

INSTITUTO DE ESPAÑA
REAL ACADEMIA DE CIENCIAS VETERINARIAS DE ESPAÑA

BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DE MAMÍFEROS EN PELIGRO DE EXTINCIÓN

DISCURSO DE INGRESO DEL
ACADÉMICO CORRESPONDIENTE EXTRANJERO
PROF. DR. EDUARDO R. S. ROLDAN

Y DISCURSO DE PRESENTACIÓN A CARGO DEL
ACADÉMICO DE NÚMERO
**EXCMO. SR. D.
JOSÉ JULIÁN GARDE LÓPEZ-BREA**



16 de Noviembre de 2009
MADRID

DISCURSO DE PRESENTACIÓN A CARGO DEL
ACADÉMICO DE NÚMERO

EXCMO. SR. D. JOSÉ JULIÁN GARDE LÓPEZ-BREA

Excelentísimo Señor Presidente,

Excelentísimas Señoras y Señores Académicos,

Señoras y Señores,

Mis primeras palabras han de ser para manifestar mi gratitud a la presidencia de esta Corporación por el encargo que me ha hecho de presentar a este nuevo académico. Por primera vez desde mi ingreso en esta docta Corporación ocupó la tribuna para cumplimentar el encargo recibido de esta Real Academia y si bien puedo afirmar que ello constituye para mi un alto honor, la satisfacción y hasta el legítimo orgullo que tal honor me depara se equilibra, en parte, con la preocupación que me produce el considerar la responsabilidad que asumo en estos momentos.

Presento al académico extranjero electo, el Dr. **Eduardo Roldán Schuth**, en nombre de la Real Academia y los muchos saberes que en ésta se encierran contrastan con mis pocas posibilidades de poder salir airoso de este cometido, dadas mis limitaciones en el tema que se va a exponer y sobre todo, teniendo en cuenta la valía profesional y humana del nuevo académico. Me va a ser difícil cumplir el encargo recibido con la altura expositiva y el rigor científico que esta Academia de Veterinaria se merece y a la que está acostumbrada por las intervenciones de otros académicos.

Afortunadamente, hay algo más. Este solemne acto académico no se puede encuadrar, al menos para mí, entre las coordenadas de un cumplimiento protocolario del encargo que, en su día, me fue encomendado por la Junta de Gobierno de la Academia. Aunque pueda considerar y de hecho así lo considero muy honrosa tal petición, ésta presenta un encuadramiento rígido que viene impuesto por el propio formalismo académico.

Pero hay algo más, algo más que escapa de esas limitaciones académicas y permite un desbordamiento de sentimientos y emociones. Porque en este acto académico cumplo con otra misión, menos formalista, y más afectiva y humana: la de presentar ante todos ustedes a un maestro, a un compañero, a un amigo, con el que he compartido muchas ilusiones y esperanzas que han contribuido a mi formación como científico y persona.

Entrando ya de lleno en el tema que tradicionalmente se aborda en la presentación de un discurso de recepción pública, he de glosar, en primer lugar, la personalidad, científica, profesional y humana del Doctor Roldán Schuth. Tarea compleja y delicada pues siempre es difícil enjuiciar objetivamente una vida humana, ya que la observamos desde nuestra particular perspectiva que no es la del interesado y se nos escapan con ello numerosos matices, aunque medie un conocimiento bastante íntimo como es el caso.

La labor, sin embargo, me ha sido excepcionalmente grata pues han ido pasando delante de mí, como en un calidoscopio, las imágenes de una vida consagrada al trabajo con la tenacidad y firme resolución que se atribuyen a su raza, pero que en él ha adquirido su máximo exponente. Trabajo tenaz, intenso, pero sobre todo, organizado lo que le ha permitido obtener de él un máximo provecho.

Eduardo Roldán Schuth nace en Buenos Aires (Argentina) hacia la mitad del siglo pasado. Es el único hijo varón de Raúl Roberto Roldán Mazzei, quien fuese veterinario pionero en la introducción y el uso de tecnologías de congelación de semen e inseminación artificial en Argentina. Está en posesión de los títulos de Licenciado en Veterinaria y de Doctor en Ciencias Biológicas, ambos obtenidos en la Universidad de Buenos Aires (Argentina). Su trabajo de Tesis doctoral llevó por título el de: *"Estudios sobre fecundación: Bases moleculares de la exocitosis en la reacción acrosómica de espermatozoides de mamíferos"*. Desde ese momento queda vinculado definitivamente, sin solución de continuidad, al estudio del espermatozoide, habiendo contribuido de manera muy significativa a un mejor conocimiento de la fisiología e importancia de dicha célula. De su brillante *currículum*, que por respeto al tiempo asignado renuncio a leer, sí quiero destacar algunas actividades y cualidades que considero de especial relevancia. Los documentos fríos que narran fechas, nombramientos, trabajos, publicaciones, y premios recibidos pueden ser consultados por cualquiera de nosotros. Sin embargo, los valores humanos que se esconden debajo de esos documentos no son tan fáciles de valorar para aquel que no conozca personalmente al investigador. No obstante, proporcionaré algunos datos objetivos que resumen y ponen en valor la importancia y relevancia internacional del *currículum* del nuevo académico.

Nuestro nuevo académico inició su actividad investigadora trabajando en temas de citogenética y reproducción en Buenos Aires (Argentina), pero rápidamente paso a interesarse por los procesos celulares y moleculares que acontecen en el espermatozoide en los momentos que anteceden a

la fecundación. Sus trabajos sobre los mecanismos moleculares implicados en la reacción acrosómica, así como sobre el papel que juega la zona pelúcida (ZP) en la misma, son de obligada lectura para todos los investigadores que hemos trabajado o trabajamos en estos temas. Parte de sus resultados relacionados con esta línea y con el papel de la progesterona y de la ZP en la exocitosis de los espermatozoides de mamífero fueron publicados en 1994 en la prestigiosa revista *Science*. A esta línea de trabajo ha dedicado una gran parte de su actividad investigadora, obteniendo resultados de sumo provecho e interés para la comunidad científica internacional. Abordó estos trabajos durante el desarrollo de su actividad profesional en distintas partes del mundo (Departamento de Histología y Embriología de la Universidad de Buenos Aires, Argentina; en la Universidad de Hawai (USA); en el AFRC Institute of Animal Physiology y en el Babraham Institute, ambos en Cambridge, (Inglaterra); en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), en Madrid, y en el Instituto de Bioquímica (centro mixto de la Universidad Complutense de Madrid y el CSIC), en Madrid.

Actualmente trabaja en Biología y Ecología de la Reproducción, desarrollando las siguientes líneas de investigación: evolución de estrategias reproductivas, papel de la selección sexual en la especiación, reproducción de especies en peligro de extinción, aplicación de biotecnologías reproductivas a especies amenazadas, efectos deletéreos de la consanguinidad y conservación de la biodiversidad. Además, es coordinador del Banco Nacional de Germoplasma y Tejidos de Especies Silvestres Amenazadas. De estos estudios surge el reconocimiento de la influencia del factor masculino en el sesgo del sex ratio de la descendencia en mamíferos, publicado también en *Science* en 2006. De gran relevancia internacional son también las aportaciones del grupo liderado por el Dr. Roldán en el campo de su discurso de ingreso. Fruto de estos estudios son el primer nacimiento a nivel mundial de una gacela mediante el empleo de semen congelado por inseminación artificial, o la posibilidad real de fecundar ovocitos de gata por espermatozoides descongelados de lince Ibérico, hecho que demuestra la capacidad fecundante de los mismos. Todos estos trabajos fueron desarrollados desde los diversos puestos ocupados en el Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos en Ciudad Real, en el Museo Nacional de Ciencias Naturales en Madrid, ambos dependientes del CSIC, y en el Royal Veterinary College de la Universidad de Londres (UK).

Fruto copioso y de calidad de su ardua y entregada acción investigadora son sus múltiples publicaciones en revistas internacionales referidas por

el ISI Web of Science. El balance de artículos en revistas con índice de impacto alcanza hasta la fecha, la cantidad de 102, habiendo recibido sus publicaciones más de 2.000 citas. Sus estudios han sido publicados entre otras en las siguientes revistas: *Science*, *Reproduction*, *Biology of Reproduction*, *PNAS*, *Journal of Cellular Physiology*, *Proceedings of the Royal Society*, *Trends in Ecology and Evolution*, *FEBS Letters*, *Journal of Biological Chemistry*, *Evolution*, y *Molecular Ecology*. Esta labor investigadora se ha visto respaldada por 21 proyectos de investigación financiados como investigador principal por numerosos organismos nacionales e internacionales (Rockefeller Foundation, USA; Wellcome Trust, UK; Biotechnology and Biological Sciences Research Council, UK; The Royal Society, UK; Ministerio de Educación y Ciencia, España; Ministerio de Medio Ambiente, España; y Fundación BBVA, España). En relación con ello hay que consignar la dirección de numerosas tesinas de licenciatura y de tesis doctorales en diferentes centros y países.

En íntima conexión con lo anterior pueden citarse sus libros y capítulos de libros, hasta un total de 29. Las conferencias invitadas en congresos internacionales (En España, UK, Francia, Italia, Holanda, China, Japón, Argentina, Canadá, USA) se saldan, por ahora, con la cifra de 31.

Sus dotes en las faenas de organización han quedado bien puestas de manifiesto en otras numerosas ocasiones, entre ellas las que siguen: *International Symposium on Fertilization*, en USA en 1989; *Reproductive Biotechnology*, *British Council-CSIC* en Almagro, España 2003; *Nuclear Transfer and Stem Cells*, *British Council-CSIC*, en Chinchón, España 2004; *10th International Symposium on Spermatology*, en Madrid, España en 2006; y *1st World Congress of Reproductive Biology*, *Kailua-Kona*, en USA 2008.

Eduardo Roldán ha sido y es miembro de numerosos comités y Sociedades Científicas internacionales, es miembro del Grupo de Cría en Cautividad del Lince Ibérico, y asesor científico de la academia Ciencias Médicas de China. Además, ha recibido numerosos premios y distinciones en distintos países del mundo (China, UK, USA, Argentina).

¿Cuál sería el colofón final a esta breve exposición de los méritos del nuevo académico? Yo diría que es la historia muy resumida y mal hilvanada por mí, de un hombre de firmes convicciones, de voluntad decidida, que con tesonera laboriosidad ha conseguido abrir el camino que desde siempre tenía trazado, a pesar de las grandes dificultades a que ello se oponían. La fe y esperanza que mantuvo le ha conducido finalmente al lugar que siempre deseaba. Buen ejemplo para tantos que

se amilanan y desaniman con los primeros tropiezos y no saben, o no quieren, mantener a ultranza una ilusión y transformarla al fin en una realidad vivificante.

Por su carácter preceptivo, voy a dedicar un comentario al discurso de recepción que vamos a escuchar, pues su omisión pudiera parecer descortesía. Comentario que será necesariamente breve y superficial pues me resultaría muy difícil aportar alguna novedad a un tema que ha sido magistralmente elaborado por el nuevo académico y que además le conoce por su experiencia personal y la de su equipo de colaboradores.

Como no puede ser de otra forma, nuestro nuevo académico nos expondrá una de sus líneas de investigación, en la que lleva trabajando ya muchos años, los estudios de Biología y la aplicación de tecnologías reproductivas a especies amenazadas. Previamente definirá el marco de actuación y la importancia de esta línea dentro de un contexto global de Biología de la Conservación. Por desgracia se trata de un tema de rabiosa actualidad. Existe una abundante biodiversidad en nuestro planeta, pero esta diversidad biológica está atravesando una grave crisis. Necesitamos mejorar nuestros conocimientos sobre dónde está y qué la amenaza pero, particularmente, diseñar estrategias para frenar este deterioro y, en la medida de lo posible, revertirlo. En la Cuenca Mediterránea habitan más de 220 especies de mamíferos terrestres, de los cuales 25 (11%) son endémicos. Algunos mamíferos grandes, como el león y el orix de cimitarra, se han extinguido en esta región en los últimos miles de años como resultado de la alteración de hábitat causada por humanos y por la presión de caza. Entre las "especies bandera" de esta región destacan la foca monje mediterránea, de la que quedan menos de 400 individuos en libertad, el mono (macaco) de Gibraltar, el único primate de Europa, el ciervo de Berbería, y el lince Ibérico, el felino más amenazado del planeta con menos de 250 individuos en libertad. En su conjunto, España es un país privilegiado en cuanto a biodiversidad. Pero esto conlleva una enorme responsabilidad respecto a su protección.

Probablemente, como nos narrará el Dr. Roldán, todos estemos de acuerdo en que la mejor estrategia para la conservación de la diversidad biológica es la preservación del medio natural. Aún así, debemos reconocer que el deterioro del hábitat no siempre es la causa del declive de ciertas poblaciones. Por ello, la conservación del hábitat (o conservación *in situ*) puede complementarse con otras acciones de conservación que impliquen actuaciones más directas sobre las especies animales o de obtención, almacenamiento y uso de materiales biológicos derivadas de estas especies. Así, las tecnologías reproductivas pueden

ser un buen complemento a los esfuerzos de conservación porque pueden facilitar el manejo y el intercambio genético entre poblaciones.

De la mano del nuevo académico nos adentraremos en el mundo apasionante de la aplicación de estas tecnologías para la resolución de problemas de conservación de especies de mamíferos en peligro de extinción. Con maestría singular nos mostrará las inmensas posibilidades que ofrecen tanto desde un punto de vista práctico como teórico. Desde sus aplicaciones para el mantenimiento del equilibrio genético de poblaciones, a las que dedica una atención especial, a su uso para la producción de gametos derivados de células madre embrionarias o de células somáticas, todos los temas tratados se estructuran en un conjunto coherente, en el que se combinan en su discurso de recepción ordenadamente conceptos teóricos con métodos de trabajo.

Sin embargo, mucho se podría polemizar y de hecho así se ha hecho sobre las ventajas o aplicaciones de alguna de estas técnicas (Por ejemplo la transferencia de núcleos de células somáticas) para la conservación de especies en peligro y si sus fines están orientados exclusivamente al bien de la humanidad o son menos altruistas. Como éste no es el momento ni el lugar apropiado para ello, solo cabe pedir que se cumpla la invocación que hace el nuevo académico en su discurso al referirse a esta tecnología. Cito literalmente las palabras del Dr. Roldán: *En resumen, además de las consideraciones relacionadas con la conveniencia de utilizar esta tecnología en esfuerzos de conservación, son necesarias una serie de mejoras en los métodos de preparación de núcleos y de micromanipulación y activación, así como un mejor conocimiento de los procesos de reprogramación del núcleo una vez transferido al óvulo, para incrementar el éxito de esta técnica.*

Con el nuevo académico electo, tenemos antigua relación afectiva e intelectual, y desde el nacimiento de la misma, apreciamos en él al universitario culto e inteligente, extremadamente educado y que destaca por su formación multidisciplinar y brillantez de pensamiento. Aún perdura en mi recuerdo, el día de 1990 que, desempeñándome yo como becario predoctoral, mi directora, la Dra. Isabel Vázquez, me presentó en su antiguo despacho del Departamento de Reproducción Animal del INIA, al Dr. Roldán. Por aquel entonces, yo estaba iniciando mi tesis doctoral sobre fecundación *in vitro* y reacción acrosómica en espermatozoides de morueco, y ya había leído alguno de los numerosos y excelentes artículos que Eduardo había publicado sobre esta temática. Recuerdo aún aquel encuentro como una de las mayores ilusiones de mi vida hecha realidad. Además, debo y quiero reconocer ahora en público

que hasta la fecha, no creo que haya habido persona con influencia más definitiva y duradera sobre mi actividad científica. Cuatro años después de aquel primer encuentro tuve la suerte de conseguir una beca postdoctoral para trabajar con el Dr. Roldán en su Laboratorio de Función de Gametos y Fertilización en Cambridge (Inglaterra). A principios de 1995 Eduardo se trasladó a España e intentó sin éxito, no por carecer de méritos suficientes, sino más bien por todo lo contrario, obtener una plaza estable en las áreas de Biomedicina y/o Reproducción Animal. Va trascurriendo así un lapso de tiempo, en el que con grandes esfuerzos y muchos sacrificios personales consigue mantener viva su vocación científica y por fin llega el día en que si se le permitió acceder a un puesto estable en la función pública en el área de Recursos Naturales del CSIC. Lujos del que la Ciencia española no sé si se ha sabido aprovechar, y no por la predisposición que él siempre ha mostrado para ello. Al menos algunos (no sé si muchos o pocos), entre los que muy honrosamente me incluyo, si que lo hemos hecho. Desde su llegada a España, y antes de irse de nuevo a Inglaterra en 2007, hemos colaborado en numerosos proyectos y actividades científicas, contribuyendo todas ellas de forma muy eficaz a mi formación científica y humana. En numerosas ocasiones he sentido la necesidad de detener el tiempo para recordar sus enseñanzas y su comportamiento y valorar el impacto que su ejemplo ha supuesto en mi trayectoria. Lamentablemente, el tiempo no puede detenerse. Por ello, y sobre todo para no quitarle el suyo en este solemne acto a nuestro nuevo académico voy a ir concluyendo. Termina con un pensamiento de Moliere: “Cuanto más admiramos a alguien, menos conviene halagarle”.

Dr. Roldán Schuth: En este acto tomáis posesión de una plaza de académico correspondiente extranjero de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de España y a mi me cabe el honor y la satisfacción, en nombre de esta docta Corporación, de daros la bienvenida. No quisiera acabar mi intervención sin hacer extensiva nuestra felicitación también a tu esposa, Montserrat y a tus hijos: Alejandro y Santiago.

Y este es el punto donde terminan mis palabras.

Excelentísimos Sres. Académicos, Señoras, Señores:

Gracias.

He dicho.

Madrid, 16 de noviembre de 2009

DISCURSO DE INGRESO DEL
ACADÉMICO CORRESPONDIENTE EXTRANJERO
PROF. DR. EDUARDO R. S. ROLDAN

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia de Ciencias Veterinarias,
Excelentísimos Señores Académicos,
Autoridades,
Colegas, familiares y amigos.

Es un verdadero honor, y placer, estar hoy aquí en este acto de ingreso a esta Real Academia. Estoy muy agradecido a los miembros de la Academia por haberme invitado a formar parte de esta Corporación. En particular, quiero agradecer a Julián Garde por presentar y avalar mi candidatura y por sus palabras de presentación. También, deseo expresar mi gratitud a quienes han respondido a la invitación de estar aquí en este momento tan importante. Además de vosotros, me acompañan, en espíritu, muchas personas que me han ayudado y me han inspirado en mi camino hasta aquí. Quiero, por tanto, agradecer a quienes he tenido la fortuna de conocer, que me han enseñado tantas cosas, y que me han regalado su tiempo y sus sentimientos.

Durante mis años de estudiante de Ciencias Veterinarias en la Universidad de Buenos Aires conocí lo que debe ser y lo que no debe ser un buen docente. Pocos de ellos me inspiraron en mi andadura hasta la finalización de mi carrera, aunque hubo algunos que sí dejaron una huella en mí. Fueron tiempos tumultuosos. Durante los años que estuve en la universidad vi hasta seis presidentes de gobierno, civiles y militares, elegidos y no, y los consiguientes cambios en los rumbos de la universidad. Decididamente, no el mejor ambiente para concentrarse en los estudios pero sí muy instructivo en otros aspectos. De esta época, cuando estaba en tercer año de la carrera, viene mi iniciación activa en la investigación, en el Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE) de La Plata, de la mano de Susana Merani, a quien le estaré siempre agradecido por larguísimas jornadas en el laboratorio y mucho más por veladas aún más largas con amigos como Renata y Sergio. Durante esta época tuve el privilegio de conocer en el IMBICE al Profesor Ovidio Núñez, botánico y citogenetista, de quien recuerdo, sobre todo, una exclamación cuando le dí a leer mi primer manuscrito con los primeros resultados de investigación. "Imagínese si Darwin hubiera incluido en su libro todos los datos que tenía!...", me dijo. Si bien ese primer intento de manuscrito claramente no había sido muy bueno, el consejo sí lo fue y lo recuerdo siempre.

Acabé la carrera gracias a la ayuda de dos compañeros de curso, Marcelo Tassara y Carlos Péndola, a quienes nunca agradecí lo

suficiente. Si no hubiera sido por ellos, seguramente no estaría aquí hoy. Mi interés en la investigación restó ánimos y tiempo de estudio y ellos me ayudaron a recuperarlos. Al acabar la carrera disfruté de una beca predoctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas (CONICET) de Argentina en el Departamento de Histología y Embriología de la Facultad de Veterinaria de Buenos Aires, y debo mi agradecimiento a la Profesora Irene von Lawzewitsch por haberme permitido desarrollar cuatro años de trabajo en su grupo. Durante este período fui dirigido por Susana Merani en estudios de citogenética y reproducción. Conocí entonces a Alfredo Vitullo, con quien comenzamos los primeros trabajos de evolución de morfología de espermatozoides y de fecundación *in vitro* interespecífica en roedores sudamericanos. Debo a Alfredo mi gratitud por muchas horas de trabajo compartido y por su amistad. En esta época conocí al Profesor Osvaldo Reig, quien volvía a Argentina después de muchos años de exilio en Venezuela. Fue para mí una influencia notable por su clara percepción de las preguntas importantes en biología evolutiva, y por el ímpetu que representó para todo un grupo de personas jóvenes que empezábamos nuestra carrera. Gracias al impulso de Osvaldo Reig, y de otras personas, se fundó en esos años la Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos y tuve la fortuna de participar en esta empresa nueva y de organizar actividades de la sociedad. Osvaldo Reig tuvo un papel crucial en mi carrera, esos que se denominan puntos de inflexión, ya que cuando solicité una beca postdoctoral a la Fundación Rockefeller escribió una carta apasionada enfatizando no tanto mis méritos (que no eran muchos) sino las ventajas de mi estancia de aprendizaje en Estados Unidos para, a mi retorno, contribuir a un siempre esperado resurgimiento de la ciencia en Argentina.

La Fundación me otorgó la beca para trabajar en el Departamento de Anatomía y Biología Reproductiva de la Universidad de Hawaii, con el Profesor Ryuzo Yanagimachi, un pionero de los estudios sobre fecundación en mamíferos y, más recientemente, de estudios de clonación en roedores. Mi estancia postdoctoral en Estados Unidos fue muy provechosa. Sin embargo, mi retorno a Buenos Aires no se produjo, no sólo por la aparición de otras oportunidades, sino también por un nuevo deterioro de la situación en Argentina que llegó a tal punto que al poco tiempo el mismo Osvaldo Reig estaba intentando organizar un grupo de investigación en Madrid, en el Museo Nacional de Ciencias Naturales.

El período de investigación en Estados Unidos fue muy importante para mí, gracias a las enseñanzas de Ryuzo Yanagimachi, de quien recuerdo unos poderosos "insights" en morfofisiología, y de varios colegas, entre los que quiero destacar al Profesor Jim Cummins quien estaba realizando en ese momento un sabático en el laboratorio.

En mi siguiente etapa postdoctoral, en el Babraham Institute en Cambridge, Gran Bretaña, dos personas, Robin Harrison y Robin Irvine, fueron también una influencia importante en mi carrera investigadora. Ambos me ayudaron y estimularon enormemente a pensar y a escribir. Uno de ellos me ayudó a prestar gran atención a los métodos y a asegurarme de que se usen con cuidado, y el otro me ayudó a identificar preguntas importantes y a no tener miedo de ir a por respuestas. También quiero recordar a la Profesora Lynn Fraser de King's College London quien actuó como mentora y se preocupó de ver que mi estancia en Babraham fuera fructífera.

De este período quiero recordar también al Profesor Thaddeus Mann, quien marcó otro punto de inflexión en mi carrera. Mann estaba ya jubilado desde hacía años y tuve el privilegio de verle en muchas ocasiones en Trinity Hall. Cuando llegó el momento de solicitar una nueva beca postdoctoral, escribió una carta a la Lalor Foundation que, imagino, hizo toda la diferencia y resultó en la concesión de dicha beca para poder continuar dos años más en Cambridge.

Al obtener más adelante una plaza de investigador independiente en el Babraham Institute, tuve la fortuna de tener en mi laboratorio una serie de magníficos postdoctorales a los que quiero agradecer su trabajo y su dedicación. Fueron buenos años compartidos con Cristina Fragío (quien llegó cuando el laboratorio estaba aún vacío y me ayudó a organizarlo), y con Qi-xian Shi, Tetsuma Murase, Chris O'Toole, Juan María Vázquez y Julián Garde.

Posteriormente, disfruté de un largo período de investigación en España, primero en el Departamento de Reproducción Animal del INIA y después en el CSIC. De la "época INIA" quiero agradecer particularmente a Belén Pintado por su apoyo y amistad, que hicieron que esta etapa fuera llevadera. En el período siguiente, el apoyo de César Nombela, Miguel García Guerrero y Emilio Lora-Tamayo hicieron posible que pudiera cristalizar y consolidar una posición en el CSIC trabajando en el Instituto de Bioquímica, el Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos y el Museo Nacional de Ciencias Naturales.

Hace un par de años tuve la oportunidad de unirme al Royal Veterinary College de la Universidad de Londres; agradezco a la Profesora Jo Price por su apoyo y a la Royal Society por el apoyo a través de un "Wolfson Research Merit Award".

Hoy, estoy nuevamente en Madrid, en el Museo Nacional de Ciencias Naturales, un instituto del CSIC con un Museo, o un Museo con investigadores, según a quién se pregunte.

Me gustaría agradecer a otras personas que también han sido importantes en mi carrera profesional y en mi vida personal. Quiero manifestar mi apreciación a los muchos colegas investigadores de tantos laboratorios a lo largo y ancho del mundo que han compartido sus visiones, sus ideas y sus preocupaciones, y que han sido extremadamente importantes para ir dando forma a una percepción de esta naturaleza que tanto nos preocupa. Me gustaría nombrarlos a todos, pero temo olvidar alguno, por lo que espero que se sientan reconocidos en este agradecimiento.

He tenido la enorme fortuna de poder contar con un grupo magnífico de estudiantes y de colaboradores en el laboratorio. En este "Grupo de Ecología y Biología de la Reproducción" han confluído muchos que han dedicado su tiempo, su esfuerzo y sus ideas en un compromiso honesto de sacar el trabajo adelante. No sé si de alguna manera "somos un equipo". Me gustaría que muchos concluyerais que lo somos y que el trabajo de todos ha sido más que la suma de los esfuerzos individuales.

En cuanto al Museo, quiero agradecer especialmente al personal de administración, de mantenimiento y de seguridad, personas que nos ayudan con paciencia y sin las cuales no podríamos hacer nuestro trabajo.

Quiero reconocer el apoyo recibido de muchos organismos públicos que han financiado nuestros proyectos. Deseo destacar al Ministerio de Educación y Ciencia, y al de Educación y al de Ciencia, en sus varias versiones, que a lo largo de muchos años han subvencionado proyectos y estudiantes pre- y post-doctorales. La Comunidad de Madrid ha apoyado con financiación de proyectos de investigación y a través del programa FINNOVA. También quiero mencionar al Ministerio de Medio Ambiente (y ahora de Medio Rural y Marino) por financiar nuestras actividades relacionadas con conservación de lince ibérico y otras especies españolas. La Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha también ha financiado proyectos de investigación. Deseo mencionar

particularmente la generosidad de la Fundación BBVA que, por muchos años, ha apoyado nuestro Proyecto Felinos Sudamericanos y, en especial a su Director, el Profesor Rafael Pardo, quien se ha interesado activamente por este proyecto y, además, ha apoyado muchas actividades de divulgación científica de nuestro grupo. Ford España y Ford-Novauto merecen reconocimiento ya que nos facilitan un vehículo para trabajo de campo. Finalmente, y no por ello menos importante, quiero agradecer al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y a su actual Presidente, el Profesor Rafael Rodrigo, por el apoyo recibido a lo largo de muchos años en forma de acciones especiales de equipamiento e infraestructura, financiación de personal, y apoyo en actividades de divulgación científica.

Quiero recordar a los amigos. Los de antes, a quien con mucha pena ya no veo. Y a los de ahora, que me hacen disfrutar con su amistad.

Es difícil agradecer a la distancia, pero quisiera manifestar mi enorme reconocimiento a mis padres por todo lo que me han dado, en educación, oportunidades, e interminables conversaciones. Cada uno a su manera supo transmitir ideas y sentimientos que me acompañan hoy. Mi madre, quien no tuvo la posibilidad de estudiar cuando joven (eran otros tiempos), me mostró con su ejemplo que nunca es tarde y lo que se puede conseguir con coraje. Una hermana, Graciela, es "de letras" y la otra, María José, de "las artes", pero ambas siempre apoyaron mi dedicación a mi mundo de la ciencia y contribuyeron y contribuyen con su tiempo para que pueda seguir con mis tareas.

Mi padre me dio la oportunidad de conocer tanto el trabajo "con las vacas en el campo", ya que fue pionero en la introducción y el uso de tecnologías de congelación de semen e inseminación artificial en Argentina, como en la empresa, ya que pasé muchos veranos "ganándome unos pesos", como en la docencia y la investigación, ya que fue Catedrático de Reproducción Animal en la Universidad de La Plata. Aprendí muchas cosas de su propia experiencia, de sus trabajos, de sus aciertos, de sus frustraciones, de sus errores, de sus ilusiones.

Quiero agradecer especialmente a Julián Garde por muchos años de colaboración profesional y por su amistad. Conocí a Julián tiempo atrás cuando disfruté de una estancia en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC y él tenía una beca en el INIA. Gracias a su ayuda desinteresada, proveyendo muestras, pude desarrollar entonces mi trabajo. Después hizo una estancia postdoctoral en Cambridge donde mostró una dedicación y esfuerzo encomiables. Finalmente, cuando vine

a España, fue un excelente compañero de aventuras entre ciervos, gacelas y lince. Aunque él a lo mejor no lo haya notado, he aprendido de él muchas cosas. Julián ha sido crucial para muchos logros de nuestro trabajo en colaboración y, además, gracias a él conocí las delicias de los procesos administrativos.

El tema de esta presentación está centrado en aspectos de la reproducción de mamíferos amenazados. Intentaré resumir información sobre diversos aspectos de la biología de mamíferos, y su fisiología de la reproducción, qué peligros les amenazan, y qué tecnologías se encuentran disponibles o podremos utilizar en el futuro para ayudar en el esfuerzo de conservación con el fin de evitar su extinción. También presentaré ideas, algunas propias, la mayoría "de jardines ajenos", como ha dicho Bioy Casares, con el propósito de poner en contexto el porqué de lo que hacemos y para qué lo hacemos.

DIVERSIDAD EN LOS MECANISMOS REPRODUCTIVOS DE MAMÍFEROS

Los mecanismos reproductivos son enormemente diversos y difieren marcadamente entre las especies. Si embargo, todas las formas de vida actuales tienen un origen único, lo que se manifiesta por tener todas el mismo código genético. No deja de sorprender pues que, partiendo de un código común, se haya generado tal variedad de estrategias y mecanismos en el proceso que utilizan los individuos de distintas especies para transmitir sus genes de una generación a la siguiente.

Por ejemplo, si nos detenemos un instante para apreciar la enorme diversidad de los gametos masculinos, un tema en el que he invertido algo de tiempo, podremos comprobar la gran variedad de formas y tamaños que existen y que, aún en especies muy cercanas, se han encontrado soluciones de diseño y función muy diferentes para resolver el problema de llevar la carga de ADN nuclear hasta el óvulo (Roldan et al. 1992, Gomendio y Roldan 2008). Así, en mamíferos, existen espermatozoides con formas muy diferentes de la cabeza, es decir, la estructura que contiene el núcleo de la célula. Hay formas redondas u ovaladas y también las hay con modificaciones en el extremo apical (donde existen estructuras en forma de "ganchos"), o en la región de la base de la cabeza (donde pueden existir uno o dos apéndices). Estos cambios en el diseño involucran diferencias marcadas en la morfología de los componentes celulares como el núcleo o el gránulo secretor (llamado "acrosoma") que contiene las enzimas que ayudarán al espermatozoide a interactuar con el óvulo.

No sólo hay diferencias en las formas. También las hay en el tamaño de los componentes de los espermatozoides (tanto de la cabeza como del flagelo), y estas diferencias parecen estar relacionadas con la velocidad a la que nadan los espermatozoides. Más aún, si consideramos el itinerario que deben recorrer desde el sitio donde son producidos hasta el sitio de la fecundación, comprobaremos que existe una gran diversidad en la estructura del tracto genital femenino, y las barreras que los espermatozoides han de superar. Además hay diferencias en los ciclos sexuales y los períodos en los que las hembras permanecen receptivas y se producen las cópulas. Por ello, algunos espermatozoides tienen que sobrevivir unas pocas horas hasta el momento de la fecundación (como en los roedores), mientras que otros han de sobrevivir meses (como en algunos murciélagos).

A nivel molecular, encontramos también diferencias en los mecanismos de señalización celular que subyacen a la función espermática o a los procesos de fecundación. Pasé buena parte de mi carrera estudiando los requerimientos de iones o de fuentes de energía que tienen los espermatozoides para los procesos que les preparan para la fecundación, y los mecanismos moleculares subyacentes, y la evidencia recogida a través de los años apunta una y otra vez a ciertos aspectos comunes entre especies pero también a una gran diversidad entre ellas en los mecanismos reguladores como, por mencionar sólo uno, en el caso de la activación e inhibición de la fosfolipasa A_2 , la enzima que genera los metabolitos lipídicos necesarios para los procesos de fusión (Roldan y Shi 2007). Es notable comprobar una y otra vez que no existe una única "especie modelo" adecuada, en mamíferos o en otros taxones, para estudiar procesos de capacitación espermática, reacción acrosómica o de reconocimiento de gametos. Y, más aún, cuando examinamos la estructura de los genes que codifican las proteínas que intervienen en procesos reproductivos (las llamadas "proteínas reproductivas") encontramos una divergencia que es mayor que la encontrada en genes que codifican proteínas involucradas en otros procesos con excepción, debo decir, de proteínas que participan en procesos inmunológicos.

Lo anterior es sólo un rápido repaso de variación en forma y función de gametos masculinos. Si consideramos la variación que existe en la fisiología femenina en mamíferos, podremos fácilmente ver cómo se incrementa mucho más esta diversidad. Por ejemplo, existen diferencias en los tipos y en la duración del ciclo estral, en los mecanismos de ovulación (que puede ser espontánea o inducida, y con varios tipos

intermedios entre estos extremos), en los procesos de activación del cuerpo lúteo, en las variaciones en la regulación del desarrollo embrionario temprano, en la existencia de implantación diferida, o en la de los tiempos de gestación, por mencionar solo algunos.

Sobre la base de toda esta diversidad en secuencias codificantes de los genes, mecanismos de regulación, procesos de señalización celular, morfología y función de los gametos y tractos reproductivos masculinos y femeninos, y características de los organismos, cabe preguntarnos cómo se ha generado toda esta variedad y, a continuación, qué amenazas tiene esta diversidad biológica, y qué podemos hacer para frenarlas.

LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA (BIODIVERSIDAD)

La enorme diversidad en los varios aspectos de la reproducción de mamíferos que he resumido no hace más que reflejar la enorme diversidad de organismos que existen. Se estima que la vida apareció en la Tierra hace unos 3.800 millones de años. A partir de un "origen muy sencillo", según palabras de Darwin, a lo largo de la historia evolutiva se ha generado una enorme variedad de especies mediante procesos selectivos. Estos procesos de evolución gradual de especies se han visto interrumpidos por episodios de extinción masiva, provocados por cambios ambientales bruscos o agentes externos. La existencia de estos episodios de pérdida masiva de especies han sido seguidos de períodos de generación de nuevas especies, lo que nos lleva a preguntarnos: ¿por qué se generan tantas especies?

Ante todo, ¿qué es una especie? Aunque podría parecer sencillo, no es fácil responder a esta cuestión. Identificamos a las especies como la forma más útil de clasificar la diversidad. Una especie, según el llamado "concepto biológico de especie" de Ernst Mayr (el concepto más aceptado en la actualidad), es un conjunto de poblaciones en las que los individuos se pueden aparear entre sí, pero que están aisladas reproductivamente de otras poblaciones. Por lo tanto, las especies representan una realidad biológica: un conjunto de individuos que se reproducen entre sí, pero no con los de otras especies.

El nivel al que tienen lugar los procesos evolutivos es el de la población. Cada especie está compuesta de numerosas poblaciones locales, que mantienen un flujo mayor o menor de individuos que migran entre ellas. En las especies que se reproducen sexualmente cada individuo posee un

genotipo único dentro de cada población. La evolución ocurre porque se genera continuamente variación genética mediante mutación, porque existen diferencias importantes entre los individuos en su éxito reproductivo a lo largo del ciclo vital, y porque estas diferencias son hereditarias. Por lo tanto, los procesos de selección actúan sobre los individuos, y son de dos tipos. La *selección natural* es el proceso mediante el cual una proporción importante de los individuos de una población se elimina en cada generación debido a su incapacidad para sobrevivir, ya sea porque no pueden defenderse de los patógenos, de los predadores, o porque son vulnerables a condiciones ambientales adversas. Por otra parte, la *selección sexual* es el proceso mediante el cual determinados individuos de una población generan un número mayor de descendientes por su habilidad para conseguir pareja, ya sea porque son portadores de caracteres atractivos, o porque compiten exitosamente con individuos del mismo sexo (generalmente competición entre machos). Estas diferencias en el éxito reproductivo de los individuos generan diferencias importantes en la representación de su genotipo en generaciones sucesivas dentro de la población. La evolución es el cambio que se produce en cada población debido a la diferente representación genética de los individuos que la componen de generación en generación. El conocimiento de estos procesos en sí no explica por qué se han generado tantas especies diferentes, pues la evolución podría haber generado muchos individuos más o menos similares, capaces de aparearse entre sí.

La variedad de especies es tan enorme que la mayoría de ellas no ha sido descubierta aún. Linneo comenzó la catalogación de especies hace 250 años reconociendo unas 9.000 especies. Desde entonces se han descrito alrededor de 1,8 millones de especies. Estas especies se distribuyen de forma muy diferente entre los distintos grupos taxonómicos, siendo los más numerosos los insectos que representan aproximadamente el 57% del total. Los grupos mejor conocidos son las aves y los mamíferos: se han identificado unas 10.000 especies de aves y algo menos de 5.500 especies de mamíferos (IUCN 2008).

El desafío que tenemos por delante consiste en desarrollar métodos de estimación para calcular cuántas especies puede haber en el planeta. Aunque se han utilizado varios tipos de argumentación, podemos resumir diciendo que los cálculos más fiables dan un rango de especies que se encuentra entre los 3 y los 30 millones, aunque algunas estimaciones apuntan a cifras cercanas a los 100 millones. Nuestro desconocimiento no se reduce a los grupos peor conocidos. En el caso de los mamíferos,

se ha pasado de 4.000 especies a más de 5.000 en las dos últimas décadas, incluyendo descubrimientos tan sorprendentes como el de cuatro especies de grandes mamíferos en la década de los '90 en los montes Annamitas entre Vietnam y Laos, y hallazgos muy recientes de grandes marsupiales y roedores en Nueva Guinea.

Merece la pena destacar, para mamíferos, cómo está distribuida esta diversidad. De un total de 5.488 especies de mamíferos, en el grupo de los elefantes sólo hay 2 especies, en el de los caballos, rinocerontes y tapires hay 16 especies, en el de los carnívoros hay 282 especies (con 37 felinos), y en el grupo que incluye a cetáceos y artiodáctilos hay 325 especies. A su vez, hay un total de 411 especies de primates, 1.139 especies de murciélagos y la sorprendente cantidad de 2.221 especies de roedores, representando estos últimos el 40% del total de especies de mamíferos!

¿De cuántas especies conocemos la biología reproductiva? No deja de llamar la atención lo poco que en verdad sabemos de los aspectos reproductivos de las especies de mamíferos. Tal vez tengamos información bastante detallada de alrededor de 50 especies de mamíferos, la mayor parte de ellas modelos de laboratorio o especies de granja o de compañía, lo que representa sólo el 1% de las especies de mamíferos conocidas. En estudios comparativos de especies de felinos actualmente en curso en nuestro programa de investigación nos ha sorprendido comprobar la ausencia de información básica sobre morfología o fisiología de la reproducción masculina y femenina de muchas especies, incluyendo nuestro propio lince ibérico. Ciertamente toda esta falta de información es una considerable limitación pero, a su vez, representa una enorme oportunidad para nuevas generaciones de estudiosos de la biología animal. Esta información no es solo de interés desde el punto de vista académico, como avance de conocimientos fundamentales, desarrollando investigación motivada por la curiosidad, sino que es importante para poder desarrollar programas de conservación de especies en la naturaleza y en programas de cría en cautividad. Teniendo en cuenta que la reproducción es esencial para la continuación de las especies, este tema de estudios forma parte esencial de los programas de biología de la conservación, junto con estudios de sanidad, genética, manejo o alimentación.

Hemos notado, pues, que existe una enorme diversidad de formas de vida. Podemos preguntarnos a continuación cómo se distribuye.

¿DÓNDE ESTÁ LA BIODIVERSIDAD?

Un estudio crucial de Norman Myers y colaboradores realizado hace 20 años identificó 10 áreas de selva tropical que se designaron como "zonas calientes" (*hotspots*) de biodiversidad, y que estaban caracterizadas por un nivel excepcional de endemismos de plantas y por niveles elevados de pérdida de hábitat. Con posterioridad se identificaron *hotspots* adicionales y una revisión global realizada por la organización *Conservation International* condujo al reconocimiento de 25 *hotspots* de biodiversidad que se presentaron en un artículo publicado por la revista *Nature* (Myers et al 2000). Estas áreas poseen, en forma conjunta, el 44% de todas las plantas endémicas y el 35% de los vertebrados terrestres en un área que antiguamente ocupaba el 11.8% de la superficie del planeta. En la actualidad estas áreas se han reducido marcadamente en relación a la superficie original, de modo que toda esta diversidad biológica ahora se encuentra en tan sólo 1.4% de la superficie del planeta.

Un nuevo análisis realizado recientemente (Mittermeier et al. 2005) ha permitido identificar 6 áreas que previamente no se habían caracterizado y, además, ha llevado a proponer que 2 áreas han de ser subdivididas ya que contienen biotas diferentes. Este nuevo análisis eleva entonces a 34 el número de *hotspots* de biodiversidad.

Estos puntos calientes concentran el 60% de todas las especies y al menos el 65% de las especies listadas en el Libro Rojo de Especies Amenazadas (IUCN 2008). En estas zonas existe pues la mayor proporción de especies amenazadas por lo que su conservación requiere medidas de urgencia. Puesto que nuestra propia especie tiende a comportarse de forma similar a otras especies en la elección de sus hábitats preferidos, dichas zonas también concentran una importante proporción de la población humana mundial (20%) y el crecimiento poblacional en ellas es mayor que en otras partes del mundo (Sachs et al. 2009). Se estima que si dicha actividad humana continúa al mismo ritmo, la mayor parte de las especies de los *hotspots* desaparecerán en las próximas dos décadas.

Entre los puntos calientes se encuentra la Cuenca Mediterránea, que se extiende desde Portugal hasta Jordania y desde el norte de Italia hasta Marruecos, rodeando el mar Mediterráneo. En ella se encuentra gran parte de la península Ibérica, las Islas Baleares y las Islas Canarias. Este *hotspot* cuenta con el dudoso privilegio de ser el que contiene la mayor proporción de especies en peligro de extinción debido a que, de las

diversas zonas calientes, es la que ha sido ocupada por poblaciones humanas desde hace más tiempo.

En la Cuenca Mediterránea habitan más de 220 especies de mamíferos terrestres, de los cuales 25 (11%) son endémicos. Algunos mamíferos grandes, como el león y el orix de cimitarra, se han extinguido en esta región en los últimos miles de años como resultado de la alteración de hábitat causada por humanos y por la presión de caza. Entre las "especies bandera" de esta región destacan la foca monje mediterránea, de la que quedan menos de 400 individuos en libertad, el mono (macaco) de Gibraltar, el único primate de Europa, el ciervo de Berbería, y el lince ibérico, el felino más amenazado del planeta con menos de 250 individuos en libertad.

España es un país privilegiado en cuanto a biodiversidad. Pero esto conlleva una enorme responsabilidad respecto a su protección. Tanto en el grupo de los vertebrados como en el de los invertebrados, en España habitan más del 50% de todas las especies presentes en Europa. La riqueza en endemismos de fauna es enorme, particularmente en Canarias. De las 6.893 especies animales presentes, un 44% son endémicas. Además, España es un punto crucial para migración de animales, lo que supone una responsabilidad adicional que nos confiere una dimensión de guardianes de la fauna Europea en general. Por lo tanto, España es responsable de la mayor diversidad biológica en Europa tanto en cuanto a número de especies como a diversidad. De las 113 especies de mamíferos españoles (sin considerar las cinco introducidas recientemente), el 52% se han incluido dentro de alguna categoría de amenaza: de éstas, 2% se encuentran extinguidas, 20% están sometidas a riesgos importantes (en peligro o vulnerables) y 10% necesitan una vigilancia especial.

Las especies de mamíferos, al igual que las especies de otros grupos taxonómicos, están distribuidas en forma desigual entre géneros, familias y órdenes (Davies et al 2008). Como comentaba anteriormente, los roedores representan el 40% de las casi 5.500 especies de mamíferos, mientras que sólo hay 2 especies de elefantes. ¿Por qué es esto así? La evidencia sugiere que los linajes han tenido (y tienen) diferente propensión para diversificarse. Estas desigualdades son frecuentes en el Árbol de la Vida (Purvis 1996, Mooers y Heard 1997) y nos hacen pensar sobre las características que pueden ser responsables. Los análisis filogenéticos han revelado que tanto un elevado número de crías y una alta abundancia están asociados con mayor riqueza en el número de especies en comparaciones de clados hermanos en primates,

carnívoros, murciélagos y marsupiales, mientras que el tamaño corporal y el período de gestación predice la riqueza en número de especies entre los carnívoros (Isaac et al. 2005).

La distribución geográfica también es desigual, con una diversidad mayor de especies de mamíferos en los trópicos y un gradiente de diversidad que varía según la latitud (Weir y Schluter 2007, Davies et al. 2008, Schipper et al. 2008). En los trópicos, la riqueza en el número de especies alcanza su máximo en la Amazonia (en la base de los Andes), en el Gran Valle del Rift de Africa, y en una región en forma de arco que va desde los Himalayas hasta el sudeste asiático (Davies et al. 2008, Schipper et al. 2008).

¿QUÉ AMENAZA ESTA BIODIVERSIDAD?

La Union Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) estudia cómo una serie de factores afecta a las distintas especies de vertebrados. Sobre esta base clasifica a las especies según diferentes categorías de riesgo: "de menor preocupación" (LC), "casi amenazada" (NT), "vulnerable" (VU), "en peligro" (EN), "en peligro crítico" (CR), "extinguida en la naturaleza" (EW) y "extinguida" (EX). La evaluación de la IUCN, compendiada en la Lista Roja de Especies Amenazadas (IUCN 2008), muestra para los mamíferos un total de 76 especies que se han extinguido en su área nativa desde el año 1500. Además, el 22% de las especies evaluadas se encuentran en alguna categoría de amenaza (VU, EN, o CR) y sólo aproximadamente la mitad de las especies está fuera de alguna categoría de preocupación.

En aves, un 12% de especies están amenazadas. Merece la pena recordar que existe actualmente alrededor del doble de especies de aves que de mamíferos, mientras que las especies de aves con algún grado de amenaza representan sólo la mitad que las de mamíferos. Por ello, puede concluirse que la situación de los mamíferos es grave. En reptiles, sólo se ha podido evaluar una proporción baja de especies (16%) pero de las que se han evaluado, se ha encontrado una proporción alta (31%) de especies amenazadas. En anfibios, se han evaluado casi todas las especies existentes (98%) y el hecho de que el 30% se encuentre en alguna categoría de amenaza es realmente preocupante. Por último, en peces sólo una proporción muy baja (11%) de especies ha sido evaluada pero, aquí también, la proporción amenazada es alta (37%).

Si tuvieramos que destacar algunas especies que están particularmente amenazadas, cabe mencionar una lista de 10 especies que pueden desaparecer en los próximos 10 años, según una lista compilada recientemente por la revista *Scientific American* (número del 21 de mayo de 2007). En esta lista, que incluye al lince ibérico, orangután de Sumatra, wombat de nariz peluda del norte, camello bactriano, gacela dama, muerciélago de las Seychelles, aligador de China rinoceronte negro, tamarin de varios colores, y tortuga laud, existen dos especies (el lince ibérico y la gacela dama) de particular relevancia ya que su supervivencia nos toca muy de cerca. En el caso de la gacela dama, una subespecie (la gacela Mohor) que está ya extinguida en la naturaleza es objeto de atención a través de un programa de cría en cautividad que gestiona el CSIC en la Estación Experimental de Zonas Áridas de Almería. Estas gacelas, junto con otras dos especies (la gacela de Cuvier y la gacela dorcas) fueron traídas desde el norte de África entre 1971 y 1975. El lince ibérico es motivo de máximo interés a nivel nacional y en varias comunidades autónomas tanto en programas de conservación *in situ* como a través de un programa de cría en cautividad.

Una vez que hemos repasado unas cuantas cifras relacionadas con diversidad de especies y su grado de amenaza, cabe preguntarnos, primero, si realmente debemos preocuparnos por estos números y la situación que hemos revisado. Después de todo, las especies surgen y se extinguen como parte de un proceso natural. Han habido ya cinco extinciones masivas a lo largo de la historia de la vida sobre este planeta. Por tanto ¿puede ser este declive que estamos observando ahora uno más de estos procesos naturales? Para intentar responder a esta pregunta repasemos, por un momento, qué está ocasionando la pérdida de diversidad actual.

El ambiente terrestre está en la actualidad dominada por la especie humana. Se calcula que entre un cuarto y un tercio del total de la superficie terrestre se ha transformado para uso humano (Vitousek et al. 1997). Los principales factores, relacionados con la actividad humana, que en la actualidad afectan a la biodiversidad, son la pérdida y la fragmentación del hábitat (probablemente el factor más importante), la invasión de las llamadas "especies alienígenas", la sobre-explotación, las enfermedades, la contaminación ambiental y el cambio climático.

La historia de la humanidad ha consistido en gran medida en un proceso de expansión a lo largo y ancho del planeta, comenzando con las sucesivas oleadas de migración de nuestros ancestros desde África hacia Asia y Europa, y las incursiones a Australia y América. Unos pocos

ejemplos, provenientes de la colonización de islas, nos pueden ilustrar la situación pasada y revelar cómo se han desarrollado estas oleadas de migración.

La llegada de los aborígenes a Australia condujo a la extinción de aves no voladoras gigantes de 100 kilos de peso, lagartos monitores de 7 metros de longitud, canguros de enorme tamaño y una gran tortuga terrestre. Los aborígenes llegaron desde Indonesia hace 53.000 - 60.000 años, y poco después (hace 40.000 años) la megafauna había desaparecido. No sobrevivió ni una sola especie de tamaño superior al de un ser humano, y se extinguieron muchos otros mamíferos, reptiles y aves incapaces de volar, de entre 1 y 50 kilos de peso. Los colonos europeos llegaron mucho después y tan sólo han llevado este proceso de extinción unos pasos más allá.

La colonización de Polinesia supuso una oleada de pérdida de especies únicas. Los primeros viajeros polinesios desembarcaron en Hawaii hacia el año 400, encontrando una enorme diversidad de especies únicas en todo el mundo. Los polinesios cazaron aves no voladoras hasta su extinción, así como todas las especies que eran presa fácil por su vulnerabilidad. Un efecto igualmente pernicioso tuvieron las especies que introdujeron los polinesios: cerdos y ratas. Especialmente destructivo fue el cerdo de los polinesios que contribuyó a la extinción de numerosas especies al consumir sus huevos, destruyendo bosques y excavando charcas donde crían los mosquitos que transmiten malaria a las aves nativas, genéticamente desprotegidas.

En Madagascar el proceso de evolución de especies en aislamiento había conducido a la aparición de especies singulares. Los pobladores humanos procedentes de Indonesia, alrededor del año 700, ocasionaron la desaparición de tortugas con un caparazón de hasta 120 cm de ancho, media docena de especies de aves elefante, cuyo tamaño iba desde el de un avestruz hasta la mayor que medía 3 m de altura y pesaba media tonelada. También desaparecieron lemures gigantes, incluyendo una especie terrestre mayor que un gorila macho adulto. En resumen, la llegada de pobladores humanos coincide con la desaparición simultánea de casi todas las especies de reptiles, aves y mamíferos de más de 10 kilos de peso.

Por tanto, la pérdida de especies como consecuencia de la sobre-explotación de recursos ha sido una constante a lo largo de nuestra historia. La crisis de la biodiversidad actual no es la consecuencia de un cambio de actitud. Se trata de un problema de escala. Recientemente la

población humana ha experimentado un crecimiento demográfico enorme que, debido a la utilización de los recursos naturales que conlleva, nos acerca peligrosamente al límite de lo que los recursos naturales del planeta pueden soportar. En el año 1800 había 1.000 millones de personas en el mundo. En 1999 se alcanzó la cifra de 6.000 millones de personas y la población humana ha continuado aumentando añadiendo 200.000 personas cada día. Se calcula que a mediados de este siglo habrá más de 8.000 millones de personas en el mundo. Las personas nacidas en 1950 fueron las primeras que vieron como la población mundial se duplicaba durante su vida (desde 2.500 millones hasta más de 6.000 millones). David Attenborough, quien nació en 1926, ha calculado que durante su vida la población mundial se ha triplicado. Para ilustrar hasta qué punto el crecimiento demográfico reciente ha supuesto un salto cualitativo respecto al tamaño de la población humana en épocas anteriores, baste decir que durante el siglo XX se incorporaron más personas al mundo que en toda la historia humana previa.

La cantidad de gente que puede soportar el planeta depende en parte del nivel de consumo. La huella ecológica, es decir, la cantidad promedio de tierra productiva y de mar apropiados por cada persona para obtener alimento, agua, vivienda, energía, transporte, comercio y absorción de residuos, es de aproximadamente una hectárea en países en vías de desarrollo, pero es de 9,6 hectáreas en Estados Unidos. Para que todas las personas que hoy habitan en el mundo alcanzasen el nivel de consumo actual en los Estados Unidos, con la tecnología existente, harían falta otros cuatro planetas Tierra.

Se han realizado muchos análisis sobre el impacto que tienen sobre el ambiente factores como la población humana, la agricultura y ganadería, las industrias, las fuentes de energía, los viajes en avión, o el tipo de coche que conducimos. Una dimensión adicional la aporta un estudio reciente sobre el impacto que ocasionan los animales de compañía del hombre (y de la mujer) sobre la "huella de carbono" (Vale y Vale 2009). ¡Los números son en verdad alarmantes! Analizando los ingredientes de las comidas para mascotas, se ha calculado que un perro de mediano tamaño come a lo largo de un año alrededor de 164 kilos de carne y 95 kilos de cereales. Teniendo en cuenta la superficie de terreno necesaria para generar carne y cereales, dicho perro mediano tiene una huella de algo menos de 1 hectárea (0.84 hectáreas, exactamente). En comparación, un todoterreno (Toyota Land Cruiser 4,6 litros), con unos modestos 10.000 km por año, tiene una huella ecológica de 0.41 hectáreas, menos de la mitad que la del perro mediano. Parece ser, que

tener un perro es una cierta extravagancia... Siguiendo con los análisis, un gato tienen una huella ecológica de 0.15 hectáreas (un poco menor a la de un Volkswagen Golf), mientras que un hamster representa 0.014 hectáreas cada uno (dos hamsters serían el equivalente a una TV de plasma). Hasta los peces tienen su huella ecológica, con un goldfish equivalente a dos teléfonos móviles. Para dar una dimensión de esta situación, hemos de considerar que en Estados Unidos hay 76 millones de gatos y 61 millones de perros. Si tenemos en cuenta la población de gatos estimada en los 10 países con mayor población de gatos, se ha calculado que el terreno necesario sólo para alimentar estos gatos es de 400.000 kilómetros cuadrados, una vez y media el tamaño de Nueva Zelanda. Una superficie equivalente a 5 veces el tamaño de Nueva Zelanda hace falta para alimentar a los perros en los 10 países con mayor población de estas mascotas. Y todo esto sin siquiera considerar los datos de las cantidades de animales silvestres que matan los gatos y los perros, además del impacto ambiental de sus heces. Por tanto, posiblemente tendremos que sopesar cuidadosamente el impacto de tener mascotas, tal vez tanto, o más, que al comprar un coche! Este estudio ilustra claramente el enorme efecto medioambiental que pueden generar nuestros hábitos de vida que asumimos como inofensivos.

¿Existe algún patrón en la pérdida de biodiversidad que pueda analizarse a nivel global? ¿Puede ello ayudar a entender el proceso que afecta a la pérdida de biodiversidad? Estudios comparativos han mostrado que los riesgos de extinción no se producen al azar (Davies et al. 2008). En mamíferos, los riesgos de extinción muestran patrones tanto geográficos como filogenéticos. La prevalencia del riesgo es mayor en el Viejo Mundo que en el Nuevo Mundo, y mayor en islas que en continentes (Davies et al. 2008). Varía también entre linajes de mamíferos con un riesgo mayor (que los valores promedios) en primates y perisodáctilos, y un riesgo menor en roedores.

Siendo estos factores de origen humano, es por tanto inevitable que deban generar una preocupación y, con ello, una responsabilidad que ha de ir acompañada de la consiguiente búsqueda de soluciones para evitar que el declive de poblaciones naturales siga produciéndose. Sobre esta base, cabe preguntarse entonces qué podemos hacer para detener y, de ser posible, revertir, esta situación.

¿QUÉ PUEDE HACERSE PARA DETENER Y EVITAR LA PÉRDIDA DE DIVERSIDAD BIOLÓGICA?

Probablemente todos estemos de acuerdo en que la mejor estrategia para la conservación de la diversidad biológica es la preservación del medio natural. Aún así, debemos reconocer que el deterioro del hábitat no siempre es la causa del declive de ciertas poblaciones. Por ejemplo, puede existir una elevada presión sobre algunas especies causada por la caza, como puede suceder en ungulados, o puede haber un descenso en las presas que haya sido ocasionado por enfermedades infecciosas, como en el caso de los felinos.

Por ello, la conservación del hábitat (o conservación *in situ*) puede complementarse con otras acciones de conservación que impliquen actuaciones más directas sobre las especies animales o de obtención, almacenamiento y uso de materiales biológicos derivadas de estas especies. En el segundo caso (conocido como conservación *ex situ*) se pueden implementar programas de cría en cautividad y establecer bancos de recursos genéticos para conservar biomateriales. Es importante tener presente que ambos, cría en cautividad y bancos de recursos genéticos, no necesariamente van juntos. Hay esfuerzos de conservación, como los que desarrolla el *Wildlife Biological Resource Centre* de Sudáfrica, que incluye un banco de recursos genéticos de poblaciones naturales, pero que no recurre a la cría en cautividad. Pero sí es importante destacar que el establecimiento de un repositorio de muestras biológicas en un banco de recursos genéticos para conservar el máximo de diversidad biológica es una iniciativa esencial que debe emplearse en todos los casos que sea posible y antes de que el descenso de la diversidad biológica de las especies que interesa conservar sea manifiesto.

Ambos tipos de esfuerzos, la conservación *in situ*, y la conservación *ex situ*, no deben verse como alternativas excluyentes que, además compiten por los mismos recursos. Por el contrario, deben plantearse como actividades complementarias, que interactúan, que se enriquecen mutuamente, y que permiten abordar esfuerzos de conservación más potentes y con más posibilidades de éxito. Tenemos ejemplos actuales como los programas de conservación del lince ibérico, que nos están mostrando las enormes ventajas de avanzar en estos dos frentes en forma conjunta.

¿Qué objetivos tiene la conservación *ex situ*? Puede pensarse en esta actividad como un medio para generar animales para reintroducciones.

Este sin duda ha sido el principal fin durante muchos años en diversos programas de cría en cautividad que se han implementado principalmente en zoológicos y que han contado con el apoyo de diversos grupos de investigación en reproducción asistida de especies amenazadas. Sin embargo, existen limitaciones al flujo génico y de animales entre instituciones, y por tanto, al número de individuos que se pueden generar en estas condiciones. Por otra parte, existen dudas sobre el éxito de los intentos de reintroducción ya que sólo una proporción muy baja tiene éxito.

Se han desarrollado varios programas de cría en cautividad destinados específicamente a la generación de animales para la reintroducción. Entre ellos, los más destacados son los que se han centrado en el turón de patas negras, el orix de Arabia o el oso panda gigante y, en España, los que se han desarrollado para la gacela dama, el gato silvestre, el lince ibérico y el visón europeo. Estos programas han sido concretamente establecidos con este propósito, dotándoseles de instalaciones, personal y recursos.

Un aspecto importante que se ha puesto en evidencia en los últimos años, es que la cría en cautividad genera una excelente oportunidad para estudiar la biología de una especie en condiciones en las que no es posible estudiarla en la naturaleza. Por este motivo, un aspecto esencial que reconocemos hoy como parte de los programas de cría en cautividad, y del establecimiento de bancos de recursos genéticos, es el estudio de la biología de la reproducción de las especies silvestres amenazadas.

PAPEL DE LA CONSANGUINIDAD EN EL DECLIVE DE POBLACIONES ANIMALES

El tamaño de una población puede disminuir por un incremento de las tasas de mortalidad, o porque los individuos no se reproducen, o por ambos motivos. La importancia relativa del incremento de mortalidad y del descenso de la tasa de fecundidad variará dependiendo de las especies o de las poblaciones. Existen muchos estudios en poblaciones naturales que se han centrado en los descensos de fertilidad debidos a disminución de la reproducción de la hembra. El éxito reproductivo de los machos es más difícil de medir ya que las hembras frecuentemente se aparean con más de un macho y no es fácil establecer paternidades (Gomendio et al. 1998). Aún cuando las hembras se aparean con un solo

macho, es difícil distinguir efectos masculinos o femeninos. Por ello existen pocos estudios que hayan podido evaluar el papel de la fertilidad masculina en declives de poblaciones.

La consanguinidad resulta del apareamiento de individuos cercanamente relacionados y es posible que se vuelva más frecuente cuando disminuye el tamaño de una población. Por este motivo, la consanguinidad será prevalente en poblaciones pequeñas y aisladas de especies amenazadas y, además, también en programas de cría en cautividad con un número reducido de fundadores.

La descendencia de individuos relacionados se caracteriza por un incremento de homocigosidad y una reducción de la eficacia biológica, un fenómeno conocido como depresión consanguínea (Charlesworth y Charlesworth 1987). La depresión por consanguinidad se ha reconocido desde hace mucho tiempo en animales domésticos y cautivos (Charlesworth y Charlesworth 1987, Thornhill 1993), siendo el efecto más observado el de un aumento de la mortalidad juvenil (Ralls et al. 1979, Ralls y Ballou 1986). Los estudios realizados en poblaciones naturales, en los que ha sido posible reconstruir las genealogías, han mostrado que la consanguinidad reduce el éxito reproductivo femenino y la supervivencia de los juveniles y adultos (Keller 1998, Keller et al. 2002).

La magnitud de la depresión por consanguinidad puede depender de las condiciones ambientales (Keller et al. 1994, 2002). Esto es así, hasta el punto en que en ocasiones sólo es posible detectar una depresión por consanguinidad cuando las condiciones ambientales son pobres. Por ello, algunas poblaciones pueden parecer saludables pero muestran el efecto de la consanguinidad cuando las condiciones se deterioran. Los efectos de la consanguinidad pueden llevar de hecho a la extinción de poblaciones naturales, como se ha observado en una gran metapoblación de mariposas (Saccheri et al. 1998). Por todo esto, a medida que las poblaciones se vuelven más y más fragmentadas en diferentes partes del mundo, la incidencia de la consanguinidad probablemente aumentará y puede ser particularmente pronunciada en especies amenazadas ya que tienen un número reducido de individuos.

EFFECTOS DE LA CONSANGUINIDAD SOBRE LA REPRODUCCIÓN

Sobre la base de las dificultades existentes para analizar el éxito reproductivo masculino, se ha prestado más atención a los efectos de la

consanguinidad sobre la fisiología reproductora del macho y, en particular, a la calidad seminal. Los trabajos pioneros de David Wildt y Stephen O'Brien en carnívoros llamaron la atención por primera vez sobre la posibilidad de que la baja variación genética podría estar asociada a una baja calidad seminal (O'Brien et al. 1983, 1985, 1987, Wildt et al. 1983, 1987a,b, Menotti-Raymond y O'Brien 1993). Los estudios liderados por estos investigadores compararon poblaciones de guepardos y leones que vivían en libertad y en cautividad. En guepardos, estos autores concluyeron que un cuello de botella reciente podría ser responsable de pérdida de variación genética que, a su vez, ha causado un descenso en la calidad seminal y que podría estar conduciendo a la especie a la extinción. Estos estudios fueron posteriormente criticados teniendo en cuenta que la comparación entre poblaciones no permite controlar factores que pueden estar afectando los resultados y que no es por tanto correcto establecer de este modo relaciones causales. Además, se puntualizó que la variabilidad genética se midió examinando unos pocos loci de alozimas que podían no ser buenos indicadores de heterocigosidad a nivel genómico (Caro y Laurenson 1994, Caughley 1994, Merola 1994, May 1995). El debate continuó durante un cierto tiempo y se llegó incluso a sugerir que la depresión por consanguinidad raramente se observa en poblaciones naturales y que, por tanto, tiene una relevancia mínima para la conservación (Lande 1993).

Nuestro grupo de investigación decidió abordar este problema, concentrándonos en poblaciones de tres especies de gacelas amenazadas que tienen registros genealógicos detallados desde que se establecieron los programas de cría hace más de 30 años (Roldan et al. 2006). Las poblaciones de estas tres especies difieren en los niveles de consanguinidad porque difieren en el tamaño de las poblaciones fundadoras (Ruiz-López et al. 2009). Nuestros estudios encontraron que los machos con niveles de consanguinidad elevados experimentan una reducción en la proporción de espermatozoides móviles, en la proporción de espermatozoides normales y en la proporción de espermatozoides con acrosoma intacto, caracteres todos que son importantes para el éxito de la fecundación (Cassinello et al. 1998, Roldan et al. 1998, Gomendio et al. 2000). De todos modos, esto sólo es evidente para la especie con los niveles de consanguinidad más elevados y no en las otras dos especies que tienen niveles de consanguinidad intermedios o bajos. Esto podría ser debido a que los efectos deletéreos de la consanguinidad sólo son detectables cuando se sobrepasa un umbral de consanguinidad, o por una diferencia en la composición genética de las poblaciones fundadoras.

Estudios subsiguientes de otros investigadores han confirmado nuestras observaciones. En un análisis realizado en tres linajes de lobo gris mexicano, examinando coeficiente de consanguinidad y parámetros del semen, se ha encontrado un efecto significativo de la consanguinidad sobre la motilidad espermática y la proporción de espermatozoides normales y, además, se observó una relación entre estos parámetros y el éxito reproductivo (Asa et al. 2007). Por otra parte, la calidad del semen de machos resultantes de la cruce entre linajes fue similar a la de machos genéricos (no consanguíneos). Sin embargo, el semen de machos provenientes de retro-cruzas tenía una calidad extremadamente mala lo que sugiere que aunque la calidad mejora cuando se mezclan linajes, la reducción concomitante de consanguinidad no elimina los alelos deletéreos.

La depresión por consanguinidad parece ser más moderada en animales que están en cautividad que en aquellos que están en libertad (Jimenez et al. 1994). Por ello, es posible que niveles similares de consanguinidad tengan efectos más marcados en poblaciones naturales. Un estudio en conejos silvestres ha encontrado que una heterocigosidad reducida está asociada a una elevada proporción de espermatozoides anormales y a una disminución del tamaño de los testículos (Gage et al. 2006). Esta relación causal entre heterocigosidad y calidad seminal ha sido puesta en duda porque no se ha tenido en cuenta la estratificación poblacional, ya que cuando se comparan individuos de una misma población, la relación no se manifestó en algunas poblaciones (Slate y Pemberton 2007). En un estudio comparativo reciente en mamíferos (Fitzpatrick et al. 2009) se ha encontrado que en especies amenazadas existe una relación entre heterocigosidad y proporción de espermatozoides anormales y motilidad, dos parámetros esenciales para la fertilidad, mientras que dicha relación no se observa entre especies que no sufren ningún riesgo de amenaza. Si bien este análisis apoya la evidencia previa de una relación entre heterocigosidad y la calidad seminal, tiene algunos problemas relacionados con el hecho de que los análisis incluyen principalmente carnívoros y que se consideran como poblaciones diferentes varias que en realidad corresponden a una misma especie (por ejemplo, poblaciones de león asiático, león del cráter Ngorongoro y león del Serengeti). Queda por tanto pendiente realizar más estudios sobre especies silvestres en libertad, particularmente aquellas amenazadas.

Debido a que algunos de los parámetros espermáticos que se ven afectados por la consanguinidad son cruciales para la fertilidad masculina, es muy posible que los machos consanguíneos experimenten

una fertilidad reducida. Esto es claro en casos extremos como el de la pantera de Florida donde los machos muestran una proporción de espermatozoides anormales extremadamente alta (superior al 90%) y otros problemas reproductivos tales como criptorquidismo (Roelke et al. 1993, Barone et al. 1994). Los machos de lince ibérico también tienen un alta proporción de espermatozoides anormales, como comentaremos más adelante, pero no está claro aún si esto está asociado a un incremento de la consanguinidad.

En algunos experimentos realizados en cautividad, el descenso en los parámetros espermáticos asociados con consanguinidad no se han visto asociados con el éxito reproductor masculino (Margulis y Walsh 2002). Sin embargo, cuando se aparean machos consanguíneos y exocriados con las mismas hembras, el éxito reproductivo de los machos exocriados es mucho mayor (Konior et al. 2005, Fritzsche et al. 2006). Estos resultados tienen implicaciones importantes, ya que los machos consanguíneos con fertilidad reducida pueden no tener fallos de reproducción en condiciones benignas cuando no hay competición espermática, pero puede que no tengan oportunidad de fecundar cuando estén en competición con eyaculados de machos menos consanguíneos.

Hasta el presente, la mayor parte de los estudios han cuantificado sólo unos pocos parámetros espermáticos importantes para el éxito en la fecundación. Estos parámetros incluyen número de espermatozoides, motilidad, viabilidad, morfología e integridad acrosómica. Los estudios futuros tendrán que ampliar esta lista y examinar la influencia de la consanguinidad sobre aspectos de la función espermática tales como la supervivencia, capacitación, reacción acrosómica y la interacción espermatozoide-oocito. La evidencia actual indica que algunos parámetros seminales básicos, tales como la proporción de espermatozoides normales, pueden ser el reflejo de algunos aspectos de la función espermática. Por ejemplo, los espermatozoides normales de machos con una alta proporción de espermatozoides anormales están comprometidos en su capacidad de experimentar la capacitación y la reacción acrosómica, y de penetrar la zona pelúcida (Pukazhenti et al. 2006b). De particular interés será investigar si la consanguinidad afecta a la integridad del ADN espermático, ya que este rasgo podría afectar a la viabilidad del embrión (Evenson et al. 2007).

Finalmente, es importante destacar que los efectos negativos de la consanguinidad pueden revertirse rápidamente mediante la introducción de nuevos genes en una población consanguínea (por ejemplo: Madsen et al. 1999). Este intercambio de material genético puede lograrse

mediante la translocación de individuos entre poblaciones, o mediante el intercambio de gametos a través de tecnologías reproductivas.

ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LA BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN EN MAMÍFEROS SILVESTRES AMENAZADOS

¿Cómo podemos abordar estudios de biología fundamental en mamíferos silvestres, particularmente si están amenazados? No es fácil realizar estudios de fisiología en animales en libertad. Es posible en la actualidad hacer seguimiento de individuos mediante telemetría o conocer cambios endocrinos mediante análisis de hormonas en heces, o realizar caracterizaciones de aspectos reproductivos en animales provenientes de cacerías o mediante trampeos. Es posible también hacer análisis puntuales de parámetros seminales en animales en libertad que son capturados y anestesiados. Pero hay varios límites a los conocimientos que pueden obtenerse en estas condiciones. ¿Es posible por tanto aprovechar la oportunidad que nos ofrece la cría en cautividad? ¿Podemos, aprovechando estas condiciones, realizar estudios científicos sobre la reproducción de especies amenazadas? Ciertamente. Aunque tendremos que tener en cuenta las condiciones en las que se encuentran los animales. Con este comentario, quiero enfatizar también la necesidad de realizar dichos estudios empleando el método científico con el fin de generar evidencia que sea útil tanto para ampliar nuestros conocimientos como para poder tomar decisiones a diversos niveles de gestión. Reconozco, junto con muchos otros investigadores, que es particularmente difícil disponer de un número adecuado de individuos con el fin de "planificar" trabajos experimentales con especies amenazadas y que, en muchos ocasiones, el acceso a los animales es "oportunistas". De todos modos, es prioritario que la obtención de la información sea sistemática, cuidadosa, con el propósito de examinar hipótesis razonables. No ganamos mucho si la información es anecdótica y poco se avanza aunque conozcamos la historia detallada de cada animal en un programa de cría en cautividad si no usamos esa información para comprender procesos generales con el fin de proveer evidencia que nos sirva para tomar decisiones.

Aún en el caso de trabajar con animales en programas de cría en cautividad, las condiciones no siempre son fáciles. No es lo mismo que trabajar en un laboratorio bien organizado y con abundante equipo, con animales de laboratorio, o con especies domésticas que estén alojadas en una granja cercana. Los animales de un programa de cría en

cautividad, sean ungulados o carnívoros, no son "mansos", y no deben serlo, ya que se pretende en la mayor parte de las ocasiones que ellos o sus descendientes sean adecuados para reintroducciones. Por ello, la captura y el manejo no son sencillos. La toma de muestras ha de ser lo menos disruptiva posible y, para realizar estudios que impliquen análisis de muestras en fresco, será necesario disponer de un laboratorio y equipamiento. No es conveniente, o posible, organizar un laboratorio en cada centro de un programa de cría, y por ello se ha de emplear un "laboratorio ambulante" que pueda montarse y desmontarse en cada sitio para analizar y criopreservar las muestras. Esto además nos permite tener la posibilidad de organizar un laboratorio sencillo en el campo cuando surge la oportunidad de mostrar animales en libertad.

Con el fin de sobreponerse a estas limitaciones se emplean especies cercanas como modelo. Existen abundantes ejemplos de programas de investigación sobre ungulados y felinos amenazados que recurren a bovinos u ovinos domésticos, o a gatos, respectivamente, para poder desarrollar experimentación en condiciones más controladas. En nuestra propia experiencia, el uso de estos modelos ha resultado muy adecuado para avanzar en la generación de conocimientos básicos, en el desarrollo o adecuación de tecnologías reproductivas y, además, en el entrenamiento de personal investigador o técnico. En el caso del gato doméstico, que hemos empleado como modelo para nuestras especies de interés, el lince ibérico, y los felinos sudamericanos, hemos podido establecer acuerdos de cooperación con una red amplia de clínicas veterinarias de Madrid y alrededores que, desinteresadamente, nos proveen material provenientes de castraciones. No quiero dejar pasar la oportunidad de agradecer a todas las personas de estas clínicas que colaboran con nuestro trabajo. La oportunidad de acceder a este material, tanto de machos como de hembras, nos ha permitido realizar una caracterización de parámetros reproductivos de la población de gatos de Madrid, valorar cambios en estos parámetros a lo largo del año y compararlos con los resultados obtenidos en otras ciudades como Berlin o Washington. Toda información, además de servir como modelo para estudios de lince o de pumas y jaguares, es de gran valor para los gatos mismos y creemos que ésta es la primera caracterización de la reproducción de los gatos de Madrid.

A pesar de las dificultades y las limitaciones mencionadas, existen estudios reproductivos de especies silvestres. Hemos tenido la posibilidad de desarrollar un proyecto sobre aspectos reproductivos de machos de ciervo ibérico de poblaciones naturales, en colaboración con

Julián Garde y su equipo, que nos ha permitido evaluar calidad seminal y factores que pueden afectarla. En primer lugar, hemos encontrado una elevada variabilidad entre los machos de estas poblaciones en cuanto a los parámetros espermáticos (cantidad, calidad, y en dimensiones de los espermatozoides) y también en su función (Malo et al 2005, 2006, Gomendio et al. 2006, 2007). Hemos encontrado también que los machos difieren marcadamente en las tasas de fertilidad (Malo et al 2005), un resultado que se opone a la idea generalizada de que todos los machos en poblaciones naturales han de tener unas tasas de fertilidad uniformemente altas debido a la fuerza de la selección sobre este carácter. Hemos visto que la fertilidad de los machos de ciervo está determinada por parámetros espermáticos específicos, que son la velocidad de natación de los espermatozoides y la proporción de espermatozoides normales (Malo et al. 2005). Los espermatozoides de los diferentes machos también difieren en su capacidad de sobrevivir a los procesos de criopreservación, en forma similar a lo que se ha visto en otras especies (Loskutoff et al. 1996, Yu et al. 2002)

Cuando se identifica una especie para conservación es necesario iniciar estudios para una caracterización de parámetros reproductivos y los factores que los afectan. Esta información será importante para conocer la variación en la producción y calidad espermática y ello, a su vez, será importante para evaluar los límites potenciales para una posible programación de recolección de semen a lo largo del año. Además, en el marco del desarrollo y uso de técnicas de reproducción asistida, esta información será valiosa para estimar las muestras que se almacenar en un banco de recursos genéticos y el tiempo, esfuerzo y financiación requeridos para obtenerlos.

La posibilidad de contar con la participación de diversos zoológicos y centros de cría diseñados especialmente para una especie concreta, permite abordar estudios sobre varios aspectos de la biología de una especie que van más allá del campo de la reproducción. Un ejemplo reciente, abordado desde la etapa inicial de planificación con un enfoque multidisciplinar, es el programa de cría en cautividad del lince ibérico. Desde sus inicio, a partir de la primera reunión en el Museo Nacional de Ciencias Naturales en 1999, el plan de cría en cautividad contó con el asesoramiento de un amplio espectro de profesionales expertos en áreas de manejo, nutrición, reproducción, sanidad, y aspectos clínicos, y representantes de varias comunidades autónomas que en su momento podrían estar involucradas en restauración de habitat y reintroducción de los individuos resultantes (Vargas et al. 2007). La puesta en marcha del

programa de cría en cautividad en noviembre de 2003 también se caracterizó por un enfoque similar, con la convocatoria a un grupo amplio de expertos y responsables de diversas áreas de especialidad en las que se debía avanzar. La actividad de los diversos grupos fue desarrollando protocolos de trabajo y resultados de investigación que ha permitido generar una enorme riqueza de conocimientos sobre el lince ibérico (Vargas et al. 2008, 2009). Intentaré resumir algo de la información sobre aspectos de la biología de la reproducción de esta especie que se ha obtenido en años recientes.

Las hembras de lince ibérico tienen una época (estación) reproductiva muy restringida, de aproximadamente un mes, entre enero y febrero, con partos en marzo-abril (Palomares et al. 2005). Las hembras presentan sólo un estro, en forma similar a otras dos especies de lince, mientras que las hembras de lince rojo difieren ya que presentan varios estros y tienen una época reproductiva más extendida. En lince ibérico se ha evaluado la actividad ovárica mediante ultrasonografía y cuantificando niveles de progesterona y estradiol. Los estudios revelaron que los patrones de metabolitos de progesterona y estradiol en heces y orina de lince ibérico (y en otras especies relacionadas como el lince rojo y el lince boreal) no siguen los mismos patrones que se observan en los demás felinos. No se encontraron diferencias en los niveles de progesterona entre hembras preñadas y no preñadas y, por ello, no es posible el diagnóstico de gestación analizando esta hormona en heces (Pelican et al. 2006) o en orina (Jewgenow et al. 2006, 2009), contrariamente a la situación con otros felinos (Brown et al. 1994). Además, se detectan niveles elevados de progesterona durante la lactancia y también después del destete hasta el momento del inicio de una nueva época reproductiva (Göriz et al. 2009) lo cual es inusual para felinos. Los exámenes mediante ecografía han permitido verificar la existencia de cuerpos lúteos durante la época no reproductiva y sugieren que éstos permanecen activos hasta el mes de noviembre, justo antes del inicio de un nuevo ciclo estral (Göriz et al. 2009). No se observan cuerpos lúteos en hembras juveniles o en las que no se han observado apareamientos, lo que sugiere que la ovulación es inducida. Después del parto, se han observado más cuerpos lúteos que el número de crías paridas (promedios de 5,5 y 2,1, respectivamente), lo que podría estar relacionado con fallos en la fecundación o absorciones embrionarias tempranas o, tal vez, por ovulaciones adicionales (Göriz et al. 2009). Claramente merecerá la pena examinar en más detalle estas posibilidades.

La ausencia de claras diferencias en los niveles de progesterona entre hembras preñadas y no preñadas ha llevado a examinar otros parámetros de la gestación que pudieran emplearse para diagnosticar preñez. El análisis de los niveles de relaxina en suero y en orina concentrada ha revelado que ésta puede detectarse en la segunda mitad de la gestación mediante la utilización de un kit comercial de relaxina (Braun et al. 2009) lo que se ha introducido ya en el manejo de las hembras del programa de cría en cautividad.

Poco se sabe de la fisiología reproductora masculina del lince ibérico. Los parámetros reproductivos podrían estar afectados por una serie de factores tales como la consanguinidad, la edad, la condición física, así como factores ambientales tales como la estacionalidad y estilo de vida (es decir, vida en cautividad o en libertad). Hemos resumido anteriormente los posibles efectos de la consanguinidad sobre la reproducción y hemos revisado ejemplos de especies de felinos y ungulados en los que la consanguinidad puede tener un efecto deletéreo. Desconocemos cuál es la situación en el lince ibérico. La variabilidad genética en esta especie es baja (Johnson et al. 2004, Godoy et al. 2009), probablemente como resultado de los niveles elevados de consanguinidad en las poblaciones actuales, y es posible que esto esté afectando a los parámetros reproductivos en esta especie. Como comentábamos, existe evidencia que sugiere una posible relación entre la consanguinidad y las características reproductivas en guepardo (Wildt et al. 1983, 1987b, Roth et al. 1995), pantera de Florida (Barone et al. 1994) y león (Wildt et al. 1987a) lo que nos hace sospechar que existirá tal vez un efecto de la consanguinidad sobre la reproducción del lince ibérico.

El análisis de los parámetros reproductivos de los machos de lince ibérico nos han mostrado que los animales tienen testículos relativamente pequeños en comparación con otras especies de felinos (Gañan et al. 2009c) y también en relación a otros mamíferos (Kenagy y Trombulak 1986, França y Godinho 2003). Los machos de lince ibérico producen, además, un número reducido de espermatozoides con una baja proporción de espermatozoides normales, aunque con una alta proporción de espermatozoides móviles. El número total de espermatozoides en el semen del lince ibérico, una vez que tomamos en cuenta el tamaño corporal, es muy bajo en comparación con otras especies de felinos (Gañan 2009).

Se sabe que la edad afecta a los parámetros del semen y que los animales más jóvenes tienen una calidad sub-óptima, tal como se ha visto en el guepardo (Crosier et al. 2007). En lince ibérico hemos

encontrado que los animales de 4 y más años de edad alcanzan los valores máximos de tamaño y peso. Los machos jóvenes (de 2 años de edad) tienen niveles de testosterona más bajos, una menor cantidad de espermatozoides y una menor proporción de espermatozoides móviles y normales que los machos de ≥ 4 años de edad (Gañan et al. 2009c), pero los parámetros de los machos de 3 años no son diferentes de ninguno de los dos grupos lo que sugiere que algunos alcanzan ya la madurez a los 3 años mientras que otros la alcanzan con un año más de edad.

Los niveles hormonales (principalmente testosterona) y la calidad del semen pueden variar a lo largo del año. Estas diferencias estacionales pueden deberse a cambios en el fotoperíodo, la temperatura, o diferencias en la disponibilidad de alimento. En las especies que se reproducen durante una sola época del año ("reproducción estacional"), las hembras pueden tener una época en la que muestran receptividad sexual restringida a un período corto (como en el caso del lince ibérico) o más largo (como en el caso del lince rojo), pero los machos podrían tener producción de espermatozoides durante períodos más largos. Los machos de algunos felinos son marcadamente estacionales, como el gato de Pallas (Swanson et al. 1996), el leopardo de las nieves (Johnston et al. 1994), el leopardo de Arabia (Haas van Dorsser y Strick 2005) o el lince boreal (Jewgenow et al. 2006). Por otra parte, los machos de especies de felinos que viven en los trópicos no tienen una estación tan marcada, como se ha comprobado en el caracal (Bernard y Stuart 1987), ocelote (Morais et al. 2002), tigrina (Morais et al. 2002), margay (Morais et al. 2002), jaguar (Morato et al. 2004) o pantera nebulosa (Wildt et al. 1986). El lince ibérico, que vive en zonas templadas, donde los cambios estacionales son menos marcados, podría tener una producción de espermatozoides durante un período más prolongado que especies que viven a mayores latitudes. Nuestros estudios han mostrado que los machos de lince ibérico tienen espermatozoides entre finales de Noviembre y Abril, y no hemos encontrados diferencias en la calidad del semen obtenido antes o después de la época reproductiva (Gañan et al. 2009c).

Un aspecto que causa gran preocupación es si los parámetros reproductivos de animales en cautividad son similares a los de animales en libertad. Estudios previos en felinos han mostrado que en algunas especies no hay diferencias en los parámetros seminales entre animales libres y cautivos (por ejemplo, en guepardo, gato de Pallas y en gato de pies negros, Wildt et al. 1993, 1987b, 1993, Swanson et al. 2007) mientras que en algunos casos sí se han encontrado diferencias entre

ambos. En jaguares se ha encontrado una calidad menor de los parámetros en cautividad (Morato et al. 2001), tal vez debido a condiciones sub-óptimas de alojamiento, manejo o alimentación de los animales. Hemos tenido oportunidad de examinar en lince ibérico la calidad de los parámetros reproductivos de los machos del programa de cría y compararlos con los de machos que viven en libertad en la comarca de Doñana y hemos encontrado que ambos tienen niveles hormonales y calidad seminal similares, siendo de hecho ligeramente mejor en cuanto a motilidad espermática en los animales cautivos, lo que sugiere que las condiciones de alojamiento y manejo no parecen tener efectos negativos sobre los machos (Gañan et al. 2009c).

En una comparación entre los parámetros reproductivos y la fertilidad de los machos de lince ibérico del programa de cría en cautividad, hemos observado que los machos con mayor tamaño relativo de testículo y más espermatozoides copulan más frecuentemente, y que los machos que producen más espermatozoides y con mayor motilidad tienen más crías por hembra (Gañan et al. 2009c). Por tanto, podemos concluir que los machos con mayor producción espermática son sexualmente más activos y más fértiles y esta información será muy importante para ayudarnos en la toma de decisiones en la gestión del programa de cría. Más aún, toda esta información será esencial para valorar la condición reproductiva de los machos antes de las temporadas de cría, para organizar la toma de muestras que se conservarán en bancos de recursos genéticos y para diseñar estrategias de uso de técnicas de reproducción asistida.

BIOLOGÍA APLICADA: TÉCNICAS REPRODUCTIVAS PARA LA CONSERVACIÓN

¿Por qué emplear técnicas de reproducción asistida en especies amenazadas?

La reproducción asistida ofrece soluciones a los problemas derivados de la consanguinidad que se producen cuando disminuye el número de individuos en poblaciones aisladas (Wildt 1992, Bainbridge y Jabbour 1998, Wildt y Wemmer 1999, Roldan y Gomendio 2008). Las tecnologías reproductivas pueden ser un buen complemento a los esfuerzos de conservación porque pueden facilitar el manejo y el intercambio genético entre poblaciones. De todos modos, no es fácil poner en marcha el uso de tecnologías de reproducción asistida en animales silvestres. Se

requiere de un esfuerzo considerable para lograr formar equipos con personas que tienen historiales, experiencia y programas de trabajo diferentes, organizar condiciones que permitan la captura, recogida y procesado de muestras (en muchos casos en condiciones de campo), desarrollar investigación preliminar (generalmente en especies modelo) con el fin de explorar condiciones apropiadas para procesar, evaluar y almacenar el material biológico y, finalmente, pero no por ello menos importante, asegurar fuentes de financiación para iniciar las actividades y, sobre todo, para dar continuidad a estos esfuerzos.

Cuando se organizan programas de cría en cautividad para especies amenazadas se generan oportunidades para obtener y conservar gametos en condiciones más controladas y de individuos que disfrutan de mejor salud y nutrición. En estas condiciones es posible planificar una rutina de recolección y almacenamiento de semen. Más aún, si las condiciones de manejo son adecuadas, y el estrés de los animales es reducido, la cantidad y calidad de los gametos que se obtienen es mejor. El examen periódico de los animales bajo anestesia y con control veterinario también genera oportunidades para la recogida de biomateriales (por ejemplo, sangre, tejido somático, heces) que permiten estudios sobre el control endocrino de la reproducción y el almacenamiento de muestras.

Una iniciativa de cría en cautividad puede integrarse en una estrategia más amplia de conservación *ex situ* y, siempre que sea posible, tiene que servir para apoyar actividades de conservación *in situ*. Así, la experiencia obtenida sobre aspectos reproductivos y sanitarios con el desarrollo del programa de conservación *ex situ* del lince ibérico ha sido empleada para recoger, manipular y almacenar células de la línea germinal masculina de individuos de vida silvestre. En algunas especies, como es también el caso en el lince ibérico, se producen además muertes de animales por accidentes de carretera. Este hecho, aunque de lamentar, genera la oportunidad de recolectar y rescatar células germinales y tejidos somáticos de animales que no tendrían la posibilidad de reproducirse. Las actividades de caza también conllevan la oportunidad de obtener, estudiar y conservar germoplasma de poblaciones naturales, como en el caso del ciervo ibérico.

Los diversos materiales biológicos pueden conservarse en un banco de recursos genéticos (BRG) con el fin de mantener y asegurar la diversidad genética de las especies en forma prácticamente indefinida (Loskutoff et al. 1995, Holt et al. 1996, Wildt et al. 1997, Pope y Loskutoff 1999, Wildt y Wemmer 1999, Pukazhenthí y Wildt 2004, Pukazhenthí et al. 2006a,

Roldan et al. 2006 2009). Los BRGs, por tanto, almacenan espermatozoides, oocitos y embriones (en conjunto, conocido como germoplasma) y también tejidos y células somáticos que pueden emplearse en el futuro mediante técnicas de clonación o, incluso, transdiferenciación en cultivo. Los gametos, embriones y tejidos somáticos conservados de esta manera pueden ser útiles a través del tiempo y del espacio ya que pueden permitir el movimiento de material genético entre poblaciones y emplearse muchos años después de la muerte de un animal. La existencia de materiales almacenados en un BRG puede ayudar a reducir el número de individuos vivos necesarios para mantener una población viable, reduciendo de este modo el espacio necesario para la cría y los costes derivados.

Las técnicas de reproducción asistida pueden facilitar las interacciones entre la conservación *ex situ* (programas de cría y banco de recursos genéticos) y los esfuerzos de conservación *in situ*, con el beneficio de agrandar la población efectiva de individuos que contribuyen al esfuerzo de conservación (Swanson et al. 2007). Por ejemplo, la obtención de muestras seminales de individuos de vida silvestre genera la posibilidad de usar este germoplasma masculino, a través de reproducción asistida, para promover flujo genético sin la necesidad de extraer animales de la naturaleza. Esto también se aplica al uso potencial de la reproducción asistida en poblaciones naturales con gametos almacenados en bancos de recursos genéticos, lo que genera la ventaja de reforzar poblaciones animales en el campo. También puede pensarse en la posibilidad de promover la translocación de alelos entre poblaciones silvestres sin la necesidad de intercambiar animales vivos. El movimiento de animales genera riesgos debidos al estrés o a la posibilidad de transmitir enfermedades, así como a problemas relacionados con una ausencia de integración de los individuos traslocados en nuevos grupos sociales, además de los costes involucrados en el transporte de individuos.

¿Qué técnicas de reproducción asistida pueden emplearse en especies amenazadas?

Obtención y criopreservación de semen

En la mayoría de los casos, los espermatozoides de animales silvestres han de ser recogidos mediante electro-estimulación, bajo anestesia general, o mediante la utilización de alguna otra forma de estimulación artificial (Pukazhenthil et al. 2006a). El procedimiento es seguro y no tiene consecuencias negativas para los machos, tal como se ha verificado en muchos laboratorios en todo el mundo. Esta es también nuestra propia

experiencia, habiendo realizado decenas de recogidas de semen en gacelas y en lince ibérico sin problema alguno, incluyendo recogidas de semen de lince de vida libre (Roldan et al. 2006, 2009, Gañan et al. 2009c). Existe también la posibilidad de obtener espermatozoides a partir del epidídimo después de la muerte de un animal. La recogida puede realizarse por lavado con medio de cultivo o mediante cortes en el epidídimo para permitir que la masa espermática se exteriorice o, de colocarse en una solución de cultivo (como en el caso de especies de pequeño tamaño), para que nadan hacia el medio de cultivo o un diluyente de criopreservación.

La recolección de espermatozoides se continúa con una evaluación de los parámetros espermáticos. Dicha evaluación incluye análisis básicos para estimar la motilidad y la concentración de células espermáticas, la morfología, y la integridad de componentes (tales como el acrosoma). Durante décadas se ha puesto un enorme esfuerzo en desarrollar métodos de laboratorio que puedan estimar la capacidad fecundante de los espermatozoides. Aunque en algunas ocasiones, y en algunas especies, se ha obtenido cierto éxito, no es sencillo basar una estimación de potencial fecundante en un único tipo de evaluación. En especies domésticas se han empleado pruebas adicionales para intentar conocer la capacidad funcional de los espermatozoides con el fin de estimar el potencial fecundante de una muestra espermática. El objetivo principal de esta evaluación es estimar en el laboratorio la capacidad que puede tener el espermatozoide de experimentar la secuencia de cambios que son necesarios para completar la fecundación. Las pruebas de laboratorio pueden examinar la supervivencia espermática en diferentes condiciones, la capacidad de interactuar con componentes o células del tracto genital (por ejemplo, flúidos del cuello uterino, o células oviductales), la capacitación o la exocitosis del acrosoma (reacción acrosómica) en respuesta a ligandos naturales (progesterona, zona pelúcida o glicoproteína de zona pelúcida recombinante) o sondas moleculares cuya diana son procesos de señalización intracelular.

En especies domésticas se han empleado ensayos de interacción de gametos (por ejemplo, adherencia de los espermatozoides a la zona pelúcida) o de fecundación *in vitro* (cuantificando penetración de los espermatozoides) con el fin de tener una mejor aproximación en la evaluación de la funcionalidad de los espermatozoides. Además, en especies domésticas, se ha intentado relacionar los resultados de estos ensayos *in vitro* con la fertilidad *in vivo*, como por ejemplo los obtenidos en pruebas de inseminación artificial (Aitken 2006, Rodríguez-Martínez

2006, 2007). En especies silvestres y, sobre todo, en especies amenazadas, no es posible desarrollar evaluaciones de fertilidad de los espermatozoides empleando pruebas de inseminación artificial sencillamente porque no se puede disponer de una abundancia de muestras espermáticas que puedan emplearse con este propósito y, más aún, no es posible disponer de un número suficiente de hembras para realizar un ensayo adecuado. Por ello, es necesario el uso de pruebas de laboratorio con el fin de estimar la capacidad fecundante de las muestras espermáticas de estas especies. Es posible en algunos casos realizar ensayos de fecundación *in vitro* homóloga, es decir empleando oocitos de la misma especie (Donoghue et al. 1992, Berlinguer et al 2008). Sin embargo, nuevamente nos encontramos con la dificultad de obtener gametos femeninos de especies amenazadas por lo que se tiene que recurrir a la utilización de oocitos de especies domésticas cercanas. Existen ejemplos de uso de oocitos de vaca para valorar espermatozoides de orix (Roth et al. 1999), de oveja para espermatozoides de muflón (Berlinguer et al. 2003) o ciervo (Soler et al. 2008), y de oocitos de gato doméstico para evaluar espermatozoides de gato pescador, gato de Pallas o de ocelote (Thiangtum et al. 2006, Stoops et al. 2007, Swanson et al. 2007). Basados en estos antecedentes, decidimos examinar si era posible utilizar oocitos de gato doméstico con el fin de evaluar espermatozoides de lince. Para ello, realizamos primero unos estudios con espermatozoides de lince rojo como modelo y comprobamos que los espermatozoides de esta especie eran capaces de fecundar los oocitos de gato (Gañan et al. 2009a). Animados por este resultado, examinamos a continuación si también los espermatozoides de lince ibérico pueden fecundar los oocitos de gato doméstico. La respuesta fue que, claramente, los espermatozoides de lince ibérico también son capaces de dicha fecundación heteróloga abriendo las puertas a evaluación más detalladas de la capacidad de los espermatozoides de sobrevivir a la criopreservación. También observamos diferencias preliminares en el éxito de los espermatozoides de diferentes machos en la fecundación y relaciones de varios parámetros seminales con el éxito de la fecundación lo que nos permitirá probablemente avanzar en el uso de esta tecnología en el laboratorio.

La evaluación espermática es por lo tanto una herramienta muy útil para la caracterización de parámetros reproductivos. Puede emplearse, como de hecho la empleamos, para realizar una evaluación periódica de los machos de los programas de cría antes de cada estación reproductiva. En un esquema de cría en cautividad, el empleo de machos que no tengan una adecuada calidad seminal conlleva riesgos elevados al

exponernos a la posibilidad de que las hembras no conciban y por lo tanto pierdan oportunidades reproductivas. Por ello, estos exámenes reproductivos sistemáticos permiten identificar casos posibles de subfertilidad o infertilidad, debidos por ejemplo a un número reducido de espermatozoides, motilidad pobre o a una elevada proporción de espermatozoides anormales. Esta información es esencial para que los gestores de un programa de cría puedan tomar decisiones durante el proceso de planificación de apareamientos.

El almacenamiento de los espermatozoides mediante criopreservación es una herramienta muy importante para la conservación de gametos y para un manejo genético adecuado tanto para poblaciones cautivas como para aquellas en libertad. La criopreservación de espermatozoides se desarrolló hace más de 50 años y ha alcanzado un uso masivo en ganado bovino a través de la inseminación artificial. Existen varios beneficios potenciales del uso de la congelación del semen en especies silvestres relacionadas con la posibilidad de almacenar gametos de animales genéticamente valiosos, extender los tiempos generacionales, evitar la posible transmisión de enfermedades infecciosas, evitar problemas de manejo y la incompatibilidad de comportamiento de animales y, principalmente, facilitar el intercambio de material genético entre poblaciones de animales cautivos, libres o entre ambos. Este último aspecto es muy importante ya que permitiría incorporar material genético de animales en libertad de poblaciones naturales sin necesidad de trasladarles a centros de cría. En este caso, merece la pena destacar ejemplos tales como la obtención de espermatozoides de guepardos en Namibia y su transporte en forma congelada a Estados Unidos para utilización en zoos de Norte América (Comizzoli et al. 2009).

Existen varios ejemplos exitosos de congelación de espermatozoides de especies silvestres (revisiones en Wildt et al. 1997, Watson y Holt 2001, Leibo y Songsasen 2002, Pukazhenti y Wildt 2004, Pukazhenti et al. 2006a, Roldan et al. 2006). A pesar de este interés y esfuerzo es necesario aún realizar trabajos adicionales para mejorar los métodos de congelación. La criopreservación de semen de ungulados silvestres se ha beneficiado de los conocimientos desarrollados con la criopreservación de semen de ungulados domésticos llevando al éxito la inseminación artificial de antílopes, cérvidos y rinocerontes (Jabbour et al. 1997, Roldan et al. 2006, Hildebrandt et al. 2007). De todos modos, la extrapolación de métodos empleados en animales domésticos no puede hacerse directamente a otras especies ya que existen diferencias aún entre especies estrechamente relacionadas y es necesario ajustar los

protocolos a las nuevas especies de interés (Garde et al. 2003, 2008). En carnívoros, la situación es más compleja ya que no existen aún métodos totalmente adecuados de criopreservación en perros y gatos que puedan usarse de referencia (Pukazhenti y Wildt 2004) aunque recientemente se han realizado avances en estas dos especies de compañía (Luvoni 2006, Axner 2008, Farstad 2009).

Como parte de nuestro proyecto sobre desarrollo de técnicas de reproducción asistida en tres especies de gacelas norafricanas, gacela de Cuvier, gacela dama y gacela dorcas, hemos examinado factores que afectan al éxito de la criopreservación de semen. Encontramos diferencias en cada especie según el tipo de diluyente de congelación empleado (Garde et al. 2003, 2008). Observamos además claras diferencias entre las tres especies ya que cuando empleamos un mismo diluyente de congelación (Tes-Tris-glucosa con 5% de yema de huevo y 6% de glicerol) se obtuvieron muy buenos resultados de recuperación de motilidad e integridad de acrosomas en gacelas dorcas mientras que fueron intermedios en gacela dama y pobres en gacela de Cuvier (Garde et al. 2003). Las diferencias pueden en parte estar relacionados con los niveles de consanguinidad de las poblaciones, ya que la especie con los niveles más bajos de consanguinidad (gacela dorcas) mostró la mejor supervivencia a la criopreservación mientras que en el otro extremo la especie con los niveles mayores de consanguinidad (gacela de Cuvier) tuvo los peores resultados de criopreservación (Garde et al. 2003, Roldan et al. 2006).

Por otra parte, en nuestros trabajos sobre congelación de semen de lince ibérico, hemos logrado congelar espermatozoides de esta especie, siguiendo protocolos previamente evaluados en gato doméstico (Gañán et al. 2009d) y en lince rojo (Gañán et al. 2009a). En estos primeros estudios de criopreservación de semen de lince ibérico, hemos notado diferencias en el éxito que se obtiene según el diluyente empleado y también hemos visualizado diferencias entre diferentes machos. Estos primeros pasos nos han permitido iniciar una conservación sistemática de semen de machos del programa de cría en cautividad y también de machos de vida libre de la comarca de Doñana. Más aún, utilizando esta metodología ha sido posible rescatar y criopreservar espermatozoides provenientes de epidídimos de animales muertos por atropello en carretera o que han muerto por enfermedades (Gañán et al. 2009c).

Si bien el método habitual de conservación de espermatozoides es a través de la congelación, existen métodos alternativos de preservación, tales como la desecación o la liofilización de espermatozoides y estos

métodos pueden ser útiles en algunas especies (o en algunos individuos) o para algunas muestras obtenidas en determinadas circunstancias. Se ha podido liofilizar espermatozoides, con obtención de crías vivas nacidas, en ratones (Wakayama y Yanagimachi 1998, Ward et al. 2003, Li et al. 2009), en conejos (Liu et al. 2004) y en ratas (Hirabayashi et al. 2005) y existen investigaciones en curso en bovinos, cerdos, perros, humanos y también en marsupiales (Martins et al. 2007, Naki et al. 2007, Kusakabe et al. 2008, Watanabe et al. 2009, Czarny et al. 2009). La desecación de los espermatozoides bajo gas nitrógeno (y el almacenamiento a 4°C ó 22°C), se ha experimentado en ratones y se ha obtenido el nacimiento de crías vivas (McGinnis et al. 2005).

Inseminación artificial

Dependiendo de las técnicas empleadas para la conservación del semen, su uso mediante técnicas de reproducción asistida puede variar. La inseminación artificial es probablemente la primera elección aunque su empleo en especies silvestres presenta limitaciones relacionadas con el desconocimiento de la fisiología reproductiva femenina. Para su implementación es importante por tanto realizar una caracterización de la fisiología femenina, la puesta a punto de protocolos de sincronización del estro y una elección adecuada de la técnica de inseminación artificial (por ejemplo, mediante vía cervical o empleando la vía intrauterina ayudados por laparoscopia).

La eficacia de la inseminación artificial es baja en especies silvestres, particularmente cuando se emplea semen congelado, por lo que en muchas ocasiones se prefiere el empleo de semen fresco o refrigerado (conservado a 5°C). El uso de inseminación artificial tiene además el inconveniente de ser difícil de emplear en especies silvestres debido al estrés que se ocasiona con el manejo de los animales.

Hasta el presente se ha obtenido descendencia viva utilizando inseminación artificial y semen congelado en unas 30 especies de mamíferos, siendo más de la mitad especies silvestres (Holt, 2001). Se ha obtenido nacimientos en diferentes especies de ciervos, como por ejemplo el ciervo de Eld (Monfort et al., 1993) y, de igual forma, se ha empleado la inseminación artificial unida a la congelación del semen para la conservación del turón de patas negras (Wildt et al., 2001). En felinos, se ha éxito con la inseminación artificial, generalmente empleando semen fresco, en varias especies incluyendo puma, tigre, guepardo, pantera nebulosa, leopardo de las nieves, ocelote y tigrina (Wildt et al. 2001, Howard y Wildt 2009). Nuestros trabajos nos han permitido

demostrar que el semen criopreservado de gacela dama es fértil y lograr el primer nacimiento en el mundo mediante inseminación artificial en una especie de gacela (Garde et al. 2006, Roldan et al. 2006).

Fecundación in vitro y microinyección de espermatozoides

Existen casos en los que es necesario recurrir a la fecundación *in vitro* (IVF) o la inyección intracitoplásmica de espermatozoides (ICSI), como por ejemplo si la cantidad (o calidad) de espermatozoides disponibles es reducida, si se emplean células espermáticas inmaduras o menos diferenciadas de la línea germinal, o en casos en que la capacidad de los espermatozoides de sobrevivir a la congelación es pobre. En el caso de IVF es necesario emplear condiciones que permitan que los espermatozoides experimenten *in vitro* cambios similares a los que experimentan en el tracto genital, tales como la capacitación o una correcta interacción entre gametos. Por otra parte, el uso de la ICSI requiere de técnicas de micromanipulación. Ambas metodologías necesitan de la obtención de los oocitos (usualmente después de la sincronización, la estimulación ovárica y la maduración *in vitro* de los oocitos), así como un método que permita incubar los embriones obtenidos en el laboratorio y técnicas de transferencia de embriones. Existe aún necesidad de mejora de métodos de ICSI en animales domésticos (o de compañía), particularmente en relación al método de preparación de los espermatozoides antes de la microinyección con el fin de lograr una adecuada activación de los oocitos por parte de los espermatozoides introducidos en el oolema mediante microinyección (Roldan 2006).

Es importante notar que la capacidad de preservar la motilidad durante la criopreservación sólo es esencial si se va a utilizar inseminación artificial o fecundación *in vitro*. En caso que la muestra de semen no tenga buena motilidad, o la recuperación a la descongelación no resulte en un mínimo aceptable de motilidad, será posible emplear ICSI. Empleando esta técnica, por ejemplo, se han podido usar con éxito muestras de semen humano que había estado criopreservado durante 21 años para obtener una concepción y desarrollo a término (Horne et al. 2004). Si existe la posibilidad de usar ICSI, las condiciones de criopreservación pueden ser entonces menos limitantes, ya que se ha observado que los espermatozoides de ratón de cadáveres conservados a -20°C en el congelador pueden ser recuperados, empleados en ICSI, y generar crías (Ogonuki et al. 2006).

El uso de IVF o ICSI en especies silvestres presenta desafíos adicionales debidos al estrés que se ocasiona con las manipulaciones de los animales y que conlleva efectos negativos sobre la calidad de gametos y embriones, y sobre el establecimiento de una gestación y su conclusión a término. En nuestra propia experiencia, hemos visto en estudios con gacela dama que el uso de tranquilizantes, tales como los neurolépticos de larga acción, permiten no solo un menor manejo de los animales, sino también la obtención de oocitos que son capaces de madurar en una mayor proporción (González et al. 2008) lo que posiblemente resulte en un incremento en la viabilidad de las gestaciones que puedan establecerse.

Aunque la ICSI permite eliminar obstáculos durante el empleo de reproducción asistida, es importante tener presente que el uso de esta técnica elimina la necesidad de los espermatozoides de atravesar ciertas barreras en el tracto femenino, y por tanto pueden resultar en la fecundación con espermatozoides de baja calidad, como por ejemplo aquellos que en condiciones naturales no podrían nadar en el tracto femenino. Además, estas técnicas podrían obviar barreras en el tracto femenino que están orientadas a impedir la fecundación de espermatozoides de machos relacionados o que son genéticamente incompatibles. Por lo tanto, el empleo de esta técnica en especies amenazadas debe intentar reducir cualquier posible efecto negativo que se derive de la ausencia de estas barreras sobre todo sobre la viabilidad y calidad de la descendencia.

Una vez producidos los embriones *in vitro*, ya sea mediante IVF o ICSI, se hace necesario transferir los embriones a hembras receptoras. Además de considerar la necesidad de disponer de métodos de sincronización entre las receptoras y el ciclo del embrión, en especies amenazadas se presenta el problema adicional de disponer de una cantidad limitada de hembras. En estas circunstancias se ha propuesto la utilización de hembras de especies cercanas más abundantes como receptoras.

Clonación por transferencia de núcleo

Esta técnica ha despertado mucho interés recientemente. Claramente, la clonación tiene importantes aplicaciones en industria ganadera, ya que permitiría la propagación de individuos genéticamente superiores, o en la producción de animales modificados genéticamente para producción de fármacos de uso humano. Por otra parte, existe mucho debate sobre la posible aplicación de la clonación a la conservación de especies en

peligro de extinción. Se ha planteado su posible uso para “rescatar” o “resucitar” especies ya extinguidas como el tigre de Tasmania, el mamut, o el bucardo. Además de las varias dificultades técnicas existentes, el valor para la conservación en estos casos es muy cuestionable. Dejando a un lado estos casos aislados, merece la pena considerar las posibles ventajas de clonación de especies amenazadas. Los argumentos iniciales, cuando comenzaron a conocerse los primeros ejemplos de especies amenazadas clonadas, se centraron en la percepción que esta técnica conduciría inexorablemente a una reducción de la variabilidad genética. Este puede, ciertamente, ser el caso, si el único objetivo es generar copias de uno o pocos animales. Sin embargo, las opiniones actuales reconocen que la clonación podría ser de enorme utilidad en los esfuerzos de conservación, justamente para preservar e incluso incrementar la variabilidad genética de las poblaciones. Mediante la clonación se podría evitar que se pierdan genotipos únicos muy valiosos, o reproducir animales sin “extraerlos” de la naturaleza (Lanza et al. 2000a, Amato 2002, Wilson 2002).

Podemos pensar en pocos individuos de una especie en la naturaleza, o en un programa de cría en cautividad con un número reducido de animales. Para el momento en que seamos capaces de corregir los problemas relacionados con el hábitat, o conozcamos cómo reproducirlos en cautividad, pueden haber pasado muchos años y durante ese tiempo varios animales habrán muerto. Si conservamos células de esos animales, en el futuro será posible recuperar mediante clonación los animales perdidos, recuperando también un patrimonio genético muy valioso. También cabe otra alternativa dentro de un programa de cría en cautividad. A través de la clonación podrían establecerse diferentes núcleos reproductivos en varios sitios (lo que serviría de prevención contra catástrofes). Esto permitiría incrementar el número de descendientes e intercambiar animales mediante un adecuado programa genético de apareamientos o reproducción asistida. En los casos de especies en estado crítico, en las que no es deseable extraer muchos individuos de las poblaciones naturales, podrían obtenerse células de los animales en libertad y generar clones para introducir en los programas de cría en cautividad y para generar nuevas poblaciones allí donde desaparezcan. Finalmente, en aquellas especies en peligro crítico de extinción, la clonación permitiría recuperar a los individuos que mueren antes de poder reproducirse, como es el caso de los machos jóvenes de lince que mueren atropellados al dispersarse.

Por estos motivos, hemos comenzado a obtener y conservar tejidos y células somáticas de especies amenazadas. En particular se han puesto muchos esfuerzos, en colaboración con los programas de conservación *in situ* y *ex situ* del lince ibérico, para poner a punto técnicas de cultivo de tejidos y criopreservación de tejidos y células obtenidos tanto de necropsias de animales que mueren por accidentes o enfermedades, como de biopsias de los animales que se examinan como parte de seguimientos de poblaciones en la naturaleza, o de exámenes sanitarios y reproductivos (Roldan et al. 2009). Se han analizado diversos factores que afectan al transporte de las muestras desde los sitios de muestreo en el campo o centro de necropsias al laboratorio, el éxito de distintos métodos mecánicos o enzimáticos para el procesado de las muestras para inicio del cultivo, y diversos métodos de criopreservación y vitrificación (Crespo 2009). Como resultado de estos trabajos, nuestro Banco de Germoplasma y Tejidos de Especies Silvestres, en el Museo de Ciencias Naturales, almacena actualmente tejidos y células viables de más de 200 individuos de lince ibérico, un repositorio extremadamente valioso para la conservación de la especie.

Existen ya ejemplos de clones de varias especies de animales domésticos y de laboratorio (Cibelli et al. 2002, Gómez et al. 2009): ovejas, ratones, vacas, cabras, cerdos, perros, gatos, conejos, caballos y mulas, y la lista continúa con algunas especies silvestres. Una de las dificultades principales en la clonación de especies amenazadas es la limitación en la provisión de óvulos, por lo que debe recurrirse a la utilización de óvulos de otras especies (Gómez et al. 2009). Se han obtenido clones de especies amenazadas mediante la utilización de la transferencia de núcleo interespecífica en gaur (Lanza et al. 2000b), muflón de Cerdeña (Loi et al. 2001), gato silvestre africano, gato de las arenas (Gómez et al. 2004, 2009) y lobo gris (Kim et al. 2007, Oh et al. 2008), además de intentos en otras especies como por ejemplo el oso panda (Chen et al. 1999) y el argali (White et al. 1999).

Antes de poder emplear esta tecnología en forma generalizada quedan por resolver muchos aspectos metodológicos. La técnica consiste en la obtención de células somáticas (por ejemplo, de piel o músculo) del individuo que se desea clonar y la transferencia de los núcleos de estas células a óvulos a los que previamente se les ha extraído su dotación cromosómica. Las células somáticas pueden emplearse “frescas” y cultivarse brevemente *in vitro*, o pueden provenir de colecciones de tejidos de bancos de recursos genéticos. Los óvulos pueden obtenerse mediante superovulación de hembras donantes o mediante maduración

in vitro de oocitos obtenidos de ovarios provenientes de matadero o castraciones. La transferencia del núcleo puede hacerse mediante microinyección, directamente en el interior del óvulo, o mediante electrofusión entre la célula somática y el óvulo. El desarrollo embrionario se activa mediante estímulos químicos o eléctricos. Los embriones obtenidos se incuban unos pocos días para verificar su desarrollo y se transfieren a una madre nodriza para que continúen su desarrollo. El éxito de la técnica es aún muy bajo: suelen nacer aproximadamente un 2% de crías (calculado a partir del total de óvulos microinyectados). Además, se han verificado anomalías en algunos de los clones que han sobrevivido.

En resumen, además de las consideraciones relacionadas con la conveniencia de utilizar esta tecnología en esfuerzos de conservación, son necesarias una serie de mejoras en los métodos de preparación de núcleos y de micromanipulación y activación, así como un mejor conocimiento de los procesos de reprogramación del núcleo una vez transferido al óvulo, para incrementar el éxito de esta técnica.

¿Gametos derivados de células madre embrionarias o células somáticas?

Las células madre embrionarias son células pluripotentes derivadas de los embriones tempranos antes del momento de la formación de las capas de tejido germinal. Estas células, que se derivan usualmente de blastocistos pre-implantatorios, exhiben una capacidad indefinida de proliferación. Varios grupos de investigación han demostrado que las células madre embrionarias de ratón pueden diferenciarse hacia células germinales primordiales (PGCs) y, en forma subsiguiente, hacia estadios tempranos de gametos (oocitos: Hubner et al. 2003, espermatozoides: Geijsen et al. 2004). Las células espermáticas inmaduras de ratón, derivadas en cultivo a partir de células madre embrionarias, son capaces de generar crías viables (Nayernia et al. 2006a). En estudios preliminares se encontró que las células madre embrionarias humanas también tienen una capacidad de desarrollo similar y pueden generar células germinales primordiales y gametos (Clark et al. 2004, Aflatoonian et al. 2005; Moore y Aflatoonian 2007). Aunque hay células que son capaces de diferenciar hasta células germinales primordiales (tal como lo revelan marcadores de superficie y los patrones de expresión génica), sólo una proporción pequeña de las células es capaz de estos cambios y, además, no avanzan demasiado en el desarrollo (Kee et al. 2006, Tilgner et al. 2008, Bucay et al. 2009, Park et al. 2009). Es interesante que las células germinales entran en meiosis en forma autónoma y se desarrollan como

oocitos a menos que se induzca un bloqueo de la meiosis y se estimule a las células a que sigan la vía de la espermatogénesis. Durante la diferenciación de las células madre embrionarias humanas, ambas vías tienen lugar, independientemente de los cromosomas sexuales de las células. Estos estudios iniciales se realizaron desconociendo cómo se generan estas células con características de gametos (Moore y Aflatoonian 2007), pero estudios muy recientes han empezado a descifrar los genes y los mecanismos que controlan la meiosis y el desarrollo de gametos haploides humanos a partir de células madre embrionarias (Kee et al. 2009). Por tanto, la tecnología de células madre ofrece enormes posibilidades para realizar investigaciones reproductivas, incluyendo un sistema accesible para estudiar los cambios iniciales de la gametogénesis.

Estas posibilidades dependen de la disponibilidad de células madre embrionarias. Sin embargo, no será fácil obtener células madre embrionarias a partir de embriones de especies silvestres producidos *in vitro*, debido a la poca disponibilidad de material y dificultades técnicas. Por ello, cabe la posibilidad de pensar en el uso de transferencia de núcleos de células somáticas, con oocitos heterólogos, para obtener células madre en estas especies. La clonación reproductiva (mediante transferencia nuclear) se ha planteado como una opción para especies amenazadas (como comentábamos más arriba), pero las tasas de éxito son y serán bajas. Por el contrario, la transferencia de núcleo de células somáticas podría ser ventajosa para generar blastocistos de especies amenazadas de un genotipo deseado y, a partir de estos blastocistos, obtener células madre embrionarias que podrían ser útiles para producir las células de la línea germinal, tanto oocitos como espermatozoides. En este contexto, la transferencia de núcleos podría ser mucho más eficiente que cuando se emplea para fines reproductivos.

Si bien existe cada vez más evidencia que sugiere que es posible generar células germinales y gametos a partir de células madre embrionarias, queda aún por conocer si es posible obtener células germinales directamente a partir de células madre "adultas" que existen fuera de las gónadas. Hay estudios que sugieren que pueden obtenerse células germinales a partir de médula ósea tanto en el ratón (Nayernia et al. 2006b, Lue et al. 2007) como en humanos (Drusenheimer et al. 2007).

Además de células madre embrionarias y adultas, se han podido desarrollar células pluripotentes inducidas (iPS) a partir de células somáticas de ratones (Takahashi y Yamanaka (2006) o humanas (Yu et al. 2007, Takahashi et al. 2007). Este método, que no involucra el uso de

células provenientes de embriones, consiste en el empleo de una combinación mínima de genes para transformar una célula somática, por ejemplo, un fibroblasto, en una célula madre de características similares a las células madre embrionarias, siendo indistinguibles, de hecho, desde el punto de vista morfológico y funcional. Estos descubrimientos, que han revolucionado el campo de la medicina regenerativa, tiene importantes implicaciones también para el uso de estas células en conservación de especies amenazadas ya que, habiendo sido posible obtener gametos haploides a partir de células madre embrionarias, cabría pensar que también ha de ser posible generar gametos a partir de estas células pluripotentes inducidas.

El uso de células madre embrionarias o de células pluripotentes inducidas tiene implicaciones excepcionales ya que pueden abrir la posibilidad de realizar estudios de mecanismos de diferenciación de la línea germinal y, pensando más en posibles aplicaciones a especies amenazadas, podrían permitir la producción de gametos "sintéticos" (Surani 2004). Cabe pensar que en el futuro tal vez puedan emplearse en reproducción asistida espermatozoides de especies amenazadas generados de esta manera, con una provisión virtualmente ilimitada.

PALABRAS FINALES

En resumen, existe una abundante biodiversidad en nuestro planeta, pero esta diversidad biológica está atravesando una grave crisis. Necesitamos mejorar nuestros conocimientos sobre dónde está y qué la amenaza pero, particularmente, diseñar estrategias para frenar este deterioro y, en la medida de lo posible, revertirlo. Como especie, somos mayoritariamente responsables de este deterioro y, por ello, tenemos la obligación de actuar. Desde nuestros campos de especialidad cada uno de nosotros puede realizar una contribución importante. El estudio de la reproducción animal nos permitirá caracterizar aspectos fundamentales de la biología de especies amenazadas y comprender cómo se ven afectados en relación a otros parámetros genéticos, de manejo o sanitarios. El desarrollo y la implementación de tecnologías de reproducción asistida en especies amenazadas, tanto en poblaciones en programas de crías en cautividad, como en libertad, o promoviendo el enlace entre ambas, nos facilitará opciones de manejo para promover flujo génico. Esta es una tarea que ha de involucrar a muchos, que requiere de infraestructura y de financiación continuada. Con el esfuerzo de todos es posible que lo logremos.

Muchas gracias a todos por vuestra atención y, nuevamente, por acompañarme en esta acto.

He dicho.

Madrid, 16 de noviembre de 2009

BIBLIOGRAFÍA

- Aflatoonian B, Fazeli A, Ruban L, Andrews P, Moore H (2005) Human embryonic stem cells differentiate to primordial germ cells as determined by gene expression profiles and antibody markers. Proc. 21 st Annual Meeting of the European Society for Human Reproduction and Embryology, Copenhagen. *Hum. Reprod.* 20 Suppl. 1 i6.
- Aitken RJ (2006) Sperm function tests and fertility. *Int. J. Androl.* 29, 69-75.
- Amato G (2002) *Wildlife Conservation* (Mayo/Junio).
- Asa C, Miller P, Agnew M, Rebolledo JAR, Lindsey SL, Callahan M, Bauman K (2007) Relationship of inbreeding with sperm quality and reproductive success in Mexican gray wolves. *Anim. Cons.* 10, 326–331.
- Axnér E (2008) Updates on reproductive physiology, genital diseases and artificial insemination in the domestic cat. *Reprod. Dom. Anim.* 43, Suppl. 2, 144-149.
- Bainbridge DRJ, Jabbour HN (1998) Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review. *Vet. Rec.* 143, 159-168.
- Barone MA, Roelke ME, Howard J, Brown JL, Anderson AE, Wildt DE (1994) Reproductive characteristics of male florida panthers: comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American Zoos. *J. Mammal.* 75, 150-162.
- Berlinguer F, González R, Succu S, del Olmo A, Garde JJ, Espeso G, Gomendio M, Ledda S, Roldan ERS (2008) *In vitro* oocyte maturation, fertilization and culture after ovum pick-up in an endangered gazelle (*Gazella dama mhorr*). *Theriogenology* 69, 349-359.
- Berlinguer F, Ledda S, Rosati I, Bogliolo L, Leoni G, Naitana S (2003) Superoxide dismutase affects the viability of thawed European mouflon (*Ovis g. musimon*) semen and the heterologous fertilization using both IVF and intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Fertil. Dev.* 15, 19-25.
- Braun BC, Frank A, Dehnhard M, Voigt CC, Vargas A, Göritz F, Jewgenow K (2008) Pregnancy diagnosis in urine of Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Theriogenology* 71, 754-761.
- Brown JL, Wasser SK, Wildt DE, Graham LH (1994) Comparative aspects of steroid-hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. *Biol. Reprod.* 51, 776-786.
- Bucay N, Yebra M, Cirulli V, Afrikanova I, Kaido T, Hayek A, Montgomery AM (2009) A novel approach for the derivation of putative primordial germ cells and Sertoli cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27, 68-77.

- Caro TM, Laurenson MK (1994) Ecological and genetic factors in conservation: a cautionary tale. *Science* 263, 485-486.
- Cassinello J, Abaigar T, Gomendio M, Roldan ERS (1998) Characteristics of the semen of three endangered species of gazelles (*Gazella dama mhorh*, *G. dorcas neglecta* and *G. cuvieri*). *J. Reprod. Fertil.* 113, 35-45.
- Caughley G (1994) Directions in conservation biology. *J. Anim. Ecol.* 63, 215-244.
- Charlesworth D, Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18, 237-268.
- Chen DY, Sun QY, Liu JL, Li GP, Lian L, Wang MK, Han ZM, Son XF, Li JS, Sun Q, Chen YC, Zhang YP, Ding B (1999) The giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) somatic nucleus can dedifferentiate in rabbit ooplasm and support early development of the reconstructed egg. *Sci. China (ser. C)* 42, 346-353.
- Cibelli J, Lanza RP, Campbell KHS, West MD (2002) *Principles of Cloning*. Academic Press, Amsterdam.
- Clark AT, Bodnar MS, Fox M, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, Pera RA (2004) Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum. Mol. Genet.* 13, 727-739.
- Comizzoli P, Crosier AE, Songsasen N, Gunther MS, Howard JG, Wildt DE (2009) Advances in reproductive science for wild carnivore conservation. *Reprod. Domest. Anim.* 44 Suppl 2, 47-52.
- Crespo C (2009) *Conservación de tejidos y células de mamíferos amenazados para el establecimiento de un banco de recursos genéticos. Aplicación al lince ibérico*. Tesis doctoral. Universidad Complutense, Madrid.
- Crosier AE, Marker L, Howard JG, Pukazhenthii BS, Helghali JH, Wildt DE (2007) Ejaculate traits in the Namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*): influence of age, season and captivity. *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 370-332.
- Czarny NA, Harris MS, De Iuliis GN, Rodger JC (2009) Acrosomal integrity, viability, and DNA damage of sperm from dasyurid marsupials after freezing or freeze drying. *Theriogenology* 72, 817-825.
- Davies TJ, Fritz SA, Grenyer R, Orme CD, Bielby J, Bininda-Emonds OR, Cardillo M, Jones KE, Gittleman JL, Mace GM, Purvis A (2008) Phylogenetic trees and the future of mammalian biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 Suppl 1, 11556-11563.
- Donoghue AM, Johnston LA, Seal US, Armstrong DL, Simmons LG, Gross T, Tilson RL, Wildt DE (1992) Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 96, 555-564.

- Drusenheimer N, Wulf G, Nolte J, Lee JH, Dev A, Dressel R, Gromoll J, Schmidtke J, Engel W, Nayernia K (2007) Putative human male germ cells from bone marrow stem cells. En: *Gamete Biology* (Ed. por S Gupta, K Koyama, JF Murray), pp. 69-76. SRF Supplement 63, Nottingham University Press, Nottingham.
- Evenson DP, Kasperson K, Wixon RL (2007) Analysis of sperm DNA fragmentation using flow cytometry and other techniques. En: *Spermatology* (Ed. por ERS Roldan, M Gomendio), pp 93-113. SRF Supplement 65, Nottingham University Press, Nottingham.
- Farstad W (2009) Cryopreservation of canine semen - new challenges. *Reprod. Domest. Anim.* 44 Suppl. 2, 336-341.
- Fitzpatrick JL, Evans JP (2009) Reduced heterozygosity impairs sperm quality in endangered mammals. *Biol. Lett.* 5, 320-323.
- França LR, Godinho CL (2003) Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cat (*Felis catus*). *Biol. Reprod.* 68, 1554-1561.
- Fritzsche P, Neumann K, Nasdal K, Gattermann R (2006) Differences in reproductive success between laboratory and wild-derived golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) as a consequence of inbreeding. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 60, 220-226.
- Gage MJG, SurrIDGE AK, Tomkins JL, Green E, Wiskin L, Bell DJ, Hewitt GM (2006) Reduced heterozygosity depresses sperm quality in wild rabbits, *Oryctolagus cuniculus*. *Curr. Biol.* 16, 612-617.
- Gañán N (2009) *Evaluación y criopreservación de espermatozoides como herramienta para la conservación de felinos amenazados. Aplicación en el caso del lince ibérico* (*Lynx pardinus*). Tesis doctoral. Universidad Complutense, Madrid.
- Gañán N, Gomendio M, Roldan ERS (2009d) Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology* 72, 1268-1277.
- Gañán N, González R, Garde JJ, Martínez F, Vargas A, Gomendio M, Roldan ERS (2009b) Assessment of semen quality, sperm cryopreservation and heterologous IVF in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reprod. Fertil. Dev.* 21, 848-859.
- Gañán N, González R, Sestelo A, Garde JJ, Sánchez I, Aguilar JM, Gomendio M, Roldan ERS (2009a) Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous *in vitro* fertilization in the bobcat (*Lynx rufus*). *Theriogenology* 72, 341-352.
- Gañán N, Sestelo A, Garde JJ, Martínez F, Vargas A, Sánchez I, Pérez-Aspa MJ, López-Bao JV, Palomares F, Gomendio M, Roldan ERS (2009c) Reproductive traits in captive and free-ranging males of the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Reproduction* (en prensa).

- Garde JJ, del Olmo A, Soler AJ, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS (2008) Effect of egg yolk, cryoprotectant, and various sugars on semen cryopreservation in endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*). *Anim. Reprod. Sci.* 108, 384-401.
- Garde JJ, Gomendio M, Espeso G, Roldan ERS (2006) Live birth of a Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) calf following intrauterine insemination of mother with frozen-thawed semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 218.
- Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS (2003) Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorr* and *G. dorcas neglecta*). *Biol. Reprod.* 69, 602-611.
- Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ (2004) Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427, 148-154.
- Godoy JA, Casas M, Fernández J (2009) Genetic issues in the implementation of the Iberian lynx ex situ conservation program. En: *Iberian Lynx Ex-Situ Conservation: An Interdisciplinary Approach* (Ed. por A Vargas, C Breitenmoser, U Breitenmoser). pp. 86-99. Fundación Biodiversidad, Madrid.
- Gomendio M, Cassinello J, Roldan ERS (2000) A comparative study of ejaculate traits in three endangered ungulates with different levels of inbreeding: fluctuating asymmetry as an indicator of reproductive and genetic stress. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 267, 875-882.
- Gomendio M, Harcourt AH, Roldan ERS (1998) Sperm competition in mammals. En: *Sperm Competition and Sexual Selection* (Ed. por TR Birkhead, AP Møller), pp 667-751. Academic Press, London.
- Gomendio M, Malo AF, Garde J, Roldan ERS (2007) Sperm traits and male fertility in natural populations. *Reproduction* 134, 19-29.
- Gomendio M, Malo AF, Soler AJ, Fernandez-Santos MR, Estes MC, Garcia AJ, Roldan ERS, Garde J (2006) Male fertility and sex ratio at birth in red deer. *Science* 314, 1445-1447.
- Gomendio M, Roldan ERS (2008) Implications of diversity in sperm size and function for sperm competition and fertility. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 439-447.
- Gómez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Cole A, Godke RA, Dresser BL (2004) Birth of African wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning Stem Cells* 6, 247-258.
- Gómez MC, Pope CE, Ricks DM, Lyons J, Dumas C, Dresser BL (2009) Cloning endangered felids using heterospecific donor oocytes and interspecies embryo transfer. *Reprod. Fertil. Dev.* 21, 76-82.

- González R, Berlinguer F, Espeso G, Ariu F, del Olmo A, Garde JJ, Gomendio M, Ledda S, Roldan ERS (2008) Use of a neuroleptic in assisted reproduction of the critically endangered Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*). *Theriogenology* 70, 909-922.
- Göriz F, Denhard M, Hildebrandt TB, Naidenko SV, Vargas A, Martinez F, López-Bao JV, Palomares F, Jewgenow K (2009) Non cat-like ovarian cycle in the Eurasian and the Iberian lynx. Ultrasonographical and endocrinological analysis. *Reprod. Domest. Anim.* 44 Suppl. 2, 87-91.
- Haas van Dorsser FJ, Strick JA (2005) Semen characteristics and sperm morphology in the Arabian leopard (*Panthera pardus nimr*) and how these vary with age and season. *Reprod. Fertil. Dev.* 17, 675-682.
- Hildebrandt TB, Hermes R, Walzer C, Sós E, Molnar V, Mezösi L, Schnorrenberg A, Silinski S, Streich J, Schwarzenberger F, Göriz F (2007) Artificial insemination in the anoestrous and the postpartum white rhinoceros using GnRH analogue to induce ovulation. *Theriogenology* 67, 1473-1484.
- Hirabayashi M, Kato M, Ito J, Hochi S (2005) Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. *Zygote* 13, 79-85.
- Holt WV (2001) Germplasm cryopreservation in elephants and wild ungulates. En: *Cryobanking the Genetic Resource* (Ed. por PF Watson, WV Holt), pp. 317-348. Taylor & Francis, London.
- Holt WV, Bennett PM, Volobouev V (1996) Genetic resource banks in wildlife conservation. *J. Zool. Lond.* 238, 531-544.
- Horne G, Atkinson AD, Pease EH, Logue JP, Brison DR, Lieberman BA (2004) Live birth with sperm cryopreserved for 21 years prior to cancer treatment: case report. *Hum. Reprod.* 19, 1448-1449.
- Howard JG, Wildt DE (2009) Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. *Theriogenology* 71, 130-148.
- Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF 3rd, Boiani M, Scholer HR (2003) Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300, 1251-1256.
- Isaac NJB, Jones KE, Gittleman JL, Purvis A (2005) Correlates of species richness in mammals: Body size, life-history and ecology. *Am. Nat.* 165, 600-607.
- IUCN (2008) IUCN Red List List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>.
- Jabbour HN, Hayssen V, Bruford MW (1997) Conservation of deer: contributions from molecular biology, evolutionary ecology, and reproductive physiology. *J. Zool., Lond.* 243, 461-484.
- Jewgenow K, Frank A, Göriz F, Vargas A, Naidenko S, Dehnhard M (2006) A

comparative analysis of the endocrine patterns of the Eurasian and the Iberian lynx in captivity. En: *Iberian Lynx Ex-situ Conservation Seminar Series* (Ed. por A Vargas), pp. 116-117. Fundación Biodiversidad, Sevilla and Doñana.

- Jewgenow K, Göritz F, Vargas A, Dehnhard M (2009) Seasonal profiles of ovarian activity in Iberian lynx (*Lynx pardinus*) based on urinary hormone metabolite analyses. *Reprod. Domest. Anim.* 44 Suppl. 2, 92-97.
- Jimenez JA, Hughes KA, Alaks G, Graham L, Lacy RC (1994) An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat. *Science* 266, 271-273.
- Johnson WE, Godoy JA, Palomares F, Fernández M, Revilla E, O'Brien SJ (2004) Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. *J. Hered.* 95, 19-28.
- Johnston LA, Armstrong DL, Brown JL (1994) Seasonal effects on seminal and endocrine traits in the captive snow leopard (*Panthera uncia*). *J. Reprod. Fertil.* 102, 229-236.
- Kee K, Angeles VT, Flores M, Nguyen HN, Reijo Pera RA (2009) Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature* (en prensa).
- Kee K, Gonsalves JM, Clark AT, Reijo Pera RA (2006) Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev.* 15, 831-837.
- Keller LF (1998) Inbreeding and its fitness effects in an insular population of song sparrows (*Melospiza melodia*). *Evolution* 52, 240-250.
- Keller LF, Arcese P, Smith JNM, Hochachka WM, Stearns SC (1994) Selection against inbred song sparrows during a natural population bottleneck. *Nature* 372, 356-357.
- Keller LF, Grant PR, Grant BR, Petren K (2002) Environmental conditions affect the magnitude of inbreeding depression in survival of Darwin's finches. *Evolution* 56, 1229-1239.
- Kenagy GJ, Trombulak SC (1986) Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J. Mammal.* 67, 1-22.
- Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, Hwang WS, Hossein MS, Kim JJ, Shin NS, Kang SK, Lee BC (2007) Endangered wolves cloned from adult somatic cells. *Cloning Stem Cells* 9, 130-137.
- Konior M, Keller L, Radwan J (2005) Effect of inbreeding and heritability of sperm competition success in the bulb mite *Rhizoglyphus robini*. *Heredity* 94, 577-581.

- Kusakabe H, Yanagimachi R, Kamiguchi Y (2008) Mouse and human spermatozoa can be freeze-dried without damaging their chromosomes. *Hum. Reprod.* 23, 233-239.
- Lanza RP, Cibelli JB, Diaz F, Morales CT, Farin PW, Farin CE, Hammer CJ, West MD, Damiani P (2000b) Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning* 2, 79-90.
- Lanza RP, Dresser BL, Damiani P (2000a) Cloning Noah's ark. *Sci. Am* 283, 84-89.
- Lande R (1993) Risks of population extinction from demographic and environmental stochasticity and random catastrophes. *Am. Nat.* 142, 911-927.
- Leibo SP, Songsasen N (2002). Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology* 57, 303-326.
- Liu JL, Kusakabe H, Chang CC, Suzuki H, Schmidt DW, Julian M, Pfeffer R., Bormann CL, Tian XC, Yanagimachi R, Yang X (2004) Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod.* 70, 1776-1781.
- Loi P, Ptak G, Barboni B, Fulka J Jr, Cappai P, Clinton M (2001) Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 962-964.
- Loskutoff NM, Bartels P, Meintjes M, Godke RA, Schiewe MC (1995) Assisted reproductive technology in nondomestic ungulates: A model approach to preserving and managing genetic diversity. *Theriogenology* 43, 3-12.
- Loskutoff NM, Simmons HA, Goulding M, Thompson G, Jongh TD, Simmons LG (1996) Species and individual variations in cryoprotectant toxicities and freezing resistance of epididymal sperm from African antelope. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 527-535.
- Lue Y, Erkkila K, Liu PY, Ma K, Wang C, Hikim AS, Swerdloff RS (2007) Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: potential implication for men with testicular failure. *Am. J. Pathol.* 170, 899-908.
- Luvoni GC (2006) Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 66, 101-111.
- Li MW, Willis BJ, Griffey SM, Spearow JL, Lloyd KC (2009) Assessment of three generations of mice derived by ICSI using freeze-dried sperm. *Zygote* 17, 239-251.
- McGinnis LK, Zhu L, Lawitts JA, Bhowmick S, Toner M, Biggers JD (2005) Mouse sperm desiccated and stored in trehalose medium without freezing. *Biol. Reprod.* 73, 627-633.
- Madsen T, Shine R, Olsson M, Wittzell H (1999) Restoration of an inbred adder population. *Nature* 402, 34-35.

- Malo AF, Garde JJ, Soler AJ, Garcia AJ, Gomendio M, Roldan ERS (2005) Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biol. Reprod.* 72, 822-829.
- Malo AF, Gomendio , Garde J, Lang-Lenton B, Soler AJ, Roldan ERS (2006) Sperm design and sperm function. *Biol. Lett.* 2, 246-249.
- Monfort SL, Asher GW, Wildt DE, Wood TC, Schiewe MC, Williamson LR, Bush M, Rall WF (1993) Successful intrauterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) with frozen-thawed spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 99, 459-465.
- Margulis SW, Walsh A (2002) The effects of inbreeding on testicular sperm concentration in *Peromyscus polionotus*. *Reprod. Fertil. Dev.* 14, 63-67.
- Martins CF, Bao SN, Dode MN, Correa GA, Rumpf R (2007) Effects of freeze-drying on cytology, ultrastructure, DNA fragmentation, and fertilizing ability of bovine sperm. *Theriogenology* 67, 1307-1315.
- May RM (1995) The cheetah controversy. *Nature* 374, 309-310.
- Menotti-Raymond M, O'Brien SJ (1993) Dating the genetic bottleneck of the African cheetah. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3172-3176.
- Merola MA (1994) A reassessment of homozygosity as the cause for inbreeding depression in the cheetah, *Acinomyx jubatus*: Implications for conservation. *Conserv. Biol.* 8, 961-971.
- Mittermeier RA, Robles Gil P, Hoffman M, Pilgrim J, Brooks T, Mittermeier CG, Lamoreaux J, da Fonseca GAB (2005) *Hotspots Revisited: Earth's Biologically Richest and Most Endangered Terrestrial Ecoregions*. Conservation International-The University of Chicago Press.
- Mooers AØ, Heard SB (1997) Inferring evolutionary process from phylogenetic tree shape. *Q. Rev. Biol.* 72, 31-54.
- Moore H, Aflatoonian B (2007) From stem cells to spermatozoa and back. En: *Spermatology* (Ed. por ERS Roldan, M Gomendio), pp 19-32. SRF Supplement 65, Nottingham University Press, Nottingham.
- Morais RN, Mucciolo RG, Gomes MLF, Lacerta O, Moraes W, Moreira N, Gram LH Swanson WF, Brown JL (2002) Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. wiedii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology* 57, 2027-2041.
- Morato RG, Conforti VA, Azevedo FC, Jacomo ATA, Silveira L, Sana D, Nunes ALV, Gimaraes MABV, Barnabe RC (2001) Comparative analyses of semen and endocrine characteristics of free-living versus captive jaguars (*Panthera onca*). *Reproduction* 122, 745-751.

- Morato RG, Verrreschi ITN, Guimaraes MABV, Cassaro K, Pessuti C, Barnabe RC (2004) Seasonal variation in the endocrine-testicular function of captive jaguars (*Panthera onca*). *Theriogenology* 61, 1273-1281.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GA, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403, 853-858.
- Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, Dev A, Wulf G, Ehrmann IE, Elliott DJ, Okpanyi V, Zechner U, Haaf T, Meinhardt A, Engel W (2006a) In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev. Cell.* 11, 125-132.
- Nayernia K, Lee JH, Drusenheimer N, Nolte J, Wulf G, Dressel R, Gromoll J, Engel W (2006b) Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab. Invest.* 86, 654-663.
- O'Brien SJ, Roelke ME, Newman A, Winkler CA, Meltzer D, Colly L, Everman J, Bush M, Wildt DE (1985) Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* 227, 1428-1434.
- O'Brien SJ, Wildt DE, Bush M, Caro TM, FitzGibbon C, Aggundey I, Leakey RE (1987) East African cheetahs: evidence for two population bottlenecks? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 508-511.
- O'Brien SJ, Wildt DE, Goldman D, Merrill CR, Bush M (1983) The cheetah is depauperate in genetic variation. *Science* 221, 459-462.
- Ogonuki N, Mochida K, Miki H, Inoue K, Fray M, Iwaki T, Moriwaki K, Obata Y, Morozumi K, Yanagimachi R, Ogura A (2006) Spermatozoa and spermatids retrieved from frozen reproductive organs or frozen whole bodies of male mice can produce normal offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 13098-13103.
- Oh HJ, Kim MK, Jang G, Kim HJ, Hong SG, Park JE, Park K, Park C, Sohn SH, Kim DY, Shin NS, Lee BC (2008) Cloning endangered gray wolves (*Canis lupus*) from somatic cells collected postmortem. *Theriogenology* 70, 638-647.
- Palomares F, Revilla E, Calzada J, Fernandez N, Delibes M (2005) Reproduction and pre-dispersal survival of Iberian lynx in a subpopulation of the Doñana National Park. *Biol. Conserv.* 122, 53-59.
- Park TS, Galic Z, Conway AE, Lindgren A, van Handel BJ, Magnusson M, Richter L, Teitell MA, Mikkola HK, Lowry WE, Plath K, Clark AT (2009) Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells. *Stem Cells* 27, 783-795.
- Pelican K, Abaigar T, Vargas A, Rodriguez JM, Bergara J, Rivas A, Martinez F, Rodriguez D, Brown J, Wildt DE (2006) Hormone profiles in the Iberian lynx: Application to in situ and ex situ conservation. En: *Iberian Lynx Ex-situ Conservation. Seminar Series* (Ed. por A Vargas), pp. 113-115. Fundación

Biodiversidad, Sevilla and Doñana.

- Pope CE, Loskutoff NM (1999) Embryo transfer and semen technology from cattle applied to nondomestic artiodactyls. En: *Zoo and Wildlife Medicine* (Ed. por ME Fowler, RE Miller), pp 597-604. WB Saunders, Philadelphia.
- Pukazhenthil B, Comizzoli P, Travis AJ, Wildt DE (2006a) Applications of emerging technologies to the study of conservation of threatened and endangered species. *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 77-90.
- Pukazhenthil BS, Neubauer K, Jewgenow K, Howard JG, Wildt D (2006b) The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology* 66, 112-121.
- Pukazhenthil B, Wildt DE (2004) Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 33-46.
- Purvis A (1996) Using interspecies phylogenies to test macroevolutionary hypotheses. En: *New Uses for New Phylogenies* (Ed. por PH Harvey, AJ Leigh Brown, J Maynard Smith, S Nee, pp 153-168. Oxford University Press, Oxford.
- Ralls K, Ballou J (1986) Captive breeding programs for populations with a small number of founders. *Trends Ecol. Evol.* 1, 19-22.
- Ralls K, Brugger K, Ballou J (1979) Inbreeding avoidance and juvenile mortality in small populations of ungulates. *Science* 206, 1101-1103.
- Rodriguez-Martinez H (2006) Can we increase the estimative value of semen assessment? *Reprod. Dom. Anim.* 41 Suppl. 2, 2-10.
- Rodriguez-Martinez H (2007) State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 91-101.
- Roelke ME, Martenson JS, O'Brien SJ (1993) The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. *Curr. Biol.* 3, 340-350.
- Roldan ERS (2006) Better intracytoplasmic sperm injection without sperm membranes and acrosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 17585-17586.
- Roldan ERS, Cassinello J, Abaigar T, Gomendio M (1998) Inbreeding, fluctuating asymmetry, and ejaculate quality in an endangered ungulate. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 265, 243-248.
- Roldan ERS, Gomendio M, Garde J, Espeso G, Ledda S, Berlinguer F, del Olmo A, Soler A, Arregui L, Crespo C, Gonzalez, R (2006) Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: Preservation of genetic variation through the organization of genetic resource banks. *Reprod. Domest. Anim.* 41 Suppl. 2, 82-92.

- Roldan ERS, Gomendio M, Garde JJ, Gañán N, González R, Crespo C, Arregui L (2009) A genetic resource bank and assisted reproduction for the critically endangered Iberian lynx. In: *Iberian Lynx Ex-Situ Conservation: An Interdisciplinary Approach* (Ed. by A Vargas, C Breitenmoser, U Breitenmoser). pp. 304-314. Fundación Biodiversidad, Madrid.
- Roldan ERS, Gomendio M, Vitullo AD (1992) The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: female selection and sperm competition. *Biol. Rev.* 67, 551-593.
- Roldan ERS, Shi QX (2007) Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Front. Biosci.* 12, 89-104
- Roth TL, Bush LM, Wildt DE, Weiss RB (1999) Scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*) spermatozoa are functionally competent in a heterologous bovine *in vitro* fertilization system after cryopreservation on dry ice, in a dry shipper, or over liquid nitrogen vapor. *Biol. Reprod.* 60, 493-498.
- Ruiz-López MJ, Roldan ERS, Espeso G, Gomendio M (2009) Pedigrees and microsatellites among endangered ungulates: what do they tell us? *Mol. Ecol.* 18, 1352-1364.
- Saccheri I, Kuussaari M, Kankare M, Vikman P, Fortelius W, Hanski I (1998) Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392, 491-494.
- Sachs JD, Baillie JE, Sutherland WJ, Armsworth PR, Ash N, Beddington J, et al. (2009) Biodiversity conservation and the Millennium Development Goals. *Science* 325, 1502-1503.
- Schipper J, Chanson JS, Chiozza F, Cox NA, Hoffmann M, Katariya V, et al. (2008) The status of the world's land and marine mammals: diversity, threat, and knowledge. *Science* 322, 225-230.
- Sechrest W, Brooks TM, da Fonseca GA, Konstant WR, Mittermeier RA, Purvis A, Rylands AB, Gittleman JL (2002) Hotspots and the conservation of evolutionary history. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 2067-2071.
- Slate J, Pemberton J (2007) Does reduced heterozygosity depress sperm quality in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*)? *Curr. Biol.* 16, R790-R791.
- Soler AJ, Poulin N, Fernández-Santos MR, Cognie Y, Estes MC, Garde JJ, Mermillod P (2008) Heterologous *in vitro* fertility evaluation of cryopreserved Iberian red deer epididymal spermatozoa with zona-intact sheep oocytes and its relationship with the characteristics of thawed spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 293-298.
- Stoops MA, Bond JB, Bateman HL, Campbell MK, Levels GP, Bowsher TR, Ferrell ST, Swanson WF (2007) Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous *in vitro* fertilisation success in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Reprod. Fertil. Dev.* 19, 685-694.

- Surani MA (2004) How to make eggs and sperm. *Nature* 427, 106-107.
- Swanson WF, Brown JL, Wildt DE (1996) Influence of seasonality on reproductive traits of the male Pallas' cat (*Felis manul*) and implications for captive management. *J. Zoo Wildlife Med.* 27, 234-240.
- Swanson WF, Stoops MA, Magarey GM, Herrick JR (2007) Sperm cryopreservation in endangered felids: developing linkage of *in situ-ex situ* populations. En: *Spermatology* (Ed. por ERS Roldan, M Gomendio), pp 417-432. SRF Supplement 65, Nottingham University Press, Nottingham.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 1-12.
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Thiangtum K, Swanson WF, Howard J, Tunwattana W, Tongthainan D, Wichasilpa W, Patumrattanathan P, Pinyopoommintr T (2006) Assessment of basic seminal characteristics, sperm cryopreservation and heterologous *in vitro* fertilisation in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*). *Reprod. Fertil. Dev.* 18, 373-382.
- Thornhill NW, ed (1993) *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Tilgner K, Atkinson SP, Golebiewska A, Stojkovic M, Lako M, Armstrong L (2008) Isolation of primordial germ cells from differentiating human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 3075-3085.
- Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T (2003) Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 11457-11462.
- Vale R, Vale B (2009) *Time to Eat the Dog: The Real Guide to Sustainable Living*. Thames & Hudson, London.
- Vargas A, Sanchez I, Godoy J, Roldan E, Martínez F, Simón MA, eds (2007) *Revised Action Plan for Captive Breeding of Iberian Lynx*, 4th edition. Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.
- Vargas A, Sánchez I, Martínez F, Rivas A, Godoy JA, Roldán E, Simón MA, Serra R, Pérez MJ, Enseñat C, Delibes M, Aymerich M, Sliwa A, Breitenmoser U (2008) The Iberian lynx *Lynx pardinus* conservation breeding program. *Int. Zoo Yearbk.* 42, 190-198.
- Vargas A, Sánchez I, Martínez F, Rivas A, Godoy JA, Roldan E, Simón MA, Serra R, Pérez MJ, Sliwa A, Delibes M, Aymerich M, Breitenmoser U (2009) Interdisciplinary methods in the Iberian lynx (*Lynx pardinus*) conservation breeding programme. En: *Iberian Lynx Ex-Situ Conservation: An Interdisciplinary Approach* (Ed. por A Vargas, C Breitenmoser, U Breitenmoser). pp. 56-71.

Fundación Biodiversidad, Madrid.

- Vitousek PM, Mooney HA, Lubchenco J, Melillo JM (1997) Human domination of Earth's ecosystems. *Science* 277, 494–499.
- Wakayama T, Yanagimachi R (1998) Development of normal mice from oocytes injected with freeze-dried spermatozoa. *Nat. Biotechnol.* 16, 639-641.
- Ward MA, Kaneko T, Kusakabe H, Biggers JD, Whittingham DG, Yanagimachi R (2003) Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol. Reprod.* 69, 2100-2108.
- Watanabe H, Asano T, Abe Y, Fukui Y, Suzuki H (2009) Pronuclear formation of freeze-dried canine spermatozoa microinjected into mouse oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.* (en prensa).
- Watson PF, Holt WV, eds (2001) *Cryobanking the Genetic Resource. Wildlife Conservation for the Future?* Taylor and Francis, London.
- Weir JT, Schluter D (2007) The latitudinal gradient in recent speciation and extinction rates of birds and mammals. *Science* 315, 1574-1576.
- White KL, Bunch TD, Mitalipov S, Reed WA (1999) Establishment of pregnancy after the transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. *Cloning* 1, 47-54.
- Wildt DE (1992) Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 247-257.
- Wildt DE, Bush M, Goodrowe KL, Packer C, Pusey AE, Brown JL, Joslin P, O'Brien SJ (1987b) Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature* 329, 328-331.
- Wildt DE, Bush M, Howard JG, O'Brien SJ, Meltzer D, van Dyk A, Ebedes H, Brand DJ (1983) Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol. Reprod.* 29, 1019-1025.
- Wildt DE, Howard J Brown J (2001) Reproductive sciences in carnivore conservation. En: *Carnivore Conservation* (Ed. por JL Gittleman, SM Funk, D Macdonald, RK Wayne) Cambridge), pp. 359-371. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wildt DE, Howard JG, Hall LL, Bush M (1986) Reproductive physiology of the clouded leopard: I. Electroejaculates contain high proportion of pleimorphic spermatozoa throughout the year. *Biol. Reprod.* 34, 937-947.
- Wildt DE, O'Brien SJ, Howard JG, Caro TM, Roelke ME, Brown JL, Bush M (1987a) Similarity in ejaculate-endocrine characteristics in captive versus free-ranging cheetahs of two subspecies. *Biol. Reprod.* 36, 351-360.

Wildt DE, Rall WF, Critser JK, Monfort SL, Seal US (1997) Genome resource banks. Living collections for biodiversity conservation. *Bioscience* 47, 689-698.

Wildt DE, Wemmer C (1999) Sex and wildlife: the role of reproductive science in conservation. *Biodiv. Conserv.* 8, 965-976.

Wilson EO (2002) *El Futuro de la Vida*. Galaxia Gutenberg, Barcelona.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.