

Resultados preliminares de la inseminación artificial del panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) en el Zoológico de Chapultepec, de la ciudad de México

Fernando Gual Sill*
José Pulido Reyes*

Abstract

The giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) is a highly endangered wild carnivore which inhabits China. It was naturally bred for the first time at the Chapultepec Zoo in Mexico City. Eight offspring were born out of 6 parturitions, and four are still alive. Since 1990, 10 artificial inseminations (A.I.) have been performed in 2 females. Techniques used to electroejaculate, conserve and freeze the semen, as well as the one for artificial insemination are described here. Due to the peculiar features of the female's reproductive tract in giant pandas, A.I. has to be performed by means of a speculum or vaginoscope and urethral catheters. The urethra and the vagina have to be differentiated inside the vestibule which is located right next to the vulva. Usually fresh or frozen/thawed semen is deposited in the vagina, and an endoscope has to be used to reach the uterus trans-cervically. Up to now, none of the females have got pregnant by means of A.I. Observation of the species behaviour and some other external signs like anorexia and vulvar color and swelling have been the only way in which the reproductive cycle has been followed. Considering this study, it is now known that A.I. is difficult to be performed in giant pandas, partly, because of the reproductive tract particular features, and because there is a need to perform a technique to determine the exact time of ovulation. One possibility would be to relate steroid hormone levels in feces and urine, together with ethological observations.

Key words: GIANT PANDA (*AILUROPODA MELANOLEUCA*), ARTIFICIAL INSEMINATION.

Resumen

El panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) es un carnívoro silvestre que habita en China y que se encuentra en grave peligro de extinción. Esta especie se reprodujo naturalmente por primera vez fuera de ese país en el Zoológico de Chapultepec de la ciudad de México y hasta el momento han nacido 8 crías en un total de 6 partos, de éstas sobreviven 4 ejemplares. A partir de 1990, se han realizado 10 inseminaciones artificiales en 2 hembras. En este trabajo se exponen las técnicas de electroeyaculación, conservación de semen fresco y congelamiento del mismo e inseminación artificial a través de la vagina en el panda gigante. La inseminación se lleva a cabo utilizando un espéculo o un vaginoscopio y catéteres uretrales. Se debe diferenciar la uretra de la entrada de la vagina en el interior de un vestíbulo que se encuentra próximo a la vulva; generalmente el semen fresco o descongelado se deposita intravaginalmente y solamente por medio de la ayuda de un endoscopio se ha logrado depositar el semen dentro del útero vía transcervical. Hasta este momento, ninguna de las hembras ha quedado gestante utilizando la inseminación artificial. El seguimiento del ciclo reproductivo se ha llevado a cabo mediante la observación del comportamiento de los ejemplares y de algunos otros signos externos tales como la disminución del apetito (anorexia) y el color e hinchazón de la vulva. Con base en el desarrollo de este estudio de la inseminación artificial en pandas gigantes, se concluye que existe cierta dificultad para realizar dicha técnica, en especial debido a las particularidades anatómicas del aparato reproductivo y a la necesidad de instrumentar una técnica de seguimiento eficaz del ciclo reproductivo en las hembras a fin de conocer el momento exacto de la ovulación y asegurar el éxito de la

Recibido el 21 de febrero de 1996 y aceptado el 28 de octubre de 1996.

* Zoológico de Chapultepec, Avenida Chivatito s/n Primera Sección del Bosque de Chapultepec, 11850, México, D.F.

inseminación artificial. Una de las técnicas que podría llevarse a cabo para tal efecto, es el análisis de los niveles de hormonas esteroides en orina y excremento, para correlacionarlo con las observaciones etológicas que se llevan a cabo.

Palabras clave: PANDA GIGANTE (*Ailuropoda melanoleuca*), INSEMINACIÓN ARTIFICIAL.

El panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) es un carnívoro que antiguamente habitaba la mayoría de los bosques de bambú en el sudeste de China; actualmente la población, en condiciones naturales en su hábitat, está estimada en alrededor de 1000 ejemplares, habitando en 6 reservas montañosas ubicadas en las provincias de Gansu, Shaanxi y Szechuan. Aproximadamente 120 ejemplares son mantenidos en cautiverio en diferentes instituciones zoológicas de todo el mundo, incluida China.⁵ Se le considera como una especie que se encuentra en grave peligro de extinción.

El panda gigante es una especie monoéstrica estacional, aunque en ocasiones se observan dos estros en primavera e inclusive signos de celo poco aparentes en otoño. La gestación que se ha dado en cautiverio va de los 90 a los 168 días (periodo observado en el Zoológico de Chapultepec de la ciudad de México),^{5,6} y se sabe que presentan implantación retardada.² La reproducción del panda gigante en cautiverio se ha logrado tanto naturalmente como a través de la inseminación artificial.^{7,9}

El 10 de septiembre de 1975 el gobierno de China donó al Zoológico de Chapultepec una pareja de pandas gigantes, formada por el macho de nombre "Pe-Pe" (número de inventario mundial 167)¹⁰ y por la hembra "Ying-Ying" (número de inventario mundial 165).¹⁰ A partir del 10 de agosto de 1980, día en que nació la primera cría de esta especie en el Zoológico de Chapultepec, se han obtenido 8 crías (incluyendo dos partos gemelares), de un total de 6 partos. De estas 8 crías, sobreviven 3 hembras y un macho.

La técnica de inseminación artificial, así como otros métodos de reproducción asistida, ha demostrado ser una opción viable para la conservación de muchas de las especies en peligro de extinción, como la de los pandas gigantes. Se han notificado inseminaciones artificiales exitosas en algunos zoológicos fuera de China, incluyendo al Zoológico de Ueno, en Tokio, Japón, en donde se utilizó semen fresco obtenido mediante electroeyaculación, el cual fue depositado en el canal cervical al fondo de la vagina a través de una pipeta⁷ y en el Zoológico Casa de Campo, en Madrid, España, en donde se utilizó semen fresco y semen previamente descongelado, depositado también en el canal cervical al fondo de la vagina por medio de un catéter de acero inoxidable calibre 19.⁹ En ambos casos, el estro en las hembras se detectó mediante la observación de cambios conductuales en la hembra y se confirmó mediante el análisis de los niveles de hormonas (estrógenos) en la orina.^{7,9}

En 1990 comenzó una nueva etapa en el manejo de la reproducción del panda gigante en cautiverio en el Zooló-

gico de Chapultepec. Hasta ese momento, la reproducción de esta especie había sido limitada exclusivamente a condiciones naturales sin introducir ninguna técnica artificial. El 21 de abril de 1990 se llevó a cabo la primera inseminación artificial del panda gigante en México con la colaboración del personal de la Zoological Society of London. Después de esta ocasión, se continuó utilizando la inseminación artificial en esta especie en 1991, 1992, 1994 y 1995. Generalmente las inseminaciones artificiales se han llevado a cabo en la época de primavera de cada año.

Cabe mencionar que la anatomía de los órganos reproductores de las hembras de panda gigante presenta algunas diferencias respecto de otros carnívoros. Existe un "vestíbulo" inmediatamente después de la vulva de las hembras. En el fondo de dicho vestíbulo se encuentra una estructura que se llama 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.⁶

La inseminación artificial de esta especie es indispensable en el Zoológico de Chapultepec para evitar la consanguinidad y todas sus graves consecuencias, ya que en la actualidad sólo se cuenta con ejemplares emparentados entre sí. En el presente trabajo se exponen la técnica de electroeyaculación, conservación de semen fresco y congelamiento del mismo, las opciones que se tienen actualmente en cuanto a la técnica de inseminación artificial en el panda gigante y la relación del momento de inseminación con el comportamiento de las hembras durante el estro.

Animales

La electroeyaculación para obtención de semen se ha llevado a cabo en 2 ejemplares machos, el primero de nombre "Chia-Chia" (número de inventario mundial 141)¹⁰ a los 19 años y el segundo, de nombre "Liang-Liang" (número de inventario mundial 256)¹⁰ a los 7 años con 9 meses.

Dos hembras diferentes han sido inseminadas artificialmente: la primera de nombre "Xiu-Hua" (número de inventario mundial 291),¹⁰ nacida el 25 de junio de 1983, ha sido inseminada en 3 ocasiones, mientras que la segunda, de nombre "Shuan-Shuan" (número de inventario mundial 332),¹⁰ nacida el 15 de junio de 1987, ha sido inseminada en 7 ocasiones.

Por la noche y gran parte del día, los ejemplares se encuentran albergados individualmente en cuartos cono-

cidos como "casas de noche". Diariamente entre las 8:00 y las 10:00 horas y entre las 15:00 y las 16:00 horas, los ejemplares salen a través de un pasillo común a un exhibidor al aire libre en donde nuevamente se albergan individualmente, excepto cuando se lleva a cabo el acoplamiento de un macho y una hembra. Los horarios exactos dependen de las condiciones climáticas del día en cuestión. Su alimentación consiste en 32% de una mezcla de frutas y verduras (manzana, zanahoria, nopales), 56% de bambú, 8% de arroz, 3% de carne de res y de pollo, y 1% de concentrado comercial para cánidos domésticos.

Es importante mencionar que en algunas de las inseminaciones artificiales, descritas a continuación, se ha utilizado semen congelado obtenido a partir del macho "Hsing-Hsing" (número de inventario mundial 121), nacido en agosto de 1971 y que habita en el Zoológico Nacional, ubicado en Washington, D.C., Estados Unidos de América (10).

Manejo

Anestesia

La anestesia de todos los ejemplares se llevó a cabo en una jaula de compresión, utilizando una combinación de clorhidrato de ketamina e hidrocloreto de xilacina por vía intramuscular. Las dosis promedio utilizadas fueron de 5 mg/kg de ketamina y 0.5 mg/kg de xilacina. Las dosis de ketamina pueden incrementarse hasta 6.6 mg/kg y la de xilacina hasta 0.66 mg/kg. Generalmente las dosis más altas han sido utilizadas en machos al momento de la electroeyaculación. Para mantener la anestesia por un tiempo más prolongado se ha utilizado halotano inhalado en concentraciones de 2% a 3%, o bolos endovenosos de ketamina a dosis de 0.5 a 1 mg/kg. En ocasiones se utiliza el antagonista alfa dos adrenérgico hidrocloreto de yohimbina a dosis de 0.15 a 0.2 mg/kg, para revertir los efectos de la xilacina. Cada vez que se anestesiaba un ejemplar, se canalizaba una vena para mantenerla permeable durante todo el procedimiento; además se obtenían muestras de sangre y suero sanguíneo, como parte del examen clínico que se realizaba, incluyendo el registro de las constantes fisiológicas.

Técnicas de colección y conservación de semen

Para la electroeyaculación de los machos de panda gigante se utilizó un aparato de electroeyaculación de ganado bovino modificado. El electroeyaculador o sonda tiene forma de pirámide cilíndrica, confeccionada especialmente para pandas, mide 47 cm de largo por 5 cm de diámetro. En un extremo tiene cuatro electrodos de cobre aplanados rodeando el cilindro y conectados en paralelo. Estos se encuentran cubiertos parcialmente con cinta de aislar para dejar únicamente libre la mitad del perímetro que describen al rodear el cilindro, de tal

manera que la corriente eléctrica se dirige al piso de la pelvis únicamente, una vez que se ha insertado el electroeyaculador en el recto.

Ya anestesiado, al macho número 141 se le realizó un examen físico. Se aplicaron de 2 a 3 volts mediante el electroeyaculador durante 3 o 4 segundos, hasta que se logró la erección del pene; en ese momento se aumentó el voltaje (3 o 4 volts) y se continuó estimulando hasta que se produjo la eyaculación. Se obtuvieron 2 ml de semen aproximadamente, de los cuales se diluyeron en un medio de conservación de espermatozoides llamado "BWW"* que es un medio Tyrodes modificado,^{6,9} dicho semen se utilizaría en ese momento.

El macho número 256 fue colocado sobre el piso en recumbencia lateral y se le introdujo el electroeyaculador por el recto con los electrodos dirigidos hacia el piso de la pelvis. Se comenzó con un bajo voltaje (2 a 3 voltios) de 2 a 3 segundos para permitir la erección del pene. En seguida se aumentó el voltaje a 3 o 4 voltios y se continuó estimulando; a menos de 3 minutos de haber iniciado el procedimiento, el macho eyaculó en varias ocasiones (5 veces).

Técnicas de congelación de semen

En el laboratorio se diluyó el semen obtenido del macho número 256 en "BWW" y yema de huevo (para evitar las lesiones del choque por frío y proporcionar nutrición a los espermatozoides) a una concentración de 800,000,000 de espermatozoides por mililitro para posteriormente congelarlo. Se llenaron 23 pajillas con 0.5 ml cada una conteniendo aproximadamente 400,000,000 de espermatozoides. Es posible inseminar a una hembra con solamente 100,000,000 de espermatozoides.** Una vez que las pajillas adquirieron la temperatura ambiente, se introdujeron durante aproximadamente 90 minutos en agua dentro del refrigerador hasta bajar su temperatura a 5 °C; posteriormente se dejaron 10 minutos sobre el vapor de nitrógeno líquido para después introducir las en éste súbitamente para que se congelaran; se colocaron las pajillas en las canastillas del tanque de nitrógeno líquido para mantenerlas congeladas durante todo el tiempo que sea necesario antes de poder ser utilizadas en un futuro.

En caso del semen congelado obtenido a partir del macho número 121, aquél fue diluido y congelado utilizando medio PDV (lactosa 11%, yema de huevo 20% y glicerol 4.7%) o con medio TES/TRIS (Tes, 4.83%; Tris, 1.15 %; glucosa, 0.4%; estreptomycin, 0.1%; yema de huevo, 20%; y glicerol, 8%).*** Al momento de realizar las inseminaciones, no se utilizaron en la misma ocasión

* Comunicación personal, Dr. Bill Holt. Zoological Society of London, 1991.

** Comunicación personal, Dr. Bill Holt. Zoological Society of London, 1991.

*** Comunicación personal, Dra. JoGayle Howard. National Zoological Park, 1995.

pajillas diluidas con diferente medio para evitar alteraciones en la viabilidad del semen.

Cabe mencionar que generalmente se evalúa la calidad del semen congelado al momento de descongelarlo, previo a las inseminaciones artificiales, ya que el evaluarlo rutinariamente constituiría un desperdicio del mismo.

Técnica de inseminación artificial

Para llevar a cabo la inseminación artificial, fue necesario la detección del estro en las hembras.

Éste se detectó mediante la observación del comportamiento y otros signos en la hembra y en el macho durante la época reproductiva. En la hembra se observaron signos tales como el color e hinchazón de la vulva, disminución del apetito, vocalización (tipo y frecuencia), aumento de la actividad y marcaje con la región anogenital, aceptación del macho por parte de las hembras, lordosis o arqueamiento del dorso del cuerpo, y estimulación manual del área ano-genital ("masturbación") principalmente. En el macho se observó un mayor interés hacia la hembra, aumento en el tamaño de los testículos y el epidídimo, disminución del apetito, aumento en la frecuencia de las vocalizaciones, en la actividad y en la frecuencia de marcaje con la región ano-genital. Hipotéticamente el periodo de estro en las hembras de esta especie dura alrededor de 11 días y la ovulación ocurre al final del mismo.⁶ Se procuró llevar a cabo la inseminación artificial entre los días 8 y 11 de dicha etapa. En aquellas hembras en las que no se observaron signos de estro posteriores a la primera inseminación, no se intentó el procedimiento en una segunda ocasión durante la misma temporada, ya que las posibilidades de gestación serían casi nulas.

Para llevar a cabo las inseminaciones artificiales en el Zoológico de Chapultepec, se instrumentaron las técnicas descritas por el Zoológico de Ueno, en Tokio, Japón,⁷ y por el Zoológico Casa de Campo, en Madrid, España;⁸ la técnica utilizada se describe a continuación: se coloca a la hembra en posición decúbito dorsal y si es posible se inclina la mesa de manera que la cabeza quede ligeramente más abajo que la cola del ejemplar. El área perineal se limpia perfectamente utilizando agua y cualquier desinfectante suave. El tamaño de la vulva puede variar, pero generalmente los espéculos vaginales utilizados en el ser humano o vaginoscopios son adecuados para poder separar los labios vulvares y poder examinar el vestíbulo; también se puede utilizar un vaginoscopio de acrílico transparente de 2 cm de diámetro con su propia fuente de luz. Es necesario contar con una fuente de luz intensa, puede ser la fuente de luz de un endoscopio o una lámpara de halógeno.

*Comunicación personal, Dra. JoGayle Howard. National Zoological Park, 1995.

**Rocket G.I.F.T. Catheter Cat. No. R57.537, Rocket of London, Watford.

Una vez que se ha localizado el falso cérvix, se sondan la uretra y la vagina. Generalmente se prefiere sondear ambas estructuras y diferenciarlas antes de introducir el semen. Para este procedimiento se pueden utilizar ya sea catéteres de acero inoxidable calibre 19G de 300 mm con punta redondeada, o bien catéteres uretrales para perro calibre 8 fg. En este momento, se puede saber cuál de las dos sondas se encuentra en la vagina y cuál en la uretra, mediante la obtención de una muestra de orina. Otra forma de distinguir la vagina de la uretra es la presencia de los pliegues transversales en vagina, que son aparentes al momento de introducir el catéter. La sonda uretral que se introduce en la vagina penetra alrededor de 20 centímetros dentro del vestíbulo, lo que significa que alrededor de 10 cm se encuentran dentro de la vagina.

En caso de no contar con semen fresco, se utiliza semen previamente descongelado a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos, para poder ser depositado en ese momento en la vagina de la hembra. Se deberá observar en el microscopio una pequeña muestra del semen en ese momento y evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles y la morfología de éstos. Solamente se utiliza semen fresco en las ocasiones en las que se cuenta con un macho no emparentado con la hembra, al cual es factible anestesiarse para llevar a cabo la electroeyaculación exactamente en el momento en que la hembra se encuentra en celo; de no ser así, es necesario utilizar semen congelado. Para la congelación del semen que se ha utilizado en las inseminaciones artificiales practicadas, se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito dentro de la técnica de electroeyaculación, conservación y congelación de semen. Dependiendo del lote de semen utilizado, la concentración por cada pajilla de 0.5 ml oscila entre 48,000,000 hasta 69,000,000 de espermatozoides.* Cada inseminación se realizó con un mínimo de 100,000,000 de espermatozoides.

Para depositar el semen, se puede utilizar un catéter para recuperación de embriones (GIFT),** el cual se inserta en la luz de la sonda uretral 8 fg que se encuentra en la vagina, y se inserta calculando aproximadamente 2 cm más que la distancia a la cual se insertó la sonda uretral, para poder depositar el semen lo más cercano al cérvix. Generalmente las inseminaciones artificiales se llevan a cabo vía intravaginal, aunque en algunas ocasiones, con la ayuda de un endoscopio rígido, se ha logrado introducir el semen a través del cérvix y depositarlo directamente en el útero. Se utiliza cierta cantidad de solución salina fisiológica para distender ligeramente la vagina y poder pasar el endoscopio a través de ésta.

Una vez depositado el semen, la hembra se mantiene en la misma posición por algunos minutos o bien se inclina la mesa ligeramente más hacia la cabeza del ejemplar. Se puede estimular la zona del vestíbulo con el mismo espéculo o el vaginoscopio que se utilizó durante todo el procedimiento, para simular el estímulo del coito natural. Cuando la hembra se encontraba a la mitad del periodo del estro, se aplicaba una dosis de gonadotropina

coriónica humana (2,500 UI), ya que algunos estudios sugieren que esta especie puede ovular mediante el estímulo de hormonas gonadotrópicas exógenas.²

La primera inseminación artificial de un panda gigante en el Zoológico de Chapultepec se llevó a cabo en la hembra número 291, a la que se inseminó artificialmente el 21 de abril de 1990, a la edad de 4 años con 10 meses. Durante la inseminación se utilizó semen fresco del macho número 141.

Esta misma hembra fue inseminada artificialmente mediante un vaginoscopio, el 25 de marzo de 1994, utilizando semen congelado del macho número 121, se observó poca motilidad progresiva de los espermatozoides (del 30% al 40%). Se utilizaron sondas uretrales para perro calibre 8 fg y catéteres de recuperación de embriones (GIFT). La hembra presentaba signos de celo poco aparentes.

La hembra número 291 fue inseminada nuevamente el 28 de marzo de 1995 utilizando semen descongelado del macho número 121, con una motilidad progresiva del 70% a 80%. El semen se depositó vía intravaginal utilizando un vaginoscopio; un día después ya no aceptó al macho número 256 con el que se encontraba en acoplamiento. El propósito del acoplamiento con el macho mencionado fue el de estimular el comportamiento natural de la hembra durante el estro, ya que dicho macho nunca ha logrado copular con ninguna hembra. A los 56 días de gestación (23 de mayo de 1995) parecía hacer nido en su cuarto, lo cual se ha relacionado con pseudogestaciones en pandas gigantes.

La hembra número 332 entró en celo por primera vez a la edad de 3 años con 9 meses (19 de marzo de 1991). Se llevó a cabo la inseminación artificial con semen fresco del macho número 141, el 21 de marzo de 1991 por vía intravaginal. Se colocó a la hembra en posición decúbito dorsal, inclinándose un poco la mesa de cirugía para colocar los miembros posteriores en un nivel más alto que el resto del cuerpo y así facilitar la inseminación. Se colocó un vaginoscopio cilíndrico rígido, previamente lubricado, a través de la vulva para observar vagina, uretra y cérvix; se observó que existía cierta cantidad de moco muy fluido y transparente, signo de que la hembra se encontraba en estro. Se canalizó primero la uretra para evitar depositar ahí el semen y después se canalizó la vagina y se depositó el semen fresco diluido en medio de conservación "BWW". Apparently el semen penetró a través del cérvix, aunque debido a que solamente se utilizó el endoscopio como fuente de luz, esto no pudo ser comprobado. Dos días más tarde, se llevó a cabo una segunda inseminación de esta misma hembra, utilizando semen congelado del macho número 141. Se colocó sobre la mesa de cirugía en la posición descrita anteriormente; la vulva se mostró más blanca y menos congestionada que dos días antes y se observó la vagina, cérvix y uretra a través del endoscopio; la mucosa del falso-cérvix se encontraba más congestionada que el día 21 de marzo y había mayor cantidad de moco, aunque más espeso, lo que significa que el periodo de estro de la hembra se

acercaba a su fin. En esta ocasión, se decidió utilizar semen del macho número 141, que había sido almacenado en el tanque de nitrógeno líquido, ya que el semen fresco que se había obtenido el día 21 de marzo y se había conservado a temperatura ambiente en el medio "BWW" presentaba un bajo porcentaje de motilidad. Se canalizó la uretra y la vagina y se depositó el semen.

El día 27 de febrero de 1992 se llevó a cabo la inseminación artificial de la hembra número 332 utilizando semen del macho número 141. Se aplicó por vía intrauterina una pajilla de semen de 0.5 ml más 1.5 ml del medio BWW. Se utilizaron sondas uretrales para perro 8 fg y catéteres para recuperación de embriones (GIFT). El 29 de febrero de 1992 se repitió el procedimiento utilizando el endoscopio. Se aplicaron 2,500 UI (5 ml) de GCH (gonadotropina coriónica humana) para intentar estimular la ovulación en caso de que ésta no hubiera ocurrido. Se observó gran cantidad de moco y leucocitos, por lo que se le proporcionó tratamiento con antibióticos para evitar una infección a ese nivel. Se utilizaron sondas uretrales para perro 8 fg y catéteres GIFT. El 20 de marzo de 1992 se llevó a cabo la inseminación artificial de la hembra número 332 con semen del macho número 141, ya que se volvieron a observar signos de celo a pesar de la inseminación previa.

El 9 de marzo de 1994 se llevó a cabo la inseminación artificial de la hembra número 332, por vía vaginal, utilizando semen descongelado del macho número 121. Se administró el semen y se estimuló durante un momento la zona de la vagina. El semen mostró poca motilidad progresiva (30% a 40%) y espermatozoides con doble cola (0 a 1 por campo). Se utilizaron sondas uretrales para perro 8 fg y catéteres de recuperación de embriones (GIFT). Dos días después se repitió la inseminación con semen del mismo macho por vía intravaginal. Se utilizaron dos dosis de semen por la poca motilidad observada. Se aplicaron 2,500 UI (5 ml) de GCH para estimular la ovulación. Se utilizaron sondas uretrales para perro 8 fg y catéteres de recuperación de embriones (GIFT).

Durante el examen físico del macho número 141, previo a la electroeyaculación, se observó que los epidídimos de ambos testículos estaban activos, ya que a la palpación se sintió un aumento de volumen de los mismos con respecto a la temporada del año en la que los pandas gigantes se encuentran inactivos reproductivamente; asimismo, se ha demostrado un incremento de más de 2 centímetros en el tamaño de los testículos y un aumento en la producción de espermatozoides en la época que coincide con el celo de las hembras.⁹ De las electroeyaculaciones de este macho se obtuvieron aproximadamente 2 ml de eyaculado en cada ocasión. La mitad fue utilizada para la primera inseminación de la hembra número 291, y la otra mitad se guardó a temperatura ambiente, ya que sería utilizada en caso de una segunda inseminación artificial de la misma hembra. En 1991, se utilizó semen fresco durante la primera inseminación artificial de la hembra número 332; la segunda inseminación de esta hembra se llevó a cabo con semen congelado del

mismo macho, debido a la poca motilidad observada en el semen fresco.

De la electroeyaculación del macho número 256 se obtuvo mayor cantidad de semen que del macho número 141 (aproximadamente 3 ml). Una vez diluidos en el medio de conservación, se dividieron en 23 pajillas de 0.5 ml cada una, para después congelarlas en nitrógeno líquido.

La hembra número 291 ha sido inseminada 3 veces en 3 temporadas diferentes. Después de la primera inseminación practicada a dicha hembra, se observaron durante aproximadamente 5 meses, signos compatibles con gestación e inclusive se llegó a observar galactorrea. La inseminación del 28 de marzo de 1995 se llevó a cabo vía intravaginal y se observó una motilidad progresiva de espermatozoides de 70% a 80%. Después de haber aceptado al macho con el que se estaba acoplando diariamente, un día después de la inseminación comenzó a rechazarlo. A los 56 días a partir de la inseminación, la hembra comenzó a construir un pequeño nido. Más adelante se comprobó que la hembra no había quedado gestante. En las tres ocasiones se inseminó vía intravaginal.

La hembra número 332 ha sido inseminada en 7 ocasiones en 3 temporadas diferentes. En las 2 ocasiones en las que se utilizó un endoscopio rígido, se logró introducir el semen por vía intrauterina.

A través de las inseminaciones artificiales realizadas en diferentes ocasiones en las dos hembras, no se ha logrado obtener crías en el Zoológico de Chapultepec, observándose semiología de pseudogestación, en una de las hembras, en 2 ocasiones.

La inseminación artificial ha demostrado ser un método efectivo para llevar a cabo la reproducción del panda gigante.^{7,9} A pesar de que no se ha logrado obtener crías de esta especie en el Zoológico de Chapultepec, la inseminación artificial constituye la única opción viable para que se reproduzcan los pandas gigantes sin fomentar la consanguinidad, ya que por el momento, las tres hembras son parientes cercanos del único macho con que se cuenta.

Las bases para llevar a cabo la técnica de electroeyaculación que se utilizó con éxito en el Zoológico de Chapultepec, han sido previamente descritas en la literatura científica.^{6,9} La electroeyaculación permite utilizar semen fresco durante la inseminación artificial además de poder utilizar este mismo para congelarlo y utilizarlo en el momento en que se requiera. Este procedimiento se deberá llevar a cabo durante la época reproductiva del panda gigante (cerca del inicio de la primavera) para obtener una mejor calidad de semen.^{6,9} El semen fresco generalmente muestra una mejor motilidad de los espermatozoides; por ello, su utilización sería más recomendable, aunque como ya se mencionó, no se cuenta con un macho que no esté emparentado con las hembras de esta especie, por lo que es necesaria la utilización de semen congelado.

La anestesia utilizada en las inseminaciones artificiales exitosas ha sido la combinación de diacepam-ketamina⁷ y también la combinación de xilacina-ketamina.⁹ En el Zoológico de Chapultepec se ha utilizado solamente la combinación de xilacina-ketamina en todos los procedimientos. No se ha demostrado que la xilacina pudiera tener algún efecto adverso sobre el útero después de la inseminación artificial, pero se podría intentar la inseminación utilizando diacepam como preanestésico, para evitar el uso de la xilacina, ya que se han observado contracciones uterinas provocadas por este sedante en otras especies.³

A pesar de que con el método intravaginal, que generalmente se ha utilizado en la inseminación artificial, se logra la gestación, se ha mencionado que la vía intrauterina sería más exitosa,⁶ por lo que se continuará intentando la inseminación artificial utilizando esta última técnica. Otra opción disponible es recurrir a la técnica de inseminación artificial intrauterina transabdominal por medio de un laparoscopia. Esta técnica ha sido exitosa, ya que con ella se han obtenido crías de guepardo,⁴ gato doméstico, gato leopardo, tigre, puma, pantera nebulosa, ocelote, leopardo de las nieves, venado de Eld, hurón europeo, hurón siberiano y hurón de patas negras.*

En 2 ocasiones, se observaron signos compatibles con gestación (pérdida de apetito, fabricación de nido y galactorrea), lo que se puede interpretar como pseudogestaciones, fenómeno que se ha registrado en otros ejemplares de pandas gigantes.^{1,2,6} Dicho proceso solamente se podría comprobar mediante el seguimiento de la función ovárica por medio de la determinación de niveles hormonales en plasma o suero.^{2,8}

Hasta este momento, el seguimiento del ciclo reproductivo de las hembras se ha llevado a cabo etológicamente por medio de la observación del comportamiento y otros signos, tanto en los machos como en las hembras, durante la época reproductiva. Se observa el color e hinchazón de la vulva, disminución del apetito, vocalización (tipo y frecuencia), aumento de la actividad y marcaje con la región anogenital, aceptación del macho por parte de las hembras, lordosis o arqueamiento del dorso del cuerpo, y estimulación manual del área ano-genital ("masturbación") principalmente.

Con base en los resultados, se puede concluir que es necesario instrumentar un método más efectivo de seguimiento del ciclo reproductivo en las hembras de panda gigante para poder conocer el momento exacto de su ovulación, de manera que se pueda llevar a cabo la inseminación artificial en el momento adecuado. Esto evitaría la aplicación de hormonas exógenas para inducir la ovulación que necesariamente interfiere en el ciclo reproductivo natural de la especie.

Otros métodos que se pueden utilizar para vigilar el ciclo en esta especie son: la observación del tipo de moco vaginal (que solamente se puede realizar al momento de la inseminación o de alguna anestesia por otro motivo), los niveles de hormonas en plasma sanguíneo, que constituye

* Comunicación personal, Dra. JoGayle Howard. National Zoological Park, 1995.

un método invasivo y poco práctico ya que altera el comportamiento, aumenta riesgos, y se tiene que realizar bajo anestesia en repetidas ocasiones, obtención de los niveles de hormonas en orina y la laparoscopia diagnóstica para observar los órganos reproductivos de la hembra directamente en la cavidad abdominal y pélvica, aunque tiene mayores riesgos para la salud del ejemplar en cuestión.^{2,6,8}

También es necesario encontrar algún otro método de inseminación artificial más efectivo, en el cual se asegure que el semen es depositado en el lugar adecuado, de preferencia en el útero de las hembras para tener mayores posibilidades de gestación.

En este momento se está comenzando a trabajar en un estudio del ciclo reproductivo en el panda gigante para poder dar seguimiento a la función ovárica mediante la determinación de los niveles hormonales en el excremento y en la orina. De esta manera será posible predecir con mayor exactitud el momento de ovulación, correlacionar el comportamiento observado e inseminar artificialmente en el momento adecuado. Más adelante, se podría intentar la inseminación artificial intrauterina, vía transabdominal, mediante la laparoscopia, método que ha demostrado ser eficaz en otras especies de carnívoros silvestres en peligro de extinción, pero que requiere de una vigilancia cuidadosa del ciclo estral y del momento de la ovulación.

Agradecimientos

A Marielena Hoyo Bastián, directora del Zoológico de Chapultepec, por su apoyo y gran interés en la reproducción del panda gigante. A los doctores James Kirkwood, Harry Moore y Bill Holt, de la Zoological Society of London, por llevar a cabo las electroeyaculaciones, por la enseñanza de la técnica intravaginal y por todos sus consejos. A Raúl Villar Rangel, subdirector del Área Técnica del Zoológico de Chapultepec, por su apoyo incondicional. A los integrantes del Servicio Médico Veterinario del Zoológico de Chapultepec, en sus diferentes etapas, por su colaboración durante los procedimientos los MVZ: David Berrón Hernández, Everardo Montfort Ramírez, Alfonso Delgado del Olmo, Miguel Peña Riverón, Gustavo Ramírez Zierold, Rafael Tinajero Ayala, Rocío Erazo García, Alberto Parás García, Sergio Zárate Monroy y los PMVZ José Luis González Hernández, Carlos Sánchez Domínguez, Jorge Guzmán y Adriana Gallegos Torres. A todos los auxiliares de zootecnia ("animaleros") que han laborado con esta especie y que nos han transmitido todos sus

conocimientos, además de colaborar en todos los procedimientos. Al Dr. Juan Xochipiltécatl Muñoz, por el apoyo técnico en la utilización del endoscopio durante algunas de las inseminaciones artificiales. A la MVZ María Claudia Suárez de Gual, por su ayuda en traducciones y en la revisión del manuscrito.

Literatura citada

1. Bush, M. and Montali, R.J.: Medical management of giant pandas. In: Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy. 3rd ed. Edited by: Fowler, M.E., 408-411. W.B. Saunders, Philadelphia, 1993.
2. Chaudhuri, M., Kleiman, D.G., Wildt, D.E., Bush, M., Frank, E.S. and Thau, R.B.: Urinary steroid concentrations during natural and gonadotrophin-induced oestrus and pregnancy in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *J. Reprod. Fertil.*, 84: 23-28 (1988).
3. Hall, L.W. and Clarke, K.W.: Veterinary Anaesthesia. 9th ed. Bailliere Tindall, London, 1991.
4. Howard, J., Donoghue, A.M., Barone, M.A., Goodlowe, K.L., Blumer, E.S., Snodgrass, K., Starnes, D., Tucker, M., Bush, M. and Wildt, D.E.: Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *J. Zoo. Wildl. Med.*, 23: 288-300 (1992).
5. Kirkwood, J.K.: Medical management of pandas in Europe. In: Zoo and Wild Animal Medicine. Current Therapy. 3rd ed. Edited by: Fowler, M.E., 404-408. W.B. Saunders, Philadelphia, 1993.
6. Knight, J.A., Bush, M., Celma, M., Garcia-Campo del, A.L., Göltenboth, R., Hearn, J.P., Hodges, J.K., Jones, D.M., Klös, H.G., Monsalve, L., Montali, R. and Moore, H.D.M.: Veterinary aspects of reproduction in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). Proceedings of the 10th International Symposium on the Giant Panda. Berlin, Germany. 1985. 93-126. *Bongo Zoologischer Garten und Aquarium Berlin*. Berlin, Germany (1985).
7. Masui, H., Hiramatsu, H., Nose, N., Nakazato, R., Sagawa, Y., Tajima, H. and Saito, K.: Successful artificial insemination in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) at Ueno Zoo. *Zoo Biol.*, 8: 17-26 (1989).
8. Monfort, S.L., Dahl, K.D., Czekala, N.M., Stevens, L., Bush, M. and Wildt, D.E.: Monitoring ovarian function and pregnancy in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) by evaluating urinary bioactive FSH and steroid metabolites. *J. Reprod. Fertil.*, 85: 203-212 (1989).
9. Moore, H.D.M., Bush, M., Celma, A.L., Garcia, A.L., Hartman, T.D., Hearn, J.P., Hodges, J.K., Jones, D.M., Knight, J.A., Monsalve, L. and Wildt, D.E.: Artificial insemination in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *J. Zool.*, 203: 269-278 (1984).
10. Qingguo, Z., Zhiyong, F., Gipps, J. and Kleiman, D.: The Giant Panda Studbook 1993. International Giant Panda Conservation Symposium. Ghengdu, China. 1993. 64 - 109. *Chinese Association of Zoological Gardens*. Ghengdu, China (1993).