

# El papel de las biotecnologías reproductivas en la conservación animal

M. Gomendio, E. Roldán<sup>1</sup>, J. Garde<sup>2</sup>, G. Espeso<sup>3</sup>

(1) Grupo de Ecología y Biología de la Reproducción, Departamento de Ecología Evolutiva, Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), José Gutiérrez Abascal 2, 28006 Madrid. España

(2) Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (CSIC-UCLM-JCCM), 02071, Albacete. España

(3) Estación Experimental de Zonas Áridas (CSIC). General Segura 1. E-04001 Almería, España - Dpto. de Biología Vegetal y Ecología. Escuela Politécnica Superior. Universidad de Almería. Crta. de Sacramento s/n. La Cañada de S. Urbano, Almería E-04120. España.

La destrucción y fragmentación del hábitat está conduciendo a un aumento de la consanguinidad que amenaza la viabilidad, tanto de poblaciones naturales como de programas de cría en cautividad. La consanguinidad aumenta la mortandad y disminuye la capacidad reproductiva de los individuos. En machos, la consanguinidad empeora la calidad seminal en aspectos clave para la fecundación. Para evitar los efectos de la consanguinidad es fundamental promover el intercambio de material genético entre diferentes poblaciones. Las biotecnologías reproductivas han aportado nuevas soluciones para facilitar el manejo genético de poblaciones de especies en peligro de extinción, como es el desarrollo de bancos de recursos genéticos, que permiten el almacenamiento de semen, óvulos y embriones congelados, además de otros tejidos. La ventaja principal de dichos bancos es que permiten mantener la variabilidad genética de una especie en forma casi indefinida. La aplicación de biotecnologías reproductivas como la congelación de semen y la inseminación artificial facilita el intercambio de genes entre poblaciones diferentes y permite llevar a cabo los apareamientos más aconsejables desde un punto de vista genético.

*Palabras clave:* consanguinidad, especies en peligro de extinción, biotecnologías reproductivas, congelación semen, inseminación artificial

**The role of reproductive biotechnologies in animal conservation.** Habitat destruction and fragmentation is leading to an increase in inbreeding which threatens the viability of both natural populations and captive breeding programmes. Inbreeding increases individual mortality rates and decreases reproductive rates. Among males inbreeding decreases seminal quality affecting traits crucial for fertilization success. To avoid the deleterious effects of inbreeding it is necessary to promote gene exchange between populations. Reproductive biotechnologies offer new solutions to facilitate the genetic management of endangered species, such as the development of genetic resource banks, which allow the preservation of semen, ova, and embryos, as well as other tissues. The main advantage of these banks is that they preserve the genetic variability of a given species indefinitely. The use of reproductive biotechnologies such as semen cryopreservation and artificial insemination facilitate the exchange of genes between populations and allow matings which are desirable from the point of view of genetic management.

*Key words:* inbreeding, endangered species, reproductive biotechnologies, semen cryopreservation, artificial insemination

## La crisis de la biodiversidad: los programas de reproducción en cautividad

La tasa de extinción de especies se ha acelerado en los últimos años debido al crecimiento exponencial de la población humana y al uso intensivo de recursos naturales que ello conlleva (May *et al.*, 1995). En mamíferos, de las 4.853 especies evaluadas, se sabe que 1.101 están amenazadas o son vulnerables, es decir el 23% de todas las especies de las que se posee suficiente información (IUCN, 2004), aunque el número real es probablemente mucho mayor. Este número es muy superior a la proporción de especies amenazadas que hay en otros grupos como las aves, probablemente porque muchas especies de mamífero son sobre-explotadas a través de la caza (Mace y Balmford, 2000). Entre los grupos de mamíferos que contienen una mayor proporción de especies amenazadas se encuentran los ungulados, siendo la causa principal su sobreexplotación a través de la caza para la obtención de comida, pieles y cuernas. De hecho es el único grupo de mamíferos donde la caza es una causa más frecuente de amenaza que la pérdida de hábitat.

Cuando resulta muy difícil detener las causas que están provocando el declive de las poblaciones en su hábitat, y las poblaciones naturales se han reducido por debajo de lo que se considera una población viable, se recomienda la cría en cautividad de una especie. La reproducción en cautividad ha salvado de la extinción a un número considerable de especies, incluso en aquellos casos en los que el declive de las poblaciones naturales había llegado a tal extremo que la cría en cautividad se tuvo que iniciar con muy pocos individuos. Este es el caso del turón de patas negras cuya población fundadora consistió en seis individuos, la del caballo de Prezwalski cuya población fundadora incluyó a 13 individuos, y la de la gacela de Speke que comenzó con cuatro, y posteriormente se incorporaron tres individuos más capturados en libertad (revisión en Hedrick y Kalinowski, 2000). Algunas de estas especies han sido reintroducidas posteriormente a su hábitat natural, aunque hasta la fecha el éxito de los programas de reintroducción ha sido muy bajo (Mackinnon, 2000).

Tradicionalmente se ha considerado que el objetivo principal de los programas de cría en cautividad era el de producir muchos individuos, con el fin de re-introducir un número suficientemente elevado de animales al hábitat natural como para garantizar la viabilidad a largo plazo de las poblaciones re-introducidas. Sin embargo, este enfoque se ha encontrado con importantes obstáculos. Por un parte, cuando se recurre a la cría en cautividad como reacción de emergencia ante una extinción inminente, a menudo se conoce tan poco de la reproducción de la especie que es muy difícil saber cómo contribuir a que aumente el número de individuos. Por otra, el coste de mantener animales en cautividad es muy elevado, y el espacio disponible limitado, por lo que los recursos no permiten establecer programas de cría en cautividad para todas las especies que lo necesitan. Finalmente, el objetivo final que este enfoque plantea ha resultado muy poco exitoso, puesto que tan sólo cinco programas de re-introducciones de especies de mamíferos (que representa el 11% de todos los intentos) han conseguido poblaciones viables en libertad (Balmford, 2000).

Estos problemas han obligado a re-evaluar los objetivos de los programas de cría en cautividad. En la actualidad dichos programas se contemplan como una estrategia complementaria, en lugar de alternativa, a la protección de las poblaciones naturales. Bajo este enfoque se considera que un objetivo fundamental de los programas de cría en cautividad es el de contar sólo con algunos de los individuos de la especie, con el fin de mejorar el conocimiento de su reproducción y desarrollar técnicas de reproducción asistida que facilitan el intercambio genético entre poblaciones mantenidas en cautividad, y entre éstas y poblaciones naturales. La aplicación de biotecnologías reproductivas permite preservar el máximo de diversidad genética y evitar los efectos de la consanguinidad en todas las poblaciones (Gomendio y Roldan, 2004; Roldan y Garde, 2004).

Dentro de este contexto se encuadran los programas de cría en cautividad de ungulados en peligro de extinción que se desarrollan en la Estación Experimental de Zonas Áridas (CSIC). Entre 1971 y 1975 se iniciaron programas de cría en cautividad de tres especies de gacelas procedentes del Norte de África: la gacela de Cuvier (*Gazella cuvieri*), gacela dorcas (*Gazella dorcas neglecta*) y gacela Mohor (*Gazella dama mhorri*). *Gazella cuvieri* es una especie de montaña que habita la zona del Atlas, donde quedan grupos pequeños y dispersos. Está categorizada por la IUCN en la Lista Roja como 'Amenazada'. *Gazella dorcas neglecta* es una especie de menor tamaño corporal que habita zonas desérticas, y la especie está categorizada como 'vulnerable', aunque no se especifica el status de la subespecie *neglecta* que se cree está amenazada, debido en gran medida a la caza indiscriminada de la que es objeto. Finalmente, *G. dama mhorri* es la especie de mayor tamaño corporal, que habitaba zonas semi-desérticas. Está categorizada como 'Amenazada' y no se han observado animales en libertad desde 1968. El éxito de los programas de cría en cautividad de estas tres especies de gacelas, y los protocolos de manejo desarrollados, permiten abordar estudios que en general no son posibles en especies amenazadas. Ello hace de estas especies un modelo ideal para estudios reproductivos de aplicabilidad a otras especies de ungulados en peligro de extinción. Nuestro grupo de investigación trabaja desde hace 10 años con estas tres especies de gacelas amenazadas con el doble objetivo de comprender los efectos de la consanguinidad sobre la reproducción y de desarrollar biotecnologías reproductivas que contribuyan a su conservación.

## Depresión por consanguinidad y heterocigosis

Es habitual que la reproducción en cautividad de una especie se inicie sólo cuando se considera que las poblaciones naturales corren un riesgo inminente de extinguirse. Cuando una especie llega a esa situación, y la cría en cautividad se inicia con una población fundadora con pocos individuos, la consanguinidad a lo largo de las primeras generaciones es inevitable, y el éxito del programa de cría depende en gran medida de que se puedan evitar los efectos deletéreos de la consanguinidad sobre la supervivencia y reproducción de los individuos (es decir, la 'depresión por consanguinidad'). El término 'consanguinidad' se refiere al apareamiento entre individuos relacionados genéticamente y sus efectos deletéreos están relacionados con la disminución de la heterocigosis que se produce a medida que se generan descendientes consanguíneos (Charlesworth y Charlesworth, 1987).

La forma tradicional de abordar el estudio de la consanguinidad y su efecto sobre la eficacia biológica ha sido calculando el coeficiente de consanguinidad  $f$  en base a la información genealógica (Wright, 1922). El coeficiente de consanguinidad se define como la probabilidad de que los dos alelos de un locus sean idénticos por descendencia, y representa el valor esperado de homocigosis para todo el genoma. En animales mantenidos en cautividad y en animales domésticos la depresión por

consanguinidad se ha reconocido desde hace tiempo (Charlesworth y Charlesworth, 1987; Thornhill, 1993), siendo el efecto más frecuentemente detectado un aumento en la mortandad juvenil (Ralls *et al.*, 1979; Ralls y Ballou, 1986; Mitton, 1993).

Nuestros estudios en gacelas han profundizado en los efectos de la consanguinidad sobre la fisiología reproductiva masculina. Puesto que las tres especies de gacelas en peligro de extinción con las que trabajamos tienen poblaciones fundadoras de diferente tamaño, sus poblaciones en cautividad tienen diferentes niveles de consanguinidad. Nuestros resultados demuestran que los machos de la especie con niveles más elevados de consanguinidad (*Gazella cuvieri*) tienen una peor calidad seminal que los machos de las otras dos especies (Cassinello *et al.*, 1998). Cuando comparamos machos de *Gazella cuvieri* con diferentes coeficientes de consanguinidad pudimos comprobar que los machos más consanguíneos sufren una disminución en la proporción de espermatozoides móviles, en la proporción de espermatozoides morfológicamente normales, y en la proporción de espermatozoides con acrosoma intacto, características importantes de cara a la capacidad fecundante de los espermatozoides (Roldan *et al.*, 1998). Los efectos de la consanguinidad sobre la calidad seminal no son tan marcados en *Gazella dorcas neglecta* y *Gazella dama mhorr* cuyas poblaciones tienen niveles bajos e intermedios respectivamente de consanguinidad (Gomendio *et al.*, 2000). Otro efecto negativo de la consanguinidad es que aumenta la vulnerabilidad de los individuos frente a los parásitos (Cassinello *et al.*, 2001), lo que podría suponer un riesgo para su supervivencia.

La consanguinidad no es un problema limitado a las poblaciones mantenidas en cautividad, pues se ha detectado depresión por consanguinidad en poblaciones naturales (Keller y Waller, 2002). Durante mucho tiempo se negó la posibilidad de que la consanguinidad fuese un fenómeno relevante en poblaciones naturales debido a la falta de evidencia. Parte del problema reside en la dificultad de construir genealogías en poblaciones naturales para poder calcular la consanguinidad. En las pocas poblaciones de aves donde se ha conseguido esta información, los análisis han revelado que la consanguinidad está presente y que disminuye el éxito reproductor, principalmente a través de una reducción en la tasa de eclosión, y que también disminuye la tasa de supervivencia tanto de juveniles como de adultos (Keller, 1998; Keller *et al.*, 1994; Kruuk *et al.*, 2002). Dadas las dificultades de construir genealogías en poblaciones naturales, un enfoque alternativo ha sido el de aprovechar el hecho de que la consanguinidad reduce la heterocigosis. Por lo tanto, se ha propuesto que la depresión por consanguinidad se puede detectar relacionando la heterocigosis medida con marcadores moleculares con caracteres asociados a la eficacia biológica. Estudios llevados a cabo en poblaciones naturales de diferentes especies han encontrado asociaciones entre los niveles de heterocigosis medida con marcadores moleculares y diversos componentes de la eficacia biológica como el peso al nacer y la supervivencia neonatal (Coltman *et al.*, 1998; Coulson *et al.*, 1998; Rossiter *et al.*, 2001), la supervivencia juvenil (Coulson *et al.*, 1999), el éxito reproductivo de las hembras (Slate *et al.*, 2000), el éxito de cópula de los machos (Hoglund *et al.*, 2002), y la vulnerabilidad frente a los parásitos y patógenos (Coltman *et al.*, 1999; Acevedo-Whitehouse *et al.*, 2003; Reid *et al.*, 2003). Los efectos de la consanguinidad sobre la reproducción y la supervivencia pueden conducir a las poblaciones naturales a la extinción, como es el caso de una metapoblación de mariposas (*Melitaea cinxia*; Saccheri *et al.*, 1998). Un estudio reciente llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en poblaciones cinegéticas de ciervos aisladas por vallados ha puesto en evidencia que los individuos con niveles bajos de heterocigosis (estimada sobre la base de microsatélites) sufren mayores cargas parasitarias (Gomendio *et al.*, 2006). Además, en poblaciones naturales de corzo hemos demostrado que los individuos con niveles más bajos de heterocigosis están en peor condición física (Ruiz *et al.*, 2006). Por lo tanto, numerosos estudios han hallado relaciones entre los niveles de heterocigosis medida con marcadores moleculares y caracteres relacionados con la eficacia biológica individual. Es probable que la consanguinidad sea un fenómeno cada vez más extendido en poblaciones naturales debido a que la destrucción del hábitat está conduciendo a la fragmentación y aislamiento de muchas poblaciones.

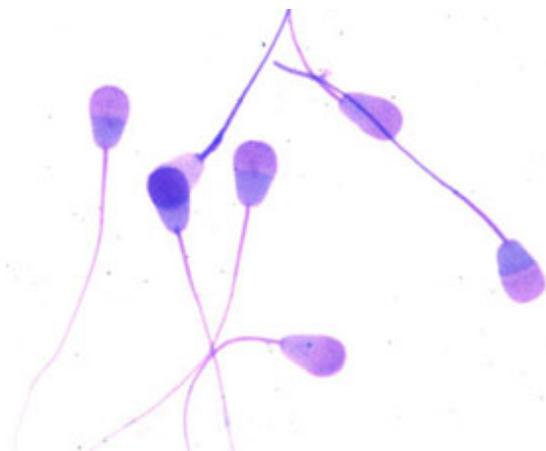
## Bancos de recursos genéticos y técnicas de reproducción asistida

Para evitar la consanguinidad es fundamental promover el intercambio de material genético entre diferentes poblaciones y mantener poblaciones de gran tamaño. Sin embargo, cumplir dichos objetivos entraña serias dificultades. El intercambio de animales entre poblaciones genera estrés en los animales trasladados, plantea riesgos sanitarios, a menudo los animales incorporados a una población diferente no se integran adecuadamente al nuevo grupo social, y en animales de gran tamaño los traslados suponen un elevado coste económico. Por otra parte, mantener poblaciones de gran tamaño en los programas de cría en cautividad es a menudo impracticable debido a la limitación de recursos.

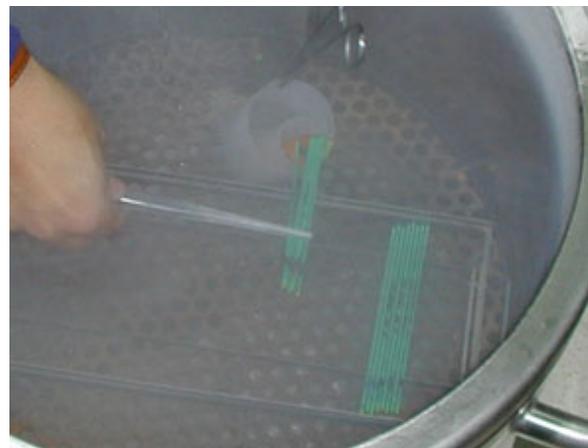
Las biotecnologías reproductivas han aportado soluciones alternativas para facilitar el manejo genético de poblaciones de especies en peligro como es el desarrollo de bancos de recursos genéticos (Holt *et al.*, 1996; Wildt *et al.*, 1997; Wildt y Wemmer, 1999). Los bancos de recursos genéticos permiten el almacenamiento de semen, óvulos y embriones congelados, además de otros tejidos. La ventaja principal de dichos bancos es que permiten mantener la variabilidad genética de una especie en forma casi indefinida. Así pues, el semen de los machos que se almacena en estos bancos se puede utilizar durante muchos años después de la muerte del animal. La existencia de un banco de recursos genéticos reduce considerablemente el número de individuos vivos que se necesitan para mantener una población viable, por lo que se reducen las necesidades de espacio que se requieren para recuperar una especie, lo que permite reducir los costos, y ampliar el número de especies que se pueden beneficiar de dichos programas.

La principal dificultad de crear un banco de recursos genéticos radica en la necesidad de conocer en profundidad la reproducción de la especie en cuestión. Puesto que a lo largo de la evolución las especies han divergido principalmente en los aspectos reproductivos, las diferencias entre especies en comportamiento y fisiología reproductiva son mucho mayores que en otros niveles. Por ello, la reproducción de cada especie presenta muchas características específicas, que limitan la aplicación de conocimientos procedentes de especies cercanas filogenéticamente. Los intentos llevados a cabo hasta la fecha han demostrado hasta qué punto las técnicas de reproducción asistida y los protocolos de congelación varían de una especie a otra. Dicha variabilidad entre especies dificulta a veces los primeros pasos, precisamente cuando la situación de una especie se considera límite.

El primer paso para el establecimiento de un banco de recursos genéticos es el desarrollo de protocolos de congelación de espermatozoides adecuados (**Fig. 1**). Los espermatozoides son células delicadas que para sobrevivir la criopreservación requieren ser deshidratados y rehidratados mediante el uso de diluyentes que contienen crioprotectores específicos (productos que estabilizan las membranas celulares), y mediante unos procesos de enfriamiento y congelación que minimicen el daño que el hielo produce en la célula. Por lo tanto, los protocolos de criopreservación deben de ser modificados y optimizados cuidadosamente para cada especie. Hemos trabajado en el desarrollo de protocolos de congelación para *Gazella cuvieri*, *Gazella dorcas neglecta* y *Gazella dama mhorrr*, y hemos encontrado que el diluyente más eficiente es diferente para cada especie. Además, el éxito en relación a la capacidad del semen de cada especie de sobrevivir a la congelación varió entre las tres especies, de forma que los mejores resultados se consiguieron en *G. dorcas neglecta*, en *G. dama* los resultados fueron intermedios, y los peores resultados se obtuvieron en *G. cuvieri* (Roldan *et al.*, 2002; Garde *et al.*, 2003a). El hecho de que estas diferencias correspondan con los niveles de consanguinidad de cada especie sugiere que la consanguinidad no sólo afecta a la morfología y motilidad de los espermatozoides, sino que también aumenta su vulnerabilidad frente a la congelación. Las diferencias entre especies podrían deberse a distinta constitución de las membranas de los espermatozoides (Roldan y Shi, 2006) y, con ello, a distintos grados de resistencia diferentes al choque osmótico (Roldan y Garde, 2004). Se ha seguido trabajando en la mejora de los protocolos de congelación para *G. dama* y *G. cuvieri* pero, aunque se han conseguido avances para la primera especie, los resultados para *G. cuvieri* siguen siendo poco satisfactorios debido a la mala calidad seminal que presentan los machos (Garde *et al.*, 2003b; Arregui *et al.*, 2005). También se ha evaluado la capacidad fecundante de los espermatozoides en el laboratorio, lo que ha revelado que en *G. cuvieri* se encuentra disminuida respecto a las otras dos especies (del Olmo *et al.*, 2005).



**Figura 1a.** Espermatozoides de gacela dama antes de la congelación.



**Figura 1b.** Congelación de espermatozoides en pajuelas sobre vapores de nitrógeno líquido.

Una vez se han desarrollado protocolos de congelación de semen adecuados, el siguiente paso es la puesta a punto de técnicas de sincronización de ciclos ováricos y de inseminación artificial, que permitan el intercambio de material genético entre poblaciones. La posibilidad de inseminar hembras con semen congelado también aumenta la eficiencia de la cría en cautividad puesto que se pueden elegir los apareamientos que minimicen los efectos de la consanguinidad sin necesidad de someter a los animales al estrés de cambios continuos de grupo social, y sin los riesgos de que incompatibilidades de tipo comportamental impidan apareamientos aconsejables desde un punto de vista genético. La inseminación artificial requiere mucho más que depositar espermatozoides en el tracto reproductor de una hembra, puesto que requiere un conocimiento muy preciso del momento de la ovulación, y del lugar específico en el que depositar espermatozoides. Experiencias previas en ciervo ibérico permitieron poner a punto la técnica y examinar factores que determinan el éxito de fecundación. Los resultados indican que una elevada velocidad de natación de los espermatozoides y una elevada proporción de espermatozoides normales son fundamentales para el éxito de la inseminación artificial (Malo *et al.*, 2005). A su vez, la velocidad de natación de los espermatozoides está determinada por el diseño morfológico de los mismos (Malo *et al.*, 2006). Hemos realizado un ensayo de inseminación artificial intrauterina mediante laparoscopia bajo anestesia quirúrgica y empleando semen congelado en *G. dama mhorrr*. Como resultado de dicho ensayo en el año 2005 se obtuvo una gestación

que transcurrió con normalidad y a los 202 días de la inseminación artificial nació un macho por parto natural que, en la actualidad, se encuentra en perfecto estado de salud (Garde *et al.*, 2006). Este resultado representa el primer nacimiento en el mundo de una cría de gacela obtenida mediante inseminación artificial con semen congelado (**Fig. 2**).



**Figura 2.** Primera cría de gacela dama nacida en el mundo mediante inseminación artificial con semen congelado

Hasta el presente, se ha puesto mucho énfasis en la obtención, criopreservación y uso de gametos masculinos (espermatozoides) en los esfuerzos de conservación de recursos genéticos de especies amenazadas. Sin embargo, y para lograr conservar un máximo de diversidad genética, es importante desarrollar métodos que permitan también la obtención, conservación y uso de los gametos femeninos, lo cual involucra una serie de desafíos técnicos. Con este propósito, hemos comenzado estudios de obtención, maduración, fecundación y cultivo *in vitro* de oocitos de gacela Mohor, con el fin de desarrollar protocolos adecuados de conservación de gametos femeninos y embriones para un banco de recursos genéticos (González *et al.*, 2005; Berlinguer *et al.*, 2006, Roldan *et al.*, 2006). Los resultados preliminares obtenidos en gacela dama son muy alentadores, pues constituyen el primer caso de maduración y fecundación *in vitro* de oocitos y cultivo de embriones *in vitro* en especies de gacelas, y representa un avance considerable en la conservación de germoplasma femenino para el establecimiento de bancos de recursos genéticos de estas especies amenazadas. También se ha tenido oportunidad de iniciar un estudio con recuperación y maduración *in vitro* de oocitos a partir de ovarios de animales que mueren súbitamente (Roldan *et al.*, 2006).

## Perspectivas de futuro

La escala a la que se está produciendo la destrucción del hábitat en todo el Planeta hace predecir que la fragmentación de las poblaciones naturales en unidades pequeñas y aisladas será un fenómeno cada vez más extendido. Ello hace suponer que la consanguinidad adquirirá cada vez mayor importancia, y evitar sus efectos deletéreos será un objetivo fundamental en las estrategias de conservación. Por un parte, en los casos en los que las causas del declive de una especie no puedan ser frenadas, será necesario establecer programas de cría en cautividad. En estos casos los bancos de recursos genéticos permitirán reducir las necesidades de espacio para cada especie, y la aplicación de biotecnologías reproductivas permitirá el intercambio de genes entre poblaciones diferentes y facilitará los apareamientos más aconsejables desde un punto de vista genético. Por otra parte, las poblaciones naturales que se fragmenten necesitarán de un manejo genético que evite la consanguinidad y promueva el flujo génico entre poblaciones aisladas, por lo que las biotecnologías reproductivas serán herramientas de indudable utilidad en el campo. Finalmente, en las ocasiones en las que sea posible, la estrategia óptima consistirá en el intercambio de gametos entre poblaciones mantenidas en cautividad y poblaciones naturales, de forma que los programas de cría puedan incorporar material genético de poblaciones naturales sin necesidad de extraer individuos de poblaciones que están en declive, y que las poblaciones naturales puedan incorporar material genético de los individuos que forma parte de un programa de cría sin necesidad de re-introducciones que implican un elevado coste y una tasa de éxito baja.

## Agradecimientos

Los proyectos de nuestro grupo de investigación han sido financiados por el Ministerio de Educación y Ciencia. Agradecemos a Eulalia Moreno (Directora EEZA-CSIC) el permiso para trabajar con los animales, y al personal del Parque de Rescate de la Fauna Sahariana (EEZA-CSIC) el entusiasmo con el que han colaborado en los proyectos de investigación y su profesionalidad en el manejo de los animales.

## Referencias

- Acevedo-Whitehouse, K., Gulland, F., Greig, D. y Amos, W. 2003. Disease susceptibility in California sea lions. *Nature* 422: 35.
- Arregui, L., del Olmo, A., Gomendio, M., Espeso, G., Garde, J.J. y Roldan, E.R.S. 2005. Puesta a punto de un protocolo de criopreservación de semen de *Gazella dama mhorr* para su aplicación en un banco de recursos genéticos. *VII Jornadas de la Sociedad Española de Conservación y Estudios de Mamíferos*, Valencia, 3-6 Diciembre 2005.
- Balmford, A. 2000. Priorities for captive breeding – which mammals should board the ark? En *Priorities for the Conservation of Mammalian Diversity*. (eds. Entwistle, A., Dunstone, N.) Cambridge University Press, pp. 291-307. Cambridge
- Berlinguer, F., Succu, S., del Olmo, A., Gonzalez, R., Garde, J.J., Espeso, G., Gomendio, M., Ledda, S. y Roldan, E.R.S. 2006. *In vitro* oocyte maturation, fertilization and culture after laparoscopic ovum pick-up in an endangered gazelle (*Gazella dama mhorr*). *Reprod. Fertil. Dev.* 18: 216.
- Cassinello, J., Abaigar, T., Gomendio, M. y Roldan, E.R.S. 1998. Characteristics of the semen of three endangered species of gazelles. *J. Reprod. Fert.* 113: 35-45.
- Cassinello, J., Gomendio, M. y Roldan, E.R.S. 2001. The relationship between coefficient of inbreeding and parasite burden in endangered ungulates. *Conserv. Biol.* 15: 1171-1174.
- Charlesworth, D. y Charlesworth, B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18: 237-268.
- Coltman, D.W., Don Bowen, W. y Wright, J.M. 1998. Birth weight and neonatal survival of harbour seal pups are positively correlated with genetic variation measured by microsatellites. *Proceedings of the Royal Society London B* 265: 803-809.
- Coltman, D.W., Pilkington, J.G., Smith, J.A. y Pemberton, J.M. 1999. Parasite-mediated selection against inbred soay sheep in a free-living, island population. *Evolution* 53: 1259-1267.
- Coulson, T., Albon, S.D., Slate, J. y Pemberton, J. 1999. Microsatellite loci reveal sex-dependent responses to inbreeding and outbreeding in red deer calves. *Evolution* 53: 1951-1960.
- Coulson, T.N., Pemberton, J.M., Albon, S.D., Beaumont, M., Marshall, T.C., Slate, J., Guinness, F.E. y Clutton-Brock, T.H. 1998. Microsatellites reveal heterosis in red deer. *Proceedings of the Royal Society London B* 265: 489-495.
- del Olmo, A., Arregui, L., Garde, J.J., Espeso, G., Gomendio, M. y Roldan, E.R.S. 2005. Crioconservación y evaluación de la capacidad funcional de los espermatozoides de tres especies de gacelas amenazadas: *Gazella cuvieri*, *Gazella dama mhorr* y *Gazella dorcas neglecta*. *VII Jornadas de la Sociedad Española de Conservación y Estudios de Mamíferos*, Valencia, 3-6 Diciembre 2005.
- Garde, J.J., del Olmo, A., Soler, A.J., Espeso, G., Gomendio, M. y Roldan, E.R.S. 2003b. Improving semen cryopreservation protocols for the establishment of a genetic resource bank of endangered Mohor gazelle (*G. dama mhorr*). *Fertility 2003, Joint Meeting of the British Andrology Society, British Fertility Society and Society for Reproduction and Fertility*, Aberdeen, Gran Bretaña, 13-17 Julio 2003.
- Garde, J.J., Gomendio, M., Espeso, M. y Roldan, E.R.S. 2006. Live birth of a Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) calf following intrauterine insemination with frozen-thawed semen. *Reprod. Fertil. Dev.* 18: 218.
- Garde, J.J., Soler, A.J., Cassinello, J., Crespo, C., Malo, A.F., Espeso, G., Gomendio, M. y Roldan, E.R.S. 2003a. Sperm

- cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorr* and *G. dorcas neglecta*). *Biol. Reprod.* 69: 602-611.
- Gomendio, M., Cassinello, J. y Roldan, E.R.S. 2000. A comparative study of ejaculate traits in three endangered ungulates with different levels of inbreeding: Fluctuating asymmetry as an indicator of reproductive and genetic stress. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 267: 875-882.
- Gomendio, M., Malo, A., Garde, J., Vicente, J., Rey, I., Gortazar, C. y Roldan, E.R.S. 2006. Genetic variation influences spleen mass and parasite burden through its effects upon body condition among male red deer (enviado a publicar).
- Gomendio, M. y Roldan, E.R.S. 2004. La conservación de la biodiversidad: un reto científico. En *El conocimiento científico como referente político en el Siglo XXI*. Nombela C, ed. Fundación BBVA, Madrid, pp. 117-158.
- González, R., Berlinguer, F., Succu, S., del Olmo, A., Espeso, G., Garde, J.J., Gomendio, M., Ledda, S. y Roldan, E.R.S. 2005. Maduración y fecundación *in vitro* de oocitos de gacelas en peligro de extinción para el establecimiento de bancos de recursos genéticos. *VII Reunión Anual de la Sociedad Española de Conservación y el Estudio de los Mamíferos*, Valencia, 3-6 diciembre 2005.
- Hedrick, P.W. y Kalinowski, S.T. 2000. Inbreeding depression in conservation biology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 31: 139-162.
- Hoglund, J., Piertney, S.B., Alatalo, R.V., Lindell, J., Lundberg, A. y Rintamaki, P.T. 2002. Inbreeding depression and male fitness in black grouse. *Proceedings of the Royal Society London B* 269: 711-715.
- Holt, W.V., Bennett, P.M. y Volobouev, V. (1996) Genetic resource banks in wildlife conservation. *J. Zool. Lond.* 238: 531-544.
- IUCN, 2004. *IUCN Red List of Threatened Animals*. <http://www.redlist.org/> Downloaded 13 January 2006.
- Keller, L.F. 1998. Inbreeding and its fitness effects in an insular population of song sparrows (*Melospiza melodia*). *Evolution* 52: 240-250.
- Keller, L.F., Arcese, P., Smith, J.N.M., Hochachka, W.M. y Stearns, S.C. 1994. Selection against inbred song sparrows during a natural population bottleneck. *Nature* 372: 356-357.
- Keller, L.F. y Waller, D.M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends Ecol. Ecol.* 17: 230-241.
- Kruuk, L.E.B., Sheldon, B.C. y Merila, J. 2002. Severe inbreeding depression in collared flycatchers (*Ficedula albicollis*). *Proc. R. Soc. Lond. B* 269: 1581-1589.
- Mace, G.M. y Balmford, A. 2000. Patterns and processes in contemporary mammalian extinction. En *Priorities for the Conservation of Mammalian Diversity*. (eds. Entwistle, A., Dunstone, N.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 27-52.
- Mackinnon, K. 2000. Never say die: fighting species extinction. En *Priorities for the Conservation of Mammalian Diversity*. (eds. Entwistle, A., Dunstone, N.) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 335-353.
- Malo, A.F., Garde, J.J., Soler, A.J., Garcia, A., Gomendio, M. y Roldan, E.R.S. 2005. Male fertility in natural populations of red deer is determined by sperm velocity and the proportion of normal spermatozoa. *Biology of Reproduction* 72: 822-829.
- Malo, A.F., Gomendio, M., Garde, J., Lang-Lenton, B., Soler, A.J. y Roldan, E.R.S. 2006. Sperm design and sperm function. *Biology Letters* doi:10.1098/rsbl.2006.0449.
- May, R.M., Lawton, J.H. y Stork, N.E. 1995. Assessing extinction rates. En *Extinction Rates*. Lawton J.H., May R.M., eds. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-24.
- Mitton, J.B. 1993. Theory and data pertinent to the relationship between heterozygosity and fitness. En *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding*. (ed. Thornhill NW) University of Chicago Press, Chicago & London, pp. 17-41.
- Ralls, K. y Ballou, J.D. 1986. Captive breeding programs for populations with a small number of founders. *Trends in Ecology and Evolution* 1: 19-22.

- Ralls, K., Brugger, K. y Ballou, J.D. 1979. Inbreeding and juvenile mortality in small populations of ungulates. *Science* 206: 1101-1103.
- Reid, J.M., Arcese, P. y Keller, L.F. 2003. Inbreeding depresses immune response in song sparrows (*Melospiza melodia*): direct and inter-generational effects. *Proceedings Royal Society London B* 270: 2151-2157.
- Roldan, E.R.S., Cassinello, J., Abaigar, T. y Gomendio, M. 1998. Inbreeding, fluctuating asymmetry, and ejaculate quality in an endangered ungulate. *Proceedings of the Royal Society of London B* 265: 243-248.
- Roldan, E.R.S., Berlinguer, F., Succu, S., Gonzalez, R., del Olmo, A., Espeso, G., Gomendio, M. y Ledda, S. 2006. *In vitro* maturation of oocytes from endangered dorcas gazelle (*Gazella dorcas neglecta*). *Reprod. Fertil. Dev.* 18: 223.
- Roldan, E.R.S. y Garde, J.J. 2004. Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. En *Los Retos Medioambientales del siglo XXI. La Conservación de la Biodiversidad en España*. M. Gomendio, ed. Fundación BBVA, Madrid, pp.283-307.
- Roldan, E.R.S. y Shi, Q.X. 2006. Sperm phospholipases and acrosomal exocytosis. *Frontiers in Bioscience* (en prensa).
- Roldan, E.R.S., Soler, A.J., Crespo, C., Malo, A.F., Espeso, G., Gomendio, M. y Garde, J. 2002. Semen cryopreservation in endangered gazelles. *Proc. 9<sup>th</sup> Int. Symp. Spermatol., Cape Town, South Africa*, (eds. van der Horst, G. et al.) Monduzzi Editore, Bologna, pp. 139-142.
- Rossiter, S.J., Jones, G., Ransome, R.D. y Barrat, E.M. 2001. Outbreeding increases offspring survival in wild greater horseshoe bats (*Rhinolophus ferrumequinum*). *Proceedings of the Royal Society of London B* 268: 1055-1061.
- Ruiz, M.J., Roldan, E.R.S., Rey, I., Malo, A.F. y Gomendio, M. 2006. La variabilidad genética influye sobre la condición física en machos de corzo. *Galemys* (en prensa).
- Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankare, M., Vikman, P., Fortelius, W. y Hanski, I. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392: 491-494.
- Slate, J., Kruuk, L.E.B., Marshall, T.C., Pemberton, J.M. y Clutton-Brock, T.H. 2000. Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 1657-1662.
- Thornhill, N.W. 1993. *The natural history of inbreeding and outbreeding*. The University of Chicago Press, Chicago & London.
- Wildt, D.E., Rall, W.F., Critser, J.K., Monfort, S.L. y Seal, U.S. 1997. Genome resource banks. Living collections for biodiversity conservation. *Bioscience* 47: 689-698.
- Wildt, D.E. y Wemmer, C. 1999. Sex and wildlife: the role of reproductive science in conservation. *Biodiv. Conserv.* 8: 965-976.