



PROGRAMA DE BECAS CIUDAD DE MÉXICO-CHINA 2010

**APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN
ASISTIDA EN EL PANDA GIGANTE (*Ailuropoda
melanoleuca*) DEL ZOOLOGICO DE CHAPULTEPEC**

Saúl Soto Mendoza

saulsom@gmail.com

Ciudad de México, diciembre de 2010

1. Antecedentes y Justificación del Tema

En el año de 1975 el Zoológico de Chapultepec recibió en donación y como símbolo de amistad de la República Popular China, un macho y una hembra de panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*), llamados “Pe Pe” y “Ying Ying”, respectivamente. En el año 1980 se registró por primera vez el nacimiento de un ejemplar de esta especie fuera de China, mismo que recibió el nombre de “Xen Li”, quien únicamente vivió 9 días. Un año más tarde, nació “Tohui”, quien fue la primera cría de panda gigante en alcanzar la edad adulta y reproducirse en el Zoológico de Chapultepec. Después del nacimiento de “Tohui”, el Zoológico de Chapultepec registró el nacimiento de 5 crías adicionales, de las cuales 3 hembras alcanzaron la etapa adulta, “Xiu Hua” (nac. 1985), “Shuan Shuan” (nac. 1987) y “Xin Xin” (nac. 1990, la única cría de “Tohui”).

Para 1998 debido a la necesidad de impulsar la reproducción de la especie, el Zoológico de Chapultepec formalizó un Convenio de Colaboración con la Sociedad Zoológica de San Diego. Como parte de esta colaboración, se inauguró el Laboratorio de Reproducción y Endocrinología “MVZ Juan Tellez Girón”, donde se establecieron varias técnicas de reproducción asistida para esta especie enfocándose al monitoreo hormonal y al empleo de la citología vaginal para la caracterización del ciclo estral y a la inseminación artificial de las pandas; así como el manejo y evaluación de semen, fresco y/o congelado.

Posteriormente, del 2001 al 2005 se formalizó un convenio de colaboración con el Zoológico de Ueno, en Tokio, Japón, cuyo objetivo principal fue el intentar la reproducción de las hembras con un macho de nombre “Ling Ling”, ya fuera por monta natural o inseminación artificial, mediante intercambio de los ejemplares entre ambos zoológicos. No se pudo realizar la reproducción por monta natural pero se obtuvo semen por electroeyaculación. Con ello se incrementó el banco de semen de panda gigante en el Zoológico de Chapultepec.

Aunque durante este período la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre (DGZVS) ha logrado avances importantes en la recopilación y análisis de información reproductiva sobre esta especie, no se ha logrado su reproducción en el Zoológico de Chapultepec desde el año de 1990. Dentro de los principales factores se cuenta: el limitado número de ejemplares, incluyendo la ausencia de un macho reproductor eficiente; la poca disponibilidad y frecuente baja calidad del semen fresco y/o congelado; y deficiencias o falta de alternativas en las técnicas de inseminación artificial implementadas.

Actualmente el programa de manejo y reproducción del panda gigante en la DGZVS se encuentra en una etapa crítica. En el Zoológico de Chapultepec existen 3 hembras de panda gigante: “Xiu Hua”, “Shuan Shuan” y “Xin Xin”, considerándose a las dos primeras en etapa senil ya sin capacidad reproductiva. Por el contrario, la hembra “Xin Xin” (Studbook 360), a pesar de ser una hembra de 20 años, aún es considerada por el Grupo de Especialista en Reproducción del Panda Gigante de China como una de las de mayor valor genético a nivel mundial y con posibilidades de reproducción.

Continuando con los esfuerzos para la conservación de la especie en México, la DGZVS en colaboración con el Centro de Estudios China-México (CECHIMEX) y el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF), ha logrado un acercamiento entre las autoridades de la República Popular China y del Gobierno de la Ciudad de México en el programa de conservación del panda gigante. En los últimos años, 4 médicos veterinarios del Zoológico de Chapultepec han participado en el programa de intercambio académico de dichas instituciones realizando estancias de intercambio académico visitando el Zoológico de Pekín, el Centro de Reproducción e Investigación del Panda Gigante de Chengdu (CRIPG, Provincia de Sichuan) y el Centro de Investigación del Panda Gigante (Base de Bifengxia) de la Reserva de Wolong (CIPGBB, Provincia de Sichuan). Como producto de estas estancias, se han desarrollado manuales técnicos para el manejo perinatal, profiláctico, nutricional, reproductivo, terapéutico y geriátrico de esta especie en el Zoológico de Chapultepec.

Siguiendo esta estrategia, el que suscribe, este año realizó dos estancias durante su programa de intercambio académico; la primera en el Centro de Investigación sobre Panda Gigante del Zoológico de Beijing y, la segunda en el Centro de Reproducción e Investigación del Panda Gigante de Chengdu (CRIPG), con el objeto de adquirir entrenamiento y actualización de conocimientos teóricos y prácticos en la reproducción asistida en esta especie. Con el conocimiento adquirido, se ha desarrollado un manual enfocado a la aplicación de técnicas de reproducción asistida en esta especie tales como: el mejoramiento de la calidad del semen congelado, el desarrollo de terapias de estimulación hormonal para ovulación múltiple, nuevas técnicas de inseminación artificial, la vitrificación de ovocitos / embriones y la fertilización in vitro. (FIV).

Solo con el uso de técnicas reproducción asistida de alta complejidad aumentarán las expectativas de reproducción de la hembra “Xin Xin” y, será factible la conservación de material genético post mortem de las hembras “Xiu Hua” y “Shuan Shuan”. Estas acciones

repercuten directamente a la viabilidad del programa de reproducción de esta especie que ha sido albergada durante 35 años en el Zoológico de Chapultepec y en los esfuerzos mundiales para su conservación.

Cabe mencionar que el conocimiento y entrenamiento adquirido en los Centros de Reproducción e Investigación en Panda Gigante en China pueden ser también de gran utilidad en programas de conservación de otras especies nativas o endémicas mexicanas amenazadas o en peligro de extinción.

2. Objetivos

2.1 General

Implementar tecnologías actualizadas y de alta complejidad de reproducción asistida en el panda gigante para incrementar las posibilidades de reproducción en cautiverio a partir de la temporada reproductiva 2011, en el Zoológico de Chapultepec.

2.2 Específicos

Inducción del celo y determinación/caracterización del estro y ovulación de 0.3 pandas gigantes a partir de la estimulación ovárica mediante un calendario de estimulación hormonal usando FSH y LH.

Incrementar la calidad y viabilidad del semen congelado del panda gigante existente en el banco de germoplasma de la DGZVS, mediante técnicas de desafío espermático.

Inseminación intrauterina por laparoscopia a la hembra "Xin Xin" con semen mejorado del Banco de Germoplasma de la DGZVS.

Recuperación de ovocitos de 0.2 panda gigante "Xiu Hua" y "Shuan Shuan" por medio de aspiración por laparoscopia.

Desarrollar las técnicas para la criopreservación de germoplasma a partir de biopsia/postmortem (tejido ovárico, ovocitos y embriones) de las pandas gigantes "Xiu Hua" y "Shuan Shuan" en el Zoológico de Chapultepec.

3. Metodología.

Para implementar la presente propuesta el Gobierno del Distrito Federal (GDF) por medio de la Secretaría de Medio Ambiente (SMA) y la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre, deberá coadyuvar, coordinar y supervisar las acciones a través de la Dirección Técnica y de Investigación, el Laboratorio de Reproducción y Endocrinología “MVZ Juan Téllez Girón”, la Dirección del Zoológico de Chapultepec y el Médico responsable del Bioma de Bosque Templado para la implementación de las técnicas descritas en el Manual de Reproducción Asistida de Panda Gigante.

De acuerdo a la información bibliográfica y a la información obtenida en el Centro de Investigación en Panda Gigante del Zoológico de Pekin y la Base de Investigación y Reproducción del Panda Gigante en Chengdu, se desprende la siguiente estrategia para aumentar las expectativas de reproducción del panda gigante en el Zoológico de Chapultepec.

0.1 Panda Gigante “Xin Xin”

Se realizará el monitoreo hormonal estrogénico y progestágeno del ciclo estral durante la estación sexual (febrero a abril) de 0.1 panda gigante “Xin Xin” de 20 años de edad. Si el pico estrogénico es adecuado ($<200\text{ng/mg Cr}$) y presenta conducta reproductiva intensa se aplicará hCG (Gonadotropina Coriónica Humana) de forma parenteral para provocar la ovulación en la fecha del pico estrogénico (día 0). Posteriormente se inseminará artificialmente, en el día 1 o 2, dependiendo de la llegada de los estrógenos a valores basales ($>20\text{ ng/mgCr}$), y si el nivel de estrógenos no es mayor a 100 ng/mg Cr se aplicará eCG (Gonadotropina Sérica Equina) de forma parenteral días consecutivos hasta observar un aumento en los estrógenos urinarios mayor a 200 ng/mg Cr , posteriormente se aplicará una dosis de LH para provocar la ovulación (día 0), inseminándose antes de 36 horas.

La Inseminación Artificial se realizará de forma intrauterina por laparoscopia con espermatozoides seleccionados de muestras de semen congelado del Banco de Germoplasma de la DGZVS. La selección consiste en que después de descongelarse los espermatozoides se colocan en medio de cultivo celular a base de HEPES a 37°C para mejorar la movilidad, la viabilidad y las propiedades de la membrana celular, una vez

realizado esto se realizan pruebas de desafío como “Swim up”, Gradientes de Percoll y reacción acrosomal.

Una vez realizada la IA intrauterina por laparoscopia se comenzará con el monitoreo hormonal progestágeno en orina durante los meses de mayo a julio para determinar una posible gestación.

0.2 Panda Gigante “Xiu Hua” y “Shuan Shuan”

Adicionalmente se someterán a 0.2 panda gigante “Shuan Shuan” y “Xiu Hua” a un esquema de estimulación ovárica artificial. Se administrará de forma parenteral por 5 días (día -5) eCG (Gonadotropina Sérica Equina) y eCG + hCG en el día 0 para provocar crecimiento folicular y una ovulación múltiple. Posteriormente se realizará (día 0) la aspiración de ovocitos por medio de cirugía laparoscópica (AOL) de los ovarios.

La mitad del número de ovocitos recuperados clasificados como normales (medianamente pigmentados –oscuros- y completamente o parcialmente rodeados por células del cúmulus o con una delgada corona radiata) se vitrificarán (congelarán) inmediatamente bajo los estándares de calidad de vitrificación para ovocitos humanos.

El resto de ovocitos recuperados se madurarán en medio de cultivo celular durante 4 a 5 horas y se fertilizarán *In Vitro* usando espermatozoides seleccionados del banco de germoplasma de la DGZVS a una relación 7500:1, los embriones obtenidos se madurarán de 2 a 5 días hasta la etapa de blastocitos por medio de cultivo celular y se vitrificarán también bajo los estándares de calidad de vitrificación para embriones humanos.

Se propone además el uso de forma experimental de un kit de ELISA de tipo comercial para la cuantificación de Hormona Luteinizante (LH) en orina para precisar el momento de ovulación ya que esto es fundamental para acercarse al éxito de la inseminación artificial.

Cabe señalar que todos los procedimientos y técnicas de reproducción asistida de alta complejidad propuestas para las pandas gigantes albergadas en el Zoológico de Chapultepec serán evaluados y aprobadas por el equipo médico de especialistas antes de su implementación para asegurar la salud y la integridad de los ejemplares.

Por otro lado, se necesita que el GDF proporcione presupuesto para la adquisición de equipo, materiales y reactivos de laboratorio para realizar las técnicas de alta

complejidad y conservación de germoplasma que se proponen. Se tiene contemplado habilitar una sala de “Biología Molecular” dentro del Laboratorio de Genómica de la DGZVS, para contar con un espacio físico adecuado ya que el Laboratorio de Reproducción no cuenta con el mismo.

4. Resultados Esperados.

Con la implementación de las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad en la panda gigante “Xin Xin”, aumentarán las expectativas de su reproducción y la viabilidad del programa de manejo y reproducción de esta especie en el Zoológico de Chapultepec; así como la posibilidad de contar con una cría que potencialmente sea un aporte de genes nuevos a la población de pandas nuestro país y el mundo.

Con la vitrificación de ovocitos y/o fertilización in vitro para la producción de embriones y su conservación en el Banco de Germoplasma de la DGZVS se contará de una fuente valiosa de material genético que se podrá usar en un futuro para aumentar la variabilidad genética de la especie.

El Área de Reproducción Asistida-Banco de Germoplasma del Laboratorio de Reproducción “MVZ Juan Téllez Girón” se beneficiará y adquirirá el potencial para desarrollar técnicas versátiles de reproducción asistida de alta complejidad para usarse en especies silvestres en peligro de extinción exóticas o nativas de México, colaborando así en programas nacionales e internacionales de conservación de especies silvestres en riesgo tales como el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*), el berrendo (*Antilocapra americana*), el jaguar (*Panthera onca*), el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*), entre otras.

5. Experiencia Profesional en el Tema.

El becario es Médico Veterinario Zootecnista, cuenta con maestría en Ciencias de la Salud y la Producción Animal, con enfoque en Reproducción en Fauna Silvestre, otorgada por la Universidad Nacional Autónoma de México en 2006. Desde el año 2005, pertenece a la Dirección Técnica y de Investigación como Jefe del Laboratorio de Reproducción “MVZ. Juan Téllez Girón” de la Dirección General de Zoológicos y Vida

Silvestre. Ha realizado el monitoreo hormonal reproductivo de especies prioritarias como el Panda gigante desde su ingreso a la institución. Además ha participado en las inseminaciones artificiales de las pandas gigantes, realizadas mediante contención química, evaluando y preparando la muestra seminal.

6. Cronograma para realizar el proyecto

ACTIVIDADES	2010	2011								2012-2015
	PERIODO DICIEMBRE	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO DICIEMBRE	
Presentación de la propuesta a la DGZVS, Ciudad de México. Zoológico de Chapultepec.										
Discusión y análisis de la propuesta con el equipo de especialistas de la DGZVS.										
Contacto con instituciones especializadas en reproducción asistida para trabajar en colaboración										
Montaje y estandarización de técnicas de alta complejidad en el Laboratorio de Reproducción.										
Aplicación de técnicas de reproducción asistidas a 0.1 panda gigante "Xin Xin".										
Aplicación de técnicas de reproducción asistidas a 0.2 panda gigante "Xiu Hua" y "Shuan Shuan"										
Desarrollo de trabajos de investigación a nivel molecular con células reproductivas.										
Consolidación del Laboratorio de Reproducción como Centro de Investigación para la conservación de especies en riesgo o en peligro de extinción.										

7. Presupuesto e instituciones vinculadas

Aunque se necesita que el presupuesto para la realización de la propuesta sea cubierto por el GDF a través de la Secretaría de Medio Ambiente, la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre y el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal, se buscará la colaboración con instituciones especializadas como el Departamento de

Reproducción Animal FMVZ, UNAM y el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI, México) para realizar el proyecto buscando la optimización de recursos.

RECURSOS REQUERIDOS	
DESCRIPCIÓN	MONTO
Equipo para laboratorio	\$1,000,000.00
Material para laboratorio	\$500,000.00
Reactivos para laboratorio	\$400,000.00
Asistencia técnica	\$100,000.00
Total	\$2,000,000.00

8. Contactos en China y en México.

Nombre	Institución y puesto	Datos (teléfono, correo electrónico, dirección)	Indicar si es un contacto real o potencial y si ya se estableció el contacto
En China			
Chengdong, Wang	Vice Director y Director Asociado del Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding	Panda Road 26, Suburbio Norte, 610081, Chengdu, Sichuan, R.P. China Tel: 862883516242, Fax: 862883505513, Mobile: 15881212185, Email: wcdsyy@yahoo.com.cn	Real. Ya se estableció contacto.
Jinguo, Zhang	Vice Director del Zoológico de Pekín	Calle Xi Zhi Men Wai No. 137, Distrito Xicheng, Pekín, P.R. China, PC. 100044, Tel: 68314411-204, Fax:68321960, Email: zhangjinguo001@yeah.net	Real. Ya se estableció contacto.
Rong, Huo	Directora del Centro de Reproducción. CRIPG de Chengdu.	Panda Road 26, Suburbio Norte, 610081, Chengdu, Sichuan, R.P. China Tel.- 86-28-83507661 Fax.- 86-28-83505513 Email. Hourong2000@yahoo.com , hourong2000@tom.com	Real. Ya se estableció contacto.
Xuefeng, Liu	Jefe de Reproducción de Panda Gigante del Zoológico de Pekín.	Calle Xi Zhi Men Wai No. 137, Distrito Xicheng, Pekín, P.R. China, PC. 100044, Tel: 68390286, Fax:68321959, Email: lx9722@yahoo.com.cn	Real. Ya se estableció contacto.
Yuliang, Liu	Investigador. Centro de reproducción e Investigación en Panda Gigante Chengdu	Panda Road 26, Suburbio Norte, 610081, Chengdu, Sichuan, R.P. China Tel: 13568876372 fax: 862883505513 sdliuyuliang@163.com	Real. Ya se estableció contacto.

Zhenxin, Peng	Jefe de Veterinarios. Curador del Zoológico de Pekín.	Calle Xi Zhi Men Wai No. 137, Distrito Xicheng, Pekín, P.R. China, PC. 100044, Tel: 68390286, Fax:68321959, Email: zhenxinpeng@yahoo.com	Real. Ya se estableció contacto.
En México			
Bernal Stoopan. José	Director de la Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre	Calle Chivatito s/n 1a. secc. Bosque de Chapultepec. Tel: 5553-6263, ext. 2001, Email: josebernalstoopan@yahoo.com	Real. Ya se estableció contacto.
Campos Morales, Rogelio	Colaborador de la Dirección de Bioética, Educación y Conservación	Calle Chivatito s/n 1a. secc. Bosque de Chapultepec. Tel: 5553-6263 fax ext. 2005, alouattaspp@hotmail.com	Real. Ya se estableció contacto.
Ojeda Chávez, Javier	Médico Responsable del Bioma Bosque Tropical Zoológico de Chapultepec	Calle Chivatito s/n 1a. secc. Bosque de Chapultepec 5553-6263, fax ext. 2005, jav_ojeda@hotmail.com	Real. Ya se estableció contacto.
Sánchez Trocino, Mariano	Coordinador de Vigilancia Nutricional Dirección General de Zoológicos y Vida Silvestre	Calle Chivatito s/n 1a. secc. Bosque de Chapultepec 5553-6263, fax ext. 2005 marianotrocino@gmail.com	Real. Ya se estableció contacto.
Servín Zamora Erika	Encargada del Bioma de Bosque Templado Zoológico de Chapultepec	Calle Chivatito s/n 1a. secc. Bosque de Chapultepec 5553-6263, fax ext. 2005 eservinz@hotmail.com	Real. Ya se estableció contacto.

9. Limitaciones y fortalezas actuales del proyecto en la Ciudad de México

La propuesta está respaldada en su totalidad por la DGZVS-GDF y forma parte importante del “Plan Estratégico de Conservación del Panda Gigante 2010–2011”.

Otra fortaleza es la factibilidad de su implementación ya que se cuenta con bases suficientes como experiencia y capacidad profesional, infraestructura parcial y la colaboración con instituciones científicas para realizar investigación de alto nivel. Se cuenta con contactos de especialistas en México y China, para recibir asesoría y el apoyo de instituciones especializadas en reproducción asistida en México.

Debido a la versatilidad de las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad contenidas en el manual existe tienen el potencial de ser aplicadas en otras especies prioritarias de la DGZVS o que se encuentren consideradas en grave peligro de extinción donde la limitante sea la baja tasa de fertilidad.

La limitación más importante es que no se cuenta aún con el todo el equipo requerido en el Laboratorio de Reproducción para realizar las técnicas de reproducción asistida de alta complejidad, es necesario redoblar esfuerzos para su adquisición lo antes posible para trabajar ya en la temporada reproductiva del año 2011.

10. Temas de interés de China en México.

Las contrapartes chinas en el CRIPG en Chengdu han manifestado interés en realizar investigación de alto nivel en colaboración, sobre temas selectos de reproducción del Panda gigante y en el zoológico de Beijing además del panda gigante en otras especies que sean comunes en ambos zoológicos como Panda rojo (*Ailurus fulgens*), Pingüino de Humboldt (*Spheniscus humboldti*) y Elefante asiático (*Elephas maximus*).