

Reproducción / Banco de Recursos Biológicos Cría en Cautividad del Lince Ibérico

Actividades desarrolladas (2002-2004)

Eduardo Roldan, *Museo Nacional de Ciencias Naturales, c/José Gutiérrez Abascal 2, 28006-Madrid, roldane@mncn.csic.es*

Banco de Germoplasma de Especies Silvestres Amenazadas (BanGES) Convenio Ministerio de Medio Ambiente – CSIC

Se firma el 10 de Octubre de 2003 un convenio entre el MIMAM y el CSIC para desarrollar en el Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN) el BanGES.

Eduardo Roldán es designado Investigador Responsable de esta iniciativa.

Los Objetivos del proyecto son:

- **Desarrollar la investigación necesaria para definir protocolos de crío-preservación de gametos en especies de mamíferos silvestres, con el objetivo de comenzar el establecimiento de un banco de germoplasma.**
- Poner a punto técnicas de congelación de gametos que permitan preservar el patrimonio genético de especies de mamíferos silvestres amenazados.
- Conservar muestras que permitan desarrollar en el futuro programas de transferencia de germoplasma entre hábitats fragmentados, entre poblaciones naturales y programas de cría en cautividad, o en programas de reintroducción de especies.
- Poner a punto técnicas de recolección, transporte, cultivo y congelación de muestras de tejidos viables de especies de mamíferos silvestres con el fin de complementar el material biológico a conservar en el banco de germoplasma.
- Contribuir a la difusión de información sobre preservación de germoplasma de especies silvestres entre las Comunidades Autónomas y centros de cría en cautividad y rehabilitación de especies amenazadas.

La priorización de las especies de mamíferos ibéricos amenazadas se centra en el lince ibérico y en el visón europeo. Sin embargo, a la vista de las dificultades para acceder inicialmente a material proveniente de estas especies, se utilizarán especies modelos para desarrollo de protocolos de trabajo. Las especies modelo serán el gato doméstico y el lince europeo (para el lince ibérico) y el visón americano (para el visón europeo).

El plan de trabajo incluye:

- Obtención y evaluación de semen de felinos y mustélidos.
- Desarrollo de protocolos de congelación de semen de felinos y mustélidos.
- Obtención, cultivo y congelación de fibroblastos.

Trabajos desarrollados y en curso

Obtención, evaluación y congelación de semen de felinos y mustélidos

Se ha incorporado al BanGES una becaria para desarrollar este trabajo.

Se han logrado acuerdos con clínicas veterinarias y Sociedades Protectoras para obtener material de gato doméstico. Se encuentran en curso trabajos de obtención y evaluación de espermatozoides de gato. Se están examinando diversos métodos de evaluación de calidad

espermática: motilidad, tinciones vitales, integridad de acrosoma, integridad morfológica, y estado funcional mediante colorantes fluorescentes. Los resultados obtenidos sugieren actualizar los métodos sugeridos en el Manual de Protocolos del Plan de Cría en Cautividad. Se están iniciando en la actualidad trabajos de congelación de semen evaluando diversos diluyentes, métodos de envasado de las dosis, y curvas de enfriamiento y congelación. Estos resultados nos ayudarán a completar los protocolos considerados en el Manual.

Obtención, transporte y cultivo de fibroblastos

Se han utilizado ratones de laboratorio y ungulados silvestres como modelo para la primera etapa de estos estudios. Se han examinado métodos de obtención de biopsias, acondicionamiento para el transporte a 5°C, congelación de biopsias en diferentes medios de cultivo y a diferentes temperaturas siguiendo diversas curvas de congelación.

Se ha examinado la viabilidad y la proliferación de fibroblastos en cultivo obtenidos a partir de las muestras obtenidas inmediatamente después de la biopsia o mantenidas 24 ó 48 h a 5°C o temperatura ambiente, o de muestras provenientes de cadáveres conservados durante 24 ó 48 h. Se está estudiando actualmente opciones de congelación de fibroblastos cultivados.

Entrenamiento de personal; intercambio con otros grupos de investigación

Estancia de becario predoctoral en el Wildlife Biological resource Centre (WBRC), Sudafrica

Estancia de 4 meses (programa FPI-MCYT) entre junio-octubre 2003.

Práctica de evaluación y congelación de semen de felinos silvestres (león, leopardo)

Práctica de recogida y procesado de muestras de ungulados y felinos para banco de recursos genéticos.

Visita al Wildlife Biological resource Centre (WBRC), y DeWilt Cheetah Breeding Centre, Sudafrica

E. Roldan y M. Gomendio visitan en septiembre 2003 el WBRC, dependiente del Endangered Wildlife Trust (EWF). Se conoce el banco de recursos genéticos, los laboratorios de biotecnologías de la reproducción y los laboratorios móviles para trabajo de campo. Se debaten iniciativas de colaboración futura e intercambio y entrenamiento de personal.

Se visita también el centro DeWildt para cría de guepardo en cautividad con el fin de conocer usos de técnicas evaluación de fertilidad y de reproducción asistida, así como métodos de manejo reproductivo (apareamientos).

Estancia de becaria predoctoral en el Conservation and Research Centre, Smithsonian Institution, USA.

Estancia de 2 semanas en marzo 2004.

Entrenamiento en técnicas de obtención, evaluación y congelación de semen de mustélidos y felinos.

Trabajos relacionados del Grupo de Ecología y Biología de la Reproducción (MNCN-CSIC); coordinadores: E. Roldan y M. Gomendio

Efectos negativos de la consanguinidad sobre calidad del semen de 3 especies de gacelas

Se ha encontrado una relación negativa entre la consanguinidad y la calidad del semen de las 3 especies. Estudios más recientes se han centrado en el análisis de los efectos de la consanguinidad sobre aneuploidías de los espermatozoides o integridad del ADN de los mismos (que podrían incidir en mortalidad embrionaria).

Congelación de semen de 3 especies de gacelas amenazadas

En los últimos 3 años se ha trabajado en el desarrollo de protocolos de congelación de tres especies de gacelas en peligro de extinción. Se han examinado diferentes diluyentes que

varían en buffer, azúcares, y concentraciones de glicerol y yema de huevo. Se han encontrado diferencias entre las especies en relación a su crioresistencia, y una relación negativa entre consanguinidad y la capacidad de sobrevivir a un proceso de congelación-descongelación. Se colabora en la organización de un banco de recursos genéticos de estas 3 especies.

Sincronización de celo y análisis de hormonas gonadales en gacelas

Se han realizado ensayos de sincronización de celo y, con el fin de monitorizar resultados, se han realizado análisis de estradiol, progesterona y cortisol mediante radioinmunoensayo.

Publicaciones de trabajos relacionados (que demuestran la experiencia adquirida sobre reproducción en especies amenazadas)

Artículos

Garde JJ, Soler AJ, Cassinello J, Crespo C, Malo, AF, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS (2003) Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorri* and *G. dorcas neglecta*). *Biology of Reproduction* 69: 602-611.

Garde J, del Olmo A, Soler AJ, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS (0000) Improving semen cryopreservation protocols for the establishment of a genetic resource bank of endangered Mohor gazelle (*Gazella dama mhorri*) (enviado)

Garde J, del Olmo A, Soler AJ, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS (0000) Effect of various diluents on semen cryopreservation of endangered Cuvier's gazelle (*Gazella cuvieri*) (enviado).

Roldan ERS, Carballada R, Garde JJ, Espeso G, Gomendio M (0000) Inbreeding effects on DNA content and integrity in spermatozoa of endangered ungulates. (enviado)

Congresos internacionales

Roldan ERS, Soler AJ, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Garde J (2002) Effect of various diluents on sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles. *9th International Symposium on Spermatology*, Cape Town, South Africa, 6-11 Octubre 2002.

Garde JJ, del Olmo A, Soler AJ, Espeso G, Gomendio M, Roldan ERS (2003) Improving semen cryopreservation protocols for the establishment of a genetic resource bank of endangered Mohor gazelle (*G. dama mhorri*). *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.

Carballada R, Roldan ERS, Garde J, Espeso G, Gomendio M (2003) Inbreeding effects on DNA content and integrity in spermatozoa of endangered ungulates. *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.

Malo AF, Martinez Pastor F, Olivier F, Spies T, Roldan ERS, Bartels P (2004) Effect of refrigeration and cryopreservation on the quality of lion epididymal sperm. *Annual Conference of the International Embryo Transfer Society*, Portland, Oregon, USA, 10-13 Enero 2004.

Capítulos de libro

Roldan ERS., Soler AJ, Crespo C, Malo AF, Espeso G, Gomendio M, Garde J (2002) Semen cryopreservation in endangered gazelles. En: *Proceedings of the 9th International Symposium on Spermatology*. G. van der horst, D. Franken, R. Bornman, T. Bornman, S. Dyer, eds. Monduzzi Editore, Bologna, pp. 139-142.

Roldan ERS, Garde JJ (2004) Biotecnología de la reproducción y conservación de especies en peligro de extinción. En: *Biodiversidad y Conservación*, M Gomendio, ed. Fundación BBVA, Madrid (en prensa).