campos M.R., Gual S.F., Ramos G.J. 2003. Vaginal Cytology and Vulvar Swelling as indicators of impending Estrus and Ovulation in the Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*). Zoo Biology 22:313-321

Durrant B., Olson M.A., Amodeo D., Anderson A., Czekala N. y Lindburg D. 2000. The use of vaginal cytology to indicate impending estrus and ovulation in the giant panda. en (memorias): Panda 2000 conservation priorities for the new millennium, An international Conference. Octubre 15-18, San Diego, California EUA. The Zoological Society of San Diego.

Fleming SD y Rey RS. 2003. Micromanipulación en la concepción asistida. Cambridge: Cambridge University Press,

Gual S.F. y Pulido R.J. 1997. Resultados preliminares de la inseminación artificial del panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) en el Zoológico de Chapultepec, Ciudad de México. Vet.Méx., 28 (3):261-267

Hafez E. y Hafez B. 2000. Reproducción e Inseminación Artificial en Animales. 7ª Ed. Mc. Graw Hill. México.

Howard J., Zhizhe Z., Desheng L., Yan H., Rong H., Guaghan L., Mei J Z., Zhiyong Jinguo Z., Shiqiang H., Splinder R., Hemin Z. 2006. Male reproductive biology in giant pandas in breeding programs in China. In: Giant Pandas. Biology, Veterinary Medicine and Management. Cambridge University Press. 159-197

Maribet-Lis V., Soves-Alcaina P., Larrea-González L R., Toing-Oltra R J. 2007. Banco de tejidos y células. La experiencia en Valencia, España. Gac Méd Méx 143 (2): 63-75

Matson H., Kapelle W., Malecki I. 2008. The use of a hypo-osmotic swelling (HOS) test on sperm of the pig (*Sus scrofa domesticus*), emu (*Dromaius novaehollandiae*), asian elephant (*Elephas maximus*), hamadryas baboon (*Papio hamadryas hamadryas*), and central rock rat (*Zyzomys pedunculatus*). Reproductive Biology. 9 (2): 181-187

McGeehan L., Li X., Jackintell L., Huang S., Wang A., and Czekala N. 2002. Hormonal and Behavioral Correlates of Estrus in Captive Giant Pandas. Zoo Biology 21:449-466

Mucci N., Aller J F., Kaiser G G., F Hozbor F., Alberio R H. 2006. Producción in vitro de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. Arch. Med. Vet. 38 (2): 97-104

Nowak R. M. 1999. Walker's Mammals of the World. 6th ed. The Johns University Press. USA.

Ogonuki N., Tsuchiya H., Hirose Y., Okada H., Ogura A., Sankai T. 2003. Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). Human Reproduction 18 (16): 1273-1280

Olson M A., Yan H., DeSheng L., Hemin Z. and Durrant B. 2003. Comparison of storage techniques for giant panda sperm. Zoo Biology 22:335-345

Pérez-Garmelo S., Garde J., Pintado B., Borque C., Talavera C., Delclaux M., López M., De la Fuente Martínez J. 2004. Characteristics and in vitro fertilizing ability of giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) frozen-thawed epididymal spermatozoa obtained 4 hours postmortem: A case report. Zoo Biology. 23 (3): 279-285

Platz C.C., Wildt D.E., Howard J.G. y Bush M. 1983. Electroejaculation and semen analysis and freezing in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). J. Reprod. Fertil. 67:9-12

Ramírez-Molina A J., Martínez-Rojero R D., Mejía-Villanueva O. y Soto-Camargo. Modificación de la técnica de inseminación artificial intrauterina mediante laparoscopia en ovejas pelibuey. 2005. Agrocienza, Noviembre-Diciembre, año/vol. 39, número 006: 589-593

Ruiz J. y Correa J. 2007. Desarrollo partenogénico in vitro con ovocitos vitrificados de bovinos. APPA-ALPA-Cusco Peru.

Splinder R E., Huang Y., Howard J G., Wang P., Zhang H., Zhang G. and Wild D E. 2004. Acrosomal integrity and capacitation are not influenced by sperm cryopreservation in the giant panda. Reproduction 127: 547-556

Stabenfeldt G. 1993. The hormones of reproduction. In Reproduction in domesticated animals. King G. Editor. Elsevier Science Publishers. USA. Pp: 70.

Steinman K J., Monfort S L., McGeehan L., Kersey D C., Gual-Sil F., Snyder R J., Wang P., Nakao T., Czekala N. 2006. Endocrinology of the giant panda and application of

hormone technology to species management. In: Giant Pandas. Biology, Veterinary Medicine and Management. Cambridge University Press.198-230

Steirteghem Van CA, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, 1993. Alta fertilización y las tasas de implantación después de la inyección intracitoplasmática de espermatozoides. Hum Reprod. Jul; 8 (7): 1061-6.

Steta J R., Gallo P., Amanza R., Alvarez-Valero R. 2010. Oncofertilidad. Anales Médicos. 55 (1): 33-37

Stornelli M C., Gimenez F., Tittarelli C M., Savignone C A., de la Sota R L., Stornelli M A. 2006. Inducción de ciclos estrales en la perra: Actualización bibliográfica. Analecta Veterinaria; 25 (2): 39-45

Yen S., Haffe R. y Barbier R. 2001. Endocrinología de la Reproducción. 4ª Ed. Médica Panamericana. Madrid. España.

Yin X., Lee H., Choi E., Yu X., Park G., Bae I., Yang C., Oh D., Kim N., Kong I. 2007. *In vitro* Maturation of Oocytes Derived from the Brown Bear (*Ursus arctos*). J. Reprod. Dev. 53 (3): 685-690

Zhang M J., Hou R., Zhang A J., Zhang Z H., He G X., Li G H., Wang J S., Li S C., Song Y F., Fei L S ., Chen H W. 1998. In vitro maturation of follicular oocytes of the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*): A report. Theriogenology. 49 (7): 1251-1255

APÉDICE I. Equipo y Material necesario que se necesita adquirir para la implementación de técnicas de reproducción de alta complejidad.

Equipo de laboratorio

1. Agitador magnético de “mosca”
2. Aguja de Verres
3. Autoclave de rango medio
4. Balanza analítica con pesaje hasta 600 gramos
5. Balanza gramera con pesaje hasta 5 kg
6. Baño María con temperatura regulable hasta 100 °C
7. Bomba de Vacío de 10-4 mbar y pipeta para aspiración de ovocitos
8. Catéter escandinavo de 30 cm/1mm
9. CellTram Aire microinjetor
10. CellTram microinjetor vario
11. Congeladora para laboratorio portátil
12. Cronometro
13. Electroeyaculador con regulador de voltaje y sondas rectales
14. Incubadora con regulador de temperatura, CO2 y nitrógeno
15. Laparoscopia 10 mm, de 0 y 30-45 grados
16. Micropipetas automáticas de 10, 20, 200 y 1000 ul
17. Microscopio estereoscópico portátil
18. Microscopio invertido equipado con Hoffmann® contraste de la modulación o contraste de interferencia diferencial (DIC)
19. Microscopio Óptico portátil
20. Osmometro para laboratorio
21. Pipetas para micromanipulación de ovocitos y/o embriones
22. Potenciometro para laboratorio
23. Set de inseminación intrauterina Shepard; J-IUIE-542009, 5.4 Fr/ 20 cm; Cook OB/GYN®, USA,
24. Tanques de CO2
25. Tanques de Nitrogeno
26. Termómetros de columnas
27. Termómetros para platinas
28. Termoplatina
29. Termoplatina para microscopio
30. TransferMan® micromanipuladores NK2 (dos unidades)
31. Trocar de Hasson

Material de laboratorio

1. Botellas corning
2. Cajas de petri de 3, 5 y 10cm de diámetro desechables
3. Cajas Nunc de 4 pozos
4. Cámara para conteo de glóbulos Neubauer
5. Cristalería:
 - a. Cubreobjetos
 - b. Laminillas portaobjetos
 - c. Matracas Erlenmeyer de 1000 ml, 500 ml, 250 ml, 125ml, 50 ml y 25 ml
 - d. Pipetas Pasteur de cuello largo

- e. Pipetas serológicas de 10 ml, 5 ml, 2 ml y 1 ml.
 - f. Pipetas Volumétricas graduadas de 10 ml y 5 ml
 - g. Probetas de 1000ml, 500 ml y 100ml. de capacidad.
 - h. Vasos de precipitado de 1000 ml, 500 ml, 250 ml, 100ml, 50 ml y 10 ml.
- 6. Equipo de disección
 - 7. Espátulas de acero inoxidable
 - 8. Filtros de hemicelulosa para jeringas
 - 9. Filtros de papel para volúmenes grandes
 - 10. Gradillas
 - 11. Lupas
 - 12. Puntas para pipetas de manipulación de ovocitos y/o embriones
 - 13. TransferTips (ICSI) capilares de inyección
 - 14. Tubos Falcon de polipropileno de 7, 10, 20, 50 ml
 - 15. VacuTips capilares de exploración

Reactivos de laboratorio

- 1. Gradientes de Percoll
- 2. Hormonas comerciales (eCG, hCG, LH, FSH)
- 3. Ionoforo de calcio (CI-A283187)
- 4. Kit ELISA para LH sérico en perro doméstico
- 5. Medio de cultivo celular Hams F10
- 6. Medio de cultivo celular HEPES
- 7. Medio de cultivo celular IVF (Medicult, Denmark).
- 8. Medio de cultivo celular KSOM
- 9. Medio de cultivo celular T199
- 10. Medio para congelación, Test-York Buffer (20% yema de huevo y 12% glicerol)
- 11. Medio para refrigeración-TEST Yolk Buffer (5% glicerol)
- 12. Pure Sperm System (Scandinavian IVF, Gothenburg, Sweden).