



Universidad Autónoma del Estado de México
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Artículo especializado de revisión para publicar en revista indizada:

**“Las técnicas de reproducción asistida como herramientas para la
conservación de *Panthera onca*”**

Que para obtener el Título de Licenciada en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Presenta:

PMVZ. María de la Luz Bernal Sánchez



Asesores:

D. en F. Sergio Recillas Morales

MVZ. EPO. Bulmaro Valdés Ramírez

Octubre 2018

ÍNDICE

1. Introducción.....	3
2.- Justificación	5
3.- Objetivo General	6
4. Revisión de literatura.....	7
4.1 Antecedentes.....	7
4.2. Técnicas de Reproducción Asistida usadas en la actualidad.....	7
4.3. Las técnicas de reproducción asistida empleadas en la veterinaria y la zootecnia ...	8
4.4. Las Técnicas de Reproducción asistida empleadas en los felinos.....	9
5. Material y Método.....	11
Inclusión	12
Elección	12
Selección.....	12
Identificación.....	12
Estrategia PICOS para la elaboración de la pregunta de investigación[36]	13
5.1.- Límite de espacio	14
5.2.- Límite de Tiempo.....	16
5.3. Resultados	17
6. - Discusión.....	29
7. – Referencias.....	33

1. Introducción

En la actualidad la temática de la conservación tiene relevancia en todos los ámbitos de la medicina veterinaria, principalmente por el hecho ineludible de que las actividades humanas continúan consumiendo los recursos naturales y esta situación afecta de manera importante ecosistema, poniendo en peligro la vida y supervivencia de ejemplares de alto valor económico y genético, como ejemplo, tiene importancia por la parte microbiológica, de reproducción, de zootecnia, de economía, y sobre todo de medicina de la conservación.

Diversas técnicas han sido estudiadas, ejecutadas y evaluadas para permitir la procreación de ejemplares, tanto domésticos como de fauna silvestre cuando se tienen condiciones que limitan y se convierten en adversidades para que la reproducción animal sea llevada a cabo de forma natural y que por lo tanto dificultan la conservación de las especies.

Todas las técnicas de reproducción asistida con las cuales se puede llevar a cabo hoy de forma segura la reproducción y perpetuación de los ejemplares garantizan en un porcentaje mayor o menor el éxito de la tarea de conservación; con ello se visualiza un camino prometedor para frenar la extinción de especies de animales que en la actualidad se encuentran en amenaza o riesgo de desaparecer.

Es por ello que, en este trabajo de investigación se revisan y analizan las técnicas de reproducción asistida, tradicionales y de última generación, con la finalidad de determinar si con dichas técnicas es posible conservar una especie que en América latina y en México, de acuerdo con la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) [1], se encuentra clasificada como en peligro de extinción desde el año 2002, el jaguar mexicano (*Panthera onca*)[2].

La Lista Roja de la UICN [1] es empleada como indicador científico para la formulación de políticas y programas gubernamentales de conservación de este ejemplar, sin embargo es importante destacar que su conservación puede ser desarrollada desde dos vertientes principales; es decir, se puede realizar una conservación *in situ* (también denominada conservación *in vivo*) y una conservación *ex situ* (que puede ser *in vivo* o *in vitro*).

La conservación *in situ*: hace referencia a la conservación a través de su uso continuo en el entorno en los que ahora se encuentra y se reproduce.

Conservación *ex situ in vivo*: hace referencia a la conservación mediante el mantenimiento de poblaciones de animales vivos que no se hallan en condiciones normales de manejo (p. ej., parques zoológicos y en algunos casos granjas del

gobierno o privadas) y/o fuera del área en la que evolucionaron o en la que ahora se hallan normalmente [3].

Conservación *ex situ in vitro*: hace referencia a la conservación externa al animal vivo en un entorno artificial, en condiciones criogénicas que incluyen, entre otras, la criopreservación de embriones, semen, ovocitos, células somáticas o tejidos que poseen el potencial de reconstituir animales vivos a futuro [4].

2.- Justificación

Derivado de la actual preocupación de instituciones públicas, privadas y sociales, tanto del ámbito gubernamental, empresarial como educativo; se han realizado inversiones de dinero, tiempo y búsqueda científica, con la finalidad de aminorar el impacto negativo que tienen las actividades humanas en la supervivencia de ejemplares de flora y fauna silvestre.

Todas esas inversiones han generado resultados importantes en cuanto a conservación se refiere, permitiendo a los estudiosos y a la sociedad proponer que la extinción de los ejemplares es una cuestión que puede ser encarada, siempre y cuando se lleve a cabo una reproducción adecuada de esos ejemplares, además de la participación social y la reestructuración y protección del territorio donde habitan.

Con base en la premisa expuesta anteriormente y a partir de los avances en cuestiones de reproducción asistida que se tienen hasta el día de hoy, gracias a las áreas de investigación como lo son la nanotecnología, la microbiología y la reproducción y crianza asistida, es que toma relevancia esta investigación, igualmente existen puntos que deben ser analizados a detalle con la finalidad de comprender y determinar si las técnicas de reproducción asistida son la herramienta para contrarrestar la disminución del número de ejemplares silvestres en vida libre y mantener los ejemplares que se tienen en cautiverio hoy día.

Este estudio es relevante porque realiza una revisión histórica desde el origen de las técnicas de reproducción asistida hasta las empleadas en el actual siglo XXI, describiendo la forma en como las técnicas de reproducción asistida eran y son llevadas a cabo, los métodos de ejecución y los niveles de éxito que estas tienen.

Así mismo, esta investigación es relevante porque al retomar la información generada en diversas investigaciones acerca de las técnicas de reproducción asistida empleadas en la actualidad en animales de producción, animales de compañía y seres humanos, se demuestra la viabilidad y efectividad que han tenido esas técnicas y su éxito al ser aplicadas a los animales de fauna silvestre; permitiendo conservar así especies animales que están amenazadas o en peligro de extinción como es el caso de la *Panthera onca*; ejemplar que tiene relevancia por ser originario de América Latina, ejemplar representativo e identitario de las culturas en México y como especie que promueve la biodiversidad de plantas y animales en el territorio donde habita.

3.- Objetivo General

Describir las técnicas de reproducción asistida que son utilizadas como herramientas para la conservación de la especie *Panthera onca* actualmente clasificada en peligro de extinción

3.1. Objetivos Específicos

- Describir el origen de las técnicas de reproducción asistida
- Describir las técnicas de reproducción asistida usadas en los seres humanos como ejemplo de uso de herramientas biotecnológicas en reproducción.
- Describir las técnicas de reproducción asistida usadas en animales de compañía y de producción pecuaria
- Describir los resultados obtenidos en las investigaciones científicas sobre la aplicación de las técnicas de reproducción asistida
- Analizar y describir la utilidad de las técnicas de reproducción asistida (inseminación artificial, criopreservación, congelación y vitrificación de embriones, inyección Intracitoplasmática de espermatozoides, cultivo a blastocisto, cocultivo, eclosión asistida, gestación por sustitución, etc.) como herramientas para la conservación del jaguar mexicano (*Panthera onca*)

4. Revisión de literatura

4.1 Antecedentes

Hasta el día de hoy el origen de las técnicas de reproducción asistida sigue siendo un tema de amplia discusión por diversos investigadores, sin embargo, se sabe que tuvo su origen aproximadamente en el año 1300 d.C. en la Arabia antigua y se cree que la primera forma de reproducción asistida que se practicó fue la inseminación artificial [5].

Con el paso del tiempo estas formas de reproducción “no natural” se fueron extendiendo y replicando teniendo como modelos de experimentación animales de casa. Primero en Italia en 1782 L. Spallanzani y en Reino Unido 1884 y 1887 Everett Milais procedieron a inseminar unas perras obteniendo cachorros sanos y saludables, y fue en 1897 que Walter Heape escribió acerca de la inseminación artificial y concluyó que el resultado en concepciones era tan exitoso como en las montas naturales [5].

Posteriormente en 1900 científicos de Rusia traspolaron esta técnica en animales de granja y se realizó con éxito en caballos, bovinos y ovinos [5] situación que permitió que en los 90's muchos científicos, empresarios y asociaciones ganaderas en los Estados Unidos de Norteamérica emplearan esta técnica para conseguir un considerable incremento del número de animales que conformaban los hatos; consiguiendo una aceptación masiva por parte de la sociedad [6].

4.2. Técnicas de Reproducción Asistida usadas en la actualidad

De manera simplificada es posible decir que se denominan técnicas de reproducción asistida (TRA) a todas aquellas técnicas mediante las cuales se trata de aproximar en forma artificial a los gametos femeninos (óvulos) y masculinos (espermatozoides) con el objeto de favorecer la preñez [7].

Diversos autores expresan que el uso de técnicas de reproducción asistida no es para nada moderno ni reciente en el campo de la medicina humana, ya que se sabe que en el año 1909 el diario Medical World publicó una carta donde se decía que la primera inseminación artificial utilizada en personas había sido en el año 1884 en el Jefferson Medical College en Filadelfia a partir de un donante de esperma [8] siendo este el inicio de lo que en años posteriores se convertiría en una tecnología reproductiva en constante perfeccionamiento.

Las primeras técnicas de reproducción asistida fueron desarrolladas para el tratamiento de casos de infertilidad en las personas, como lo son problemas o deficiencias morfológicas durante el coito, o también cuando se presentaba una baja motilidad de los espermatozoides, empleando a las TRA para aproximar lo más posible los gametos masculinos al encuentro con los gametos femeninos;

estas técnicas eran llevadas a cabo con equipo de laboratorio básico y simple, sin mayor complejidad que aquella que demandaba el conocimiento anatómico y fisiológico de ambos sistemas reproductivos; sin embargo aunque en la actualidad estas técnicas emplean equipo altamente especializado y requieren de personal capacitado continúan siendo la principal vía de reproducción para aquellos individuos que por diversos factores no pueden reproducirse de manera natural [9].

Actualmente el abanico de técnicas de reproducción asistida utilizada es amplia y muy variada [10], y cada vez se van agregando nuevas tecnologías que permiten llevar la reproducción asistida a un nivel más especializado, dentro de estas técnicas están: la inseminación artificial (IA)[11], la criopreservación, la congelación y vitrificación de embriones [12], la clonación o transferencia nuclear de células somáticas, [13] la biopsia y vitrificación de embriones, la inyección intracitoplasmática de espermatozoides, el cultivo a blastocisto, el cocultivo[12], la eclosión asistida y la gestación por sustitución [14]

4.3. Las técnicas de reproducción asistida empleadas en la veterinaria y la zootecnia

Desde hace ya 90 años se ha buscado tener una constante producción de animales para abasto con la finalidad de disminuir la probabilidad de que se presente escasez de alimento en los países de todo el mundo; esa producción de animales para abasto está respaldada por investigadores (médicos veterinarios, biólogos, microbiólogos, genetistas y zootecnistas) que se han dedicado a perfeccionar técnicas de manipulación reproductiva para obtener resultados (animales) que cubran la demanda que existe en el mercado alimentario y de sus productos derivados [15].

Esas técnicas actuales de manipulación reproductiva, tan ampliamente empleadas en los animales de producción, están fundamentadas en el estudio de la biología y los procesos fisiológicos (producción de hormonas, funcionamiento, y sitios u órganos de acción) que caracterizan a cada una de las especies animales; tal es el caso de los bovinos[16], ovinos, caprinos, porcinos y conejos, de los cuales se conoce de manera precisa el ciclo reproductivo natural y derivado de ello se emplean de técnicas de reproducción asistida (inseminación artificial, transferencia de embriones, criopreservación y vitrificación de gametos) con protocolos de sincronización establecidos (control y manipulación del estro,[17] la gestación, la inducción del parto y el tiempo de espera para otro ciclo reproductivo) fueron creados y han sido orientados exclusivamente a incrementar la producción (número) de estos animales [15].

Una situación un poco diferente se presenta en otros animales, mismos en los que si bien es cierto que se emplean también protocolos de sincronización y técnicas de reproducción asistida, estos animales no son producidos para consumo sino por su alto valor genético y monetario (como lo son los equinos) [18], o bien por la empatía y las relaciones que pueden establecer con las personas (perros y gatos) [19].

Y finalmente se tiene la enorme oleada de investigación que ha surgido alrededor de la piscicultura en la cual se tiene una más amplia manipulación genética y una mayor oportunidad de manipulación reproductiva que aún no ha sido explorada [15].

Es cierto que, las técnicas de reproducción asistida que comenzaron a realizarse en especies de producción han alcanzado a aquellos animales que son de compañía y además en las últimas dos décadas han llegado a tocar algunas de las especies que pertenecen a la denominada fauna silvestre, como lo son los monos, elefantes, jirafas y jaguares [20].

Cabe mencionar que el hecho de que las técnicas de reproducción asistida hayan alcanzado a la fauna silvestre representa una acción importante de la medicina veterinaria como medicina de la conservación; es decir, se puede estar frente a una oportunidad de disminuir la cantidad de especies, que pertenecen a la fauna silvestre y a la fauna endémica de los países, que actualmente se encuentran en riesgo o bien en peligro inminente de extinción.

4.4. Las Técnicas de Reproducción asistida empleadas en los felinos

Aun cuando las técnicas de reproducción asistida han sido escasamente empleadas en los felinos, a pesar de tener 40 décadas de investigación, se han realizado aportes de resultados fidedignos que permiten asegurar que la aplicación de estas técnicas para garantizar una reproducción exitosa representa una oportunidad para los felinos que presentan alguna limitación para reproducirse de manera natural [21].

Las investigaciones hasta hoy desarrolladas en felinos domésticos se apegan al estudio fisiológico, morfológico, anatómico y reproductivo de hembras y machos y están orientadas a la evaluación de los caracteres antes mencionados; por mencionar algunos ejemplos está el uso de la electroeyaculación para la obtención y evaluación de semen [22], la obtención, conservación, incubación e implantación de embriones de hembras donadoras a receptoras [21–23], o bien el empleo de la inseminación artificial cuando los animales tienen algún problema en las células reproductivas [21–24]

Estos estudios realizados en felinos domésticos han sido traspolados en la última década a los grandes felinos (aunque ya en los 70s se realizaron los primeros estudios de la reproducción de estas especies) [25] principalmente por el valor cultural, histórico, social y de biodiversidad que representan y por la constante amenaza que existe de su extinción.

Las investigaciones y los estudios realizados en grandes felinos [26,27] involucran a aquellos como son: lince ibérico [28,29], guepardo [30], leopardo [31], puma [32] y jaguar [33] y están enfocados específicamente a la inseminación artificial y a la criopreservación de esperma y de embriones , resaltando que estas técnicas de reproducción asistida han dado resultados satisfactorios para la reproducción exitosa de estas especies, y dejan en claro que estas acciones representarán una esperanza de recuperación y conservación de especies que se encuentran amenazadas con desaparecer.

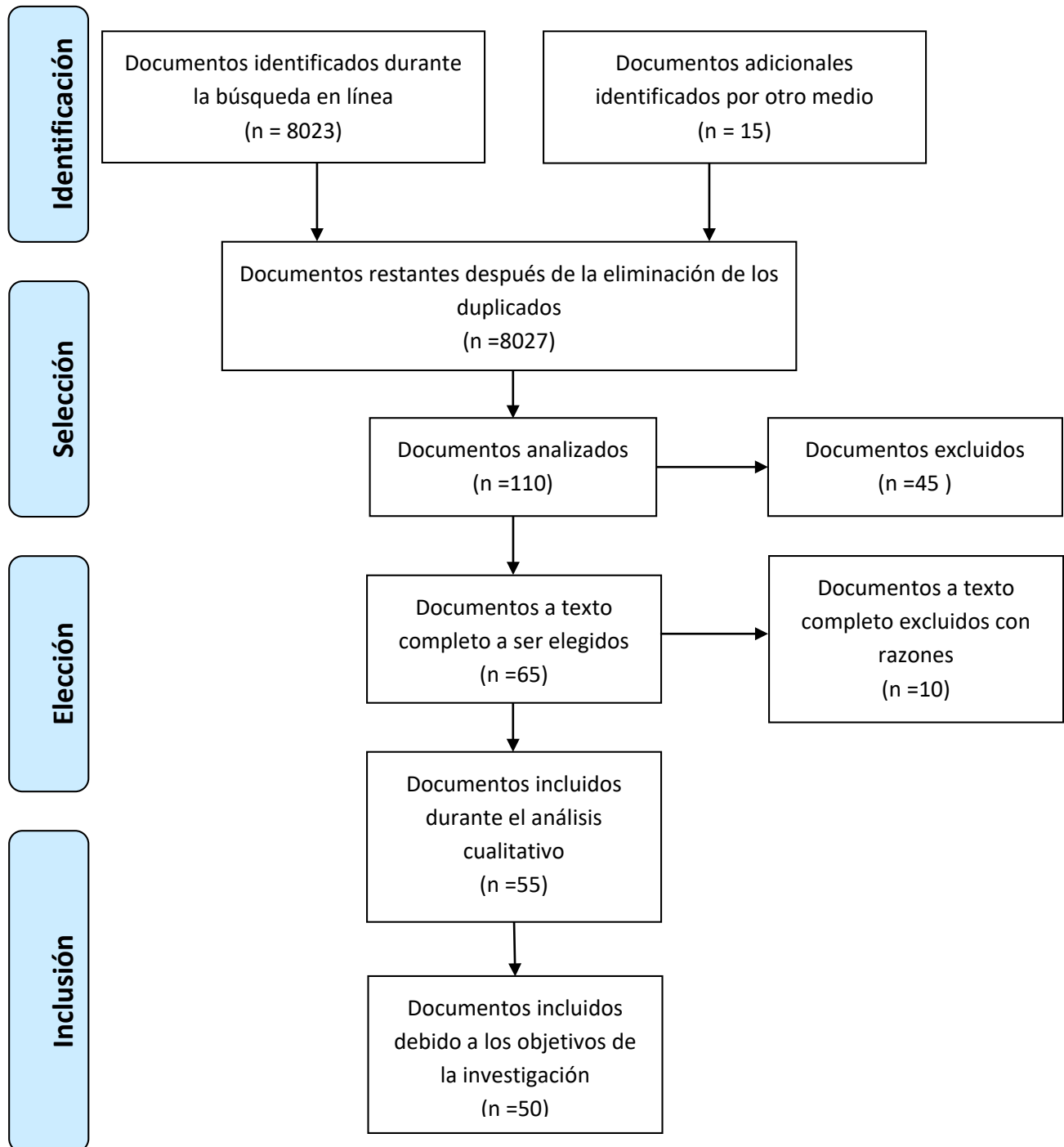
5. Material y Método

El desarrollo de una investigación científica de revisión de literatura requiere de una búsqueda exhaustiva de información en todos los medios físicos (libros, artículos impresos, revistas de investigación, etc.) y electrónicos; es por ello que se recurrió al mayor motor de búsqueda que ofrece en la actualidad el internet, es decir, se usó el buscador de google en la página www.google.com.mx con la finalidad de acceder a las normas, leyes, políticas, programas y proyectos públicos y privados empleados para la conservación de especies en peligro de extinción.

Para la elaboración de este documento se realizó una revisión sistemática retrospectiva de las técnicas de reproducción asistida existentes desde su origen hasta el mes de septiembre de 2016 y su aplicación a los humanos, los animales de producción y de fauna silvestre, así como, su uso en los programas de conservación de especies de felinos mayores en peligro de extinción; se llevó a cabo una amplia búsqueda en material bibliográfico impreso y electrónico; éste último empleando como buscador Google Scholar y las palabras clave: “técnicas de reproducción asistida, inseminación artificial en animales, reproducción asistida en animales, programas de conservación, felinos mayores en peligro de extinción, leyes y políticas aplicadas en la conservación de la fauna” revisando artículos indexados y en texto completo.[34]



PRISMA 2009 Diagrama de Flujo [35]



Estrategia PICOS para la elaboración de la pregunta de investigación[36]



Siendo en total 8023 documentos encontrados que correspondieron con las palabras claves de búsqueda de los cuales únicamente fueron seleccionados 110 tras una revisión del título del artículo en cuestión; de esos 110 documentos elegidos como posibles fuentes de información se descartaron 45 por no corresponder con el objetivo de esta investigación; de los 65 documentos restantes se seleccionaron únicamente 50 que correspondían con el total de palabras clave empleadas en este documento y se ajustaban al objetivo planteado para este artículo, dejando en claro que los documentos incluidos en la revisión sistemática no dependen en ningún momento de los resultados obtenidos en ellos [34].

Para la obtención de la información respecto al tema que aborda esta investigación de forma física se consultaron libros de la biblioteca del campus El Cerrillo, piedras blancas; se recurrió al acervo bibliográfico que poseen los doctores, maestros y MVZ de la UAEM que se dedican al área de la reproducción asistida, así como a la zootecnia; por este medio se tuvo acceso a aproximadamente 120 libros de los cuales únicamente se usaron 5 por contener información que resultó básica para el desarrollo de ésta investigación.

Una vez que se revisó la información física y digital respecto a las técnicas de reproducción asistida y la conservación de especies en peligro de extinción, se realizó una revisión de las principales magazines de investigación veterinaria que se encuentran en los índices del Redalyc, Pub Med, Scielo, Scopus, Google Scholar, Elsevier, Research Gate y en el Journal Citation Report (JCR); decidiendo así la estructura definitiva que tendrá este proyecto de investigación.

5.1.- Límite de espacio

El espacio físico en donde se desarrolló este proyecto de investigación resulta irrelevante, debido a que, al ser producto de una revisión de literatura, se torna más importante el espacio digital en el cual se llevó a cabo esta investigación.

Se recurrió a fuentes información en al menos 4 idiomas diferentes al español, se consultaron resultados arrojados por el buscador google con las palabras claves técnicas de reproducción asistida, es decir, se visitaron aproximadamente 400 sitios web orientados a brindar información respecto a la reproducción asistida, aproximadamente 80 sitios de internet que brindan información respecto a la conservación del jaguar mexicano y 30 sitios relacionados con la biología de la especie.

Se tuvo acceso solo a 2 bibliotecas digitales debido a que la mayoría de ellas son de acceso exclusivo para usuarios denominados "Premium", o bien para alumnos de las diferentes universidades que ofrecen ese servicio.

5.2.- Límite de Tiempo

El uso de técnicas de reproducción asistida empleadas desde su origen, según el libro de Reproducción Animal en 1782, hasta el mes de septiembre de 2016 en la producción y conservación de animales domésticos y su traspolación hacia la fauna silvestre.

5.3. Resultados

The Assisted-Reproduction Techniques as tools for the conservation of *Panthera onca*.

Bernal L¹. Ibanovichi C¹. Sánchez Aparico P². Arredondo J¹. Valdés B¹. Recillas S¹.

¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

²Hospital Veterinario Grandes Especies, Universidad Autónoma del Estado de México.

Corresponding Author

Sergio Recillas Morales, srecillas@uaemex.mx, (52) 7222965548.

Address: El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. C.P. 50090.

Abstract:

Current status of the jaguar population (*Panthera onca*) in the Americas represents less than 20%; it is a species listed in danger of extinction in Mexico since 1987, preserve it is imperative as a part of the ecosystem. Its original range of distribution included the south of the United States in Arizona, New Mexico, and southeast Texas; however, due to human activities and the devastation of its habitat, jaguar population has been reduced until its disappearance in that territory. Currently, jaguar lives in northern Mexico in the Sierra Madre Occidental and the Sierra Madre Oriental. In the Sierra Madre Oriental, records of the jaguar inhabiting have been reported in the states of Querétaro, Tamaulipas and Nuevo León. Nevertheless, the numbers of free-living specimens continue decreasing, educational and governmental institutions have focused their efforts on finding an efficient way to preserve this specimen. The purpose of this work was to analyse the use of assisted-reproduction techniques, implemented in wild and domestic felines, as a suitable tool for the jaguar conservation, as a result of this investigation, it is coherent to affirm that assisted reproduction techniques represent an opportunity for the preservation of this species.

Keywords:

Assisted Reproduction Techniques, conservation, *Panthera onca*, felines.

1.1.1 Introduction

Until today the origin of Assisted-Reproduction Techniques is still a subject of broad discussion by various researchers. Nevertheless, it is known that it was originated approximately in the year 1300 A.D. in ancient Arabia. It is believed that the first method of assisted reproduction that was practised, was artificial insemination [1].

As time went by, these methods of "unnatural" reproduction were spreading out and replicated, having as experimental models domestic animals. First in Italy in 1782 L. Spallanzani and in the United Kingdom in 1884 and 1887 Everett Milais proceeded to inseminate bitches obtaining healthy puppies. It was until 1897 that Walter Heape wrote about artificial insemination in which he concluded that the outcome of the conceptions was so successful as those as in natural matings [1].

Subsequently, in 1900 scientists from Russia transferred this technique to farm animals and it was successfully carried out on horses, bovines as well as on ovines. In the 90s such given allowed many scientists, entrepreneurs and livestock associations in the United States of America to utilize this technique to achieve a considerable increase in the number of animals that made up the herds; reaching massive acceptance from society [1].

1.2.1 Method:

For the elaboration of this document, a systematic review was conducted of the Assisted-Reproduction Techniques which covers the origin until September 2017, and its application to humans, production animals, and wild fauna.

8023 documents were found corresponding to the search keywords, only 110 were selected, after the review of the title from the article in question. From those 110 chosen documents, as the possible sources of information, 45 were discarded because they did not fulfill the need of the objective from this investigation; from the remaining 65 documents only 50 were selected which corresponded to the total number of keywords applied in this document, and they fulfill the needs of the objective set for this article.[2]

Once the physical and digital information was reviewed, regarding the Assisted-Reproduction Techniques and the conservation of species in danger of extinction, An search of the main veterinary research journals was made, in the websites of Redalyc, Pub Med, Scielo, Wiley, Google Scholar, Elsevier, Research Gate and in

the Journal Citation Report (JCR). It was through this means that the final structure of this research was designed.

For the development of the research, the search was carried out in 4 languages: English, Portuguese, German and Spanish.

1.3.1 Assisted-Reproduction Techniques used nowadays

In a simplified way, it is possible to say that they are called Assisted-Reproduction Techniques (ART) to all those techniques by which it is tried to approximate the female (ovum) and male (sperm) gametes artificially to favour pregnancy [3].

Several authors express that the use of Assisted-Reproduction Techniques is not at all modern or recent in the field of human medicine, It is already known that in 1909, the journal Medical World published a letter saying that the first artificial insemination had been used in people in the year 1884 in the Jefferson Medical College, in Philadelphia from a sperm donor [4], being the beginning of what in later years would become a reproductive technology in continuous improvement.

The first Assisted-Reproduction Techniques were developed for the treatment of cases of infertility in people, Such as problems or morphological deficiencies during intercourse, or also when there was a low motility of the sperm, Using the ART to approximate, the most possible, male gametes to encounter with female gametes; these techniques were carried out with basic and simple laboratory equipment, without greater complexity than that which required the anatomical and physiological knowledge of both reproductive systems; nevertheless, although these techniques currently employ highly specialized equipment and require trained personnel, they continue to be the main means of reproduction for those individuals who, due to diverse factors, cannot reproduce naturally [5].

Currently the range of Assisted-Reproduction Techniques utilized is wide and varied [6], and every time more new technologies are being summed up that allow Assisted-Reproduction Techniques to be conducted at a greater specialized level, within these techniques there are: artificial insemination (AI) [7], cryopreservation, embryo freezing and vitrification [8], cloning or somatic cell nuclear transfer, embryo biopsy and vitrification, Intracytoplasmic sperm injection, blastocyst culture, cocultivation, assisted hatching [9] and gestation by substitution [10].

1.3.2 The Assisted-Reproduction techniques utilised in veterinary science and zootechnic

For 90 years now, it has been sought to have a constant vast production of animals for supply to prevent food shortages from occurring in countries around the world. This production of livestock for supply is supported by researchers (veterinarians, biologists, microbiologists, geneticists and zootechnicians) who have dedicated themselves to perfecting techniques of reproductive manipulation to obtain results (animals) that cover the demand that exists in the food and feed market and its derived products [11].

These current reproductive manipulation techniques, which are broadly used in production animals, are based on the study of biology and physiological processes (production of hormones, functioning and sites or organs of action) that characterize each of the animal species; as it is in the case of bovines [12], ovines, goats, pigs and rabbits, from which the natural reproductive cycle is precisely known and derived from Assisted-Reproduction Techniques (Artificial Insemination, Embryo Transfer, Cryopreservation and vitrification of gametes) with established synchronized protocols of (control and manipulation of oestrus, gestation, induction of birth and lapse of time for another reproductive cycle) were created and have been exclusively aimed at increasing the production (number) of these animals [11].

A slightly different situation occurs in other animals, even if it is true, synchronisation protocols and Assisted-Reproduction Techniques are also applied. These animals are not produced for human consumption but for their high genetic and monetary value (like the equines) [13], or due to the empathy and the relationships they can establish with people (dogs and cats) [14].

It is a fact that the Assisted-Reproduction Techniques which began to be applied on production species have reached those animals that are companions for people. Furthermore, in the last two decades, such application has come to impact some of the species that belong in the wild fauna; such as monkeys, elephants, giraffes and Jaguars [15].

It is worth mentioning that the fact that the Assisted-Reproduction Techniques have reached the wild fauna. It represents an important action in the field of veterinary medicine as conservation medicine. That is, it can be an opportunity to reduce the number of species that belong to the endemic and wild fauna of the countries that are currently at risk or in imminent danger of extinction.

1.3.3 Assisted-Reproduction Techniques utilised on felines and current panorama in the use of Assisted-Reproduction Techniques as tools for the conservation of *Panthera onca*.

Even though Assisted-Reproduction Techniques have been scarcely utilised on felines, despite having 40 decades of research, contributions of reliable results have been made to ensure that the application of these techniques guarantee a successful reproduction which represents an opportunity for felines that have any limitation to reproduce naturally [16].

The investigations carried out up until now on domestic felines adhere to the physiological, morphological, anatomical and reproductive study of females and males which are oriented towards the evaluation of the aforementioned characters; to mention some examples, the use of electroejaculation for obtaining and evaluating semen [17], semen collection, conservation, incubation and implantation of embryos from donor females to recipients [16,18], or the application of artificial insemination when the animals have any problem in the reproductive cells [19].

These studies done on domestic felines have been transposed to the big cats in the last decade (although in the 70s the first studies of reproduction from these species were carried out) [20], mainly because of the cultural, historical, social value and the biodiversity they represent as well as the constant threat that exists of their extinction.

Research and studies on big cats involve those such as the following: Iberian lynx, cheetah, leopard, puma and jaguar, and these studies are specifically focused on artificial insemination and the cryopreservation of sperm and embryos [21–23], highlighting that these Assisted-Reproduction Techniques have had favorable outcomes for the successful reproduction of these species. It is clear that these actions will represent an opportunity of recovery and conservation of species that are threatened to disappear.

The developed research has got to acknowledge the success and viability of applying the Assisted-Reproduction Techniques on big cats and wildlife animals. It has generated information that is of relevance to this field; the findings of Morato (NDA) show that it is possible to collect and conserve up to 61% of jaguar oocytes in good condition to then be used to generate viable embryos of that species; [24] Proved that feline oocytes at morula stage resist conservation by vitrification and cryopreservation at 50.2% and 32.2% respectively [25] it is possible to notice through in this study that it is viable to recover oocytes from a *post mortem* female and achieve up to 34.1% of these oocytes to reach the blastocyst stage in an *in vitro* culture.

With regard to the treatment in males, it was found that it is possible to recover *post mortem* sperm with adequate characteristics to be conserved and used in the fertilization of some oocytes; from these sperm collected up to 33.5% have

adequate motility, 42.4% are viable according to Cochia[26] and, Lueders presents similar information in his research on semen collection from an Asian Golden Cat specimen with up to 70% motility, and when used *in vitro* fertilization and implantation the result was two puppies of this species [22].

Additionally, the research carried out by Pope [16] denotes that with *in vitro* fertilization and implantation of embryos in cats up to 67% of pregnant females are obtained. According to Conforti, the research carried out by Swason showed that with the transfer and implantation of embryos up to 70% of success is obtained in pregnancies and parturition in big cats [27].

The information described clarifies that Assisted-Reproduction Techniques represent a promising tool to carry out the reproduction of animals who due to various factors, cannot undergo reproduction naturally. In words, the elements necessary to preserve the samples of any species are available with the mere objective that these specimens never cease. However, the challenge of preserving these animals goes beyond the application of techniques, methods and reproductive protocols due to the fact that these animals need an adequate habitat for a proper development, surrounded by animals of the same species and from which to learn natural attitudes of their ancestors and, can thus survive without depending on human beings.

1.4.1 Discussion:

Both humans and animals of production, domestic animals and wild fauna have been tested through different means of investigations to determine the feasibility of carrying out Assisted-Reproduction Techniques and the success of these in the generation of pregnancies and healthy individuals. A range of techniques that go from simple to complex which have been utilized as it is in the case of the collection and evaluation of semen as well as cryopreservation of gametes assisted hatching, gestation by substitution or cloning; obtaining positive and promising results to guarantee the continuity of each species.

Even when the research papers report that the Assisted-Reproduction Techniques utilized in wildlife do not have a solid background since they began to develop in this field in recent years. It is accepted that they represent a promising alternative to avoid the extinction of some of these species; as in the case of big felines, in which representative works have been carried out the importance of generating an extensive and profound knowledge regarding the reproductive management

protocols of in order to obtain successful pregnancies in these species by minimizing the negative effects that generates the stress by capture, at the same time they it is expressed that there must be special care must be taken to get to know the physiology correctly from each individual and not only of the species [23,24,28].

There are also the investigations focused on determining of the viability of Assisted-Reproduction Techniques on big cats, where it is reported that these are tools for successful reproduction and are the keystone of any conservation program which may be applied if it is *in situ* or *ex situ*, because they allow the reproduction of individuals that are in different geographic locations, through them gene banks can be generated and/or enriched, apart from minimizing the natural reproductive deficiencies from the individuals of this family [21,22,26,29,30].

Nevertheless, despite all the benefits that Assisted-Reproduction Techniques used on big cats possesses which have already been reported in various investigations, there are some that make it clear that it is important to remember that even when the reproductive protocols used in domestic felines are widely tested and have been transferred to big felines; they do not always react in the same way as their domestic fellows due to the biological characteristics from each species the biology of individuals and their way of life modify the results [19,23,25,27].

From the already stated data, it is possible to affirm that Assisted-Reproduction Techniques and technologies can represent an important tool for the conservation of *Panthera onca*, since this species is classified by The International Union for Conservation of Nature (IUCN) as an endangered [31,32]. Though, the biological and reproductive factor of the species are not the only important in the conservation of this species, because the main thing is to guarantee the existence of a broad, delimited territory and protected which serve as a habitat and where there is plenty of prey to feed from whole. Besides allowing free access to individuals between various protected natural areas, reserves and sanctuaries to prevent inbreeding from increasing among individuals and, consequently, consanguinity; thus decreasing the likelihood that it will disappear [33–35].

Nonetheless, it is an obvious the fact that there is a lack of national and regional strategies which allow their conservation to be a success, since the *Panthera onca* conservation programs utilized in Mexico and Latin America are currently substantiated in regards to the administrative part of conservation but not in the social, economic, environmental nor territorial part that the preservation and conservation of this species represents because these programs and plans lack incentives that encourage the population from all social stratum to participate actively [36–38]

However, it is important to keep in the mind that for the *Panthera onca* conservation to be carried out in an adequate way it is necessary to solve the problems this species faces, mainly those problems of anthropogenic origin, since it is the species that is mostly threatened by illegal hunting, its capture of it and its preys as well as the destruction of its habitat (from the fragmentation and destruction of its territory due to the construction of roads in the areas where its originally inhabits) [37,38].

It is broadly known that governmental institutions and non-governmental organizations direct the information to educate the population on the importance of the *Panthera onca*. Though but they ignore the importance of the preys they feed on in their conservation, the possibility of moving long distances to carry out their hunt, and especially the need to live away from people to prevent for any confrontation between them [37].

In Mexico there are more than 80 recognized Natural Protected Areas (PNAs) and from 60 of them, there is a record that *Panthera onca* exists. However, there is no census information to be able to quantify the population that exists; that is why the decisions made regarding its conservation are not the adequate ones because one problem cannot be resolved if data is unknown [39–41].

Those who have studied this species, its biology, its behavior and its distribution claim that the protection and conservation of the *Panthera onca* leads to the protection of other species. It allows controlling herbivores populations that affect cropfields as well as the forests and that are prey from which it feeds. It maintains the vigor within populations by eliminating old or sick ones from these species. Furthermore, it intervenes directly in the diminishment of the proliferation of diseases among the preys, and allows the reproduction of animals that are pollinators, maintaining perfect ecological health that is why the protection and conservation of this species must be handled formally (through government agencies and the laws they generate) and informally (through the participation of the society) [42–44]

Formatting and funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References:

- [1] Bearden HJ, Fuquay JW, López HS, Camberos LO. Reproducción animal aplicada. El Manual Moderno; 1982.
- [2] Higgins JPT, Green S. Manual Cochrane de revisiones sistemáticas de intervenciones. Cochrane 2011:1–639. doi:Available from www.cochrane-handbook.org.
- [3] Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K E Al. Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Versión revisada y preparada por el International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2010:1–11.
- [4] Daniels CR. Exposing Men: The Science and Politics of Male Reproduction. Oxford University Press; 2008.
- [5] Jiménez RG. Derecho Familiar y sus Reformas más recientes a la legislación del Distrito Federal- Reproducción asistida. *Reprod asistida* 2007;9:97–116.
- [6] Khaldoun S. Assisted Reproduction Techniques. First. United Kingdom: Blackwell Publishing; 2012.
- [7] Mart S, Vella C. Tratamientos de reproducción asistida 2017:2.
- [8] Fecundación CREA Valencia C de. Técnicas de fecundación *in vitro*: FIV / ICSI. *Tec fecundación Vitro* 2017:2.
- [9] Muñoz P. Preservación de la Fertilidad Femenina. Valencia: 2016.
- [10] Laboratorios CREA Valencia. Incubación Bench Top-Time Lapse. Valencia: 2016.
- [11] Intervet, Ptaszynska M. Compendium of Animal Reproduction. 2006.
- [12] Mapletoft RJ, Hasler JF. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech* 2005;24:393–403.
- [13] Isabel Catalina Vélez KH. Difusión académica Assisted reproductive technologies in the horses . *Revisa CES Med Vet Y Zootec* 2011;6:6.
- [14] Kustritz MVR. Managing the Reproductive Cycle in the Bitch. *Vet Clin Small Anim Pract* 2012;42:423–37. doi:10.1016/j.cvsm.2012.01.012.
- [15] Tobergte DR, Curtis S. Tecnicas de reproducción asistida. *J Chem Inf Model* 2013;53:1689–99. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [16] Pope CE. Aspects of invivo oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat. *Theriogenology* 2014;81:126–37. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.006.

- [17] Valiente C, Sota PE De, Arauz S, Gobello C. Ejaculation training , seminal alkaline phosphatase and semen preservation through cooling in a milk-based extender in domestic cats. *J Feline Med Surg* 2014. doi:10.1177/1098612X13508192.
- [18] Morris RK, Kilby MD. *Assisted Reproduction Techniques*. 2012. doi:10.1002/9781444398854.
- [19] Galiguis J, Gómez MC, Leibo SP, Pope CE. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes q. *Cryobiology* 2014;68:459–66. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.02.012.
- [20] Howard JG, Wildt DE. Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. *Theriogenology* 2009;71:130–48. doi:doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.046.
- [21] Brown JL. Female reproductive cycles of wild female felids. *Anim Reprod Sci* 2011;124:155–62.
- [22] Lueders I, Ludwig C, Schroeder M, Mueller K, Sc M, Zahmel J, et al. Successful nonsurgical artificial insemination and hormonal monitoring in an Asiatic golden cat (*Catopuma temmincki*). *J Zoo Wildl Med* 2014:372–9. doi:10.1638/2013-0269R.1.
- [23] Jewgenow K, Painer J, Amelkina O, Dehnhard M, Goeritz F. Lynx reproduction – Long-lasting life cycle of corpora lutea in a feline species. *Phytochem Lett* 2014;14:83–8.
- [24] Merlo B, Iacono E, Regazzini M, Zambelli D. Cat blastocysts produced in vitro from oocytes vitrified using the cryoloop technique and cryopreserved electroejaculated semen 2008;70:126–30. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.03.009.
- [25] Fernandez-gonzalez L, Hribal R, Stagegaard J, Zahmel J, Jewgenow K. *Theriogenology* Production of lion (*Panthera leo*) blastocysts after in vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2015;83:995–9. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.11.037.
- [26] Cocchia N, Ciani F, El-Rass R, Russo M, Borzacchiello G, Esposito V, et al. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote* 2010;18:1–8. doi:10.1017/S0967199409990256.
- [27] Howard JG, Roth TL, Byers AP, Swanson WF, Wildt DE, Al HET. Sensitivity to Exogenous Gonadotropins for Ovulation Induction and Laparoscopic Artificial Insemination in the Cheetah and Clouded Leopard ' 1997;1068:1059–68.
- [28] Pelican KM, Wildt DE, Pukazhenthil B, Howard J. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids 2006;66:37–48.

doi:10.1016/j.theriogenology.2006.03.013.

- [29] Conforti A, Bateman HL, Schook MW, Newsom J, Lyons LA, Robert A, et al. Laparoscopic Oviductal Artificial Insemination Improves Pregnancy Success in Exogenous Gonadotropin-Treated Domestic Cats as a Model for Endangered Felids 1 2013;89:1–9. doi:10.1095/biolreprod.112.105353.
- [30] Moro LN, Sestelo AJ, Salamone DF. Evaluation of Cheetah and Leopard Spermatozoa Developmental Capability after Interspecific ICSI with Domestic Cat Oocytes 2014;700:693–700. doi:10.1111/rda.12355.
- [31] Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Ficha de identificación 2014:1–3.
- [32] International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. The IUCN red list of threatened species. IUCN Global Species Programme Red List Unit; 2000.
- [33] Chávez C, Ceballos G. El Jaguar Mexicano en el Siglo XXI : Situación Actual y Manejo. 2006.
- [34] Conservación y manejo del jaguar en México estudios de caso y perspectivas Gerardo Ceballos , Cuauhtémoc Chávez ,. 2006.
- [35] Dentro A, Roo Q, Ku B, Laguna F. Anexo 2 Protocolo de Monitoreo No. 35: Jaguar (*Panthera onca*) en el Corredor Laguna de Términos – Calakmul con énfasis en la región prioritaria para la conservación de Chenkan. 2010:1–12.
- [36] Vásques CC. Estructura poblacional y filogeografía del jaguar (*Panthera onca*) A Partir Del Gen Mitocondrial Nadh5 Catalina. Trab Grado Pontif Univ Javeriana Fac Ciencias 2006.
- [37] Carrillo L, Ceballos G, Chávez C, Cornejo J, Faller JC, List R. análisis de viabilidad de poblaciones y del hábitat del jaguar en n.d.:187–224.
- [38] Faller JC, Chávez C, Johnson S. ensidad y tamaño de la población de jaguar en el noreste de la n.d.:111–22.
- [39] SEMARNAT. Ficha de identificación. México: 2008.
- [40] Mech LD, Sariago GC, Servín J, Baena ML, Halfter G, Soulé ME, et al. Biodiversidad Mexicana. La situación los recur. zoogenéticos mundiales para la aliment. y la agric., vol. II, ROMA: FAO; 2009, p. 485–520. doi:10.2307/3503924.
- [41] Miller, Grieser B y RN. Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. J090. Ciudad de México: 1999.
- [42] Chávez C. Ecología y conservación del jaguar (*Panthera onca*) y Puma

(*Puma concolor*) en la region de calakmul y sus implicaciones para la conservación de la península de yucatán. 2009.

- [43] Ceballos, G, Chávez HZ y CM. Ecología y conservación del jaguar en la región de calakmul. Biodiversitas 2005:1–7.
- [44] Hoogesteyn RHAL. Manual sobre os problemas de predação causados por onças em gado de corte. Brazil: 2005.

6. - Discusión

Tanto humanos como animales de producción, animales domésticos y de fauna silvestre, han sido probados a través de diferentes investigaciones para determinar la viabilidad de llevar a cabo en ellos técnicas de reproducción asistida y el éxito de éstas en la generación de gestaciones e individuos sanos; se han probado desde algo tan cotidiano como lo es una extracción y evaluación de semen hasta técnicas complejas como la criopreservación de gametos, la eclosión asistida, la gestación por sustitución o bien la clonación; obteniendo resultados positivos y prometedores para garantizar la continuidad de cada especie.

Aun cuando los trabajos de investigación reportan que las técnicas de reproducción asistida empleadas en la fauna silvestre no presentan sólidos antecedentes, por comenzar a desarrollarse en ese campo en años recientes, aceptan que representan una alternativa prometedora para evitar la extinción de algunas de éstas especies; tal como es el caso de los felinos mayores, en los cuales se han realizado trabajos representativos acerca de la importancia que tiene generar un conocimiento extenso y profundo respecto a los protocolos de manejo reproductivo con la finalidad de obtener preñeces exitosas en estas especies minimizando los efectos negativos que genera el estrés por captura, de igual manera expresan que se debe tener especial cuidado en conocer correctamente la fisiología de cada individuo y no únicamente de la especie [28,32,37].

También están las investigaciones enfocadas a la determinación de la viabilidad que tienen las técnicas de reproducción asistida en los felinos mayores, donde se reporta que éstas son herramientas para la reproducción exitosa y son la pieza clave de cualquier programa de conservación que se quiera aplicar sin importar si es in situ o ex situ debido a que permiten reproducir individuos que se encuentran en distintos puntos geográficos, a través de ellas se pueden generar y/o enriquecer los bancos de genes además de minimizar la deficiencias reproductivas naturales de los individuos de esta familia. [26,27,31,38,39]

Una de las investigaciones que brinda información importante respecto al uso de las técnicas de reproducción asistida como método de conservación de grandes felinos es la que realizan Howard J,G. y DE Wildt,[25] demostrando que todos los felinos eyaculan más del 70% de espermias con anomalías estructurales, comprometiendo la fertilización de manera natural; ellos atribuyen este elevado porcentaje de teratospermia a la disminución de la diversidad genética que existe en los grandes felinos al quedar pocos miembros con vida.

Lueders y Colaboradores [27] desarrollaron una investigación orientada a la obtención de semen por electro eyaculación y la inseminación artificial en fresco; se apoyaron para la fertilización y el desarrollo de los embriones en la administración de la hormona GnRH y realizado dos maneras diferentes de inseminación (una a nivel uterino y otra a nivel vaginal) con resultados sorprendentes, debido a que tras 84 días de gestación se obtuvieron gemelos.

Conforti V.A.[39] realiza su investigación en la técnica de inseminación bilateral intrauterina auxiliada con laparoscopia donde el 69% de las hembras quedó gestante y afirmando que la inseminación artificial en oviducto incrementa el número de fetos obtenidos al final que la inseminación artificial en útero.

Fernandez Gonzalez L. [33]desarrollo su investigación con 68 racimos de ovocitos extraídos postmortem de un ejemplar de Leon Africano (*Panthera Leo*) que tenía dos años de vida; se pusieron en medios de cultivo y se les realizó una inyección intracitoplasmática de espermatozoides de un congénere desarrollando al paso de los días un blastocisto y finalmente embriones viables para convertirse en futuros felinos.

Sin embargo, a pesar de todos los beneficios que las técnicas de reproducción asistida empleadas en felinos mayores traen consigo y que ya se reportan en diversas investigaciones, existen aquellas que dejan claro que es importante recordar que aun cuando los protocolos reproductivos utilizados en los felinos domésticos están ampliamente probados y han sido traspolados a los felinos mayores estos últimos no siempre responden de la misma manera que sus semejantes domésticos ya que la biología propia de los individuos y su forma de vida modifican los resultados. [24,28,30,33]

A partir de lo antes mencionado es posible afirmar que, las técnicas y tecnologías de reproducción asistida representan una herramienta importante para la conservación de la *Panthera onca*, ya que esta especie se encuentra clasificada por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UINC) como en peligro de extinción [1,40], sin embargo, el factor biológico y reproductivo de la especie no son lo único importante en la conservación de esta especie, ya que, lo primordial es garantizar la existencia de un territorio amplio, delimitado y protegido que funja como hábitat y que en ese lugar existan las presas de las cuales se alimenta, además de permitir el libre acceso de individuos entre diversas áreas naturales protegidas, reservas y santuarios a fin de impedir que se incremente la endogamia entre los individuos y por lo tanto la consanguinidad; disminuyendo así la probabilidad de que desaparezca. [41,42]

No obstante, es tangible el hecho de que se carecen de estrategias nacionales y regionales que permitan que su conservación sea exitosa, ya que los programas de conservación de la *Panthera onca* aplicados en México y en América latina en la actualidad están fundamentados en la parte administrativa de la conservación pero no en la parte social, económica, ambiental y territorial que la preservación y conservación de esta especie representa debido a que estos programas y planes carecen de incentivos que alienten a la población de todos los estratos sociales a participar activamente. [43–45]

Además de que es importante no perder de vista que para que la conservación de la *Panthera onca* pueda llevarse a cabo de una manera adecuada es necesario resolver los problemas que enfrenta esta especie, principalmente están aquellos problemas de origen antropogénico, ya que es la especie que es mayormente amenazada por la cacería ilegal, captura de él y de sus presas y destrucción de su hábitat (a partir de la fragmentación y destrucción de su territorio con las vialidades y construcciones habitacionales en las áreas donde originalmente habita). [43,44]

Es ampliamente conocido que las instituciones gubernamentales y los organismos no gubernamentales llevan a cabo acciones encaminadas a educar a la población acerca de la importancia que posee la *Panthera onca*, pero dejan de lado la relevancia que tienen en su conservación las presas de las cuales se alimentan, la posibilidad de desplazarse amplias distancias para llevar a cabo su cacería, y sobre todo la necesidad de vivir alejado de las personas a fin de impedir un enfrentamiento entre ambos. [43]

En México existen más de 80 Áreas Naturales Protegidas (ANP) reconocidas y en 60 de ellas se tiene registro de que existe *Panthera onca*, sin embargo no se cuenta con información censal que permita cuantificar la población que existe; es por ello que las decisiones que se toman respecto a su conservación no son las adecuadas por que no se puede resolver un problema que no se conoce. [46][46,47]

Quienes se han dedicado a estudiar esta especie, su biología, su comportamiento y su distribución afirman que la protección y conservación de la *Panthera onca* conlleva a la protección de otras especies, permite controlar poblaciones de herbívoros que afectan sembradíos y bosques y que son presas de las cuales se alimenta, mantiene el vigor de las poblaciones al eliminar de esas especies a los individuos viejos o enfermos, interviene directamente en la disminución de la proliferación de enfermedades entre las presas, y permite que se reproduzcan animales que son polinizadores manteniendo una perfecta salud ecológica; es por ello que la protección y conservación de esta especie debe ser de manera formal

(a través de los organismos gubernamentales y las leyes que generan) e informal (a partir de la participación de la sociedad).

7. – Referencias

- [1] SEMARNAT. Norma Oficial Mexicana. Nom-059-Ecol-2001. Protección Ambiental-Especies Nativas de México de Flora y Fauna Silvestres Categorías de Riesgo y Especificaciones para su Inclusión, Exclusión o Cambio-Lista de especies en Riesgo. D Of La Fed 2002:85. doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- [2] Sanderson EW, Redford KH, Chetkiewicz CLB, Medellin RA, Rabinowitz AR, Robinson JG, et al. Planning to save a species: The jaguar as a model. *Conserv Biol* 2002;16:58–72. doi:10.1046/j.1523-1739.2002.00352.x.
- [3] Tellez, Giron, Guadalupe, Lopez-Forment W. *Panthera onca* veraecrucis (carnivora: felidae) en Querétaro, México 1995:3.
- [4] Rosas-Rosas OC, Bender LC, Valdez R. Jaguar and puma predation on cattle calves in northeastern Sonora, Mexico. *Rangel Ecol Manag* 2008;61:554–60. doi:10.2111/08-038.1.
- [5] Higgins JPT, Green S. Manual Cochrane de revisiones sistemáticas de intervenciones. *Cochrane* 2011:1–639. doi:Available from www.cochranehandbook.org.
- [6] Bearden HJ, Fuquay JW, López HS, Camberos LO. Reproducción animal aplicada. *El Manual Moderno*; 1982.
- [7] Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K E Al. Glosario de terminología en Técnicas de Reproducción Asistida (TRA). Versión revisada y preparada por el International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2010:1–11.
- [8] Daniels CR. *Exposing Men: The Science and Politics of Male Reproduction*. Oxford University Press; 2008.
- [9] Jiménez RG. Derecho Familiar y sus Reformas más recientes a la legislación del Distrito Federal- Reproducción asistida. *Reprod ASISTIDA* 2007;9:97–116.
- [10] Khaldoun S. *Assisted-Reproduction Techniques*. First. United Kingdom: Blackwell Publishing; 2012.
- [11] Mart S, Vella C. *Tratamientos de reproducción asistida* 2017:2.
- [12] Fecundación CREA Valencia C de. *Técnicas de Fecundación In vitro: FIV / ICSI*. Tec fecundación Vitr 2017:2.
- [13] Muñoz P. *Preservación de la Fertilidad Femenina*. Valencia: 2016.

- [14] Laboratorios CREA Valencia. Incubación Bench Top-time lapse. Valencia: 2016.
- [15] Intervet, Ptaszynska M. Compendium of Animal Reproduction. 2006.
- [16] Mapletoft RJ, Hasler JF. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech* 2005;24:393–403.
- [17] Isabel Catalina Vélez KH. Difusión académica Assisted reproductive technologies in the horses . *Revisa CES Med Vet Y Zootec* 2011;6:6.
- [18] Kustritz MVR. Managing the Reproductive Cycle in the Bitch. *Vet Clin Small Anim Pract* 2012;42:423–37. doi:10.1016/j.cvsm.2012.01.012.
- [19] Tobergte DR, Curtis S. Técnicas de Reproducción Asistida. *J Chem Inf Model* 2013;53:1689–99. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [20] Pope CE. Aspects of in vivo oocyte production, blastocyst development, and embryo transfer in the cat. *Theriogenology* 2014;81:126–37. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.006.
- [21] Valiente C, Sota PE De, Arauz S, Gobello C. Ejaculation training , seminal alkaline phosphatase and semen preservation through cooling in a milkbased extender in domestic cats. *J Feline Med Surg* 2014. doi:10.1177/1098612X13508192.
- [22] Morris RK, Kilby MD. Assisted-Reproduction Techniques. 2012. doi:10.1002/9781444398854.
- [23] Galiguis J, Gómez MC, Leibo SP, Pope CE. Birth of a domestic cat kitten produced by vitrification of lipid polarized in vitro matured oocytes q. *Cryobiology* 2014;68:459–66. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.02.012.
- [24] Howard JG, Wildt DE. Approaches and efficacy of artificial insemination in felids and mustelids. *Theriogenology* 2009;71:130–48. doi:doi:10.1016/j.theriogenology.2008.09.046.
- [25] Brown JL. Female reproductive cycles of wild female felids. *Anim Reprod Sci* 2011;124:155–62.
- [26] Lueders I, Ludwig C, Schroeder M, Mueller K, Sc M, Zahmel J, et al. Successful nonsurgical artificial insemination and hormonal monitoring in an Asiatic golden cat (*Catopuma temmincki*). *J Zoo Wildl Med* 2014:372–9. doi:10.1638/2013-0269R.1.
- [27] Painer J, Goeritz F, Dehnhard M, Hildebrandt TB, Naidenko S V, Sánchez I, et al. Hormone-induced luteolysis on physiologically persisting corpora lutea in Eurasian and Iberian lynx (*Lynx lynx* and *Lynx pardinus*). *Theriogenology* 2014;82:557–62.

- [28] Merlo B, Iacono E, Regazzini M, Zambelli D. Cat blastocysts produced in vitro from oocytes vitrified using the cryoloop technique and cryopreserved electroejaculated semen 2008;70:126–30. doi:10.1016/j.theriogenology.2008.03.009.
- [29] Fernandez-gonzalez L, Hribal R, Stagegaard J, Zahmel J, Jewgenow K. Theriogenology Production of lion (*Panthera leo*) blastocysts after in vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology* 2015;83:995–9. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.11.037.
- [30] Lima DBC, Silva TFP, Aquino Cortez A, Pinto JN, Magalhães FF, Caldini BN, et al. Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and tris extenders. *Arq Bras Med Vet E Zootec* 2016;68:873–81. doi:10.1590/1678-4162-8653.
- [31] Conforti A, Bateman HL, Schook MW, Newsom J, Lyons LA, Robert A, et al. Laparoscopic Oviductal Artificial Insemination Improves Pregnancy Success in Exogenous Gonadotropin-Treated Domestic Cats as a Model for Endangered Felids 1 2013;89:1–9. doi:10.1095/biolreprod.112.105353.
- [32] Jewgenow K, Painer J, Amelkina O, Dehnhard M, Goeritz F. Lynx reproduction – Long-lasting life cycle of corpora lutea in a feline species. *Phytochem Lett* 2014;14:83–8.
- [33] Pelican KM, Wildt DE, Pukazhenth B, Howard J. Ovarian control for assisted reproduction in the domestic cat and wild felids 2006;66:37–48. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.03.013.
- [34] Moro LN, Sestelo AJ, Salamone DF. Evaluation of Cheetah and Leopard Spermatozoa Developmental Capability after Interspecific ICSI with Domestic Cat Oocytes 2014;700:693–700. doi:10.1111/rda.12355.
- [35] Cocchia N, Ciani F, El-Rass R, Russo M, Borzacchiello G, Esposito V, et al. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote* 2010;18:1–8. doi:10.1017/S0967199409990256.
- [36] Howard JG, Roth TL, Byers AP, Swanson WF, Wildt DE, Al HET. Sensitivity to Exogenous Gonadotropins for Ovulation Induction and Laparoscopic Artificial Insemination in the Cheetah and Clouded Leopard ' 1997;1068:1059–68.
- [37] Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Ficha de identificación 2014:1–3.
- [38] International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. The IUCN red list of threatened species. IUCN Global Species Programme Red List Unit; 2000.

- [39] Conservación y manejo del jaguar en México estudios de caso y perspectivas Gerardo Ceballos , Cuauhtémoc Chávez. 2006.
- [40] Dentro A, Roo Q, Ku B, Laguna F. Anexo 2 Protocolo de Monitoreo No. 35: Jaguar (*Panthera onca*) en el Corredor Laguna de Términos – Calakmul con énfasis en la región prioritaria para la conservación de Chenkan. 2010:1–12.
- [41] Carrillo L, Ceballos G, Chávez C, Cornejo J, Faller JC, List R. análisis de viabilidad de poblaciones y del hábitat del jaguar en n.d.:187–224.
- [42] Faller JC, Chávez C, Johnson S. ensidad y tamaño de la población de jaguar en el noreste de la n.d.:111–22.
- [43] Prioritarias E, Nacional C, Direcci J, Subsecretar VS. Proyecto para la Conservación y Manejo del Jaguar en México. n.d.
- [44] Riesgo DE. Ficha de identificación 2008.
- [45] James B, Grieser M. No Title 1999.
- [46] La EN, Calakmul RDE. Ecología y conservación del jaguar en la región de calakmul 2005:1–7.
- [47] Hoogesteyn RHAL. Manual sobre os problemas de predação causados por onças em gado de corte. Brazil: 2005.