



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Tecnología de reproducción asistida en felinos salvajes

Assisted reproductive technology in wild felids

Autor/es

Natalia Albertos López

Director/es

José Ignacio Martí Jiménez

Facultad de Veterinaria

2023

# ÍNDICE

1. Resumen .....	2
2. Abstract .....	2
3. Introducción .....	3
3.1. Taxonomía .....	3
3.2. Alimentación .....	6
3.3. Comportamiento .....	7
3.4. Reproducción .....	8
3.4.1. Reproducción en hembras .....	8
3.4.2. Reproducción en machos .....	9
4. Justificación y objetivos .....	10
5. Metodología .....	11
6. Resultados y discusión .....	12
6.1. Recolección de semen .....	12
6.2. Inseminación artificial .....	13
6.3. Fecundación <i>in vitro</i> .....	14
6.4. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides .....	15
6.5. Transferencia de células nucleares somáticas .....	16
6.6. Transferencia de embriones .....	17
6.7. Crioconservación .....	19
7. Conclusiones .....	21
8. Conclusions .....	21
9. Valoración personal .....	22
10. Bibliografía .....	23

## **1. Resumen**

Para mantener y reforzar las poblaciones de felinos salvajes es necesario utilizar estrategias de conservación tanto en los hábitats naturales como en centros de recuperación o zoológicos. Para ello, es necesario conocer su biología reproductiva y, así, mejorar su reproducción para mantener y aumentar su diversidad genética, favoreciendo las poblaciones sostenibles de felinos silvestres. Existe una problemática ante la escasa información sobre los felinos salvajes y su correcta forma de conservación en zoos, lo que dificulta este objetivo.

Por ello, en esta memoria se han recopilado las técnicas de reproducción asistida (ARTs) empleadas para ayudar a la Familia *Felidae* contra la extinción, tales como la inseminación artificial (IA), fecundación *in vitro* (IVF), inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), transferencia de células nucleares somáticas (SCNT), transferencia de embriones o crioconservación.

## **2. Abstract**

Maintaining and strengthening wild cat populations requires conservation strategies both in natural habitats and in recovery centers or zoos. For this, it is necessary to know their reproductive biology and, thus, improve their reproduction to maintain and increase their genetic diversity, favouring sustainable populations of wild cats. There is a problem with the scarce information about wild cats and their correct form of conservation in zoos, which makes this objective difficult.

Therefore, this report has compiled the assisted reproduction techniques (ARTs) used to help the *Felidae* Family against extinction, such as artificial insemination (AI), *in vitro* fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI), somatic cell nuclear transfer (SCNT), embryo transfer or cryopreservation.

### 3. Introducción

Actualmente, en la Familia *Felidae* se reconocen dos subfamilias (*Felinae* y *Pantherinae*), 14 géneros y 40 especies, distribuidos en todos los continentes, excepto en Oceanía y la Antártida (Clavijo y Ramírez, 2009). La mayoría de ellos, excepto los gatos domésticos, están clasificados como amenazados, vulnerables o en peligro debido a la caza ilegal, pérdida de hábitat o degradación (Thongphakdee et al., 2020).

El origen de los felinos data de más de 50 millones de años, cuando se separó el linaje de cánidos y félidos. Entre 20 y 16 millones de años antes apareció el primer felino, denominado *Pseudaelurus*, del cual descendieron los demás felinos actuales. Hace menos de 2,5 millones de años, durante el Pleistoceno, se diferenció otro linaje del que se originan los linceos y grandes gatos (Ceballos et al., 2010).

#### 3. 1. Taxonomía

Con el fin de realizar un estudio adecuado sobre las diferentes especies felinas, se procederá a realizar una descripción detallada de su clasificación filogenética:

REINO	Animal
TIPO	Cordados
SUBTIPO	Vertebrados
SUPERCLASE	Gnatostomados
CLASE	Mamíferos
SUBCLASE	Terios
INFRACLASE	Euterios
COHORTE	Ferungulados
ORDEN	Carnívoros
SUBORDEN	Feloides
FAMILIA	Félidos

**Tabla 1.** Taxonomía de la familia *Felidae* (Gutiérrez, 2006)

Dentro de la familia de los félidos, se distinguen los siguientes géneros:

- Género Acinonyx: donde encontramos únicamente a la especie *Acinonyx jubatus* (guepardo) (Fig. 1), el cual tiene una amplia distribución desde las praderas abiertas del centro de la India hasta el suroeste de Asia, Arabia y África (Krausman y Morales, 2005).
- Género Panthera: el cual contiene a todos los felinos grandes: *Panthera leo* (león), *Panthera tigris* (tigre), *Panthera onca* (jaguar) y *Panthera pardus* (leopardo) (West, Heard y Caulkett, 2014).
  - *Panthera leo*: se distribuye por regiones abiertas del África subsahariana e India (Yamaguchi et al., 2004) (Fig. 2).
  - *Panthera tigris*: se localiza en zonas con una cubierta vegetal grande, con acceso constante a agua y grandes presas de zonas como Asia, sobre todo la India, Nepal, Bután, Bangladesh y Siberia (Gutiérrez, 2006) (Fig. 3).
  - *Panthera onca*: habita en zonas donde abunde el agua como bosques junto a ríos, lagos, ... desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina (Perovic y Herrán, 1998) (Fig. 4).
  - *Panthera pardus*: habita bosques de grano, montañas, ambientes semiáridos y áreas suburbanas en todo África subsahariana, medio Oriente y desde el sur de Asia hasta el lejano oriente ruso (Stein y Hayseen, 2013) (Fig. 5).
- Género Felis: de este género destacan las especies *Felis concolor* (puma), *Felis silvestris* (gato montés), *Felis pardalis* (ocelote) y *Felis serval* (serval) (Gutiérrez, 2006).
  - *Felis concolor*: lo encontramos distribuido por todo el continente americano (Currier, 1983) (Fig. 6).
  - *Felis silvestris*: tiene preferencia por los bosques de Europa, Asia y África (Randi et al., 2001) (Fig. 7).
  - *Felis pardalis*: al igual que el puma, se encuentra por toda América (Gutiérrez, 2006) (Fig. 8).
  - *Felis serval*: localizado en el sur de África (Smithers, 1978) (Fig. 9).
- Género Lynx: donde distinguimos a la especie *Lynx pardinus* (Lince Ibérico) y al *Lynx lynx* (Lince Boreal) (García-Perea, 1996).
  - *Lynx pardinus*: distribuido por el cuadrante suroeste de la península ibérica (Vargas y Breitenmoser, 2009) (Fig. 10).
  - *Lynx lynx*: su rango geográfico abarca desde el centro de Europa del este hasta Asia oriental (Schmidt, Ratkiewicz y Konopiński, 2011) (Fig. 11).



**Figura 1.** *Acynonyx jubatus* (Temple, 2004)



**Figura 2.** *Panthera leo* (Pluck, 2003)



**Figura 3.** *Panthera tigris* (Moghe, 2003)



**Figura 5.** *Panthera pardus* (Lombardo, 2010)



**Figura 4.** *Panthera onca* (Sharp, 2004)



**Figura 6.** *Felis concolor* (Hume, 2005)



**Figura 7.** *Felis silvestris* (Hun, 2018)



**Figura 8.** *Felis pardalis* (Medau, 2004)



**Figura 9.** *Felis serval* (Reutlinger, 2004)



**Figura 10.** *Lynx pardinus* (Delso, 2005)



**Figura 11.** *Lynx lynx* (Cerniauskas, 2023)

### 3. 2. Alimentación

Son carnívoros estrictos, que aprovechan las distintas presas en cada lugar particular. En su dieta se pueden identificar presas básicas y presas que son alternativas (Chinchilla, 1997). Se ha observado que los leones africanos y los pumas consumen pequeños trozos de hueso, a menudo de individuos jóvenes. Sin embargo, la mayor parte de la dieta de los grandes felinos está compuesta de carne. Los felinos existentes son reconocidos como una de las familias morfológicamente más uniformes entre los carnívoros (Parkinson, Plummer y Hartstone-Rose, 2015).

Han sufrido algunas adaptaciones para cazar a sus presas como cambios en la coloración que les permite pasar desapercibidos entre la vegetación; una capa reflectante en los ojos, llamada *tapetum lucidum*, que les permite ver en la oscuridad debido a sus hábitos nocturnos o sus largas vibriras que funcionan como receptores del sentido del tacto (Ceballos et al., 2010).

Son digitígrados con garras fuertes, curvadas y retráctiles (solo parcialmente en el guepardo) lo que les facilita la caza. En general, son depredadores que acechan a la presa y la atacan de un salto o tras una corta carrera (Gutiérrez, 2006).

El ocelote se alimenta de presas de menor tamaño que el jaguar y el puma. En estas especies se aprecia que los mamíferos son las presas principales, mientras que las aves y los reptiles resultan menos importantes (Chinchilla, 1997).

Sus técnicas de caza a corta distancia hacen de éstos, animales solitarios, excepto los leones que viven en manadas y los guepardos adultos jóvenes que ocasionalmente se encuentran en parejas o tríos. A pesar de todas las características mencionadas, el éxito en su cacería es bajo (Ceballos et al., 2010).

### **3. 3. Comportamiento**

Según un modelo de etograma común a todas las especies felinas se pueden observar distintos tipos de comportamientos como se muestra en la Tabla 2:

<b>Categoría</b>	<b>Comportamiento</b>
<i>Descanso</i>	Acostarse, estación, autoacicalamiento
<i>Alimentación</i>	Comer/Beber
<i>Actividad</i>	Caminar, aproximación, saltar/trepar, arañar/rascar, correr, restregarse, revolcarse, manipular/lamer un objeto
<i>Socialización</i>	Acicalamiento social, atacar/jugar, gruñir
<i>Otros comportamientos</i>	Olfatear, comer hierba, vocalizar, orinar/defecar

**Tabla 2.** Definición de los comportamientos del etograma (Urrutia et al., 2023)

Los tigres son animales solitarios y nocturnos, ferozmente territoriales y que cazan mucho. Las hembras pueden tener un territorio de 20 km<sup>2</sup>, mientras que el de los machos es más extenso (alrededor de 80 km<sup>2</sup>). Los machos pueden permitir la entrada de varias hembras a su territorio, pero no toleran la entrada de otros machos, volviéndose violentos y pudiendo terminar con la vida de otros machos (Sosa, 2012).

En ocasiones, los felinos salvajes en cautividad muestran cambios en su comportamiento que podrían ser señales de una falta de bienestar. Estos cambios incluyen estereotipias (comportamientos repetitivos que pueden surgir como resultado de una enfermedad o de los intentos repetidos por adaptarse a un ambiente difícil; siendo las estereotipias de desplazamiento las más frecuentes en los felinos salvajes en cautividad), aumento de la conducta agresiva, y la reducción del consumo de alimento y de la conducta exploratoria. (Vargas y Breitenmoser, 2009).

### **3. 4. Reproducción**

El gran número de especies de felinos y su amplia distribución geográfica determina muchas de las particularidades de la especie, especialmente en los aspectos reproductivos. La estacionalidad reproductiva es uno de los aspectos más variables entre especies; mientras que en los gatos domésticos están influidos por el fotoperiodo, en la naturaleza, también dependen de los suministros de alimentos durante las estaciones (da Paz, 2012).

#### **3.4.1. Reproducción en hembras**

Tanto los ovarios de los felinos salvajes como del gato doméstico se localizan caudales a los riñones y están conectados proximalmente por el ligamento suspensor, y dorsalmente por el mesovario. El útero es bicorne y el cuerpo uterino se divide internamente por un tabique incompleto. El cuello uterino es corto, pero se abre en un ángulo cercano al orificio vaginal. Presentan una placenta de tipo endoteliocorial zonal (Cocchia et al., 2015).

A diferencia de los gatos domésticos, muchas especies de felinos salvajes en cautividad suelen mostrar signos de receptividad sexual como serían el frotamiento, lordosis o cola levantada (Thongphakdee et al., 2020). Sin embargo, sí es destacable la vocalización y el balanceo como muestra de celo en leones asiáticos (*Panthera leo persica*) (Umapathy et al., 2007). La duración del estro parece similar en todas las especies felinas, excepto en gatos domésticos, gatos de las arenas (*Felis margarita*), gato herrumbroso (*Prionailurus rubiginosus*), jaguares (*Panthera onca*), leopardos de las nieves (*Panthera uncia*) y pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*) donde su duración es más larga (Andrews et al., 2018). La citología vaginal, ecografía y la monitorización de la actividad ovárica no son métodos que se puedan utilizar en animales salvajes sin ser anestesiados (Thongphakdee et al., 2020).

Los patrones de estro pueden darse tanto por ovulación inducida como espontánea. El aumento espontáneo de progestágenos después de las oleadas de estrógeno es raro o inexistente en el tigre (*Panthera tigris*), leopardo de las nieves (*Panthera uncia*), ocelote (*Leopardus pardalis*), puma (*Felis concolor*), leopardo tigre (*Leopardus tigrinus*), guepardo (*Acinonyx jubatus*) y el lince (*Lynx pardinus*, *Lynx canadensis*, *Lynx lynx*). Sigue, de forma ocasional, en el león (*Panthera leo*), manil (*Otocolobus manul*), leopardo (*Panther pardus*), gato pescador (*Prionailurus viverrinus*), y regularmente en el margay (*Leopardus wiedii*), pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*) y gato doméstico (*Felis silvestris catus*). En algunas especies de ciertos taxones, la ovulación espontánea ocurre de manera más frecuente cuando las hembras se mantienen juntas, mientras que en otros la ovulación inducida se produce si se mantienen aisladas. Así, dentro de la misma taxonomía, los mecanismos de ovulación están regulados de diferente forma dependiendo de

la especie y de las respuestas individuales específicas a estímulos psicosociales y/o físicos (Cocchia et al., 2015).

El ciclo estral, la duración de la gestación y el número de crías observados en las diferentes especies de neotropicales felinos salvajes están descritos en la Tabla 3.

<b>Especie</b>	<b>Estro (días)</b>	<b>Ciclo estral (días)</b>	<b>Gestación (días)</b>	<b>Crías (nº)</b>
<i>L. pardalis</i>	4,63±0,63	16,5±1,5	70-85	1-4
<i>L.tigrinus</i>	3±9	15,8±1,5	73-78	1-4
<i>F. concolor</i>	8	23	84-98	1-6
<i>P. onca</i>	12±1	47,2±5,4	90-111	1-2

**Tabla 3.** Características reproductivas en felinos salvajes neotropicales (da Paz, 2012)

### 3.4.2. Reproducción en machos

El aparato reproductor masculino de los felinos salvajes guarda una gran similitud con el de las especies domésticas, estando compuesto por los testículos, epidídimo, conductos deferentes, próstata, glándulas bulbouretrales, uretra, pene y escroto. No poseen vesícula seminal, como sucede en los carnívoros en general (Ceregatti y Feitosa, 2023).

La calidad del esperma es una característica importante para la evaluación de la capacidad reproductiva individual. Las concentraciones del eyaculado muestran grandes variaciones (Tabla 4) que pueden deberse a los diferentes métodos de recolección, la estación del año o la dieta que hayan podido seguir. También cabe destacar que los félidos de pequeño tamaño producen concentraciones de esperma mayores que los de mayor tamaño. Por ello, estos números únicamente pueden usarse de referencia (Ceregatti y Feitosa, 2023).

<b>Especies</b>	<b>Concentración de espermatozoides (<math>\times 10^6/\text{ml}</math>)</b>
<i>P. onca</i>	3,9-5115
<i>F. concolor</i>	15,6-400
<i>F. pardalis</i>	28-190,2

**Tabla 4.** Concentración espermática en felinos salvajes neotropicales (Ceregatti y Feitosa, 2023)

#### **4. Justificación y objetivos**

La elección de este tema surge tras la preocupación por la amenaza, vulnerabilidad o peligro ante el que se encuentra gran parte de las especies de la Familia *Felidae*, las cuales tienen gran importancia en el mantenimiento de los ecosistemas y redes tróficas en su amplia distribución geográfica. También existen diferentes desafíos a la hora de mantener las poblaciones de estos animales de manera natural, como la incompatibilidad entre individuos, ambientes subóptimos para la reproducción o problemas de consanguinidad, que hacen necesario la aplicación de ARTs en estas especies.

Por tanto, el objetivo de esta revisión bibliográfica es, una vez conocida la anatomía, fisiología, biología y reproducción de estas especies, recopilar la información de los resultados de las diferentes técnicas de reproducción asistida que se han utilizado para mejorar su conservación, tanto *ex situ* como *in situ*.

## 5. Metodología

Para la realización de este trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica utilizando libros publicados de forma digital en internet, artículos disponibles en diferentes buscadores web como Google académico, ResearchGate, Web of Science y ScienceDirect; y revistas científicas y de divulgación como Mammal Review, Theriogenology y Animal Reproduction Science. Para una búsqueda más precisa y sencilla se han utilizado términos clave como: “assisted reproduction”, “wild felids”, “reproduction”, “male reproduction”, “ART wild felids”, “taxonomía grandes felinos”, “comportamiento felinos salvajes”.

A continuación, se muestra en la Tabla 5 los resultados totales obtenidos al realizar la búsqueda de los términos nombrados anteriormente en los buscadores Google Scholar y Web of Science, donde se han seleccionado las aparecidas en los últimos 30 años y algunas más antiguas a las que se hace frecuente referencia.

	<i>Google Scholar</i>	<i>Web of Science</i>
<i>Assisted reproduction</i>	2590000	38993
<i>Wild felids</i>	37000	1117
<i>Reproduction</i>	7350000	594376
<i>Male reproduction</i>	5260000	71261
<i>ART wild felids</i>	7200	26
<i>Taxonomía grandes felinos</i>	7480	0
<i>Comportamiento felinos salvajes</i>	6960	0

**Tabla 5.** Resultados obtenidos tras la búsqueda de términos clave

## **6. Resultados y discusión**

Se entiende por técnicas de reproducción asistida (ARTs) al conjunto de métodos biomédicos que conducen a facilitar o sustituir a los procesos biológicos naturales que se desarrollan durante la reproducción, como la deposición del semen en la vagina, la progresión de los espermatozoides a través de las vías genitales femeninas, la capacitación del espermatozoide una vez eyaculado, la fecundación del óvulo por el espermatozoide, ... (Solís, 2000).

A pesar de las variaciones dentro de la Familia *Felidae* en fenotipo, genotipo y fisiología, todas las especies se enfrentan a un desafío similar, la amenaza o peligro de extinción en algún lugar de su área de distribución natural. Por ello, el establecimiento de poblaciones reservorio en cautividad se considera útil como una “póliza de seguro” y al mismo tiempo ofrece unas oportunidades de investigación que no estarían disponibles en la naturaleza. Sin embargo, la creación de poblaciones autosuficientes de felinos silvestres *ex situ* ha sido un desafío, ya que en algunas especies existe apareamiento, pero no una reproducción exitosa (ej.: guepardo) o la agresividad durante la reproducción es extrema pudiendo causar la muerte de uno de los dos. Sin embargo, cuando la reproducción se establece con éxito, la prolificidad puede ser alta (ej.: pantera nebulosa (Verma, 2017).

### **6.1. Recolección de semen**

El mal historial de reproducción en félidos no domésticos en cautividad es debido, en parte, a la pobre calidad del semen por la fisiología específica de la espermatogénesis o sus requerimientos de capacitación. La correcta realización de recolección del semen es imprescindible para el éxito de la reproducción asistida. Existen diferentes técnicas disponibles para la recolección de semen, tales como: post-mortem, manipulación manual, vagina artificial o electroeyaculación, siendo post-mortem y la electroeyaculación las más utilizadas debido al menor riesgo que supone tanto para el animal como para el personal (Wilwerding y Evans, 1994).

La electroeyaculación ocurre tras la introducción de una sonda transrectal con tres electrodos, conectada a un estimulador eléctrico que provoca una descarga eléctrica controlada que estimula el reflejo eyacular (Cocchia et al., 2015) (Fig. 12). Una de las desventajas de la electroeyaculación es que el semen se puede contaminar con la orina cuando el voltaje excede el mínimo necesario. Una alternativa para minimizar este problema sería la cateterización o cistocentesis antes de empezar el proceso (da Paz, 2012).

En caso de la muerte súbita de un individuo valioso es posible recolectar espermatozoides de la cola del epidídimo después del aislamiento previo del testículo. Los espermatozoides se

obtienen mediante múltiples incisiones de la cola del epidídimo suspendido en un medio adecuado, que conduce a la liberación de espermatozoides móviles. Este procedimiento permite obtener espermatozoides vivos incluso 24 horas después de la muerte del animal, siempre que el testículo haya sido debidamente conservado (Kochan et al., 2019).

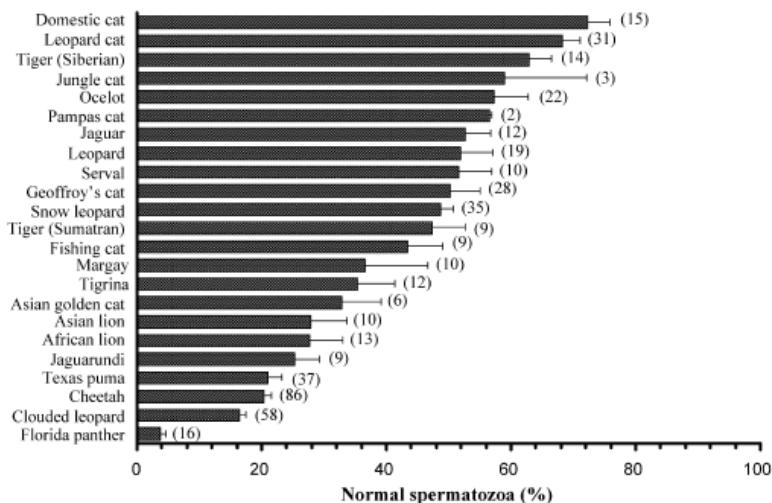


**Figura 12.** Proceso de electroeyaculación en un Ocelote (da Paz, 2012)

## 6.2. Inseminación artificial

El éxito de la inseminación artificial (IA) solamente ha sido descrito en 10 especies salvajes de felinos utilizando tanto técnicas quirúrgicas como no quirúrgicas: se consiguieron gestaciones en ocho especies (tigre, leopardo de las nieves, pantera nebulosa, puma, ocelote y tigrillo) mediante inseminación intrauterina quirúrgica; en el tigre siberiano, león y leopardo por inseminación transvaginal; y mediante inseminación transcervical ecoguiada en el guepardo y leopardo Amur. Antes de realizar la IA, es necesario inducir el celo y la ovulación (Goeritz et al., 2012), siendo particularmente útil en estas especies debido a sus bajos niveles de variación genética y a su pobre éxito reproductivo en zoológicos. El éxito de la IA se encuentra muy influenciado por la gonadotropina exógena, el momento, la dosis y el lugar utilizado para la inseminación (Howard et al., 1997).

La anestesia es necesaria para estos animales salvajes, pero puede comprometer el transporte de esperma en los félidos inseminados vaginalmente. Este problema puede ser solucionado mediante la deposición intrauterina de esperma (Howard et al., 1997). Este abordaje transabdominal involucra la inserción de un laparoscopio a través de una cánula y una apertura de tres centímetros de piel y músculo en la pared abdominal, seguido de la cateterización de la luz uterina y la deposición del semen en la parte craneal del cuerno uterino. Los felinos silvestres normalmente producen densidades de esperma bajas, acompañadas con altos pleomorfismos. Por ello, lo más seguro es que los espermatozoides se depositen lo más cerca posible del oviducto (Howard y Wildt, 2009).



**Figura 13.** Proporción de espermatozoides estructuralmente normales en 23 especies (o subespecies) de la Familia *Felidae* (Howard y Wildt, 2009).

Para una IA exitosa debemos controlar múltiples variables, siendo uno de los obstáculos más desafiantes que un ovario normal responda a la ovulación. Aunque la actividad folicular puede ser inducida en las especies felinas utilizando gonadotropinas exógenas, la capacidad de respuesta del ovario es muy variable y, a veces, incluso inexistente. La mayoría de los felinos salvajes que reciben gonadotropina coriónica equina (eCG, utilizada para estimular el desarrollo del folículo)/gonadotropina coriónica humana (hCG, usada para provocar la maduración del ovocito y la ovulación) ovulan 37-42 horas después de la inyección (Pelican et al., 2006).

### 6.3. Fecundación *in vitro*

La fecundación *in vitro* consiste en la exposición de ovocitos maduros a espermatozoides capacitados de forma que se produzca la fecundación fuera del tracto genital femenino (Martínez et al., 1989). El éxito de la IVF en estos animales es menor que el registrado en otras especies, solo entre el 50-60% de los ovocitos cultivados alcanzan la maduración nuclear en el cultivo y, tras la inseminación, generalmente menos del 40% de los ovocitos se fecundan. Incluso en condiciones óptimas de cultivo, menos del 20% de embriones se convierten en blastocistos *in vitro* (Cocchia et al., 2015).

La aspiración folicular laparoscópica es la técnica de obtención de ovocitos más utilizada para IVF, la cual, debe ir precedida de un tratamiento hormonal (gonadotropinas exógenas) (da Paz, 2012).



**Figura 14.** Imagen de laparoscopia de un ovario de guepardo con folículos preovulatorios (áreas más oscuras) donde se aspirarán los ovocitos (Crosier et al., 2020).

El procedimiento de IVF desarrollado para el gato doméstico se adapta fácilmente para el tigre también. Las hembras de tigre respondieron al estímulo de eCG/hCG produciendo una gran cantidad de folículos en desarrollo y un alto porcentaje de ovocitos maduros que eran capaces de ser fecundados y desarrollarse *in vitro*. Los embriones desarrollados fueron biológicamente competentes, dando lugar a tres crías que nacieron después de 107 días (Donoghue et al., 1990).

#### 6.4. Inyección intracitoplasmática de espermatozoides

La inyección intracitoplasmática es una técnica de micromanipulación en la cual se inyecta un único espermatozoide dentro del citoplasma de un ovocito maduro (Salamone, Canel y Rodríguez, 2017).

En el caso del león, el tiempo establecido para la maduración del ovocito es de 32-34 horas, en lugar de las 24 horas que necesita el gato doméstico. La calidad del esperma es un factor limitante y, por ello, se ha sugerido esta técnica como solución para aumentar la producción de embriones. La microinyección de espermatozoides frescos o congelados-descongelados en ovocitos maduros *in vivo* e *in vitro* ha sido exitosa en la producción de embriones felinos competentes, dando lugar al nacimiento de crías (Fernández-González et al., 2015).

Con la utilización de ICSI, el éxito o el fracaso de la fecundación no depende de que se hayan producido cambios específicos o no en la estructura y función de los gametos, siempre que se haya mantenido una suficiente y buena integridad del ADN (Kochan et al., 2019).

Esta técnica debería utilizarse para producir embriones *in vitro* cuando la calidad del esperma no es adecuada para realizar la fecundación *in vitro* estándar (Pope, 2000).

La inyección intracitoplasmática ha sido eficientemente aplicada en el yaguarundí (*Herpailurus yagouaroundi*) (utilizando semen eyaculado crioconservado), león (usando esperma epididimal crioconservado) y gato pescador (*Prionailurus viverrinus*) (con eyaculado de esperma crioconservado). Aun así, esta técnica no está siendo muy utilizada actualmente, particularmente en términos de producción de nacidos vivos, lo que puede deberse a la falta de disponibilidad de donantes de ovocitos, una respuesta ovárica imprecisa después de la estimulación, pequeño número de destinatarios y/o por la complejidad y ser una técnica costosa en la que se necesitan profesionales adecuadamente formados (Thongphakdee et al., 2020).

### **6.5. Transferencia de células nucleares somáticas**

La transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) es una técnica usada para la multiplicación rápida del germoplasma. “Dolly” fue la primera oveja clonada con éxito, obtenida a través de células epiteliales mamarias creando una revolución en la ciencia (Campbell et al., 1996), permitiendo la utilización de esta técnica en otras especies (Cortez et al., 2017). No obstante, hasta el momento no se han conseguido avances significativos en la mejora de la eficacia de esta técnica debido a que no se conocen con exactitud los mecanismos moleculares capaces de orquestar la reprogramación celular (Navarro, 2022). Es una parte del proceso de clonación, que consiste en introducir el material genético de la célula a clonar en el ovocito de la misma especie, desprovisto de su propio material genético (Felmer et al., 2007). Estas células pueden ser recolectadas de animales vivos o muertos (Thongphakdee et al., 2020).

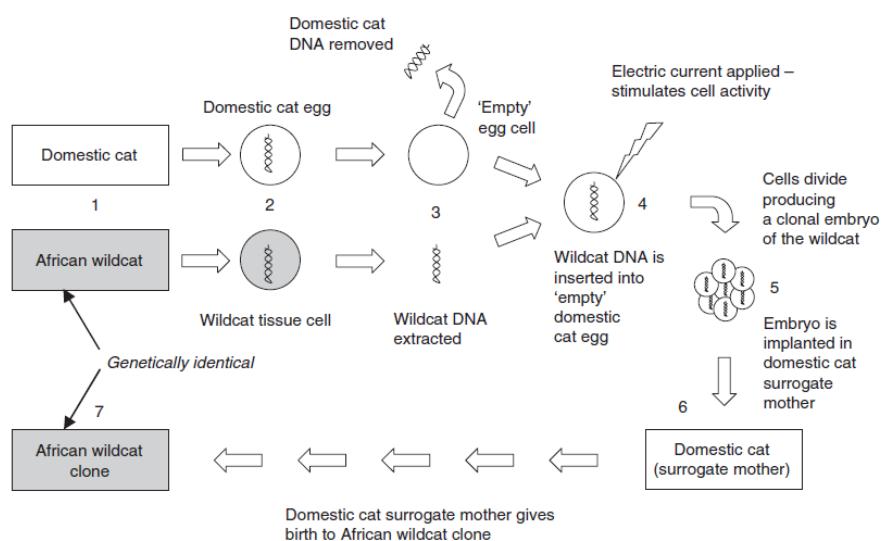
En este proceso, el primer paso es aislar una célula somática de un animal adulto. El núcleo de esta célula luego se transfiere a un óvulo en el cual el núcleo ha sido extraído, utilizando agujas microscópicas. Después de una manipulación química, el óvulo comenzará a comportarse como si hubiera sido fecundado. El cigoto resultante se convierte en un embrión y luego se implanta en el útero de otra hembra, la cual, parirá con normalidad (Rees, 2011).

La estimulación ovárica es crucial para producir donantes de ovocitos en SCNT, ya sea entre especies o transferencia nuclear intergenérica. Los ovocitos del huésped de especies estrechamente relacionadas, como el gato doméstico, se han utilizado como alternativa (Thongphakdee et al., 2018).

Se describió que una hembra receptora de una gata doméstica ha parido gatos monteses africanos (*F. silvestris lybica*) (Fig. 15) y gatos de las arenas (*F. margarita*) clonados. Se fusionaron los núcleos de fibroblastos de gatos monteses africanos con ovocitos de gatos domésticos y los embriones clonados se transfirieron a hembras receptoras de gato doméstico, de los cuales nacieron 17 gatitos, pero solo 8 sobrevivieron después del nacimiento hasta un mes (Cocchia et

al., 2015). Los ovocitos enucleados del gato doméstico tienen una alta capacidad para reprogramar las células donantes de los felinos salvajes para dar lugar a embriones. Sin embargo, los embrones alcanzan un pobre éxito en el blastocisto que se cree que puede deberse a la distancia filogenética entre la célula genética y el citoplasma del receptor (Thongphakdee et al., 2020).

Los ovocitos de cerdo y conejo son capaces de reprogramar las células donantes de los grandes felinos, pero no de forma tan eficaz como los ovocitos de los gatos domésticos (Veraguas et al., 2017).



**Figura 15.** Clonación de gato montés africano utilizando un gato doméstico (Rees, 2011)

## 6.6. Transferencia de embriones

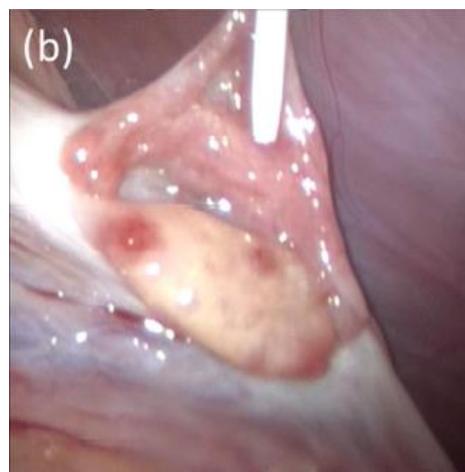
La transferencia de embriones se define como la translocación de un embrión producido por fecundación *in vitro* o *in vivo* a una hembra receptora para su gestación (Wildt y Roth, 1997). Para aplicar esta técnica es fundamental una relación entre el manejo hormonal para la inducción de ciclos reproductivos, el análisis seminal buscando potenciar la fecundación, la valoración de la calidad de los embriones (seleccionando los de mayor viabilidad) y la propia transferencia de embriones (Arias, 2020). Los embriones de buena o excelente calidad son aquellos con perfecta simetría (o solo ligeramente asimétricos), esféricos y uniformemente oscuros; mientras que, los embriones de regular o mala calidad son aquellos degenerados parcial o severamente, pálidos o contenidos en blastómeros lisados (Donoghue et al., 1990). Mediante esta técnica se ha conseguido que las hembras reproductoras que normalmente solo tenían algunas crías a lo largo de su vida produzcan una gran progenie, pero en el caso de los

carnívoros salvajes el objetivo es diferente: quiere mantener toda la diversidad genética existente (Vargas y Breitenmoser, 2009).

La transferencia de embriones frescos o congelados obtenidos *in vitro* ha demostrado ser exitosa en algunos felinos silvestres como el león (algunos embriones se desarrollaron hasta la etapa de blastocisto), tigre (las crías se desarrollaron a término después de la transferencia *in vitro*), gato montés africano (nació una cría tras la transferencia de embriones derivados *in vitro* congelados y posteriormente descongelados) y ocelote (dos crías nacidas a término tres más en el Zoológico de Cincinnati) (Cocchia et al., 2015).

La capacidad de transferir embriones directamente al oviducto de los félidos permite transferir embriones viables en etapas tempranas. Este enfoque se desarrolló en el gato doméstico y también se ha demostrado su éxito en pequeños félidos salvajes (Crosier et al., 2020). Esta transferencia se realiza de manera quirúrgica mediante una incisión medial-ventral que expone los ovarios y oviductos de forma bilateral. En cada ovario se examina el número de cuerpos lúteos y folículos preovulatorios (Donoghue et al., 1990). También existe la posibilidad de realizar una cirugía laparoscópica o transferir los embriones a través del cérvix utilizando un endoscopio, aunque esta última aún continúa investigándose (Kochan et al., 2019).

A pesar de que la transferencia de embriones ha sido exitosa en especies seleccionadas o poblaciones, la incidencia general de éxito sigue siendo baja (menos del 20%) (Pelican et al., 2006).



**Figura 16.** Ovario de guepardo con lugares de ovulación fresca (puntos rojos brillantes) y oviducto durante trasferencia de embriones (Crosier et al., 2020)

## **6.7. Crioconservación**

La creación del banco de recursos biológicos representa una herramienta de apoyo complementaria para la aplicación de ART en la conservación *in situ* y *ex situ* de félidos en peligro de extinción, siendo su objetivo principal preservar la máxima diversidad genética y biológica actual de la población mediante el procesamiento y crioconservación de células germinales, semen congelado y tejidos de animales muertos para que estos recursos genéticos puedan usarse en futuros proyectos reproductivos (Cocchia et al., 2015). No obstante, esta técnica requiere del desarrollo de protocolos de crioconservación que sean adecuados para su uso en el campo, así como aplicables en diferentes especies (Madrigal-Valverde, Freitas y Ribeiro de Araujo, 2021).

Los espermatozoides y ovocitos de los grandes felinos tienen unas características físicas peculiares, lo que aumenta la dificultad de utilización de métodos exitosos de crioconservación comparado con otras especies. Además, a pesar de la variedad de procesos que han sido investigados, las técnicas óptimas de crioconservación, tanto para espermatozoides como para ovocitos, aun no se han realizado (Cocchia et al., 2015). La teratospermia es un fenómeno en el que menos del 40% de los espermatozoides de un eyaculado muestran una morfología normal, siendo un fenómeno particularmente común en felinos en comparación con otros mamíferos, ocurriendo en más del 70% de las especies del taxón. Este suceso da lugar a bajas tasas de supervivencia en crioconservación, comprometiendo el uso de semen en reproducción asistida (Ceregatti y Feitosa, 2023).

El crioalmacenamiento de espermatozoides en combinación con AI o IVF/transferencia de embriones podría permitir la conservación de los genes de ocelote entre poblaciones *in situ* y *ex situ*, sin sacar a los animales de su naturaleza. Los espermatozoides de esta especie pueden congelarse eficazmente en campo utilizando vapor de nitrógeno líquido (LN2) solo o incluso con un transportador seco sin comprometer el éxito de la fecundación *in vitro* post-descongelación (Stoops et al., 2007). Por otro lado, destacar al guepardo, ya que, un eyaculado típico contiene habitualmente más del 70% de espermatozoides con formas anormales. No obstante, la crioconservación de espermatozoides de guepardo en diversas condiciones de exposición al glicerol dio lugar a una mejor recuperación post-descongelación de la integridad (50-60%) y la motilidad (40-50%) acrosómica de los espermatozoides (Crosier et al., 2006).

En lo que respecta a la eficacia de la crioconservación de ovocitos, está sujeta a investigaciones en curso. Tras la aplicación de métodos tradicionales utilizados para otras especies, se comprobó que no más del 25% de los ovocitos felinos conservan su competencia de desarrollo después de

la fecundación *in vitro*. También se ha intentado utilizar la vitrificación, pero el porcentaje de embriones felinos en división no superó el 20%. Por ello, sigue siendo necesario mejorar la eficacia de la crioconservación (Kochan et al., 2019). La crioconservación de embriones no se utiliza como herramienta de gestión y no existen bancos de embriones a gran escala para ninguna especie de felino silvestre (Vargas y Breitenmoser, 2009).

Recientemente, ha surgido un gran interés en el almacenamiento de gametos intragonadales de tejido ovárico o testicular crioconservados, a pesar de que todavía se considera estrictamente experimental. Sin embargo, representa una estrategia importante para preservar las células germinales de individuos jóvenes que mueren antes de alcanzar la madurez sexual o sin descendencia (Vargas y Breitenmoser, 2009).

En los felinos salvajes, se utiliza de forma habitual la congelación lenta para la crioconservación de células somáticas y tejidos, especialmente los derivados de la piel, como se ha observado en la crioconservación del jaguar y el gato de las arenas. En general, la congelación lenta utiliza bajas concentraciones de crioprotectores y se realiza mediante la reducción gradual de la temperatura de forma controlada. Como crioprotectores se suele utilizar dimetilsulfóxido como crioprotector intracelular en combinación con un crioprotector extracelular como puede ser la sacarosa, que protege la membrana celular uniéndose a grupos fosfolípidos y reduce el shock osmótico al controlar la entrada de agua a la célula (Praxedes et al., 2018).

## **7. Conclusiones**

1. Existe limitada información sobre la biología reproductiva y el comportamiento de apareamiento de algunas especies de felinos salvajes.
2. El desarrollo de las técnicas ART en la Familia *Felidae* se fundamenta en animales domésticos, en especial, el gato.
3. A pesar de que los resultados de ART son variables y no muy favorables, esta es la única posibilidad de preservar estas especies y su diversidad.

## **8. Conclusions**

1. There is limited information on the reproductive biology and mating behaviour of some species in wild felids.
2. The development of ART techniques in the *Felidae* Family is based on domestic animals, especially the cat.
3. Despite of the results of ART are variable and not very favorable, this is the only possibility to preserve these species and their diversity.

## **9. Valoración personal**

La reproducción asistida en felinos salvajes es un tema complejo que involucra diversas consideraciones éticas, científicas y de conservación. Las técnicas de reproducción asistida en felinos salvajes no están tan desarrolladas ni son tan comunes como en especies domésticas. Por lo que, su aplicación en la conservación de estas especies presenta desafíos significativos. Sin embargo, ha demostrado ser una herramienta valiosa para la conservación de especies en peligro de extinción, ya que, puede ayudar a mantener la diversidad genética en poblaciones pequeñas y evitar la endogamia, asegurar la supervivencia de especies con tasas de reproducción naturales bajas o inexistentes y puede proporcionar información valiosa sobre la biología reproductiva de estas especies, lo que a su vez puede ayudar en la realización de estrategias de conservación más efectivas.

Es importante considerar también los costes y recursos necesarios para llevar a cabo estos programas, ya que, suelen ser técnicas costosas y que requieren experiencia especializada en el campo de la medicina veterinaria y biología reproductiva. Aun así, los resultados pueden ser variables dependiendo de la especie y circunstancias individuales.

La realización de esta revisión bibliográfica me ha ayudado a profundizar en unos animales que siempre me han despertado curiosidad, ayudándome a conocer mejor su familia en aspectos biológicos y reproductivos. De igual modo, he mejorado mi búsqueda y selección de información relevante para este trabajo; además de mi redacción. Además, he conseguido ampliar la información dada en la asignatura de Reproducción y Obstetricia y adquirir conocimientos más específicos sobre las diferentes técnicas de reproducción asistida que pueden ayudar a la conservación, tanto en la vida silvestre como en cautividad, de la Familia *Felidae*.

Me gustaría agradecer este trabajo a mi tutor, José Ignacio Martí Jiménez, por proporcionarme su ayuda desde el principio y resolverme cada duda que haya podido tener. También me gustaría darles las gracias a mis padres porque siempre me apoyaron en cumplir mi sueño, incluso cuando yo ya había tirado la toalla, y por el esfuerzo que han hecho para que yo continuara.

## 10. Bibliografía

- Andrews, C. J., Thomas, D. G., Yapura, J. y Potter, M. A. (2018). "Reproductive biology of the extant felid species: a review". *Mammal Review*, **49**(1), pp. 16–30. Disponible en: DOI: 10.1111/mam.12145
- Arias, A. K. (2020). *Transferencia de embriones en Panthera Onca*. Trabajo Fin de Grado. Universidad Cooperativa de Colombia.
- Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A. y Wilmut, I. (1996). "Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line". *Nature*, **380**(6569), pp. 64-65. Disponible en: DOI: 10.1038/380064a0
- Ceballos, G., List, R., Medellín, R. A., Bonacic, C. y Pacheco, J. (2010). *Los felinos de América. Cazadores sorprendentes*. Fundación TELMEX y UNAM. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/277019372\\_Los\\_felinos\\_de\\_America\\_Cazadores\\_sorprendentes](https://www.researchgate.net/publication/277019372_Los_felinos_de_America_Cazadores_sorprendentes)
- Ceregatti, G. y Feitosa, W. B. (2023). "Male reproductive physiology of neotropical felids". *Theriogenology Wild*. **2**, 100023. Disponible en: DOI: 10.1016/j.therwi.2023.100023
- Cerniauskas, M. (2023). *Lynx lynx* [Imagen]. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/photos/299792566>
- Chinchilla, F. A. (1997). "La dieta del jaguar (*Panthera onca*), el puma (*Felis concolor*) y el manigordo (*Felis pardalis*) (Carnivora: Felidae) en el Parque Nacional Corcovado, Costa Rica". *Revista de Biología Tropical*. **45**(3), pp. 1223-1229. Disponible en: <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/rbt/article/view/21416>
- Clavijo, A. y Ramírez, G. F. (2009). "Taxonomía, distribución y estado de conservación de los felinos suramericanos: revisión monográfica". *Boletín científico centro de museos, museo de historia natural*. **13** (2), pp. 43-60. Disponible en: ISSN: 0123-3068.
- Cocchia, N., Tafuri, S., Abbondante, L., Meomartino, L., Esposito, L. y Ciani, F. (2015). "Assisted Reproductive Technologies in Safeguard of Feline Endangered Species". *New Discoveries in Embryology*. Disponible en: DOI: 10.5772/61004

- Cortez, J., Murga, N., Segura, G., Rodríguez, L., Vásquez, H. y Maicelo-Quintana, J. (2017). “Capacidad de dos líneas celulares para la producción de embriones clonados mediante transferencia nuclear de células somáticas”. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. **28**(4), pp. 928. Disponible en: DOI: 10.15381/rivep.v28i4.13878
- Crosier, A. E., Lamy, J., Bapodra, P., Rapp, S., Maly, M., Junge, R., Haefele, H., Ahistus, J., Santiestevan, J. y Comizzoli, P. (2020). “First Birth of Cheetah Cubs from In Vitro Fertilization and Embryo Transfer”. *Animals*. **10**(10), pp. 1811. Disponible en: DOI: 10.3390/ani10101811
- Crosier, A. E., 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. Disponible en: DOI: 10.1016/j.cryobiol.2005.10.011
- Currier, M. J. P. (1983). “*Felis concolor*”. *Mammalian Species*. (200), 1. Disponible en: DOI: 10.2307/3503951
- da Paz, R. C. R. (2012). “Wildlife Cats Reproductive Biotechnology”. *Current Frontiers in Cryobiology*. Disponible en: DOI: 10.5772/32464
- Delso, D. (2005). *Lynx pardinus* - Wikipedia, la enciclopedia libre [imagen]. Disponible en: [https://es.wikipedia.org/wiki/Lynx\\_pardinus#/media/Archivo:Lince\\_ibérico\\_\(Lynx\\_pardinus\)\\_Almuradiel,\\_Ciudad\\_Real,\\_España,\\_2021-12-19,\\_DD\\_07.jpg](https://es.wikipedia.org/wiki/Lynx_pardinus#/media/Archivo:Lince_ibérico_(Lynx_pardinus)_Almuradiel,_Ciudad_Real,_España,_2021-12-19,_DD_07.jpg)
- Donoghue, A. M., Johnston, L. A., Seal, U. S., Armstrong, D. L., Tilson, R. L., Wolf, P., Petrini, K., Simmons, L. G., Gross, T. y Wildt, D. E. (1990). “In Vitro Fertilization and Embryo Development in Vitro and in Vivo in the Tiger (*Panthera Tigris*)”. *Biology of Reproduction*. **43**(5), pp. 733–744. Disponible en: DOI: 10.1095/biolreprod43.5.733
- Felmer, R., Arias, M. E. y Muñoz, G. (2007). “Transferencia nuclear de células somáticas (clonación): aplicaciones en producción animal y biotecnología”. *Revista Tierra Adentro*. **77**, pp. 42-45. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.14001/6378>
- Fernández-González, L., Hribal, R., Stagegaard, J., Zahmel, J. y Jewgenow, K., (2015). “Production of lion (*Panthera leo*) blastocysts after in vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection”. *Theriogenology*. **83**(6), pp. 995–999. Disponible en: DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.11.037

García-Perea, R. (1996). "Patterns of postnatal development in skulls of lynxes, genus *Lynx* (Mammalia: Carnivora)". *Journal of Morphology*. **229**(3), pp. 241–254. Disponible en: DOI: 10.1002/(sici)1097-4687(199609)229:3%3C241::aid-jmor1%3E3.0.co;2-1

Goeritz, F., Painer, J., Jewgenow, K., Hermes, R., Rasmussen, K., Dehnhard, M. y Hildebrandt, T. (2012). "Embryo Retrieval after Hormonal Treatment to Control Ovarian Function and Non-surgical Artificial Insemination in African Lions (*Panthera leo*)". *Reproduction in Domestic Animals*. **47**, pp. 156–160. Disponible en: DOI: 10.1111/rda.12026

Gutiérrez, J. M. (2006). Introducción (Taxonomía y características). "Conservación y medicina de felinos salvajes".

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. Disponible en: 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. Disponible en: DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.09.046

Hume, G. (2005). *Puma concolor* - Wikipedia, la enciclopedia libre [imagen]. Disponible en: [https://es.wikipedia.org/wiki/Puma\\_concolor#/media/Archivo:Cougar\\_25.jpg](https://es.wikipedia.org/wiki/Puma_concolor#/media/Archivo:Cougar_25.jpg)

Hun, J. (2018). *Felis silvestris* [imagen]. Disponible en: <https://www.naturalista.mx/photos/40278868>

Krausman, P. R. y Morales, S. M. (2005). "Mammalian Species. *Acinonyx jubatus*". *American Society of Mammalogists*. (771), pp. 1–6. Disponible en: [chrome-extension://efaidnbmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.science.smith.edu/departments/Biology/VHAYSEN/msi/pdf/771\\_Acinonyx\\_jubatus.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.science.smith.edu/departments/Biology/VHAYSEN/msi/pdf/771_Acinonyx_jubatus.pdf)

Kochan, J., Niżański, W., Moreira, N., Cubas, Z. S., Nowak, A., Prochowska, S., Partyka, A., Młodawska, W. y Skotnicki, J. (2019). "ARTs in wild felid conservation programmes in Poland and in the world". *Journal of Veterinary Research*. **63**(3), pp. 457–464. Disponible en: DOI: 10.2478/jvetres-2019-0043

Lombardo, A. (2010). *Panthera pardus* [imagen]. Disponible en: <https://fotoslombardo.blogspot.com/2010/04/el-leopardo-es-uno-de-los-grandes.html>

Madrigal-Valverde, M., Freitas, R. y Ribeiro de Araujo, G. (2021). "Biotecnologías reproductivas en el macho de felinos silvestres: la revisión". *Ciencia y Tecnología*. **14**(2), pp. 57–65. Disponible en: DOI: 10.18779/cyt.v14i2.503

Martínez, E., Ruíz, S., Roca, J. y Vázquez, J. M. (1989). *Fecundación "in vitro" en los animales de granja*. Universidad de Murcia: EDITUM. Vol. 22 Cuadernos series.

Medau, J. C. (2004). *Leopardus pardalis* - Wikipedia, la enciclopedia libre [imagen]. Disponible en: [https://es.wikipedia.org/wiki/Leopardus\\_pardalis#/media/Archivo:Ocelot\(Jaguatirica\)\\_Zoo\\_Itatiba.jpg](https://es.wikipedia.org/wiki/Leopardus_pardalis#/media/Archivo:Ocelot(Jaguatirica)_Zoo_Itatiba.jpg)

Moghe, S. (2003). *Panthera tigris* - Wikipedia, la enciclopedia libre [imagen]. Disponible en: [https://es.wikipedia.org/wiki/Panthera\\_tigris#/media/Archivo:Tigress\\_at\\_Jim\\_Corbett\\_National\\_Park.jpg](https://es.wikipedia.org/wiki/Panthera_tigris#/media/Archivo:Tigress_at_Jim_Corbett_National_Park.jpg)

Navarro, M. (2022). *Estudio del epigenoma y transcriptoma de células madre embrionarias bovinas derivadas a partir de embriones producidos por fecundación in vitro y transferencia nuclear de células somáticas*. Tesis. Universidad Nacional de General San Martín.

Parkinson, J. A., Plummer, T. y Hartstone-Rose, A. (2015). "Characterizing felid tooth marking and gross bone damage patterns using GIS image analysis: An experimental feeding study with large felids". *Journal of Human Evolution*. **80**, pp. 114–134. Disponible en: DOI: 10.1016/j.jhevol.2014.10.011

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

Perovic, P. G. y Herrán, M., (1998). "Distribución del jaguar (*Panthera onca*) en las provincias de Jujuy y Salta, noroeste de Argentina". *Mastozoología Neotropical*. **5**(1), pp. 47-52. Disponible en: ISSN: 0327-9383

Pope, C. E. (2000). "Embryo technology in conservation efforts for endangered felids". *Theriogenology*. **53**(1), pp. 163–174. Disponible en: DOI: 10.1016/s0093-691x(99)00249-6

Pluck, K. (2003). *Panthera leo* - Wikipedia, la enciclopedia libre [imagen]. Disponible en: [https://es.wikipedia.org/wiki/Panthera\\_leo#/media/Archivo:Lion\\_waiting\\_in\\_Namibia.jpg](https://es.wikipedia.org/wiki/Panthera_leo#/media/Archivo:Lion_waiting_in_Namibia.jpg)

- Praxedes, É. A., Borges, A. A., Santos, M. V. O. y Pereira, A. F. (2018). "Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids". *Zoo Biology*. **37**(4), pp. 258–263. Disponible en: DOI: 10.1002/zoo.21416
- Randi, E., Pierpaoli, M., Beaumont, M., Ragni, B. y Sforzi, A. (2001). "Genetic Identification of Wild and Domestic Cats (*Felis silvestris*) and Their Hybrids Using Bayesian Clustering Methods". *Molecular Biology and Evolution*. **18**(9), pp. 1679–1693. Disponible en: DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003956
- Rees, P. A. (2011). *Introduction to Zoo Biology and Management*. Wiley & Sons, Incorporated, John.
- Reutlinger, M. (2004). *Felis serval* [imagen]. Disponible en: <https://www.fotocommunity.de/photo/ein-sonnender-serval-felis-serva-michael-reutlinger/2528187>
- Salamone, D. F., Canel, N. G. y Rodríguez, M. B. (2017). "Intracytoplasmic sperm injection in domestic and wild mammals". *Reproduction*. **154**(6), pp. 111–124. Disponible en: DOI: 10.1530/rep-17-0357
- Schmidt, K., Ratkiewicz, M. y Konopiński, M. K. (2011). "The importance of genetic variability and population differentiation in the Eurasian lynx *Lynx lynx* for conservation, in the context of habitat and climate change". *Mammal Review*. **41**(2), pp. 112–124. Disponible en: DOI: 10.1111/j.1365-2907.2010.00180.x
- Sharp, J. C. (2004). *Panthera onca - Wikipedia, la enciclopedia libre* [imagen]. Disponible en: [https://es.wikipedia.org/wiki/Panthera\\_onca#/media/Archivo:Jaguar\\_\(Panthera\\_onca\\_palustris\)\\_female\\_Piquiri\\_River\\_2.JPG](https://es.wikipedia.org/wiki/Panthera_onca#/media/Archivo:Jaguar_(Panthera_onca_palustris)_female_Piquiri_River_2.JPG)
- Smithers, R. H. N. (1978). "The serval *Felis serval Schreber*". *African Journal for Physical Activity and Health Sciences (AJPHES)*. **26**(2). Disponible en: DOI: 10.37597/ajphes.2020.26.2.4
- Solís, L. (2000). *Técnicas de reproducción asistida. Aspectos bioéticos*. Cuadernos de bioética, **41**, pp. 37-47. Disponible en: ISSN: 1132-1989
- Sosa, R. (2012). *Estudio del comportamiento y junta de tigres (*Panthera tigris*) en el parque zoológico municipal de Córdoba*. Trabajo Fin de Master. Universidad de Córdoba.
- Stein, A. B. y Hayssen, V. (2013). "*Panthera pardus* (Carnivora: Felidae)". *Mammalian Species*. **900**, pp. 30–48. Disponible en: DOI: 10.1644/900.1

Stoops, M. A., Bond, J. B., Bateman, H. L., Campbell, M. K., Levens, G. P., Bowsher, T. R., Ferrell, S. T. y Swanson, W. F. (2007). "Comparison of different sperm cryopreservation procedures on post-thaw quality and heterologous in vitro fertilisation success in the ocelot (*Leopardus pardalis*)". *Reproduction, Fertility and Development*. **19**(5), pp. 685. Disponible en: DOI: 10.1071/rd06078

Temple, J. (2004). *Acinonyx jubatus* - Wikipedia, la enciclopedia libre [imagen]. Disponible en: [https://es.wikipedia.org/wiki/Acinonyx\\_jubatus#/media/Archivo:TheCheethcat.jpg](https://es.wikipedia.org/wiki/Acinonyx_jubatus#/media/Archivo:TheCheethcat.jpg)

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

Thongphakdee, A., Tipkantha, W., Punkong, C. y Chatdarong, K. (2018). "Monitoring and controlling ovarian activity in wild felids". *Theriogenology*. **109**, pp. 14–21. Disponible en: DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.12.010

Umapathy, G., Sontakke, S. D., Srinivasu, K., Kiran, T., Kholkute, S. y Shivaji, S. (2007). "Estrus behavior and fecal steroid profiles in the Asiatic lion (*Panthera leo persica*) during natural and gonadotropin-induced estrus". *Animal Reproduction Science*. **101**(3-4), pp. 313–325. Disponible en: DOI: 10.1016/j.anireprosci.2006.09.014

Urrutia, L.I., Hevia, M. L., Escribano, D. y Navarro, R. (2023). "Enriquecimiento sensorial en grandes felinos en cautividad (Zoológico Terra Natura Murcia)". *Anales de Veterinaria de Murcia*, 37. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.6018/analesvet.545731>

Vargas, A. y Breitenmoser, U. (2009). *Conservación ex situ del lince ibérico: Un enfoque multidisciplinar: Iberian lynx ex situ conservation: an interdisciplinary approach*. Editado por Breitenmoser-Würsten Christine, Fundación Biodiversidad y Iucn/ssc Cat Specialist Group. Madrid: Fundación Biodiversidad

Veraguas, D., Echeverry, D., Castro, F. O. y Rodriguez-Alvarez, L. (2017). "Applied Biotechnologies in the Conservation of Wild Felids: In Vitro Embryo Production and Cellular Regenerative Therapies". *Big Cats*. InTech. Disponible en: DOI: 10.5772/intechopen.71311

Verma, R. (2017). *Using assisted reproductive technologies for the conservation of endangered wild cats.* Tesis. Monash University. Disponible en: DOI: <https://doi.org/10.4225/03/58b4f3733e767>

West, G., Heard, D. y Caulkett, N., eds. (2014). *Zoo Animal and Wildlife Immobilization and Anesthesia*. Ames, USA: John Wiley & Sons, Inc. Disponible en: DOI: 10.1002/9781118792919

Wildt, D. E. y Roth, T. L. (1997). "Assisted reproduction for managing and conserving threatened felids". *International Zoo Yearbook*. 35(1), pp. 164–172. Disponible en: DOI: 10.1111/j.1748-1090.1997.tb01207.x

Wilwedding, L. D. y Evans, L. E. (1994). *Assisted Reproduction in Captive Wild Felids*. 56: Iss. 2, Artículo 12. Disponible en: [https://lib.dr.iastate.edu/iowastate\\_veterinarian/vol56/iss2/12brought](https://lib.dr.iastate.edu/iowastate_veterinarian/vol56/iss2/12brought)

Yamaguchi, N., Cooper, A., Werdelin, L. y Macdonald, D. W. (2004). "Evolution of the mane and group-living in the lion (*Panthera leo*): a review". *Journal of Zoology*. 263(4), pp. 329–342. Disponible en: DOI: 10.1017/s0952836904005242