



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estrategias reproductivas enfocadas en la conservación del guepardo (*Acinonyx jubatus*)

Reproductive strategies focused on cheetah conservation (*Acinonyx jubatus*)

Autor/es

Maria Fernández Mir

Director/es

Antonio Del Niño Jesús García

Facultad de Veterinaria

2023

ÍNDICE

1. Resumen/Abstract	1
2. Introducción.....	2
3. Justificación y objetivos	4
4. Metodología	4
5. Resultados y discusión	5
5.1. Generalidades de la especie	5
5.1.1. Diversidad genética	5
5.1.2. Estado de la población.....	6
5.1.3. Amenazas.....	8
5.1.4. Status de conservación.....	8
5.2. Reproducción	9
5.2.1. Fisiología reproductiva de la hembra	9
5.2.1.1. Pubertad y ciclo sexual	9
5.2.1.2. Gestación	10
5.2.2. Fisiología reproductiva del macho.....	12
5.2.3. Biotecnologías reproductivas	14
5.2.3.1. Recolección de semen	15
5.2.3.2. Criopreservación de semen	16
5.2.3.3. Control del ciclo.....	16
5.2.3.4. Inseminación artificial	17
5.2.3.5. Fecundación <i>in vitro</i> , obtención y transferencia de embriones.....	19
5.2.3.6. Bancos de recursos genéticos	21
5.3. Planes y herramientas de conservación	22
6. Conclusiones/Conclusions	24
7. Valoración personal	26
8. Bibliografía/infografía.....	27

1. RESUMEN

Las biotecnologías reproductivas van cobrando cada vez más importancia en el mundo del guepardo. Esta especie está considerada como “vulnerable” ya que solo quedan 7.100 individuos confinados al 9 % de su rango de distribución histórico, por lo que es de suma importancia evitar que se extingan. Se enfrenta a múltiples amenazas como la destrucción de su hábitat, la caza furtiva y el tráfico ilegal. A pesar de tener una baja diversidad genética, han conseguido reproducirse en la naturaleza sin demasiados problemas. Sin embargo, no tienen la misma suerte en cautiverio. Por eso, en este trabajo repasaremos algunos aspectos de la fisiología reproductiva y revisaremos algunas de las biotecnologías más usadas en el guepardo, como son la recolección de semen y la criopreservación, la estimulación hormonal de la hembra, la extracción de ovocitos, la inseminación artificial, la fecundación *in vitro* y la transferencia de embriones. Además, son de gran importancia los planes de conservación que, en términos generales, todos abordan objetivos para promover la coexistencia del guepardo-humano, mejorar la planificación del uso de la tierra y reducir la fragmentación del hábitat.

Abstract

Reproductive biotechnologies are becoming increasingly important in the world of the cheetah. This species is considered "vulnerable" since there are only 7.100 individuals left confined to 9 % of its historical distribution range, so it is extremely important to prevent them from becoming extinct. They face multiple threats such as the destruction of their habitat, poaching, and illegal trafficking. Despite having low genetic diversity, they have managed to reproduce in the wild without too many problems. However, they don't have the same luck in captivity. For this reason, in this work we will review some aspects of reproductive physiology and we will review some of the most used biotechnologies in the cheetah, such as semen collection and cryopreservation, hormonal stimulation of the female, oocyte extraction, artificial insemination, *in vitro* fertilization and embryo transfer. In addition, conservation plans address objectives to promote cheetah-human coexistence, improve land use planning, and reduce habitat fragmentation are of great importance.

2. INTRODUCCIÓN

El guepardo es uno de los miembros de la familia Felidae [Tabla 1], que comprende alrededor de 40 especies vivas (Kitchener et al., 2017). Es el mamífero terrestre más veloz, capaz de correr a una velocidad de 100 km/h en carreras de corta distancia (Sharp, 1997). El nombre común "cheetah" deriva de la palabra hindú "chita" que significa "el manchado". El nombre científico "acinonyx" puede derivarse de las palabras griegas "akaina" que significa "una espina" y "onyx" que significa "una garra". El epíteto específico "jubatus" es latino y se refiere al pelo largo dorsal (manto) en los guepardos juveniles y algunos adultos (San Diego Zoo Wildlife Alliance, 2018).

Uno de los aspectos más sorprendentes de los estudios de genética molecular en los félidos fue la rapidez con la que estos evolucionaron en 8 linajes diferentes (durante un periodo de 6 millones de años), cada uno con historias biogeográficas distintas. El guepardo está incluido en el linaje Puma, que fue el sexto de los ocho linajes que se ramificaron durante la evolución de los felinos [Figura 1]. Se sabe que los parientes vivos más próximos al guepardo son el puma (*Puma concolor*) y el jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*) [Figura 1]. Tiene 19 pares cromosómicos (es decir, 38 cromosomas) como la mayoría de los felinos y es el único representante existente de su género (*Acinonyx*) (Schmidt-Küntzel et al., 2018).

Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Mammalia
Orden	Carnivora
Familia	Felidae
Subfamilia	Felinae
Género	<i>Acinonyx</i>
Especie	<i>Acinonyx jubatus</i>
Subespecie	<i>Aj jubatus</i> <i>Aj raineyi</i> <i>Aj soemmeringii</i> <i>Aj venaticus</i> <i>Aj hecki</i>

TABLA 1. Taxonomía del guepardo (San Diego Zoo Wildlife Alliance, 2018)

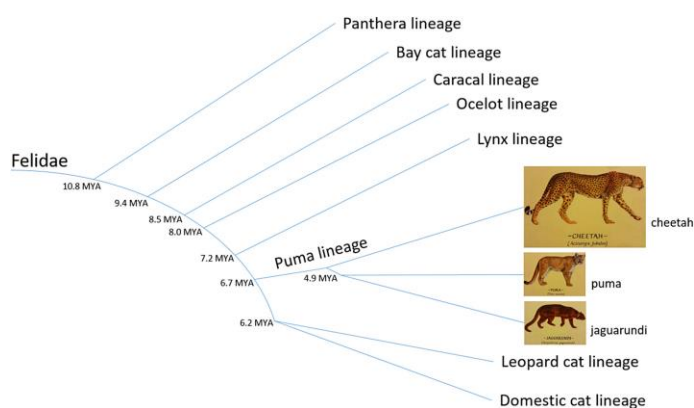


FIGURA 1. Árbol filogenético del guepardo (*Acinonyx jubatus*) dentro del linaje Puma. El tiempo de divergencia para cada linaje se indica en la base de la rama en millones de años (Schmidt-Küntzel et al., 2018)

Como recoge Krausman y Morales (2005) en la revista *Mammalian Species*, hasta la fecha se han identificado 5 subespecies:

- *Acinonyx jubatus jubatus*, distribuido por el sur de África
- *Acinonyx jubatus raineyi*, distribuido por el este de África
- *Acinonyx jubatus soemmeringii*, distribuido por el noreste de África
- *Acinonyx jubatus venaticus*, distribuido en Irán
- *Acinonyx jubatus hecki*, distribuido en África occidental y noroccidental [Figura 2].

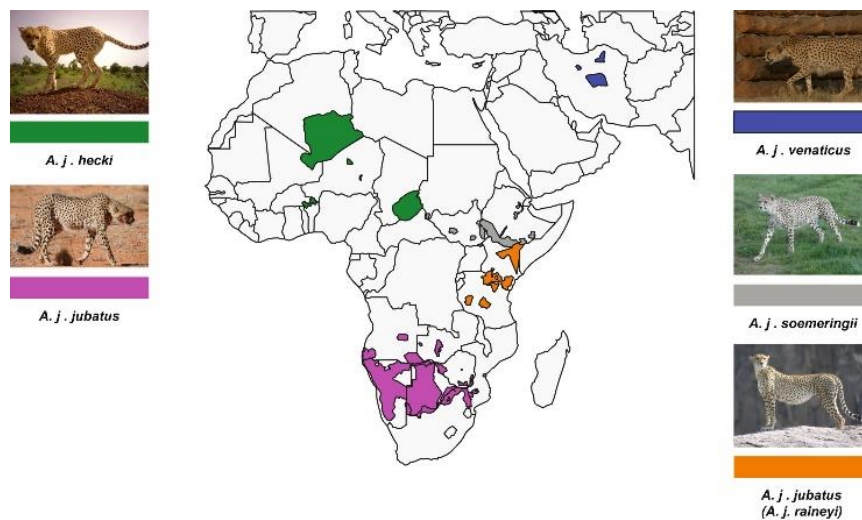


FIGURA 2. Distribución actual de las cinco subespecies clásicas de guepardo (Prost et al., 2022)

En cuanto al hábitat, en África los guepardos se encuentran en una amplia gama de hábitats y ecorregiones, que van desde bosques secos y matorrales espesos hasta praderas y desiertos muy áridos, como el Sahara. En Irán, el hábitat del guepardo consiste en el desierto, donde el terreno en el que se encuentran varía desde llanuras y salinas hasta colinas erosionadas y cordilleras desérticas escarpadas (Khalatbari et al., 2018). Un estudio reciente ha indicado que los bosques de miombo (Zimbabue, Zambia, Mozambique, Angola, República Democrática del Congo, Tanzania y Malaui) pueden ser un hábitat importante para el guepardo (Strampelli et al., 2021). Su estilo de vida principalmente diurno se desvía de la mayoría de los otros felinos salvajes (Meissner et al., 2023). Capturan una amplia variedad de presas, dependiendo del hábitat y la ubicación geográfica, pero prefieren presas de peso medio, como la gacela (*Gebretextsae* y Kebede, 2022).

La población mundial de guepardos se estima en solo unos 7.100 individuos y están confinados al 9 % de su rango de distribución histórico (Durant, SM., Mitchell, N. y Groom, R., 2017). En la naturaleza pueden vivir hasta los 12 - 14 años, pero de normal los machos suelen vivir hasta los 8 y las hembras hasta los 7. En cautiverio, el promedio de vida es de 8 a 12 años.

El individuo más longevo tenía 21 años de edad cuando murió (San Diego Zoo Wildlife Alliance, 2018). En la población cautiva europea, de media el 30 % de los cachorros no sobreviven el primer mes, aunque después de sobrevivir los dos primeros años, la tasa de mortalidad disminuye. En la naturaleza, una de las principales causas del declive de los cachorros se debe a la depredación de leones y hienas manchadas (Laurenson, MK., Caro, TM. y Borner, M., 1992).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Dada la situación en la que se encuentra el guepardo, he decidido realizar una revisión bibliográfica para ayudar a comprender más profundamente los aspectos reproductivos de estos felinos y todas las biotecnologías y procedimientos relacionados con su fertilidad. Por tanto, los objetivos que persigue este trabajo son:

- Realizar una breve descripción de la fisiología reproductiva, profundizando en los aspectos más relevantes.
- Detallar las principales biotecnologías reproductivas usadas actualmente para este tipo de especies.
- Conocer cómo son algunos de los programas de conservación.
- Analizar las nuevas tendencias en un futuro cercano de los planes de conservación.

4. METODOLOGÍA

Esta revisión bibliográfica se ha llevado a cabo mediante la búsqueda de documentos para obtener las fuentes bibliográficas con las que se ha desarrollado la parte más importante del trabajo. Este proceso se ha realizado indagando en las bases de datos, buscadores y repositorios más recurrentes como Science Direct, Web of Science, SciELO, AlcorZe, Dialnet, Wiley Online Library y Researchgate. También en libros y revistas científicas.

Se ha revisado la información obtenida para intentar resolver los objetivos planteados y se ha descartado la que estaba desactualizada o no se ajustaba al tema.

Las estrategias de búsqueda han consistido en el uso de palabras clave como: “cheetah”, seguidas de “assisted reproductive technology (ART)”, “reproductive biotechnologies”, “wild felids”, “in vitro fertilization”, “cryopreservation”, “embryo transfer”, “conservation”, etc.

La bibliografía utilizada en la realización de este trabajo se ha citado siguiendo las reglas de HARVARD BUZ tal como se indica en la guía docente de la asignatura.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Generalidades de la especie

5.1.1. Diversidad genética

Según Kitchener et al. (2017) *Aj raineyi* y *Aj jubatus* se habían fusionado en una sola subespecie, basándose en datos de ADN mitocondrial (ADNmt). Sin embargo, Prost et al. (2022) muestra que la filogeografía del guepardo es más compleja de lo que se creía anteriormente, y que los guepardos de África Oriental (*Aj raineyi*) son genéticamente distintos de los individuos del sur de África (*Aj jubatus*), lo que justifica su reconocimiento como una subespecie distinta. Meissner et al. (2023) también afirman que son dos subespecies diferentes, ya que su estudio muestra que solo el ADNmt podría no ser un indicador suficiente para el origen geográfico y la asignación de subespecies de un guepardo.

Muchos autores puntualizan que son necesarios más análisis genéticos para evaluar si estas designaciones de subespecies son apropiadas o si es conveniente que haya una mayor consolidación (Durant et al., 2022).

Los guepardos tienen una baja diversidad genética que está respaldada por un cuello de botella genético o una serie de reducciones demográficas en el tiempo y el espacio. Se estimó que el evento demográfico que causó esta pérdida drástica de diversidad ocurrió durante el final del Pleistoceno (hace 10.000–12.000 años) (Schmidt-Küntzel et al., 2018). Por ejemplo, el guepardo iraní (*Aj venaticus*) que está en peligro crítico, tiene la cantidad más baja de diversidad genética de todas las subespecies actualmente reconocidas (Charruau et al., 2011).

Se han realizado varios estudios que muestran esta diversidad genética reducida (O'Brien et al., 1985). Un ejemplo son los estudios funcionales que demostraron que los aloinjertos de piel recíprocos entre 12 guepardos no emparentados y 2 hermanos no mostraron signos de rechazo agudo del injerto, mientras que los xenoinjertos (de gato doméstico, *Felis catus*) fueron rápidamente rechazados. Estos resultados se atribuyeron a la reducción funcional de la variación alélica en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) del guepardo, una importante familia de genes inmunitarios, que codifica las proteínas de la superficie celular responsables de distinguir las moléculas extrañas de las propias. La variación funcional reducida finalmente fue respaldada por estudios moleculares. A medida que las técnicas de secuenciación estuvieron disponibles, también se observaron bajos niveles de variación genética en el ADNmt. Los genomas de los guepardos son, en promedio, un 95 % homocigóticos en comparación con otros genomas de mamíferos [Figura 3]. (Dobrynin et al., 2015). Eso se debe a que la descendencia de individuos consanguíneos se caracteriza por un incremento de esta homocigosidad y una reducción de la eficacia biológica, un fenómeno conocido como depresión consanguínea (Roldan, 2009).

Para evitar la consanguinidad es fundamental promover el intercambio de material genético entre diferentes poblaciones y mantener poblaciones de gran tamaño (Gomendio et al., 2006).

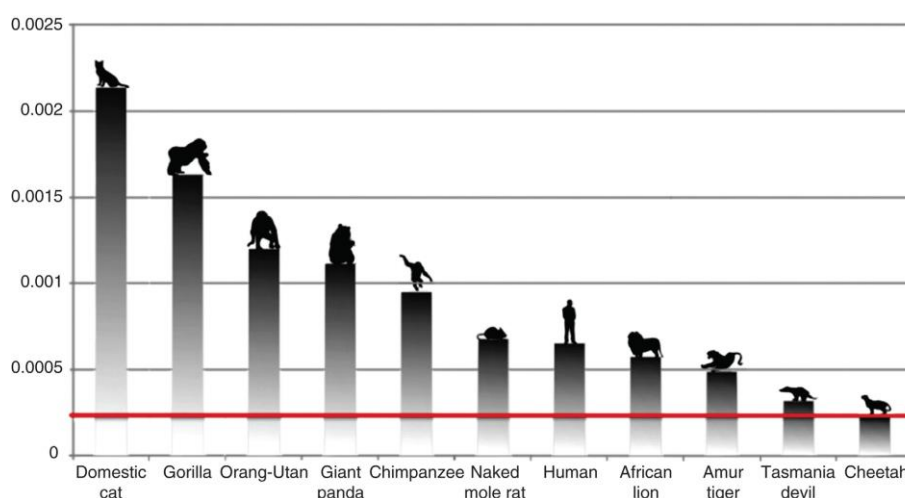


FIGURA 3. Representación de la diversidad del genoma del guepardo (*Acinonyx jubatus*) en relación con el de otros mamíferos. (Dobrynin et al., 2015)

Aun así, es sorprendente como el guepardo ha persistido a pesar de niveles notablemente bajos de variación genética. En general, se considera que la variación genómica es crucial para la supervivencia a largo plazo de las especies, ya que brinda potencial para respuestas adaptativas (selección natural) a los cambios ambientales, como el cambio climático, y la adaptabilidad de la inmunidad a los brotes de enfermedades (O'Brien y Evermann, 1988). Sin embargo, el descubrimiento de que el evento o eventos que condujeron a la pérdida de diversidad podrían ubicarse hace más de 10.000 años y que el número de guepardos se había recuperado en el siglo XIX, indica la capacidad del guepardo para sobrevivir y prosperar, a pesar de los niveles reducidos de diversidad genética, durante periodos prolongados de tiempo. No obstante, esto no garantiza la supervivencia del guepardo en el futuro, ya que la falta de diversidad limita la capacidad de adaptarse y evolucionar, en particular ante cambios importantes en las condiciones ambientales o la presión patógena.

5.1.2. Estado de la población

La población mundial de guepardos se estima en unos 7.100 individuos y están confinados al 9 % de su rango de distribución histórico. Establecer y mantener áreas protegidas (AP) son herramientas clave para la conservación de la biodiversidad. Sin embargo, este enfoque es insuficiente para el guepardo, ya que se distribuye ampliamente y hay pocos individuos [Figura 4].

Es uno de los carnívoros de mayor distribución, con áreas documentadas de más de 3.000 km² y desplazamientos de animales trasladados superiores a 1.000 km. Sin embargo, las densidades rara vez superan los 0,02 individuos/km² y se han registrado tan bajas como 0,0002 individuos/km². No solo ha habido una reducción preocupante en el rango global de guepardos, sino que el rango actual está extremadamente fragmentado. Todos los guepardos del mundo están distribuidos en 33 poblaciones. Más de la mitad (entre unos 3.577 y 4.032 adultos y adolescentes) se encuentran en una sola población transfronteriza que se extiende por el sur de África (Zimbabue, Sudáfrica, Namibia y Botswana). Apenas 400.000 km² contienen aproximadamente el 55 % de la población conocida, gran parte de ella en tierras desprotegidas (Weise et al., 2017).

Solo otra población comprende más de 1.000 individuos, y la mayoría de las poblaciones (91 %) comprende 200 individuos o menos. Seis poblaciones ni siquiera llegan a los dos dígitos (Durant, SM., Mitchell, N. y Groom, R., 2017).

En Asia, el declive del guepardo ha sido particularmente precipitado. Los guepardos han sido extirpados del 98 % de su área de distribución histórica y una población de guepardos asiáticos está en peligro crítico de extinción. *Acinonyx jubatus venaticus* sobrevive sólo en Irán. En 2017 se estimaba que esta población remanente comprendía menos de 50 individuos distribuidos en tres áreas principales de distribución, pero ahora solo quedan 12 (Solo quedan 12 guepardos en Irán, en grave peligro de extinción, 2022).

Estos resultados respaldan la conclusión para revisar el estado de amenaza del guepardo y considerar la inclusión de la especie en el estado de peligro de extinción (Durant et al., 2022).

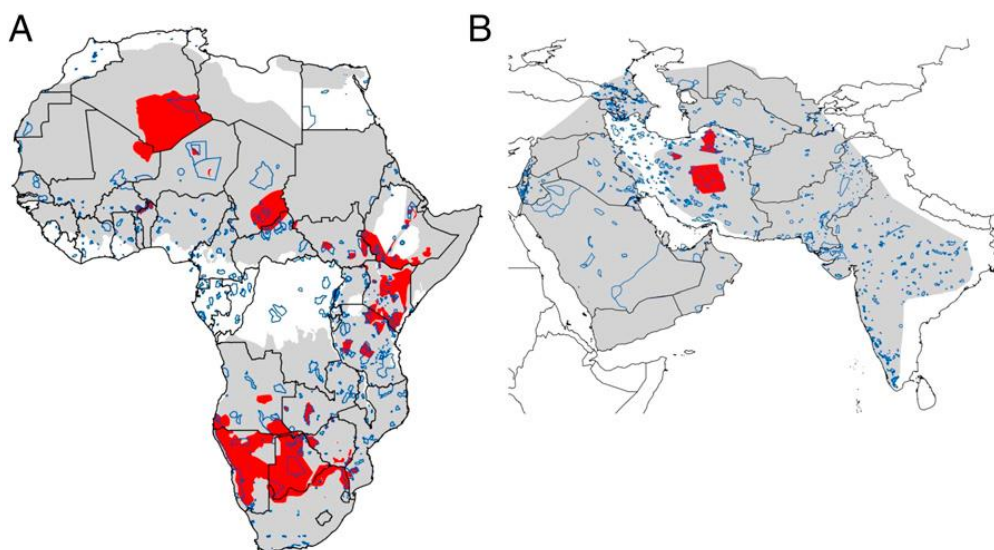


FIGURA 4. Distribución conocida de guepardos en (A) África y (B) Asia. El sombreado gris denota el rango histórico, y el sombreado rojo muestra el rango donde se sabe que residen los guepardos. Los límites de las AP bajo las categorías I-IV de la UICN están marcados en azul. (Durant, SM., Mitchell, N. y Groom, R., 2017)

5.1.3. Amenazas

La mayoría de las 38 especies de la familia Felidae, excepto el gato doméstico, están clasificadas como amenazadas, vulnerables o en peligro de extinción (Thongphakdee et al., 2020). La tasa de extinción de especies se ha acelerado en los últimos años a causa del crecimiento exponencial de la población humana y al uso intensivo de recursos naturales que ello conlleva (Gomendio et al., 2006). Entre las causas multifactoriales que afectan a la disminución de la población de guepardos se pueden dividir en causas provocadas por el hombre, como la pérdida de hábitat, el comercio ilegal de vida silvestre y pieles (Klaassen y Broekhuis 2018; Marker y Dickman, 2004), cambio climático (Khalatbari et al. 2018), y causas no antrópicas, principalmente relacionadas con la endogamia (O'Brien et al., 1985). La mayor parte del área de distribución residente (77 %) se encuentra fuera de las AP, donde el guepardo enfrenta mayores presiones por el conflicto generalizado entre humanos y vida silvestre, por la pérdida de presas causadas por la caza excesiva, etc. Por lo tanto, la especie enfrenta amenazas espacialmente heterogéneas que son más altas fuera que dentro de las AP. Es probable que disminuyan las poblaciones en tierras desprotegidas y en áreas protegidas pequeñas o mal administradas, donde están expuestas a múltiples amenazas (Durant, SM., Mitchell, N. y Groom, R., 2017).

5.1.4. Status de conservación

Hay varias convenciones internacionales y diferentes planes de acción establecidos para ayudar con la conservación del guepardo y su hábitat. La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES) incluyó al guepardo en el Apéndice I en 1975. Esto significa que CITES prohíbe el comercio internacional de especímenes de esta especie. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) clasificó al guepardo como vulnerable desde 1986 en la Lista Roja. Dos de sus subespecies *Aj venaticus* y *Aj hecki* están clasificados como en peligro crítico. Además, la Convención para la Conservación de Especies Migratorias y Animales Silvestres (CMS) ha incluido al guepardo en el Apéndice I. Este es el nivel más alto de protección para una especie y significa que están tratando de conservar y restaurar sus hábitats (Sengenberger, K., Bus, H. y Versteegen, L., 2018)

El guepardo se evalúa como “Vulnerable” según la IUCN por el criterio A4b basado en una reducción del tamaño de la población del 37 % (21–51 %) durante tres generaciones (aproximadamente 15 años) entre 2017 - 2032 y el criterio C1 basado en el tamaño de la población global y un declive continuo promedio proyectado. Los datos de una evaluación nacional integral en Zimbabue, la única área grande que incluye paisajes protegidos y desprotegidos con estimaciones demográficas confiables de dos puntos en el tiempo, indican una disminución del 85 % en 15 años.

Las proyecciones de población realizadas por Durant, SM., Mitchell, N. y Groom, R. (2017) muestran que, si los guepardos fuera de las áreas protegidas están sujetos a altos niveles de amenaza, entonces la población mundial de guepardos puede disminuir en más del 50 % durante los próximos 15 años (tres generaciones de guepardos) y, por lo tanto, los guepardos pueden estar cerca de calificarse como “En peligro” bajo el criterio A3. Prevenir una fuerte disminución de las poblaciones de guepardos frente a un período continuo de rápido crecimiento en la población humana de África durante las próximas décadas será el desafío más serio para la conservación de esta especie (Durant et al., 2022).

5.2. REPRODUCCIÓN

5.2.1. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DE LA HEMBRA

5.2.1.1. Pubertad y ciclo sexual

Maly (2015) mediante inmunoensayos enzimáticos (EIA), concluyó que las hembras de guepardo en cautiverio alcanzan la pubertad entre los 25 y los 30 meses. Este rango de edad se basa únicamente en datos fisiológicos y no tiene en cuenta el componente conductual de interés/receptividad reproductiva que debe existir antes de que pueda ocurrir un apareamiento exitoso. Sin embargo, esta edad aproximada concuerda con los datos de hembras en libertad que supuestamente quedan preñadas poco después de la pubertad y tienen su primera camada en promedio a los 29 meses de edad. (Kelly et al., 1998).

Las hembras de guepardo son poliéstricas no estacionales y de ovulación inducida. En condiciones naturales, ovularán folículos maduros solo después del apareamiento. La duración del ciclo de las hembras de guepardo en cautiverio muestra una amplia variación entre y dentro de los individuos de 5 a 30 días (Crosier et al., 2017). Una vez que alcanzan la madurez sexual, las hembras de guepardo experimentan ciclos que constan de cuatro fases principales.

La primera de estas fases, el proestro, normalmente dura solo un día. El proestro es seguido por el estro. El celo en los guepardos suele durar entre 2 y 6 días y las concentraciones máximas de estrógeno se observan durante aproximadamente 4 días. A diferencia de muchas otras especies de felinos, los signos conductuales del estro son difíciles de detectar y requieren una observación y experiencia considerables. (Wielebnowski y Brown, 1998). En los guepardos, varios folículos maduran simultáneamente, lo que puede llevar a camadas con el potencial de múltiples paternidades si las hembras se aparean con varios machos durante el celo (Gottelli et al., 2007).

Después de que ocurra la ovulación, la siguiente fase del ciclo sexual marca el comienzo de la fase luteal, el diestro. Esta fase se caracteriza por la presencia de al menos un cuerpo lúteo (CL).

El CL produce progesterona en concentraciones similares, ocurra o no la gestación (Maly, 2015). La última fase es el anestro. En los guepardos no es infrecuente que pueda variar de 30 días a varios meses y rara vez es constante incluso dentro de los individuos. Las hembras adultas son solitarias en la naturaleza, pero debido al espacio limitado, los zoológicos a menudo agrupan a hembras no emparentadas, lo que puede conducir a un aumento de los períodos de anestro, especialmente en las subordinadas (Wielebnowski y Brown, 1998).

La separación de las hembras por una cerca o valla resultó en el reinicio de la actividad ovárica en las hembras con supresión reproductiva (Brown et al., 1996). Por el contrario, el alojamiento de hembras estrechamente unidas, como hermanas juntas, resultó en un ciclo ovárico sincrónico e ininterrumpido. (Koester et al., 2017; Wielebnowski y Brown, 1998).

5.2.1.2. Gestación

El período de gestación de los guepardos dura unos 3 meses, con un rango de 90 a 98 días y el período entre nacimientos en la naturaleza es de unos 20 meses (Kelly et al, 1998).

En cautiverio, la edad promedio de la primera reproducción en guepardos hembras es de 61 meses (aproximadamente cinco años). Tienen un pico reproductivo que comienza en su cuarto año y dura hasta los 9 años (Sengenberger, K., Bus, H. y Versteeg, L., 2018).

En la naturaleza, la edad de la primera concepción es poco más de 37 meses y reanudan la ciclicidad rápidamente cuando se pierde una camada. Los cachorros nacen durante todo el año tanto en cautiverio como en libertad. Sin embargo, en la naturaleza nacen más cachorros durante la estación húmeda en comparación con la estación seca. Esto puede deberse en parte a la abundancia de presas durante la estación seca (Laurenson, MK., Caro, TM. y Borner, M., 1992; Brown et al., 1996). El primer nacimiento en cautiverio documentado fue en el Zoológico de Filadelfia en 1956 (Marker y O'Brien, 1989).

Después del período de gestación, la hembra pare camadas de un promedio de 3 a 4 cachorros, pero el número puede oscilar entre 1 y 8 (Ziegler-Meeks, 2009). Los cachorros de guepardo son altriciales al nacer y tienen un manto grueso de color gris plateado en la espalda. El manto ayuda a camuflar a los cachorros imitando el aspecto de un animal agresivo llamado tejón de miel [Figura 5]. Este mimetismo puede ayudar a disuadir a depredadores como leones, hienas y águilas de intentar matarlos. Los cachorros pierden su manto alrededor de los tres meses de edad (Cheetah conservation fund, s.f.). Se destetan entre los primeros 4 a 6 meses de edad. De los 6 a los 12 meses en adelante, la madre les enseña a cazar, aunque en esta época todavía proporciona la mayor parte de la comida. La edad promedio de independencia del cachorro de su madre es de alrededor de 18 meses.

Una vez que los cachorros se han separado, forman un grupo de hermanos con hembras y machos por igual. Estos grupos permanecen juntos hasta que alcanzan unos 27 meses de edad. Las hembras permanecerán cerca del área de distribución de sus madres mientras que los machos se irán evitando reproducirse con parientes (Laurenson, MK., Caro, TM. y Borner, M., 1992).



FIGURA 5. Cachorro de guepardo y tejón de miel. Fuente:

<https://www.pinterest.es/pin/548735535822213811/>
<https://www.naturalista.mx/taxa/41834-Mellivora-capensis>

Existen varios métodos para la detección de la gestación en el guepardo, pero actualmente no hay ninguno práctico y confiable para diagnosticarla hasta la segunda mitad de esta (Crosier, Byron y Comizzoli, 2022). El método más utilizado es el análisis de muestras fecales para determinar las concentraciones de metabolitos de progestágeno mediante EIA o RIA. En general, las concentraciones de progesterona permanecen en los niveles iniciales hasta que se induce la ovulación mediante el apareamiento o la estimulación hormonal exógena (Adachi et al., 2011; Brown et al., 1996; Crosier et al., 2011). Independientemente de si se produce la fertilización, el CL producirá progesterona en concentraciones elevadas durante aproximadamente 55 días (rango de 45 a 65 días) después de la ovulación. Este estado fisiológico, sin el desarrollo de un feto, se conoce como fase lútea sin preñez (NPLP: non-pregnant luteal phase). Si no se produce la gestación, el CL retrocede alrededor del día 50 después del apareamiento y la producción de progesterona disminuye. En cambio, si hay gestación, el CL se mantiene y las concentraciones de progesterona permanecen elevadas hasta el parto (Maly, 2015). La diferenciación entre gestación y NPLP mediante la medición de progestágenos solo es posible después de que los niveles vuelven a la línea de base en las hembras no preñadas (Brown et al., 1996).

La radiografía de guepardos no anestesiados se usa rutinariamente también como una evaluación precisa de la gestación, revelando la presencia y el número de fetos después de unos 55 días tras la cubrición/inseminación/transferencia [Figura 6]. Tener conocimiento del número de cachorros es importante en esta especie, ya que no pueden mantener una sola cría debido a los insuficientes estímulos de lactación.

Otros métodos son el ultrasonido, la ecografía y el muestreo de orina, pero no son técnicas de rutina ya que requieren que la hembra sea dócil y/o anestesia. Se ha demostrado también la utilidad de medir el metabolito de la prostaglandina F2 α (PGFM) en las heces (Dehnhard et al., 2012) y se descubrió un nuevo marcador de gestación fecal, el aumento de la cadena J de inmunoglobulina (IGJ) (Koester et al., 2017).

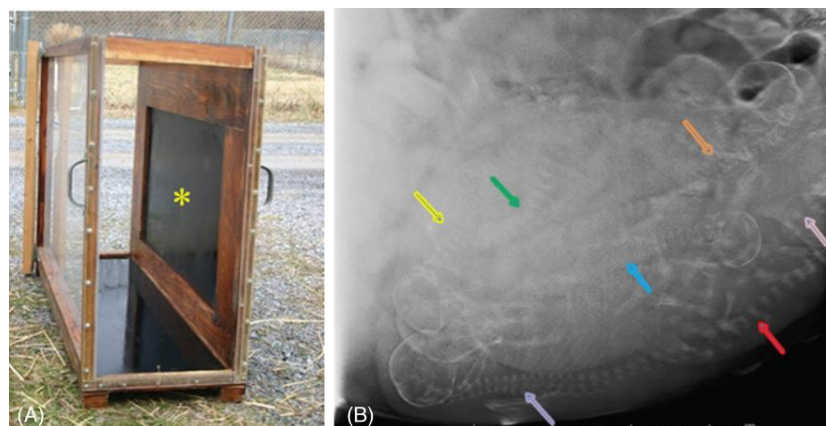


FIGURA 6. Caja para realizar radiografías de hembras de guepardo no anestesiadas. (A) Caja con material radiotransparente incorporado en un lateral (*) para diagnóstico de gestación y determinación del número de cachorros. El plexiglás en el lado contrario permite ver la posición del guepardo en la jaula (B) Radiografía de una hembra de guepardo preñada de 7 cachorros (flechas apuntando a la columna vertebral) en el día 73 postcópula (Crosier et al., 2018).

5.2.2. FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA DEL MACHO

Las concentraciones periféricas de testosterona en los guepardos jóvenes aumentarán notablemente antes de que se observe la producción de espermatozoides fértiles en la eyaculación de un macho (Maly, 2015). Según los datos de recolección de semen a través de electroeyaculación (EE), los machos de guepardo en cautiverio comienzan a producir esperma a los 14 meses de edad (Crosier et al., 2007). Por otra parte, según Maly et al. (2018) el inicio de la pubertad en los guepardos ex situ ocurre entre los 18 y los 24 meses de edad, observando un aumento en la composición media y basal de andrógenos fecales. Además, alcanzan pesos corporales adultos a los 21 meses de edad.

Según Caro (citado en Crosier et al., 2018), se cree que los machos, al igual que las hembras, alcanzan la capacidad reproductiva entre los 24 y los 36 meses de edad. Sin embargo, en las poblaciones en libertad, generalmente no se reproducen hasta que son adultos (48 a 96 meses), una edad en la que pueden obtener y defender un territorio de sus congéneres. En cautiverio, la edad promedio de la primera reproducción, medida en el momento de la concepción, es de 63 meses (aproximadamente cinco años).

Se ha demostrado que su estructura de vida social afecta a la reproducción, ya que las concentraciones de metabolitos de andrógenos fecales se correlacionaron positivamente con una calidad superior del esperma en machos alojados en grupo, pero no en machos mantenidos individualmente. (Koester et al., 2015).

Los parámetros básicos del eyaculado del guepardo son un volumen de 0,2 - 3,7 ml, una concentración de $14,5 - 189 \times 10^6/\text{ml}$ y una motilidad del 44,4 - 78 %, todo dependiendo del método de recogida y de los individuos (Crosier et al., 2018). Un hallazgo común en los eyaculados obtenidos en todas las poblaciones de guepardos estudiadas de machos en cautiverio y en libertad fue el alto porcentaje (aproximadamente 75 %) de espermatozoides con alteraciones en la forma. Algunas de estas malformaciones podemos observarlas en la Figura 7. Se cree que la diversidad genética reducida en los guepardos contribuye a esta teratospermia observada (definida como la producción de ≥ 60 % de espermatozoides estructuralmente anormales en un eyaculado) (Dobrynin et al., 2015). A pesar de la alta incidencia de espermatozoides anormales, los eyaculados contienen una gran proporción de espermatozoides con acrosomas intactos y los guepardos se las arreglan para reproducirse con éxito en la naturaleza. Sin embargo, sus congéneres ex situ no muestran un éxito similar, lo que sugiere que el manejo en cautiverio y los factores ambientales también pueden ser la fuente de este problema y no solo problemas fisiológicos genéticos.

Una evaluación de Crosier et al. (2007) sobre la calidad seminal del guepardo reveló que los guepardos machos de Namibia muestran algunos efectos de estacionalidad. Con base a la evaluación de 200 eyaculaciones de 97 machos, se encontró que el porcentaje de espermatozoides móviles aumentó en la estación seca y fría (mayo - agosto) en comparación con la estación seca y calurosa (septiembre - diciembre), aunque no influyó la estación en el volumen general de la eyaculación, la motilidad progresiva de los espermatozoides, concentración o espermatozoides móviles totales por eyaculado.

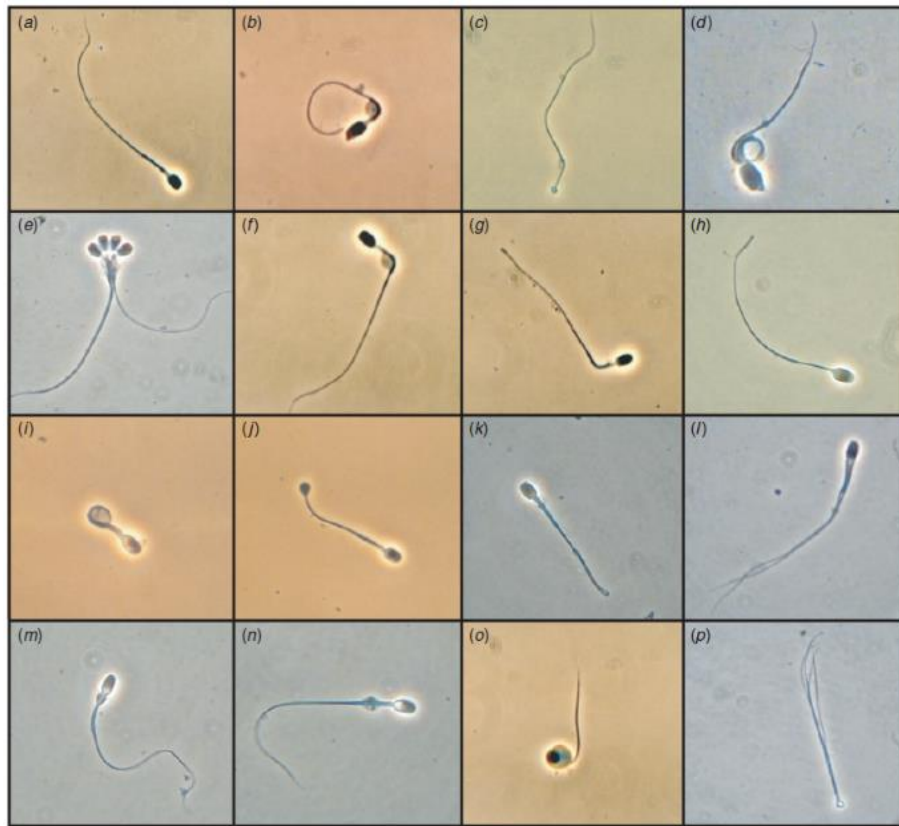


FIGURA 7. Morfotipos de espermatozoides de guepardo (1000×) (a) Espermatozoide con estructura morfológica normal. (b–p) Formas de células pleomórficas: (b) Un espermatozoide con un acrosoma anormal. Deformidad de la cabeza del espermatozoide, que incluye (c) microcefalia, (d) macrocefalia y (e) bi/tri/tetracefalia. Malformaciones de la pieza intermedia, que incluyen (f) una pieza intermedia doblada con gotitas citoplasmáticas retenidas, (g) pieza intermedia doblada sin gotitas, (h) aplasia de la pieza intermedia. Anomalías del flagelo, que incluyen (i) un flagelo fuertemente enrollado, (j) flagelo doblado con gota citoplasmática retenida, (k) flagelo doblado sin gota, (l) bi/triflagelado, (m) gota citoplasmática proximal retenida y (n) gota citoplasmática distal retenida. (o) Una espermátida. También se observaron otras anomalías graves del desarrollo, por ejemplo, (p) un espermatozoide tetraflagelado microcefálico (Crosier et al., 2007).

5.2.3. BIOTECNOLOGÍAS REPRODUCTIVAS

Para preservar e incrementar las poblaciones de especies amenazadas se han implementado técnicas complementarias ex situ. Entre estas estrategias, podemos encontrar la cría en cautividad, bancos de recursos genéticos (BRG) y el uso de biotecnologías reproductivas (Gonzales et al., 2019).

La reproducción de guepardos en cautiverio ha sido muy desafiante y solo ha sido exitosa de manera regular después de la década de 1970 (Crosier et al., 2018).

Anteriormente se había sugerido que las deficiencias reproductivas observadas en poblaciones *ex situ* podían estar relacionadas con bajos niveles de diversidad genética, sin embargo, a pesar de estos bajos niveles, la reproducción en la naturaleza no parece enfrentar los mismos desafíos que se han visto en cautiverio. En la naturaleza, las hembras de guepardo tienen una alta fecundidad con hasta el 95 % de las hembras observadas teniendo cachorros con éxito (Laurenson, MK., Caro, TM. y Borner, M., 1992). Las biotecnologías reproductivas comprenden métodos desarrollados para lograr la gestación cuando la reproducción natural no es posible o cuando se necesitan técnicas asistidas para mejorar la variación genética de una población. Estos métodos incluyen la recolección y criopreservación de semen, la inducción hormonal del estro y la ovulación, la aspiración de ovocitos, la inseminación artificial, la fecundación *in vitro* y la transferencia de embriones (Wildt et al., 1997).

5.2.3.1. RECOLECCIÓN DE SEMEN

Antes de la recolección de semen, se deben evaluar los órganos reproductivos. Es importante fijarse en el perímetro testicular y el tono de los testículos para garantizar la ausencia de anomalías y en el pene para buscar anomalías o lesiones. Para recolectar semen, se han descrito tres métodos principales en guepardos: vagina artificial (VA), electroeyacuación (EE) transrectal y cateterismo uretral (CU) (Crosier et al., 2018).

La VA se ha utilizado con éxito en guepardos domesticados (criados a mano) sin sedación. Las muestras recolectadas tenían una calidad similar a los eyaculados recolectados por otros métodos. Un estudio longitudinal de un solo macho que proporcionó un promedio de 26 muestras de eyacuación mediante VA/año desde los 2 a los 15 años, reveló que el volumen del semen aumentaba con la edad, y la motilidad y la concentración alcanzaban su punto máximo entre los 8 y los 10 años de edad (Durrant et al., 2001).

La EE transrectal ha sido el método más comúnmente aplicado para obtener semen de guepardos (Wildt et al. 1983). Con esta técnica, se puede contaminar la orina debido al estrés durante la inducción de la anestesia que provoca la micción y la presencia de esta en la uretra. Además, los fármacos anestésicos que causan flujo retrógrado de esperma, la inexperiencia del recolector, la colocación demasiado profunda de electrodos en el recto (induce la contracción de la vejiga) y edad de los animales pueden contribuir también a la contaminación (Marrow et al., 2015). Esta contaminación puede determinarse mediante la medición del pH (<8,7), el aspecto de la eyacuación (amarillento) y la observación microscópica de los cristales de orina (Crosier et al., 2007)

El tercer método es la recolección de semen por CU. Es una técnica más nueva que rara vez se usa para guepardos porque tiende a producir menos volumen y concentraciones más bajas de esperma, a pesar de que requiere menos experiencia o equipo técnico en comparación con la EE. Se usa la medetomidina, de la familia de los agonistas α_2 , como agente anestésico ya que induce la liberación de espermatozoides en la uretra. El esperma se recolecta por aspiración con un catéter urinario (Crosier et al., 2018).

5.2.3.2. CRIOPRESERVACIÓN DE SEMEN

Para la conservación de los espermatozoides obtenidos y su uso en el futuro, se utiliza la criopreservación. Sobre todo, la congelación, si bien el acrosoma de los espermatozoides de los guepardos es especialmente sensible a la criopreservación. Los espermatozoides generalmente se crioconservan utilizando glicerol, que a su vez contribuye al flujo de fluidos y al estrés osmótico y puede alterar la integridad de la membrana celular (Pukazhenthil et al., 2002). La mayor parte del daño durante la crioconservación es causada por el crioprotector y el movimiento del agua a través de las membranas espermáticas durante el equilibrio inicial antes de la congelación y nuevamente durante la descongelación cuando este se elimina y la célula se rehidrata.

En un estudio realizado por Crosier et al. (2009) se comprobó que mediante el procesamiento con el gradiente "Accudenz®" aproximadamente el 40 % o más de los espermatozoides descongelados retuvieron los acrosomas intactos mientras mejoraba la motilidad general en al menos un 10 %. En comparación con el control, el procesamiento con "Accudenz®" aumentó la proporción de espermatozoides estructuralmente normales recuperados. La morfología de los espermatozoides se evaluó mediante microscopía de contraste de fase.

5.2.3.3. CONTROL DEL CICLO

El control del ciclo requiere protocolos que incluyen gonadotropinas exógenas, gonadotropinas coriónicas equinas (eCG) y humanas (hCG), particularmente hCG, que tiene propiedades similares a la LH para inducir la ovulación en félidos (Conforti et al., 2013). La aparición de picos de estradiol naturales y su detección en las hembras es importante para la eficacia de los protocolos de gonadotropinas exógenas. La administración de estas induce la ovulación, pero el éxito es variable y a menudo mejora si los ovarios están inactivos, por eso Crosier et al. (2017) examinó el efecto del momento de la administración de gonadotropinas coriónicas exógenas equinas y humanas (eCG - hCG) dentro del patrón de concentración de estrógenos en el posterior desarrollo folicular y la calidad de los ovocitos y el cuerpo lúteo.

Cuando el tratamiento se dio al menos 3 días (72 h) después de un pico de estradiol detectado, se recuperaron más ovocitos viables y se produjeron patrones de progestágeno más normativos después de la aspiración en comparación con las hembras que recibieron gonadotropinas ≤ 2 días después del pico de estradiol. También demostró que la suplementación con progestina exógena (Altrenogest®) es efectiva para suprimir la actividad folicular, puede contribuir a reducir la producción de glucocorticoides y puede resultar en una inducción de la ovulación más efectiva a través de los procedimientos con gonadotropinas.

Por otra parte, Howard et al. (1997) evaluó la sensibilidad ovárica a las gonadotropinas exógenas en el guepardo. Se les administró a 18 hembras inyecciones de 100, 200 o 400 UI de eCG y 100 o 250 UI de hCG 80 h después. Los ovarios se examinaron por laparoscopia a las 43 - 48 h después de hCG. Todas las dosis de gonadotropina estimularon la actividad ovárica pero el éxito de la ovulación y la morfología del CL variaron con el tratamiento. Las dosis de eCG más altas e intermedias dieron como resultado la ovulación en una alta proporción (72 - 100 %) de hembras. La dosis más baja de eCG, aunque capaz de estimular el desarrollo folicular, comprometió la ovulación y resultó en pocas hembras postovulatorias (<26 %). Se observaron CL pequeños (2 - 4 mm de diámetro) con la dosis de eCG más alta y más baja, y CL grandes (5 - 8 mm de diámetro) se asociaron con dosis de eCG intermedias.

En un estudio a gran escala de Crosier et al. (2011) se vio que la edad de la hembra no afecta a la respuesta ovárica a las gonadotropinas exógenas y la calidad de los ovocitos, pero si el estado del resto del genital, ya que se observaron hembras de edad avanzada con hiperplasia endometrial y otras patologías relacionadas. Esto indica que la FIV y la transferencia de embriones pueden ser útiles para "rescatar" el genoma de guepardos no reproductivos. Esta estrategia también permite la recolección de gametos y material genético de hembras genéticamente valiosas que de otro modo no podrían reproducirse debido a su salud o comportamiento. Después de la FIV, los embriones pueden transferirse a hembras jóvenes y sanas con un valor genético más bajo o ser preservados en los bancos de material biológico.

5.2.3.4. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL

La IA intrauterina se realizó por primera vez en el guepardo a principios de la década de 1990. Debido al escaso éxito reproductivo en cautiverio, el desarrollo de técnicas de IA se ha perseguido aún más. Hay tres componentes principales importantes para el éxito de la IA: el momento correcto para inducir el crecimiento folicular y la ovulación mediante hormonas, la disponibilidad de semen de calidad aceptable y la colocación de la muestra de semen en el lugar apropiado del tracto reproductivo de la hembra en el momento óptimo (Crosier et al., 2018).

La concentración de espermatozoides tiene una fuerte influencia en el éxito del procedimiento de inseminación. En general, se prefieren los espermatozoides frescos o refrigerados al semen congelado debido al daño sustancial a las membranas acrosómicas y la pérdida de células móviles durante el proceso de criopreservación (Crosier et al., 2006). Sin embargo, en guepardos, la IA con semen fresco y congelado ha dado gestaciones exitosas después de la deposición intrauterina a través de un abordaje laparoscópico (Howard y Wildt, 2009).

Las hembras domesticadas podrían ser entrenadas para la deposición intravaginal de esperma recién recolectado con una alta concentración, (10^7 – 10^8 células/ml) (Pelican et al., 2006), mientras que, para los eyaculados con volúmenes pequeños, baja concentración de espermatozoides o semen congelado se tiene que realizar mediante inyección intraoviductal o colocación intrauterina profunda con anestesia total (Howard et al., 1997). Los métodos sin anestesia requieren que la IA se lleve a cabo antes de la ovulación para permitir el paso del cuello uterino y el transporte de esperma.

El primer nacimiento documentado de un cachorro de guepardo como resultado de la IA fue en 1991 gracias a un trabajo de un estudio de Howard et al. (1992). Siete hembras fueron estimuladas hormonalmente y posteriormente evaluadas por laparoscopia en busca de CL frescos. La ovulación se indujo con éxito en todas (rango: 3 - 13 CL entre las hembras). Seis de las hembras fueron inseminadas por laparoscopia depositando esperma obtenido por electroeyaculación y depositado vía transabdominal en la cara proximal de cada cuerno uterino. Una hembra inseminada con 10×10^6 espermatozoides móviles a las 42,5 h después de la administración de la hCG, quedó gestante y tuvo un solo cachorro vivo después de 95 días.

En otro estudio de Howard et al. (1997) se realizaron 19 procedimientos intrauterinos laparoscópicos para inseminar a varias hembras. Seis de las 13 hembras, todas a las que se les administró 200 UI de eCG/100 UI de hCG, quedaron preñadas. Las que se quedaron preñadas habían sido inseminadas con el doble de concentración de espermatozoides móviles ($15,8 \pm 3,8 \times 10^6$) que las que no se quedaron ($8,0 \pm 2,4 \times 10^6$). Nacieron 12 cachorros vivos.

A pesar de los continuos intentos, el último cachorro de guepardo vivo obtenido por IA fue en 2003 (Crosier, Byron y Comizzoli, 2022).

5.2.3.5. FECUNDACIÓN *IN VITRO*, OBTENCIÓN Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

Las primeras investigaciones sobre la fecundación *in vitro* (FIV) se centraron en la recuperación de ovocitos de tejidos ováricos que se recolectaron después de una ovariectomía o de hembras fallecidas. Debido a que no se usó estimulación con gonadotropinas, solo el 8 % de estos ovocitos maduraron después de su proceso de maduración *in vitro* y ninguno fue fertilizado con éxito en cultivo (Johnston et al., 1991). Las técnicas de FIV adaptadas al guepardo han sido útiles para comprender el desarrollo folicular, inducir la maduración del óvulo y la ovulación, estudiar la función del espermatozoides, la interacción de los gametos y el desarrollo del embrión (Donoghue 1992).

Crosier et al. (2011) llevó a cabo un estudio mediante el cual las hembras fueron estimuladas con eCG y hCG y de los ovocitos aspirados por vía laparoscópica se evaluó su calidad morfológica, se realizó un proceso de maduración (proporción en metafase II) y se estudió su capacidad para fertilizarse y formar embriones. El 41 % de los embriones que evidenciaron procesos de división celular, progresaron al menos a la etapa de desarrollo de 8 células *in vitro*, con el 24 % de todos los embriones divididos desarrollándose hasta la etapa de mórula y el 5 % formando blastocistos [Figura 8]. Este fue el primer informe de embriones de guepardo en etapa de blastocisto producidos *in vitro*. Cabe destacar que solo se utilizó espermatozoides de guepardo crioconservado para la FIV de ovocitos maduros, lo que resultó en una fertilización del 70 % de todos los ovocitos en metafase II.

Estos resultados indican que una proporción significativa de ovocitos de hembras de edad avanzada tienen capacidad de desarrollo *in vitro*.

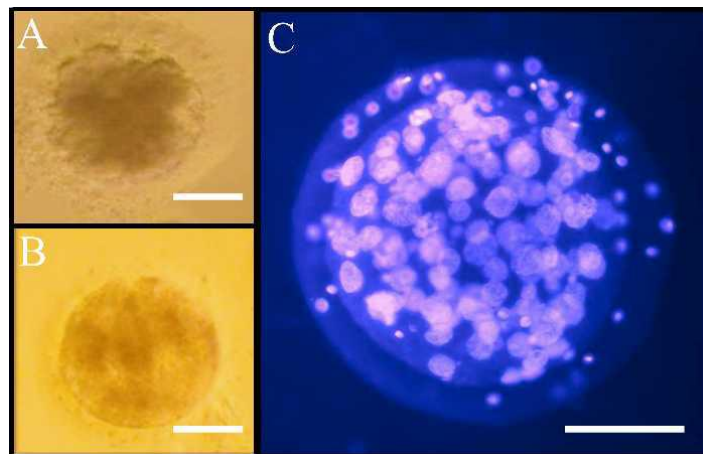


FIGURA 8. Mórula (A) y blastocisto (B) producidos por FIV (microscopía óptica), así como blastocisto de guepardo (C) teñidos con Hoechst para evaluar el número de blastómeros. Barra= 50 μ m (Crosier et al., 2011).

Existe una población de guepardos de la Asociación de Zoológicos y Acuarios (AZA) que se gestiona a través de un Plan de Supervivencia de Especies (SSP), y actualmente hay unos 350 guepardos, lo que representa una reserva genética para la población que está en libertad. El éxito reproductivo dentro del SSP es pobre, con menos del 20 % de las hembras teniendo descendencia. Gracias a un proyecto de Crosier et al. (2020), nacieron los dos primeros guepardos por FIV.

Se recolectó semen de 3 guepardos adultos mediante electroeyaculación bajo anestesia. Después de todo el proceso de comprobación y evaluación, se cargaron pajuelas estériles a una concentración de unos 60×10^6 espermatozoides móviles/ml. Se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron hasta la FIV. Los ovocitos se recolectaron de las hembras donantes mediante laparoscopia. Cada hembra donante recibió la misma estimulación hormonal. Durante la laparoscopia, se confirmó que todas las donantes desarrollaron folículos en respuesta a la estimulación de eCG/LH [Figura 9a].

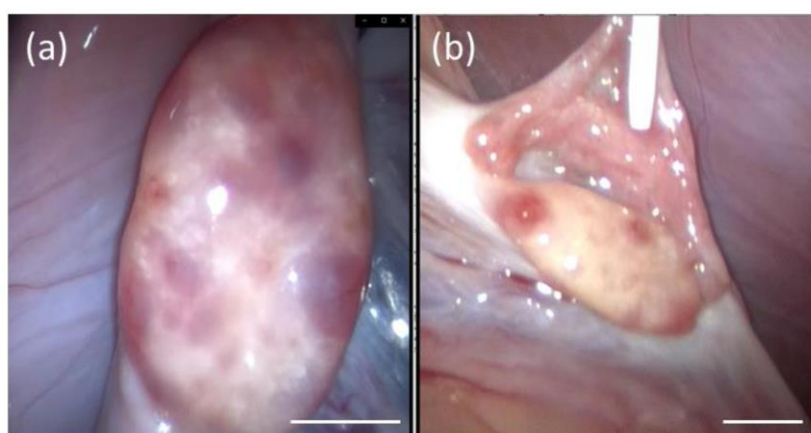


FIGURA 9. Imágenes representativas de laparoscopia. Ovario de la donante (a) con folículos preovulatorios (áreas más oscuras) que luego fueron aspirados para recuperar los ovocitos. Ovario con puntos de ovulación frescos (manchas rojas brillantes) y oviducto de la receptora (b) durante la transferencia embrionaria oviductal. Barra= 10 mm. (Crosier et al., 2020).

De los ovocitos recuperados solo se conservaron los de grado 1 y 2 para la fertilización.

Las pajuelas individuales se descongelaron y se comprobó la concentración de espermatozoides (aproximadamente solo quedaron 1 millón de espermatozoides móviles/ml). Después de la descongelación, las muestras utilizadas presentaron buenos porcentajes de motilidad espermática. Se agregaron 5 μ L de espermatozoides en cada pocillo que contenía los ovocitos seleccionados. Luego se colocaron las placas de fertilización a 38,5 °C en la incubadora con una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂ durante 18–22 h. Después de la fertilización, los presuntos cigotos se lavaron con un medio específico y se dejaron desarrollar en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO₂ durante 24 h.

Solo los embriones divididos se transfirieron a las receptoras mediante laparoscopia [Figura 9b]. Cada hembra receptora recibió la misma dosis de hormonas que las donantes.

La transferencia de embriones fue intraoviductal y se transfirieron un total de 20 embriones a 3 receptoras. Recibieron 5, 6 y 9 embriones respectivamente. El día de la laparoscopia, la receptora que tenía más CL y recibió la mayor cantidad de embriones ($n=9$) y fue la que estableció la gestación. Se recolectaron muestras fecales (4–5 por semana) durante 9 semanas. Se detectó que una receptora estaba gestante 32 días después de la transferencia de embriones (34 días después de la FIV). Se confirmó por ultrasonografía y se determinó el número de cachorros en esta misma 62 días después de la transferencia mediante radiografía [Figura 10]. La hembra parió dos cachorros 92 días después de la FIV.

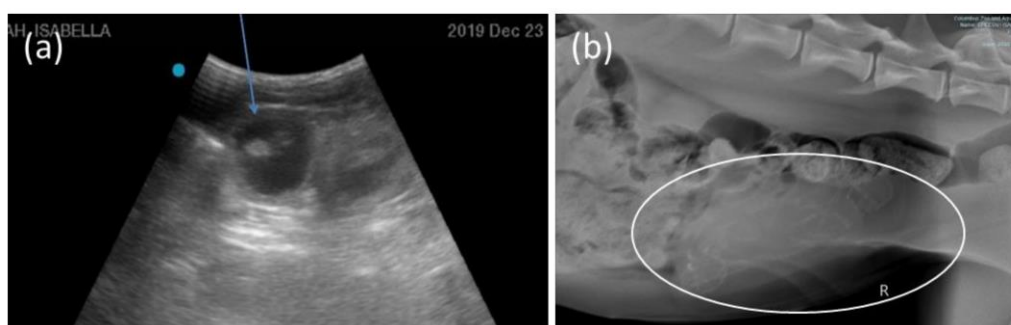


FIGURA 10. Seguimiento de la gestación de la hembra receptora mediante ultrasonografía 32 días después de la transferencia, la flecha apunta a la vesícula embrionaria llena de líquido (a) y radiografía 62 días después de la transferencia, los esqueletos mineralizados de ambos cachorros son visibles dentro del círculo (b) (Crosier et al., 2020).

5.2.3.6. BANCOS DE RECURSOS GENÉTICOS

Las biotecnologías reproductivas han aportado soluciones alternativas para facilitar el manejo genético de poblaciones de especies en peligro, como el desarrollo de bancos de recursos genéticos (BRG) (Wildt et al., 1997). Los BRG permiten el almacenamiento de semen, óvulos y embriones congelados, además de otros tejidos. La ventaja principal de dichos bancos es que permiten mantener la variabilidad genética de una especie en forma casi indefinida. Pueden permitir el movimiento de material genético entre poblaciones y emplearse muchos años después de la muerte de un animal. La posibilidad de inseminar hembras con semen congelado también aumenta la eficiencia de la cría en cautividad puesto que se pueden elegir los apareamientos que minimicen los efectos de la consanguinidad sin necesidad de someter a los animales al estrés de cambios continuos de grupo social, y sin los riesgos de que incompatibilidades de tipo comportamental impidan apareamientos aconsejables desde un punto de vista genético (Gomendio et al., 2006).

Es crucial mantener o recuperar tamaños de población suficientemente grandes, mientras se preserva la variación existente a través del almacenamiento a largo plazo de espermatozoides y ovocitos viables (Schmidt-Küntzel et al. 2018).

5.3. PLANES Y HERRAMIENTAS DE CONSERVACIÓN

Vivimos en un mundo caracterizado por la pérdida de biodiversidad y el cambio climático global (Prost et al., 2022). La baja densidad de guepardos en toda su área de distribución significa que se requieren acciones de conservación en una escala que rara vez se ve en la conservación terrestre. Esto incluye la cooperación transfronteriza, la planificación del uso de la tierra en grandes paisajes para mantener la conectividad del hábitat y la mitigación de conflictos entre humanos y vida silvestre (Durant et al., 2022).

Hay un libro que tiene el propósito de registrar todos los guepardos del mundo que se encuentran tanto en zoológicos como en instalaciones privadas y proporcionar información sobre los animales existentes, el Libro genealógico internacional de guepardos. Las decisiones de reproducción en cautividad están guiadas por los datos genealógicos de estos libros (Schmidt-Küntzel et al., 2018). El Libro de 2020 es la trigésima edición del registro mundial de guepardos en cautiverio. Esta combina toda la información disponible del período del 1 de enero de 2020 al 31 de diciembre de 2020. La población de guepardos en cautiverio el 31 de diciembre de 2020 era de 1851 animales en 272 instalaciones conocidas en 46 países. Durante este periodo se registraron 200 animales nuevos, que representan nacimientos y animales capturados en la naturaleza recién importados. De las nuevas incorporaciones, 146 fueron nacimientos en establecimientos de cautiverio. 39 de las nuevas adiciones fueron confiscaciones realizadas por el equipo del Cheetah Conservation Fund que trabaja en Somalilandia, del comercio ilegal de vida silvestre. De estos 200 guepardos recién registrados, 28 murieron antes de finales de 2020, dejando 172 aún vivos en la población cautiva a finales de año (Marker y Johnston, 2022).

Una herramienta de conservación que se utiliza cada vez con mayor frecuencia es la translocación. Es el movimiento deliberado de individuos de especies de un sitio para su liberación a otro (Seddon et al., 2007) que se utiliza para mitigar los conflictos entre humanos y vida silvestre, asegurar la viabilidad de poblaciones aisladas e introducir o reintroducir poblaciones en áreas de distribución anteriores o nuevas (Van der Meer, E., Sousa, L., y Loveridge, A., 2021). Con los programas de reintroducción se puede llevar a cabo la liberación de guepardos en pequeñas poblaciones existentes o el restablecimiento de la conectividad entre poblaciones fragmentadas de guepardos para impulsar la diversidad genética a escala local, minimizando así los problemas genéticos y demográficos asociados con poblaciones pequeñas (Boast et al., 2018).

Existen planes de acción nacionales de conservación para la mayoría de los estados del área de distribución. Durante la década de 1990 empezaron a implantarse los programas de conservación africanos, por ejemplo, Laurie Marker fundó Cheetah Conservation Fund (CCF) en Namibia el año 1990. Cada plan de acción de conservación nacional es publicado por las autoridades gubernamentales de vida silvestre y representa el compromiso de cada estado con la conservación del guepardo. Si bien existen algunas diferencias entre los planes y estrategias individuales, en términos generales todos abordan objetivos para mejorar la capacidad nacional para la conservación y el manejo del guepardo; aumentar la conciencia y el compromiso político con la conservación del guepardo; promover la coexistencia del guepardo-humano; mejorar la planificación del uso de la tierra y reducir la fragmentación del hábitat; mejorar la política y la legislación; y abordar las necesidades de información sobre la conservación del guepardo. Los proyectos locales y nacionales y las ONG son fundamentales para este proceso, así como los gobiernos, y la implementación de los planes y estrategias (Durant et al., 2022).

En general, la necesidad de conservar el guepardo no viene a la mente de la mayoría de los agricultores de África ya que han perdido ganado o animales de caza debido a la depredación de este. Los habitantes de esos países viven en la pobreza y, por tanto, tienen preocupaciones más importantes que las poblaciones decrecientes de guepardos, por lo que cualquier estrategia de conservación efectiva debe ser multidisciplinaria, relevante y apropiada para la situación local. La mejor solución es la educación. Sin embargo, el valor de dicha educación será limitado si las personas aún sufren pérdidas a causa de los depredadores, por lo que trabajar con los agricultores para tratar de reducir las tasas de depredación será muy importante para reducir el problema del conflicto entre humanos y guepardos. Se han tomado varias medidas con este fin, incluida la colocación de perros guardianes de ganado (Marker, 2007).

En Irán, los pastores locales son también la causa más importante de mortalidad inducida por humanos, generalmente en asociación con perros pastores. Los disparos intencionales o el envenenamiento de guepardos son poco comunes posiblemente porque encontrarse con guepardos en la naturaleza es raro, pero hay puntos críticos de colisiones entre guepardos y vehículos que no se solucionan. El desarrollo minero insostenible y sus impactos secundarios asociados, como la alteración del hábitat, la expansión de la infraestructura, la migración humana y la caza ilegal también suponen un problema (Eslami, Gholikhani y Moqanaki, 2017). Es fundamental que se reduzcan las principales fuentes de mortalidad antropogénica. Se debería exigir la asistencia a talleres educativos destinados a abordar el comportamiento de los pastores hacia los guepardos (y otros animales salvajes) (Farhadinia, 2017).

6. CONCLUSIONES

Tras la realización de este trabajo de fin de grado en el que se ha llevado a cabo una revisión de las biotecnologías reproductivas del guepardo enfocadas a su conservación, he llegado a las siguientes conclusiones:

1. A pesar del número reducido de individuos y de su baja variabilidad genética, el guepardo ha conseguido sobrevivir en la naturaleza y es capaz de reproducirse con cierto éxito en ella.
2. En cambio, ha tenido muchos problemas para reproducirse en cautiverio por lo que las biotecnologías reproductivas van cobrando cada vez más importancia en su entorno.
3. Para la FIV y la IA se tienen que conocer muy bien todas las características de la hembra para inducir el crecimiento folicular y la ovulación en el momento correcto y del macho para disponer de un semen de calidad aceptable y lograr el éxito reproductivo.
4. Métodos confiables y aplicables para la determinación de la preñez antes de los 55 días tras la cubrición o métodos de reproducción asistida ayudarían a mejorar las condiciones de cría y el manejo del guepardo.
5. Los bancos de recursos genéticos son una valiosa opción para preservar a largo plazo el semen, óvulos, embriones y otros tejidos de animales vivos o que han muerto y así poder mantener la variabilidad genética durante tiempo indefinido.
6. Hay que concienciar a la población para intentar reducir al máximo las amenazas que sufren los guepardos, e implementar planes de conservación para ayudar a que sobreviva la especie.

Conclusions

After carrying out this end-of-degree project in which a review of the reproductive biotechnologies of the cheetah focused on its conservation has been done, I have reached the following conclusions:

1. Despite the small number of individuals and its low genetic variability, the cheetah has managed to survive in the wild and is capable of reproducing with some success in the wild.
2. On the other hand, it has had many problems reproducing in captivity, which is why reproductive biotechnologies are gaining more and more importance in its environment.
3. For IVF and AI, it is necessary to know very well all the characteristics of the female to induce follicular growth and ovulation at the correct time and of the male to have semen of acceptable quality and achieve reproductive success.
4. Reliable and applicable methods for determining pregnancy before 55 days after mating or assisted reproduction methods would help improve breeding conditions and management of cheetahs.
5. Genetic resource banks are a valuable option for long-term preservation of semen, eggs, embryos, and other tissues from animals that are alive or have died, and thus be able to maintain genetic variability for an indefinite period of time.
6. We must raise awareness among the population to try to minimize the threats suffered by cheetahs, and implement conservation plans to help the species survive.

7. VALORACIÓN PERSONAL

Los félidos son de las especies que más me gustan, por eso me parecía interesante realizar mi trabajo de fin de grado sobre una de ellas. La reproducción y las biotecnologías reproductivas también son un tema que me apasiona por lo que me ha gustado mucho poder profundizar mis conocimientos sobre ello conjuntamente.

La situación en la que se encuentra el guepardo es grave y es muy necesario aplicar medidas para evitar que desaparezca. Todas estas biotecnologías anteriormente explicadas son de gran ayuda y son un avance para la conservación de la especie, pero queda aún mucho trabajo por delante en este ámbito por lo que no se debe parar de investigar ni de realizar estudios sobre su reproducción para poder implementar de manera rutinaria estas técnicas.

La supervivencia del guepardo debe ser responsabilidad de todos, no solo de los gobiernos y los conservacionistas.

Durante mi búsqueda de información en revistas y artículos científicos aprendí mucho más de lo que me esperaba sobre otros temas que no tenía tan en mente como por ejemplo las poblaciones que conviven con guepardos en la naturaleza, sobre los planes de conservación, sobre todas las acciones que realizan las instituciones como CCF, etc. Gracias a este trabajo tengo aún más claro a lo que me quiero dedicar en un futuro.

8. BIBLIOGRAFÍA

Adachi, I., Kusuda, S., Kawai, H., Ohazama, M., Taniguchi, A., Kondo, N., Yoshihara, M., Okuda, R., Ishikawa, T., Kanda, I., y Doi, O. (2011). "Fecal progestagens to detect and monitor pregnancy in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*)". *The Journal of reproduction and development*, 57(2), pp.262–266. DOI: 10.1262/jrd.10-057t

Boast, L., Chelysheva, E., van der Merwe, V., Schmidt-Kuentzel, A., Walker, E., Cilliers, D., Gusset, M. y Marker, L. (2018). "Cheetah Translocation and Reintroduction Programs: Past, Present, and Future". *Cheetahs: Biology and Conservation*, 20, pp.275-289. DOI: 10.1016/B978-0-12-804088-1.00020-4

Brown, J. L., Wildt, D. E., Wielebnowski, N., Goodrowe, K. L., Graham, L. H., Wells, S., y Howard, J. G. (1996). "Reproductive activity in captive female cheetahs (*Acinonyx jubatus*) assessed by faecal steroids". *Journal of reproduction and fertility*, 106(2), pp.337–346. DOI: 10.1530/jrf.0.1060337

Charruau, P., Fernandes, C., Orozco-Terwengel, P., Peters, J., Hunter, L., Ziaie, H., Jourabchian, A., Jowkar, H., Schaller, G., Ostrowski, S., Vercammen, P., Grange, T., C Schlötterer, C., Kotze, A., Geigl, E.; M., Walzer, C. y Burger, P.A. (2011). "Phylogeography, genetic structure and population divergence time of cheetahs in Africa and Asia: evidence for long-term geographic isolates". *Molecular Ecology*, 20, pp.706-724. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04986.x

Cheetah conservation fund (CCF) (s.f.). Disponible en: <https://cheetah.org/learn/about-cheetahs/> [Consultado 16-03-2023]

Conforti, V. A., Bateman, H. L., Schook, M. W., Newsom, J., Lyons, L. A., Grahn, R. A., Deddens, J. A., y Swanson, W. F. (2013). "Laparoscopic oviductal artificial insemination improves pregnancy success in exogenous gonadotropin-treated domestic cats as a model for endangered felids". *Biology of reproduction*, 89(1), pp.1-9. DOI: 10.1095/biolreprod.112.105353

Crosier, A. E., Byron, M. J., y Comizzoli, P. (2022). "Connecting the spots: Understanding cheetah reproduction to improve assisted breeding and population management". *Theriogenology*, 185, pp.70–77. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2022.03.025

Crosier, A. E., Comizzoli, P., Baker, T., Davidson, A., Munson, L., Howard, J., Marker, L. L., y Wildt, D. E. (2011). "Increasing age influences uterine integrity, but not ovarian function or oocyte quality, in the cheetah (*Acinonyx jubatus*)". *Biology of reproduction*, 85(2), pp.243–253. DOI: 10.1095/biolreprod.110.089417

Crosier, AE., Comizzoli, P., Koester, D. C., y Wildt, D. E. (2017). "Circumventing the natural, frequent oestrogen waves of the female cheetah (*Acinonyx jubatus*) using oral progestin (Altrenogest)". *Reproduction, fertility, and development*, 29(8), pp.1486-1498. DOI: 10.1071/RD16007

Crosier, A. E., Henghali, J. N., Howard, J., Pukazhenth, B. S., Terrell, K. A., Marker, L. L., y Wildt, D. E. (2009). "Improved quality of cryopreserved cheetah (*Acinonyx jubatus*) spermatozoa after centrifugation through Accudenz". *Journal of andrology*, 30(3), pp.298–308. DOI: 10.2164/jandrol.108.006239

Crosier, AE., Lamy, J., Bapodra, P., Rapp, S., Maly, M., Junge, R., Haefele, H., Ahistus, J., Santiestevan, J., & Comizzoli, P. (2020). "First Birth of Cheetah Cubs from In Vitro Fertilization and Embryo Transfer". *Animals: an open access journal from MDPI*, 10(10). DOI: 10.3390/ani10101811

Crosier, AE., Marker, L., Howard J., Pukazhenth Budhan S., Henghali JN. y Wildt DE. (2007). "Ejaculate traits in the Namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*): influence of age, season and captivity". *Reproduction, Fertility and Development*, 19, pp.370-382. DOI: 10.1071/RD06057

Crosier, AE., Pukazhenth, B. S., Henghali, J. N., Howard, J., Dickman, A. J., Marker, L., y Wildt, D. E. (2006). "Cryopreservation of spermatozoa from wild-born Namibian cheetahs (*Acinonyx jubatus*) and influence of glycerol on cryosurvival". *Cryobiology*, 52(2), pp.169–181. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2005.10.011

Crosier, AE., Wachter, B., Schulman, M., Lüders, I., Koester, D., Wielebnowski, N., Comizzoli, P. y Marker, L. (2018). "Reproductive Physiology of the Cheetah and Assisted Reproductive Techniques". *Cheetahs: Biology and Conservation*, 27, pp.385-402. DOI: 10.1016/B978-0-12-804088-1.00027-7

Dehnhard, M., Finkenwirth, C., Crosier, A., Penfold, L., Ringleb, J., y Jewgenow, K. (2012). "Using PGFM (13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2 α) as a non-invasive pregnancy marker for felids". *Theriogenology*, 77(6), pp.1088–1099. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.10.011

Dobrynin, P., Liu, S., Tamazian, G., Xiong, Z. Yurchenko, A.A., Krashennnikova, K., Kliver, S., Schmidt-Küntzel, A., Koepfli, K., Johnson, W., Kuderna, L.F., García-Pérez, R., de Manuel, M., Godinez, R., Komissarov, A., Makunin, A., Brukhin, V., Qiu, W., Zhou, L, Li, F., Yi, J., Driscoll, C., Antunes, A., Oleksyk, T.K., Eizirik, E., Perelman, P., Roelke, M., Wildt, D., Diekhans, M., Marques-Bonet, T., Marker, L., Bhak, J., Wang, J., Zhang, G. y O'Brien, S.J. (2015). "Genomic legacy of the African cheetah, *Acinonyx jubatus*". *Genome Biology* 16, 277. DOI: 10.1186/s13059-015-0837-4

Donoghue, A. M., Howard, J. G., Byers, A. P., Goodrowe, K. L., Bush, M., Blumer, E., Lukas, J., Stover, J., Snodgrass, K., y Wildt, D. E. (1992). "Correlation of sperm viability with gamete interaction and fertilization in vitro in the cheetah (*Acinonyx jubatus*)". *Biology of reproduction*, 46(6), pp.1047–1056. DOI: 10.1095/biolreprod46.6.1047

Durant, S.M., Groom, R., Ipavec, A., Mitchell, N. y Khalatbari, L. (2022). "*Acinonyx jubatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2022" Disponible en: <https://www.iucnredlist.org/species/219/124366642> [Consultado 22-03-2023].

Durant, SM., Mitchell, N. y Groom, R. (2017). "The global decline of cheetah *Acinonyx jubatus* and what it means for conservation". *Biological Sciences*, 114(3), pp.528-533. DOI: 10.1073/pnas.1611122114

Durrant, B.S., Millard, S.E., Zimmerman, D.M. y Lindburg, D.G. (2001). "Lifetime semen production in a cheetah (*Acinonyx jubatus*)". *Zoo Biology*, 20, pp.359-366. DOI: 10.1002/zoo.1034

Eslami, M., Gholikhani, N. y Moqanaki, E. (2017). "Time to get real about the Asiatic cheetah conservation". *Cat News*, 66, pp.4. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/321081595_Time_to_get_real_about_the_Asiatic_cheetah_conservation [Consultado 2/05/2023]

Farhadinia, M.S., Hunter, L.T.B., Jourabchian, A., Hosseini-Zavarei, F., Akbari, H., Ziaie, H., Schaller, G.B. y Jowkar, H. (2017). "The critically endangered Asiatic cheetah *Acinonyx jubatus venaticus* in Iran: a review of recent distribution, and conservation status". *Biodivers Conserv* 26, pp.1027–1046. DOI: 10.1007/s10531-017-1298-8

Gebretensae, K., y Kebede, F. (2022). "Status of the cheetah (*Acinonyx jubatus*) in Ethiopia: A review". *International Journal of Biodiversity and Conservation*, 14(4), pp.173-180. DOI: 10.5897/IJBC2022.1557

Gomendio, M., Roldán, E., Garde, J. y Espeso, G. (2006) "El papel de las biotecnologías reproductivas en la conservación animal:", *Ecosistemas*, 15(2), pp.50-57. Disponible en: <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/185> [Consultado 20-02-2023].

Gonzales, H.M., Scotto, C., Davalos, R., Gonzales, H. (2019). "BIOTECNOLOGÍA REPRODUCTIVA EN ANIMALES SILVESTRES Reproductive Biotechnology in Wild Animals". *Spermova*, 9(2), pp.69-82. DOI: 10.18548/aspe/0007.09

Gottelli, D., Wang, J., Bashir, S. y Durant, S. (2007). "Genetic analysis reveals promiscuity among female cheetahs". *Proceedings. Biological sciences*, 274, pp.1993-2001. DOI: 10.1098/rspb.2007.0502

Howard, J.G., Donoghue, A.M., Barone, M.A., Goodrowe, K.L., Blumer, E.S., Snodgrass, K., Starnes, D.D., Tucker, M.J., y Wildt, D.E. (1992). "Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinonyx jubatus*)". *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 23(3), pp.288-300.

Howard, J. G., Roth, T. L., Byers, A. P., Swanson, W. F., y Wildt, D. E. (1997). "Sensitivity to exogenous gonadotropins for ovulation induction and laparoscopic artificial insemination in the cheetah and clouded leopard". *Biology of reproduction*, 56(4), pp.1059–1068. DOI: 10.1095/biolreprod56.4.1059

Howard, J. G., y Wildt, D. E. (2009). "Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids". *Theriogenology*, 71(1), pp.130–148. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.046

Johnston, L. A., Donoghue, A. M., O'Brien, S. J., & Wildt, D. E. (1991). "Rescue and maturation in vitro of follicular oocytes collected from nondomestic felid species". *Biology of reproduction*, 45(6), pp.898–906. DOI: 10.1095/biolreprod45.6.898

Kelly, M.J., Laurenson, M.K., FitzGibbon, C.D., Collins, D.A., Durant, S.M., Frame, G.W., Bertram, B.C. y Caro, T.M. (1998). "Demography of the Serengeti cheetah (*Acinonyx jubatus*) population: the first 25 years". *Journal of Zoology*, 244, pp.473-488. Disponible en: <https://doi-org.cuarzo.unizar.es/9443/10.1111/j.1469-7998.1998.tb00053.x> [Consultado 10/04/2023]

Khalatbari, L., Yusefi, G. H., Martínez-Freiría, F., Jowkar, H. y Brito, J.C. (2018). "Availability of prey and natural habitats are related with temporal dynamics in range and habitat suitability for Asiatic Cheetah". *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 29(1), pp.145-151. DOI: 10.4404/hystrix-00080-2018

Kitchener, A. C., Breitenmoser-Würsten, C., Eizirik, E., Gentry, A., Werdelin, Lars, Wilting, A., Yamaguchi, N., Abramov, A. V., Christiansen, P., Driscoll, C., Duckworth, J. W., Johnson, Warren E., Luo, S. J., Meijaard, E., O'Donoghue, P., Sanderson, J., Seymour, K., Bruford, M., Groves, C., Hoffmann, M., Nowell, K., Timmons, Z., y Tobe, S. (2017). "A revised taxonomy of the Felidae: The final report of the Cat Classification Task Force of the IUCN Cat Specialist Group." *Cat News*, 11. Disponible en: <https://repository.si.edu/handle/10088/32616> [Consultado 22-03-2023]

Klaassen, B. y Broekhuis, F. (2018). "Living on the edge: Multiscale habitat selection by cheetahs in a human-wildlife landscape". *Ecology and Evolution*, 8, pp.7611-7623. DOI: 10.1002/ece3.4269

Koester, D. C., Freeman, E. W., Brown, J. L., Wildt, D. E., Terrell, K. A., Franklin, A. D., y Crosier, A. E. (2015). "Motile Sperm Output by Male Cheetahs (*Acinonyx jubatus*) Managed Ex Situ Is Influenced by Public Exposure and Number of Care-Givers". *PloS one*, 10(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0135847

Koester, D. C., Wildt, D. E., Brown, J. L., Meeks, K., y Crosier, A. E. (2017). "Public exposure and number of conspecifics have no influence on ovarian and adrenal activity in the cheetah (*Acinonyx jubatus*)". *General and Comparative Endocrinology*, 243, pp.120-129. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.11.010

Krausman, P. R., y Morales, S. M. (2005). "Acinonyx jubatus". *Mammalian Species*, 771. DOI: 10.1644/771

Laurenson, MK., Caro, TM. y Borner, M. (1992). "Female cheetah reproduction". *National Geographic. Research & Exploration*, 8(1). DOI:10.1038/35069145

Maly, MA. (2015). *Assessing Puberty in Ex Situ Cheetahs (Acinonyx jubatus) via Growth Patterns and Fecal Hormone Metabolites*. Trabajo fin de master. North Carolina State University.

Maly, M. A., Edwards, K. L., Farin, C. E., Koester, D. C., y Crosier, A. E. (2018). "Assessing puberty in ex situ male cheetahs (Acinonyx jubatus) via fecal hormone metabolites and body weights". *General and comparative endocrinology*, 268, pp.22–33. DOI: 10.1016/j.ygcen.2018.07.011

Marker, L. y Dickman, A. (2004). "Human Aspects of Cheetah Conservation: Lessons Learned from the Namibian Farmlands". *Human Dimensions of Wildlife*, 9(4), pp.297-305. DOI: 10.1080/10871200490505729

Marker, L., Dickman, A., Wilkinson, C., Schumann, B. y Fabiano, E. (2007). "The Namibian Cheetah: Status Report". *CAT News*, 3, pp-4-13. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/254847613> The Namibian Cheetah Status Report [Consultado 2/05/2023]

Marker, L. y Johnston, B. (2022). "International cheetah (Acinonyx jubatus) studbook". Otjiwarongo, Namibia: Cheetah Conservation Fund. Disponible en: <https://cheetah.org/resource-library/2020-international-studbook/> [Consultado 1/05/2023]

Marker L. y O'Brien SJ. (1989). "Captive breeding of the cheetah (Acinonyx jubatus) in North American zoos (1871–1986)". *Zoo Biology*, 8(1), pp.3–16. DOI: 10.1002/zoo.1430080103.

Marrow, J. C., Woc-Colburn, M., Hayek, L.-A. C., Marker, L., y Murray, S. (2015). "Comparison of two α_2 -adrenergic agonists on urine contamination of semen collected by electroejaculation in captive and semi-free-ranging cheetah (Acinonyx jubatus)". *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46(2), pp.417–420. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/24551414> [Consultado 28/04/2023]

Meissner, R., Winter, S., Westerhüs, U., Sliwa, A., Greve, C., Bottriel, L.G., Bottriell, P., Rodríguez Fernandes, C., Vercammen, P., Hunter, L. y Prost, S. (2023). "The potential and shortcomings of mitochondrial DNA analysis for cheetah conservation management". *Conservation Genetics*, 24, pp.125–136. DOI: 10.1007/s10592-022-01483-1.

O'Brien, S.J. y Evermann, J.F. (1988). "Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations". *Trends in Ecology and Evolution*, 3(10), pp.254-259. DOI: 10.1016/0169-5347(88)90058-4.

O'Brien, S.J., Roelke, M.E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C.A., Meltze, D., Colly, L., Evermann, J.F., Bush, M., y Wildt, D.E. (1985). "Genetic Basis for Species Vulnerability in the Cheetah". *Science*, 227, pp. 1428–1434. DOI: 10.1126/science.2983425.

Pelican, K. M., Wildt, D. E., Pukazhenth, B., y Howard, J. (2006). "Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids". *Theriogenology*, 66(1), pp.37–48. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.013

Prost, S., Machado, A.P., Zumbroich, J., Preier, L., Williams, S.M., Meissner, R., Guschanski, K., Brealey, J. C., Rodríguez, C., Vercammen, P., Hunter, L.T., Abramov, A. V., Plasil, M., Horin, P., Godsall- Bottriell, L.G., Bottriell, P., Dalton, D.L., Kotze, A. y Burge, P. A. (2022). "Genomic analyses show extremely perilous conservation status of African and Asiatic cheetahs (*Acinonyx jubatus*)". *Molecular Ecology*, 31, pp.4208-4223. DOI: 10.1111/mec.16577

Pukazhenth, B., Spindler, R., Wildt, D., Bush, LM., Howard, JG. (2002). "Osmotic properties of spermatozoa from felids producing different proportions of pleiomorphisms: influence of adding and removing cryoprotectant" *Cryobiology*, 44, pp.288-300 DOI: [10.1016/S0011-2240\(02\)00035-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(02)00035-4)

Roldan, E. (2009). "Biología de la reproducción de mamíferos en peligro de extinción". *Discurso de ingreso del académico correspondiente extranjero*. 16 noviembre 2009. Madrid. Pp.21-59.

San Diego Zoo Wildlife Alliance (2018). "*Cheetah (Acinonyx jubatus) Fact Sheet*". Disponible en: <http://ielc.libguides.com/sdzg/factsheets/cheetah> [Consultado 22-03-2023].

Schmidt-Küntzel, A, Dalton, D. L., Menotti-Raymond, M., Fabiano, E., Charruau, P., Johnson, W.E., Sommer, S., Marker, L. Kotzé, A. y O'Brien, S.J. (2018). "Conservation Genetics of the Cheetah: Genetic History and Implications for Conservation". *Cheetahs: Biology and Conservation*, pp.71-92. DOI: 10.1016/B978-0-12-804088-1.00006-X.

Seddon, P.J., Armstrong, D.P., y Maloney, R.F. (2007). "Developing the science of reintroduction biology". *Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology*, 21(2), pp.303–312. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2006.00627.x

Sengenberger, K., Bus, H. y Versteeg, L. (2018). "EAZA Best Practice Guidelines Cheetah (*Acinonyx jubatus*)" Disponible en: <https://www.eaza.net/assets/Uploads/CCC/EAZA-Best-Practice-Guidelines-FINAL-SM.pdf> [Consultado 23-03-2023]

Sharp, N.C.C. (1997). "Timed running speed of a cheetah (*Acinonyx jubatus*)". *Journal of Zoology*, 241, pp.493-494. DOI: 10.1111/j.1469-7998.1997.tb04840.x

Solo quedan 12 guepardos en Irán, en grave peligro de extinción (2022). Suiza, Sociedad Suiza de Radiodifusión (SRG). Disponible en: <https://www.swissinfo.ch/spa/afp/solo-quedan-12-guepardos-en-ir%C3%A1n--en-grave-peligro-de-extinci%C3%B3n/47248866> [Consultado 28-02-2023]

Strampelli, P., Searle, C.E., Smit, J., Grau, A., Henschel, P., Lobora, A.L., Mitchell, N., Macdonald, D.W. y Dickman, A.J. (2021). "Insights into the status and distribution of cheetah (*Acinonyx jubatus*) in an understudied potential stronghold in southern Tanzania". *African Journal of Ecology*, 59, pp.334– 341. DOI: 10.1111/aje.12850

Thongphakdee A., Sukparangsi W., Comizzoli P., y Chatdarong K. (2020). "Reproductive biology and biotechnologies in wild felids". *Theriogenology*, 150, pp.360-373. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2020.02.004

Van der Meer, E., Sousa, L., y Loveridge, A. (2021). "Reassessment of an introduced cheetah *Acinonyx jubatus* population in Matusadona National Park, Zimbabwe". *Oryx*, 55(2), pp.294-301. DOI: 10.1017/S0030605319000164

Weise, F.J., Vijay, V., Jacobson, A.P., Schoonover, R.F., Groom, R.J., Horgan, J., Keeping, D., Klein, R., Marnewick, K., Maude, G., Melzheimer, J., Mills, G., Merwe, V., Meer, E., Vuuren, R., Wachter, B. y Pimm, S.L. (2017). "The distribution and numbers of cheetah (*Acinonyx jubatus*) in southern Africa". *PeerJ*, 5. PeerJ, Dec 11; 5:e4096. DOI: 10.7717/peerj.4096. eCollection 2017

Wielebnowski, N. y Brown, J.L. (1998). "Behavioral correlates of physiological estrus in cheetahs". *Zoo Biology*, 17, pp.193-209. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2361(1998)17:3<193::AID-ZOO4>3.0.CO;2-4

Wildt, D. E., Bush, M., Howard, J. G., O'Brien, S. J., Meltzer, D., Van Dyk, A., Ebedes, H., & Brand, D. J. (1983). "Unique Seminal Quality in the South African Cheetah and a Comparative Evaluation in the Domestic Cat". *Biology of Reproduction*, 29(4), pp.1019–1025. DOI: 10.1095/biolreprod29.4.1019

Wildt, D. E., Rall, W. F., Critser, J. K., Monfort, S. L., y Seal, U. S. (1997). "Genome Resource Banks". *BioScience*, 47(10), pp.689–698. DOI: 10.2307/1313209

Ziegler-Meeks, K. (2009). "*Husbandry Manual for the Cheetah (Acinonyx jubatus)*". Edited and Compiled by: Karen Ziegler–Meeks. White Oak Conservation Center, pp.45-81. Disponible en: <https://www.awjac.org/docs/CheetahManualFinal-1-19-2009.pdf> [Consultado 26/04/2023].

INFOGRAFÍA

<https://www.pinterest.es/pin/548735535822213811/>

<https://www.naturalista.mx/taxa/41834-Mellivora-capensis>