

POTENCIAL DE TÉCNICAS REPRODUCTIVAS PARA LA CONSERVACIÓN DEL JAGUAR

Ronaldo G. Morato y R.C. Barnabe

ABSTRACT. Considering that genetic variability maintenance is dependent on reproduction, assisted reproduction techniques are important tools for the preservation of endangered species. Semen collection, evaluation and cryopreservation, endocrine status, artificial insemination, oocyte recovery and "in vitro" maturation and *in vitro* fertilization are discussed. The preliminary results and the potential application of the assisted reproduction techniques for jaguar conservation are presented here.

RESUMO. Considerando que a manutenção da diversidade genética é dependente da reprodução, a aplicação de técnicas de reprodução assistida é uma importante ferramenta na preservação de espécies selvagens ameaçadas de extinção. Colheita, avaliação e criopreservação de sêmen, monitoramento da função endócrina, inseminação artificial, colheita e maturação de oócitos *in vitro* e fecundação *in vitro* são discutidos. Resultados preliminares e o uso potencial das técnicas de reprodução assistida na preservação da onça pintada são aqui apresentados.

RESUMEN. Considerando que el mantenimiento de la variabilidad genética depende de la reproducción, las técnicas de reproducción asistida son herramientas importantes para la conservación de especies en peligro de extinción. En este trabajo se discuten la colecta, evaluación y criopreservación de semen, el estado endocrino, la inseminación artificial, la recuperación y maduración *in vitro* de oocitos, y la fertilización *in vitro*. Se presentan aquí los resultados preliminares y la aplicación potencial de las técnicas de reproducción asistida para la conservación del jaguar.

INTRODUCCIÓN

El jaguar (*Panthera onca*), el gato más grande del continente americano, habita diferentes regiones desde el norte de México hasta Argentina (Oliveira, 1994).

PALABRAS CLAVE: Jaguar, reproducción *in vitro*, cautiverio, conservación, criopreservación.

Sin embargo, el número de animales en condición silvestre ha disminuido debido a una variedad de factores. El principal de ellos es la pérdida y fragmentación del hábitat, lo que ha llevado a la reducción de las poblaciones a niveles críticos que pueden conducir a la pérdida de la diversidad genética, cuyas consecuencias han sido bien documentadas por muchos autores (Barone *et al.*, 1994a; O'Brien *et al.*, 1985; O'Brien *et al.*, 1986; O'Brien y Evermann, 1988; Ralls *et al.*, 1979; Roelke *et al.*, 1993).

Se ha reportado que las poblaciones cautivas de jaguar son en su mayoría genéricas en los zoológicos brasileños (Morato y Gasparini, 1994) y estadounidenses (registro de control genético de jaguar), lo que disminuye el uso potencial de los zoológicos como fuentes genéticas.

Considerando la importancia de mantener la diversidad genética, la reproducción de jaguares en estado silvestre y cautivos de origen conocido debe convertirse en un componente integral de los esfuerzos de preservación.

Las tecnologías reproductivas asistidas, como la inseminación artificial (IA), la fertilización *in vitro* (FIV) y la transferencia de embriones (TE), pueden ser vistas como herramientas importantes para salvaguardar al jaguar; esto con base en sus aplicaciones altamente exitosas en el ganado doméstico, en el ser humano (Wildt *et al.*, 1993) y en el progreso reciente obtenido en especies de gatos salvajes.

La Organización Mundial de Zoológicos y el Grupo de Especialistas en Reproducción en Cautiverio de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza consideran las técnicas de reproducción artificial como herramientas útiles para el manejo de poblaciones porque pueden 1) simplificar el intercambio genético entre dos o más sitios de programas *ex situ*; 2) permitir la reproducción de animales con desventajas físicas o en su comportamiento reproductivo; 3) hacer posible el crecimiento rápido de las poblaciones; 4) ayudar a corregir proporciones sexuales disparejas; 5) ayudar a regular el número de crías por individuo, y 6) hacer posible el intercambio de material genético entre poblaciones *in situ* y *ex situ*.

En años recientes, se han producido crías utilizando IA en los chitas (*Acinonyx jubatus*, Howard *et al.*, 1992), la pantera nebulosa (*Neofelis nebulosa*; Howard *et al.*, 1996), el tigre (*Panthera tigris*, Donoghue *et al.*, 1993), el gato leopardo (*Prionailurus bengalensis*, Wildt *et al.*, 1992), el puma (*Puma concolor*; Barone *et al.*, 1994b) y el ocelote (*Leopardus pardalis*, Swanson *et al.*, 1996), y el uso de FIV y TE han producido crías en el tigre Donoghue *et al.*, 1990) y en el gato del desierto indio (*Felis silvestris*, Pope *et al.*, 1989). Sin embargo, un régimen de reproducción asistida que funciona para una especie puede fallar con otra debido a características fisiológicas específicas que existen incluso entre es-

pecies cercanamente relacionadas dentro de la misma familia y género (Wildt *et al.*, 1992).

Aquí describimos el avance de las técnicas de reproducción que han sido utilizadas en varias especies de gatos y su aplicación actual y potencial para la conservación del jaguar.

MÉTODOS

Colecta de semen, evaluación y criopreservación

La colecta de semen se ha realizado en 28 especies de gatos (Howard *et al.*, 1984) utilizando el protocolo estándar desarrollado por Wildt *et al.* (1983), que consiste en la aplicación de 80 estímulos divididos en 3 series de la siguiente manera: 30 estímulos (10 estímulos en 2, 3 y 4V: serie 1), 30 estímulos (10 estímulos a 3, 4 y 5V: serie 2) y 20 estímulos (10 estímulos a 5 y 6V: serie 3).

El procedimiento de colección de semen se hace en animales anestesiados. Para esta investigación, fue utilizada una combinación de tiletamina-zolazepam en una proporción de 10 mg/kg (Morato, 1997). Debe evitarse el uso de algunas drogas porque pueden interferir con la electroeyaculación induciendo la contaminación con orina (p. ej. acepromazina; Martin, 1978) o disminuyendo el volumen total en la eyaculación (p. ej. atropina; Platz y Seager, 1978). También puede haber contaminación con orina cuando el voltaje excede el máximo necesario para la electro-eyaculación o cuando la sonda está desplazada hacia el cráneo (Howard, 1993).

Se utilizó una sonda de 29×2.3 cm (Morato *et al.*, 1998) y el electroeyaculador es el mismo que se usa para bovinos.

El volumen total y el pH de cada muestra de semen fueron evaluados al momento de la colecta. La movilidad estimada (0-100%) y la tasa de progresión (estado 0-5) se basan en observaciones de cuatro campos microscópicos por separado magnificados a 100x. La concentración de espermatozoides se determinó con un hemacitómetro de Neubauer, para lo cual se diluyó 1:3 una alícuota del semen colectado. La evaluación morfológica de 200 células espermáticas individuales se llevó a cabo con un microscopio de contraste de fases (1000x; Howard, 1993; Morato *et al.*, 1998; Wildt *et al.*, 1993). El resultado de las evaluaciones de 54 colecciones de semen de jaguares cautivos se presenta en el cuadro 1.

Desde 1995 hemos colectado y evaluado el semen de 3 jaguares libres, capturados para estudios de radioteleetría. Los resultados para cada animal se muestran en el cuadro 2.

Cuadro 1. Características del semen colectado de jaguares en cautiverio
(promedio \pm DE) en los zoológicos de São Paulo y de Sorocaba,
de julio de 1995 a julio de 1996

<i>Parámetro</i>	<i>Promedio \pm DE</i>
Volumen(ml)	7,42 \pm 3,69
Concentración de espermatozoides (10 ⁶ /ml)	6,20 \pm 3,03
Movilidad (%)	62,60 \pm 11,00
Estado (0-5)	2,71 \pm 0,52
Normal (%)	46,70 \pm 5,80
Anormal	
Primario	
Macrocefálico (%)	0,50 \pm 0,89
Microcefálico (%)	1,30 \pm 1,25
Bicefálico (%)	1,00 \pm 1,58
Cabezas de forma angosta (%)	18,40 \pm 6,49
Cabeza redonda (%)	1,60 \pm 1,23
Acrosoma anormal (%)	3,60 \pm 2,00
Acrosoma en forma de botón (%)	1,80 \pm 1,40
Porción media anormal (%)	1,50 \pm 1,36
Sin porción media (%)	0,20 \pm 0,42
Cola apretadamente enrollada (%)	4,70 \pm 3,20
Biflagelado (%)	0,50 \pm 0,97
Secundario	
Porción media doblada sin gotita (%)	2,95 \pm 1,90
Porción media doblada con gotita (%)	2,90 \pm 2,40
Cola doblada sin gotita (%)	4,30 \pm 2,42
Cola doblada con gotita (%)	1,95 \pm 1,80
Gotita proximal (%)	2,95 \pm 2,32
Gotita distal (%)	2,40 \pm 2,47
Cuello doblado (%)	0,75 \pm 1,00

La criopreservación de las muestras de semen se ha hecho utilizando el protocolo estándar para especies de gatos descrito por Platz y Seager (1978). En breve, después de diluir el espermatozoides con el medio de Ham F10 la mezcla se centrifuga a 300 g por 10 min., el sobrenadante se remueve y el botón de espermatozoides se resuspende con PDV, un criodiluyente de semen (20% de yema de huevo, 11% de lactosa, 4% glicerol). Después, el espermatozoides se transfiere a tubos (0.25 ml) que son colocados en refrigeración (4-7° C) por 30 min. Posteriormente son congelados en vapor de N₂ y luego sumergidos en N₂ líquido para su almacenamiento.

La evaluación del semen descongelado ha demostrado su calidad pobre con 30% de motilidad y estado promedio dos para los jaguares cautivos y libres.

Cuadro 2. Características del semen de jaguares de vida libre capturados en Brasil de 1995 a 1998 para realizar estudios de radiotelemetría

	<i>Macho 1</i>	<i>Macho 2</i>	<i>Macho 3</i>
Número de colectas	1	1	1
Edad estimada (años)	10	4	2.5
Volumen eyaculado (ml)	65	5.0	2.2
Conteos totales de espermatozoides ($\times 10^6$ ml)	283	442	17
Movilidad de los espermatozoides (%)	86	60	86
Estado (0-5)	4	3	3-4
Espermatozoides anormales (%)	28	41	36
Volumen testicular (cm^3)	63.8	59.7	54.5

Otros procedimientos para comprobar el funcionamiento del esperma son el homólogo (gato) o el hámster heterólogo de zona-libre (Howard, 1993) y el ensayo de penetración de óvulos bovinos (Nelson *et al.*, 1999). Nuestros datos hasta el momento, revelan una tasa de penetración para el esperma de jaguar descongelado de 27% (Paz, com. pers.). Estos ensayos también son efectivos para estudiar factores que influyen en la FIV (Howard, 1993). Paz (com. pers.) ha demostrado que la tasa óptima para la penetración de óvulos por espermatozoides de jaguar se logra después de 30 min de pre-incubación a temperatura ambiente y 3 h de co-incubación (5% CO_2 a 38° C). Los oocitos de gato doméstico pueden ser utilizados para estimar la capacidad de los espermatozoides para ligarse a la zona pelúcida y para penetrarla (Howard, 1993). La combinación de ensayos de hámster de zona libre o de bovinos y el ensayo de zona intacta de gato, puede ser útil para analizar tres estados críticos de las interacciones espermatozoide-óvulo: ligamiento a la zona pelúcida, penetración de la misma y descondensación del núcleo del espermatozoide dentro del vitelo (Howard, 1993; Howard *et al.*, 1991).

Monitoreo de la función testicular y de los ovarios

Es importante entender la fisiología reproductiva básica para hacer un manejo eficaz de especies cautivas y libres (Lasley y Kirkpatrick, 1991). En animales domésticos, tales estudios pueden ser realizados con colectas de muestras de sangre y mediciones de los niveles de las hormonas esteroideas en el suero por medio de ensayos radioinmunes. Sin embargo, para especies como el jaguar, la colecta de muestras de sangre en serie puede ser estresante y cara, ya que es necesaria una inmovilización con métodos químicos. El estrés puede alterar la producción las de

hormonas cuyos niveles se registran (Loskutoff *et al.*, 1982). Aún más, las gonadotropinas y las hormonas esteroideas sexuales son liberadas en ondas por pulsos, produciendo variaciones en los niveles del suero durante el día (Reichlin, 1992).

Un método alternativo para vigilar el estado de las hormonas reproductivas es la colecta de orina y heces fecales. Esto usualmente puede lograrse sin contener o capturar los animales. El análisis de metabolitos de esteroides sexuales de orina o heces ha sido útil para determinar el estado reproductivo en muchas especies (Lasley y Kirkpatrick, 1991). Sin embargo, la aplicación de esta técnica requiere de estudios adicionales para entender el metabolismo y la excreción de hormonas esteroideas en la familia, el género y la especie de interés. Utilizando al gato doméstico como modelo para la familia Felidae, Shille *et al.* (1990) observaron que > 90% de los metabolitos esteroideos son excretados en las heces. Después de esto, Brown *et al.* (1994) fueron capaces de cuantificar los metabolitos de estradiol y progesterona en gatos no domésticos. En 1996, Brown *et al.* extrajeron y midieron testosterona en gatos domésticos y en el gato de Pallas (*Felis manul*), demostrando la utilidad de esta técnica para estudios longitudinales de la función reproductiva de los machos.

Actualmente estamos colectando muestras fecales de machos y hembras de jaguar en cautiverio en los zoológicos de São Paulo, Sorocaba, Campinas y Río de Janeiro, y de animales en libertad en los parques estatales Porto Primavera y Morro do Diabo con objeto de 1) estudiar el ciclo del estro en animales en cautiverio y en libertad; 2) estudiar la función testicular en jaguares cautivos y libres; 3) analizar la influencia de las estaciones en la actividad reproductiva en jaguares machos y hembras, cautivos y en libertad; 4) analizar la relación entre el comportamiento sexual y los perfiles hormonales en los jaguares macho y hembra, y 5) diagnosticar las fallas testiculares y de ovarios.

Recuperación de oocitos, maduración in vitro, FIV y transferencia de embriones

La recuperación de oocitos se basa en dos técnicas: 1) colecta post mortem o después de la ovariectomía, y 2) aspiración de folículos vía laparoscopia.

En el primer caso, los oocitos de ovarios pueden ser recuperados después de 36 h a partir de ovarios almacenados *ex situ* en un medio fisiológico (Johnston *et al.*, 1991). Anteriormente, Johnston *et al.* (1989) reportaron que los oocitos foliculares de gatos pueden madurar a la metafase II cuando son recuperados de 24 a 32 h después del almacenamiento original.

En el segundo caso, previo a la laparoscopia se aplica un tratamiento exógeno de gonadotropinas para inducir la actividad de los ovarios. Un tratamiento

Cuadro 3. Resultados preliminares de la estimulación de los ovarios en las hembras de jaguar tratadas con 50_{UI} FSH seguido de 25_{UI} LH, por vía intramuscular

Mes	Núm. hembras superovuladas/ núm. de hembras tratadas	Núm. total de folículos ³ de 2 mm de diámetro
Mayo	2/2 (100%)	29*
Agosto	1/1 (100%)	18
Noviembre	1/1 (100%)	29

* Resultados para tres ovarios visualizados.

con gonadotropina coriónica de equinos (GCE) seguido por gonadotropina coriónica de humanos (GCH) ha tenido éxito en tigres (Donoghue *et al.*, 1990), chitas (Howard *et al.*, 1992), panteras nebulosas (Howard *et al.*, 1996), pumas (Barone *et al.*, 1994b) y ocelotes (Swanson *et al.*, 1996). Sin embargo, tratamientos múltiples con GCE/GCH pueden disminuir progresivamente la sensibilidad de los ovarios debido a la formación de inmunoglobulinas que las neutralizan (Swanson *et al.*, 1995). Recientemente, Amanda Miller, en el Instituto Eplley (Centro Médico de la Universidad de Nebraska), encontró que las gonadotropinas de tigre (FSH y LH) parecen ser homólogas a las gonadotropinas porcinas (no publicado). Esta información proporcionó un nuevo protocolo de tratamiento para tigres, utilizando FSH (FSHP) y LH (LHP) de puercos, lo que permitió estimulaciones repetidas cada 100 días para la recuperación de oocitos maduros (N. Loskutoff, com. pers.). Con base en los resultados de la estimulación de ovarios en tigres, empezamos un estudio en colaboración con el Zoológico de Henry Doorly, la Asociación Pro-Carnívoros/Centro Nacional de Predadores (CENAP)/Instituto Brasileiro de Meio Ambiente (IBAMA) y el Departamento de Reproducción/FMVZ/USP utilizando FSHP y LHP para la estimulación de ovarios en el jaguar. Los resultados preliminares se muestran en el cuadro 3.

De los oocitos recuperados, 17 (61%) fueron clasificados como buenos, 6 (21%) como satisfactorios, y 4 (14%) como pobres (véase Pope *et al.*, 1997). Uno de ellos (4%) había degenerado.

La investigación que se está realizando permitirá acumular datos suficientes para hacer recomendaciones sobre el uso de FSHP y LHP en los jaguares, incluyendo dosis y tiempo de administración.

La FIV ha sido exitosa para muchas especies de gatos; sin embargo, por el momento no hemos sido capaces de producir embriones por FIV para los jaguares. Hemos considerado la baja calidad del semen y el momento de la recuperación del oocito como factores limitantes. Este año se realizarán nuevos ensayos y nuestros objetivos son analizar diferentes tiempos para la recuperación de los oocitos

y probar diferentes protocolos para la criopreservación del semen. Otro paso es la producción de crías una vez que barreras como la técnica de criopreservación de embriones y el tiempo de la transferencia del embrión sean superadas, y lograr con ello el éxito completo de la técnica de FIV.

CONCLUSIONES

Las técnicas de reproducción asistida han sido exitosas para muchas especies de gatos. Para los jaguares estamos colectando y evaluando semen exitosamente utilizando protocolos estándares. También estamos probando un nuevo protocolo de congelación de semen de jaguar, pues hemos observado que el protocolo de congelación utilizado para muchas especies de gatos no es el óptimo para este caso. Conforme se acumulen los datos sobre la fisiología básica del jaguar y los resultados de la estimulación de los ovarios y resucitación de los oocitos, estaremos en condiciones de escoger el mejor momento para los procedimientos de reproducción artificial como IA, FIV y TE. Aunque el tratamiento de pFSH y PLH ha inducido exitosamente la estimulación de los ovarios en jaguares, los resultados han sido variables y todavía no estamos en condiciones de recomendar este protocolo, incluso considerando el alto porcentaje de oocitos de buena calidad así recuperados. La producción de embriones por FIV continúa siendo un reto para nuestro equipo. Con base en los resultados exitosos utilizando las técnicas de reproducción asistida para muchas especies de gatos, creemos que IA, FIV y TE pueden ser herramientas muy importantes para la preservación del jaguar. Para mejorar los resultados e incrementar el entendimiento de la reproducción, los trabajos en colaboración serán muy importantes.

AGRADECIMIENTOS

Esta es una publicación de la Asociación Pro-Carnívoros/CENAP/IBAMA (núm. 6). Reconocemos y agradecemos a Elizabeth Crichton, Naida Loskutoff y Douglas Armstrong su asesoría y asistencia. Este trabajo fue apoyado por la Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, núm. 97/ 02051-7 y núm. 97/9160-0), el Zoológico Henry Doorly de Nebraska, y Companhia Energética de São Paulo (CESP).

LITERATURA CITADA

- BARONE, M.A., M.E. ROELKE, J.G. HOWARD, J.L. BROWN, A.E. ANDERSON y D.E. WILDT. 1994a. Reproductive characteristics of male Florida panthers; comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America, and North American zoos. *Journal of Mammalogy*, 75: 50-162.
- , D.E. WILDT, A.P. BYERS, M.E. ROELKE, C.M. GLASS y J.G. HOWARD. 1994b. Gonadotrophin dose and timing of anaesthesia for laparoscopic artificial insemination in the puma (*Felis concolor*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 101: 103-108.
- BROWN, J.L., S.K. WASSER, D.E. WILDT y L.H. GRAHAM, 1994. Comparative aspects of steroid hormone metabolism and ovarian activity in felids, measured noninvasively in feces. *Biology of Reproduction*, 51: 776-786.
- , K.A. TERIO y L.H. GRAHAM. 1996. Fecal androgen metabolite analysis for non invasive monitoring of testicular steroidogenic activity in felids. *Zoo Biology*, 15: 425-434.
- DONOGHUE, A.M., L.A. JOHNSTON, U.S. SEAL, D.L. ARMSTRONG, R.L. TILSON, P. WOLF, K. PETRINI, L.G. SIMMONS, T. GROSS y D.E. WILDT. 1990. In vitro fertilization and embryo development in vitro and in vivo in the tiger (*Panthera tigris*). *Biology of Reproduction*, 43: 733-743.
- , L.A. JOHNSTON, D.L. ARMSTRONG, L.G. SIMMONS y D.E. WILDT. 1993. Birth of a siberian tiger cub (*Panthera tigris altaica*) following laparoscopic intrauterine artificial insemination. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 24: 185-189.
- HOWARD, J.G., M. BUSH, L.L. HALL y D.E. WILDT. 1984. Morphological abnormalities in spermatozoa of 28 species of non-domestic felids. 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.
- , M. BUSH y D.E. WILDT. 1991. Teratospermia in domestic cats compromises penetration of zona-free hamster ova and cat zonae pellucidae. *Journal of Andrology*, 12: 36-45.
- , A.M. DONOGHUE, M.A. BARONE, K.L. GOODROWE, E. BLUMER, K. SNODGRASS, D. STARNES, M. TUCKER, M. BUSH y D.E. WILDT. 1992. Successful induction of ovarian activity and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the cheetah (*Acinonyx jubatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 23: 288-300.
- , A.P. BYERS, J.L. BROWN, S.J. BARRET, M.Z. EVANS, R.J. SCHWARTZ y D.E. WILDT. 1996. Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). *Zoo Biology*, 15: 55-70.
- . 1993. Semen collection and analysis in carnivores. Pp. 390-398, *in* *Zoo and Wildlife Medicine* (M. E. Fowler, ed). W. B. Saunders, Philadelphia, EUA.
- JOHNSTON, L.A., S.J. O'BRIEN y D.E. WILDT. 1989. In vitro maturation and fertilization of domestic cat follicular oocytes. *Gamete Research*, 24: 343-356.
- , A.M. DONOGHUE, S.J. O'BRIEN y D.E. WILDT. 1991. Rescue and maturation in vitro of follicular oocytes collected from nondomestic felid species. *Biology of Reproduction*, 45: 898-906.

- LASLEY, B.L. y J.F. KIRKPATRICK. 1991. Monitoring ovarian function in captive and free-ranging wildlife by means of urinary and fecal steroids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 22: 23-31.
- LOSKUTOFF, N.M., J.E. OTT, y B.L. LASLEY. 1982. Urinary steroid evaluation to monitor ovarian function in exotic ungulates. I. Pregnanediol3glucuronide immunoreactivity in okapi (*Okapia johnstoni*). *Zoo Biology*, 1: 45-53.
- MARTIN, I.C.A. 1978. The principles and practice of electroejaculation of mammals. Symposium of Zoological Society of London, 43: 127-52.
- MORATO, R.G. y R.L. GASPARINI. 1994. Levantamento preliminar sobre a situação da onça-pintada (*Panthera onca*) em cativeiro: XVIII Congresso da Sociedade de Zoológicos do Brasil.
- . 1997. Reprodução em onça pintada *Panthera onca* (Linnaeus, 1758): avaliação do método para contenção e para obtenção de sêmen, caracterização do ejaculado, biometria testicular, níveis séricos de testosterona e sazonalidade. Tesis de Maestria, Universidad de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- , M.A.B.V. GUIMARÃES, A.L.V. NUNES, A.C. CARCIOFI, F. FERREIRA, V.H. BARNABE, y R.C. BARNABE. 1998. Semen collection and evaluation in the jaguar. *Brazilian Journal of Veterinary and Research and Animal Science*, 35: 30-34.
- NELSON, K.L., E.G. CRICHTON, L. DOTY, D.E. VOLENEC, R.G. MORATO, C.E. POPE, B.L. DRESSER, C.S. BROWN, D.L. ARMSTRONG y N.M. LOSKUTOFF. 1999. Heterologous and homologous fertilizing capacity of cryopreserved felid sperm: a model for endangered species. *Theriogenology*, 51: 290.
- O'BRIEN, S.J., M.E. ROELKE, L. MARKER, A. NEWMAN, C.A. WINKLER, L. MELTZER, L. COLLY, J.F. EVERMANN, M. BUSH y D.E. WILDT. 1985. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science*, 227: 1428-1434.
- , D.E. WILDT y M. BUSH. 1986. The cheetah in genetic peril. *Scientific American*, 254: 84-92.
- y J.F. EVERMANN. 1988. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 3: 254-259.
- OLIVEIRA, T.G. 1994. Cats: ecological and conservation. Edufma, São Luís, Brasil.
- PLATZ JR., C.C. y W.J. SEAGER. 1978. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 173:1353-1355.
- POPE C.E., E.J. GELWICKS, K.B. WACHS, G.L. KELLER, E.J. MARUSKA y B.L. DRESSER. 1989. Successful interspecies transfer of embryos from the indian desert cat (*Felis silvestris*) to the domestic cat (*Felis catus*) following in vitro fertilization. *Biology of Reproduction*, suppl. 40.
- , M.A. MCRAE, B.L. PLAIR, G.L. KELLER y B.L. DRESSER. 1997. In vitro and in vivo development of embryos produced by in vitro maturation and in vitro fertilization of cat oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 51: 69-72.
- RALLS, K., K. BRUGGER y J. BALLOU. 1979. Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. *Science*, 206: 1101-1103.

- REICHLIN, S. 1992. Neuroendocrinology: hypothalamus and pituitary. Pp.135-193, *in* Textbook of endocrinology (J. D. Wilson y D. W. Foster, eds.). W. B. Saunders, Philadelphia, EUA.
- ROELKE, M.E., J.S. MARTENSON y S.J. O'BRIEN. 1993. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. *Current Biology*, 3: 340-350.
- SHILLE, V.M., M.A. HAGGERTY, C. SHACKLETON y B.L. LASLEY. 1990. Metabolites of estradiol in serum, bile, intestine and feces of the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 34: 779-794.
- SWANSON, W.F., D.W. HOROHOV y R.A. GODKE. 1995. Production of exogenous gonadotrophin-neutralizing immunoglobulins in cats after repeated eCG-hCG treatment and relevance for assisted reproduction in felids. *Journal of Reproduction and Fertility*, 105: 35-41.
- , J.G. HOWARD, T.L. ROTH, J.L. BROWN, T. ALVARADO, M. BURTON, D. STARNES y D.E. WILDT. 1996. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 106: 87-94.
- WILDT, D.E., M. BUSH, J.G. HOWARD, S.J. O'BRIEN, D. MELTZER, A. VAN DYK, H. EBEDDES y D.J. BRAND. 1983. Unique seminal quality in the South African cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biology of Reproduction*, 29: 1019-1025.
- , S.L. MONFORT, A.M. DONOGHUE, L.A. JOHNSTON y J.G. HOWARD, 1992. Embryogenesis in conservation biology—or how to make an endangered species embryo. *Theriogenology*, 37: 161-184.
- , U.S. SEAL y W.F. RALL. 1993. Genetic resource banks and reproductive technology for wildlife conservation. Pp.159-173, *in* Genetic conservation of salmonid fishes. (J.G. Cloud y G.H. Thorgaard, eds.). Plenum Press, New York, EUA.