

# CONSERVACIÓN DE TEJIDOS Y CÉLULAS DE LINCE IBÉRICO (*Lynx pardinus*), LINCE BOREAL (*L. lynx*) Y LINCE ROJO (*L. rufus*) PARA EL ESTABLECIMIENTO DE UN BANCO DE RECURSOS GENÉTICOS

CRISTINA CRESPO, NATALIA GAÑÁN, LAURA PULIDO, GEMA OSUNA,  
MONTSERRAT GOMENDIO Y EDUARDO R. S. ROLDÁN

Grupo de Ecología y Biología de la Reproducción.  
Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), 28006 Madrid.

## RESUMEN

Multitud de especies se encuentran en graves dificultades para mantener poblaciones viables en libertad, siendo éste el caso del lince ibérico, el felino más amenazado del planeta. A pesar de los esfuerzos para su conservación en su medio natural los censos poblacionales indican un descenso en el número de individuos. Es urgente, por tanto, poner en marcha una herramienta dirigida a la conservación *ex situ*, tratando de almacenar un máximo de diversidad genética en un banco de recursos genéticos disponible para uso en el futuro mediante tecnologías reproductivas. Se recogieron explantes de tejidos, tanto de necropsias como de biopsias, y se enviaron al laboratorio mediante un dispositivo eficaz de aislamiento térmico. Parte del tejido se congeló y el resto se procesó para su incubación, criopreservando las células obtenidas. Explantes y fibroblastos se conservan almacenados en nitrógeno líquido. Se utilizaron como modelo tejidos de lince rojo y lince boreal. Se congelaron células de 2 lince rojos, que iniciaron cultivo tras 9 meses criopreservados, y de 7 lince boreales, congelando células en el 57% de los casos. Se obtuvieron biomateriales de 13 lince ibéricos: 7 biopsias, de las que se congelaron células del 86% de los individuos, y 6 necropsias, de las que se congelaron tejidos en todos ellos (100%) y células del 67% de los casos. El éxito en la obtención de células vivas a partir de biopsias y de necropsias pone de manifiesto el inestimable valor del rescate de estos biomateriales, permitiendo la conservación de estos genotipos para uso futuro.

Palabras clave: banco recursos genéticos, criopreservación, explantes, fibroblastos, lince ibérico.

## ABSTRACT

*Conservation of tissue and cells from Iberian lynx (Lynx pardinus), Eurasian lynx (L. lynx) and bobcats (L. rufus) to establish a genetic resource bank*

Many species face considerable difficulties in maintaining viable populations under natural conditions. This is the case of the Iberian lynx, the most endangered felid in the world. Despite

substantial conservation efforts in its natural habitat, the population size is decreasing. Thus, *ex-situ* conservation strategies must be implemented, aimed at preserving the maximum genetic variation through conserving biomaterials in a genetic resource bank, and the future use of these materials by means of reproductive biotechnologies. We obtained tissue explants from biopsies and necropsies, and transported them to the laboratory under thermal isolation. Part of the tissue was cryopreserved and the rest was incubated to collect and cryopreserve fibroblasts. Tissue samples and fibroblasts are currently cryopreserved in liquid nitrogen. We used skin samples from bobcats and Eurasian lynxes as models. Tissue and cells from 2 bobcats were cryopreserved and viable cells were recovered after being preserved for 9 months. Skin samples were biopsied from 7 Eurasian lynxes and cells were preserved from 57% of the animals; the main problem encountered was contamination during sample collection and transport. Biomaterials from 13 Iberian lynxes were obtained (7 biopsies, 6 necropsies). Cells were obtained and cryopreserved from 86% of biopsies. Regarding necropsy tissue, samples were cryopreserved for all individuals (100%), and cells from 67% of them. The successful cryopreservation of tissue and cells from live and dead lynxes highlights the advantages of rescuing these genotypes and the potential use of these biomaterials.

Key words: cryopreservation, genetic resource banks, Iberian lynx, skin samples fibroblasts.

## INTRODUCCIÓN

El lince ibérico (*Lynx pardinus*) es el felino más amenazado del planeta, considerado "En Peligro Crítico" de extinción (Nowell y Jackson 1996, IUCN 2004). El tamaño de población es inferior a 200 individuos (Guzmán *et al.* 2004) y actualmente sólo existen núcleos reproductores en el sur de la Península Ibérica, en Doñana y Sierra Morena, y ambas poblaciones están aisladas. En una situación como ésta es fundamental potenciar todas las acciones dirigidas a la conservación de la especie, con estrategias complementarias *in-situ* y *ex-situ*, que contribuyan a mantener la diversidad genética actual. Con este objetivo, y como complemento a los esfuerzos de conservación *in-situ* que se vienen realizando desde hace décadas, se considera fundamental la puesta en marcha de medidas de conservación *ex-situ* como la creación de un Banco de Recursos Genéticos.

La disponibilidad del material biológico conservado en estos bancos ofrece muchas ventajas pues no sólo supone un ahorro de dinero, al resultar más económico el intercambio de estos biomateriales que el de animales, sino que además evita los riesgos sanitarios asociados a la introducción de individuos en poblaciones diferentes y se elimina la necesidad de extraer más individuos de poblaciones

naturales si la depresión por consanguinidad amenaza la continuidad de un programa de cría en cautividad.

Los bancos de recursos genéticos constituyen, por lo tanto, una herramienta fundamental para el manejo genético de especies amenazadas al permitir conservar biomateriales con el fin de evitar la consanguinidad y la pérdida de variabilidad genética y brindan la oportunidad de maximizar las oportunidades reproductivas de los individuos vivos y de preservar biomateriales de animales que mueren para posibilitar su reproducción futura (Wildt *et al.* 1997, Karow y Critser 1997). Los biomateriales frecuentemente conservados en bancos de recursos genéticos incluyen semen y embriones y, a partir de esfuerzos más recientes, también óvulos. Estos biomateriales se agrupan generalmente bajo la denominación de “germoplasma”. La criopreservación de semen de animales domésticos es un procedimiento de rutina en algunas especies desde hace muchos años. Más recientemente, se han desarrollado muchos trabajos de investigación con el fin de desarrollar métodos de conservación de espermatozoides de especies silvestres (Watson y Holt 2001). También existen considerables esfuerzos para la conservación y uso de embriones de especies silvestres (Watson y Holt 2001).

En años recientes, y gracias al avance de procedimientos de transferencia de núcleo (clonación) en especies de laboratorio (Nagy *et al.* 2003), de animales domésticos (Cibelli *et al.* 2002), y en especies silvestres (Lanza *et al.* 2000, Loi *et al.* 2001, Gómez *et al.* 2003, 2004), se ha resaltado la ventaja de conservar también tejidos y células somáticas. La conservación de células somáticas viables tiene por tanto, en este contexto, un papel fundamental para el desarrollo de biotecnologías reproductivas.

Para poder conservar tejidos y células somáticas es esencial disponer de protocolos de congelación adecuados. Por ello, se han desarrollado varios estudios en especies domésticas con el fin de caracterizar condiciones adecuadas de obtención y criopreservación de diversos tejidos (Silvestre *et al.* 2002, 2003, 2004). También se ha puesto interés en el desarrollo de procedimientos adecuados de obtención de células de especies silvestres (Caamaño *et al.* 2005). Puesto que las posibilidades de experimentar con ejemplares de especies en peligro de extinción son muy limitadas, es necesario trabajar con especies modelo, que resultarán tanto mejores cuanto más próximas se encuentren, desde un punto de vista filogenético, de la especie de interés. En esta ocasión, como modelo para el lince

ibérico (*Lynx pardinus*), se ha recurrido al lince rojo (*Lynx rufus*) y al lince boreal (*Lynx lynx*).

El objetivo de este trabajo ha sido explorar condiciones de obtención y transporte de muestras de tejidos al laboratorio, así como definir condiciones de cultivo y criopreservación de tejidos y fibroblastos de lince rojo, boreal e ibérico.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los reactivos y medios de cultivo empleados provienen de Sigma (Madrid) o Gibco Invitrogen (Madrid). El material plástico de cultivo de tejidos fue adquirido a Falcon (Becton-Dickinson, Madrid).

Se implementó un sistema de recolección de muestras a partir de necropsias y de biopsias de animales anestesiados para exámenes o procedimientos rutinarios. Mediante este sistema, las muestras se conservaron en medio de transporte de biopsias (MTB) basado en “Medio Independiente de CO<sub>2</sub>” con 10% de suero fetal bovino inactivado y suplementado con 200 µg/ml de penicilina-estreptomina, 100 µg/ml de gentamicina, y 5 µg/ml de anfotericina B y se trasladaron al laboratorio a 5°C en un contenedor con aislamiento térmico.

El material recepcionado se lavó en abundante D-PBS y, en el caso de las necropsias, parte del tejido se criopreservó en medio de congelación de biopsias (MCB) preparado a partir del MTB suplementado con el 10% del crioprotector (DMSO) en criotubos, refrigerando 2 horas a 5°C, congelando a -80°C toda la noche y almacenado en nitrógeno líquido a -196°C. En todos los casos se procesó el tejido mediante troceado manual sobre una placa de 35 mm de diámetro para su incubación en medio D-MEM con 10% de suero bovino inactivado, L-glutamina al 1%, 100 µg/ml de penicilina-estreptomina y 2,5 µg/ml de anfotericina B a 37°C en atmósfera húmeda con el 5% de CO<sub>2</sub> en aire.

Las células obtenidas de los explantes crecieron ocupando la superficie del recipiente hasta alcanzar confluencia, momento en el que se realizó un primer pasaje para incrementar el número de fibroblastos, lavando con D-PBS y levantando la monocapa con Tripsina-EDTA al 0,25% dejando actuar 5 minutos, neutralizando la acción enzimática con D-MEM completo. A continuación se centrifugó 5 minutos a 1.000 r.p.m. a 20°C, se resuspendieron las células con D-MEM completo y se sembraron en una botella de 25 cm<sup>2</sup>. Se repitió el proceso en un segundo

pasaje, subcultivando en una botella de 75 cm<sup>2</sup>. Una vez alcanzada la confluencia en el recipiente de mayor tamaño, se tripsinizaron las células y se evaluó la viabilidad mediante tinción vital con azul tripán y se estimó la concentración celular (Davis 2002). Los fibroblastos se criopreservaron en medio D-MEM completo con 10% de DMSO en criotubos debidamente rotulados, refrigerando 2 horas a 5°C, congelando a -80°C durante toda la noche y almacenado en nitrógeno líquido a -196°C.

Se comprobó la eficacia de la criopreservación cultivando células descongeladas de algunos individuos. La descongelación rápida se realizó sacando los criotubos del nitrógeno y sumergiéndolos 2 minutos directamente en un baño maría a 37°C, desinfectando el criotubo con alcohol al 70% antes de abrir. El DMSO se neutralizó con DMEM y se centrifugó 5 minutos a 1.000 r.p.m. a 20°C. Las células se resuspendieron en D-MEM completo comprobando la viabilidad antes de sembrarlas en una botella de 75 cm<sup>2</sup>.

## **RESULTADOS**

El protocolo de recogida y transporte de las muestras de piel se modificó en ocasiones para rescatar mayor cantidad de material biológico prestando especial atención a las condiciones de obtención de la muestra de los individuos. En dos ocasiones la contaminación de las muestras obligó a una modificación del tipo y concentraciones de antibiótico para el medio de transporte. Inicialmente se empleó 10 µg/ml de penicilina-estreptomicina, y estas cantidades se incrementaron a 200 µg/ml de penicilina-estreptomicina. En ocasiones se añadió también 100 µg/ml de gentamicina y 5 µg/ml de anfotericina B. Se prestó especial atención a las condiciones de asepsia durante el procesado con el fin de evitar contaminaciones. Aún así, se observó en ocasiones la pérdida de los cultivos por contaminación masiva de las muestras.

Se obtuvieron muestras de 2 linceos rojos mediante biopsia de piel; estas muestras se obtuvieron aprovechando las ocasiones en las que se realizaba anestesia de los animales para otros procedimientos. En estos animales se pudo obtener desarrollo de fibroblastos en ambos casos, y se congelaron células también en ambas ocasiones (Tabla 1). Con el fin de examinar la viabilidad de los procedimientos de criopreservación las células se descongelaron y se procedió a cultivo celular.

Las células conservaron la viabilidad y fueron capaces de iniciar cultivo después de 9 meses almacenadas en nitrógeno líquido.

TABLA 1

Relación de individuos de tres especies de lince procesados desde Mayo 2004 hasta Agosto 2005 y conservados en nitrógeno líquido (-196°C) discriminando, en cada caso, el material tisular del material celular. El bajo rendimiento en algunos casos se ha debido a contaminaciones o a un tiempo prolongado entre la obtención del material, transporte e inicio del cultivo celular.

*Individuals of three lynx species for which samples have been collected and processed from May 2004 to August 2005 and cryopreserved in liquid nitrogen (-196°C), discriminating tissue samples and cells. Low output in a few cases was due to contamination or a long time between collection and initiation of tissue culture.*

	lince rojo ( <i>Lynx rufus</i> )	lince boreal ( <i>Lynx lynx</i> )	lince ibérico ( <i>Lynx pardinus</i> )	
Procedencia del explante	biopsia	biopsia	biopsia	necropsia
Nº individuos	2	7	7	6
Nº individuos con tejidos conservados a -196°C	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)
Nº individuos con células conservadas a -196°C	2 (100%)	4 (57%)	6 (86%)	4 (67%)

Se obtuvieron biopsias de piel de 7 lince boreales, aprovechando también las capturas y anestésicas realizadas para otros procedimientos. De estos individuos se obtuvo crecimiento en cultivo en 4 ocasiones (57%) y de todos estos individuos se criopreservaron células (Tabla 1); los casos de crecimiento negativo se debieron a contaminaciones o a un tiempo demasiado prolongado entre la obtención de la biopsia y el inicio del cultivo celular.

Se obtuvieron muestras de piel de 13 lince ibéricos (Tabla 1). Las muestras procedieron, por una parte, de 7 biopsias realizadas con ocasión de exámenes sanitarios. A partir de este material se obtuvo crecimiento en cultivo (Figura 1) en 6 ocasiones (86%) y se criopreservaron células en estos casos. De estas muestras de piel, obtenidas por biopsia, no se criopreservaron trozos de tejido debido a la limitada cantidad de material recibido (2 trozos de 5 mm cada uno). Por otra parte, se rescataron tejidos de 6 animales muertos. Se obtuvieron muestras de piel

y se criopreservan en todas las ocasiones. Se realizaron, además, cultivos de tejidos y se obtuvieron células, con posterior criopreservación en el 67% de los casos.

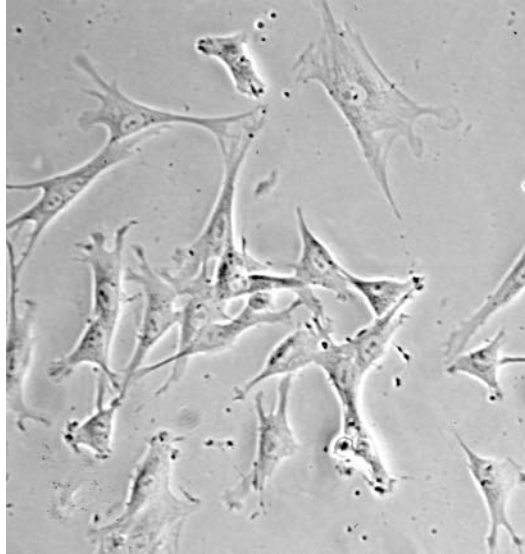


Figura 1. Fibroblastos de lince ibérico en cultivo pertenecientes a “Brisa”, hembra de la primera camada de lince ibérico nacida en cautividad.

*Fibroblasts obtained after incubation of Iberian lynx skin samples from “Brisa”, a female from the first litter born in captivity.*

Se evaluó el efecto del tiempo transcurrido desde el momento de la obtención de la muestra hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio sobre el éxito del crecimiento celular en cultivo. Los análisis se realizaron para el total de muestras recibidas sin discriminar entre especies de lince. El éxito del inicio del cultivo (es decir, el número de muestras con crecimiento celular en relación al total) disminuyó a medida que transcurrió más tiempo desde el muestreo (Figura 2). Transcurridas 12 horas se observó crecimiento en el 77,8% de las muestras procesadas (que fue del 100% si se eliminan del análisis las muestras que se contaminaron). Con 24 horas hasta el inicio del cultivo se observó crecimiento en el 73,3% de los casos. Y, finalmente, tras 48 horas tan solo iniciaron crecimiento en cultivo el 66,7% de las muestras. En relación al tiempo que tardaron las células en crecer a partir del explante (teniendo en cuenta los cultivos en los que se observó crecimiento), los

resultados reflejan que el incremento de unas horas en el tiempo transcurrido hasta el comienzo del cultivo retrasó unos días el inicio del crecimiento (Figura 3). Se observaron diferencias significativas entre los cultivos procesados en el mismo día (12 horas) y los procesados a las 24 horas ( $p < 0,02$ ) y 48 horas ( $p < 0,005$ ).

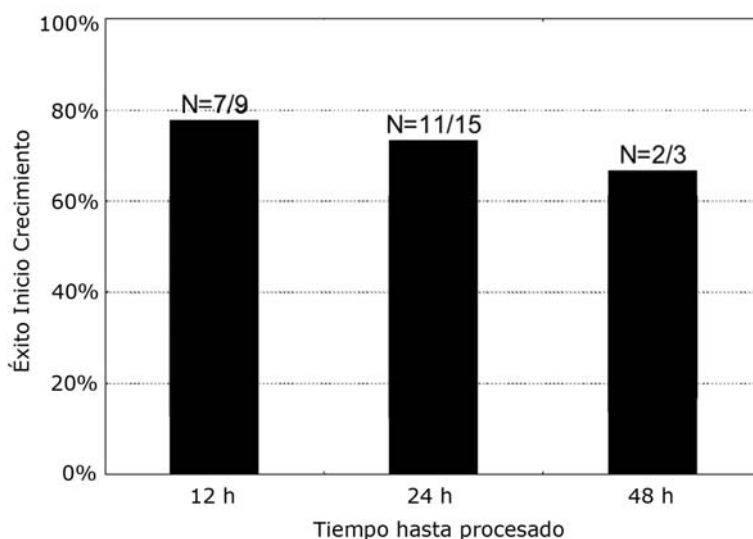


Figura 2. Proporción de cultivos que mostraron crecimiento celular según el tiempo transcurrido desde la obtención de la muestra de tejido hasta el inicio del cultivo.

*Proportion of cultures showing cell growth depending on the time elapsed from sampling until the beginning of tissue culture.*

Se cuantificó para las tres especies el tiempo en que los fibroblastos comenzaron a emerger del explante, el tiempo de crecimiento hasta alcanzar confluencia, y el tiempo necesario para completar 2 pasajes y realizar congelación de células. Se observó en bobcats y lince boreales períodos similares para las tres fases del protocolo de obtención de células y congelación (Figura 4). Estos períodos fueron de aproximadamente 7 días para la emergencia de los fibroblastos del explante, 18 días para el crecimiento, y 29 días para completar la congelación. En lince ibérico se observó que, si bien las dos primeras fases eran de una duración similar, el tiempo necesario para completar el proceso de crecimiento y criopreservación se extendía durante más tiempo hasta un total de 40-43 días.



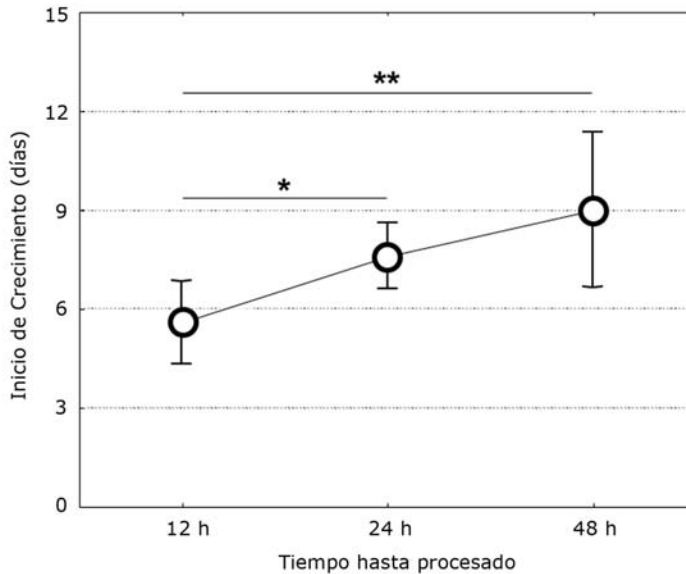


Figura 3. Efecto del tiempo transcurrido entre el muestreo y el procesamiento de epidermis en el laboratorio sobre el tiempo de inicio del crecimiento celular en el cultivo primario. Los valores son medias  $\pm$  error estándar. Diferencias significativas: \* $p < 0,02$ ; \*\* $p = 0,005$ .

*Effect of time elapsed between skin sampling and processing on the start of cellular growth in the primary culture. Values are means  $\pm$  standard error. Statistically significant differences between time groups, \* $p < 0.02$ ; \*\* $p = 0.005$ .*

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que es posible obtener y procesar tejidos de tres especies de lince para el establecimiento de un banco de recursos genéticos. Se han encontrado dificultades en el mantenimiento de la viabilidad de los cultivos, tanto por problemas debidos a contaminación, como por el tiempo transcurrido entre la obtención de las muestras y el inicio del cultivo celular. Sin embargo, estos problemas se han podido superar en gran medida y se ha logrado establecer un protocolo de procesamiento de muestras que se emplea de rutina en la actualidad.

A pesar del escaso número de individuos con el que se ha podido trabajar y las distancias entre los sitios de alojamiento de los animales, o el lugar de las necropsias, y el laboratorio, se ha podido realizar una puesta a punto de un sistema de recolección, transporte y procesamiento de las muestras. Se inició este trabajo con

especies modelo (bobcats y lince boreal) y también se ha tenido la oportunidad de acceder a muestras de piel de lince ibérico recolectadas durante procedimientos de exámenes sanitarios. Finalmente, y debido a las muertes de individuos de lince ibérico (principalmente por atropellos en carretera), se ha contado también con la ocasión de realizar rescate de biomateriales con material procedente de necropsias.

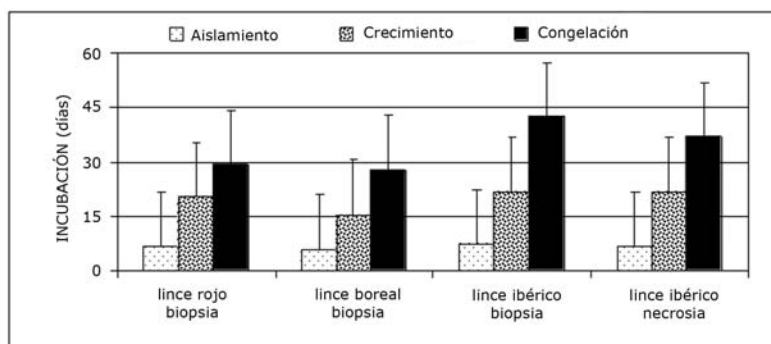


Figura 4. Cultivo de tejidos de tres especies de lince: bobcat (*Lynx rufus*), lince boreal (*L. lynx*) y lince ibérico (*L. pardinus*). Los resultados indican el tiempo de emergencia de células desde los explantes, el tiempo de crecimiento hasta confluencia, y el tiempo necesario para completar 2 pasajes y congelación.

*Tissue culture in three lynx species: bobcat (Lynx rufus), Eurasian lynx (L. lynx) and Iberian lynx (L. pardinus). Results indicate the time for emergence of cells from explants, time to confluence and time needed for 2 passages and freezing of cells.*

Se encontraron diferencias en el éxito del procesado de tejidos. En el caso de los lince boreales, la proporción de éxito de crecimiento de células en cultivo fue bajo, en parte debido a contaminaciones pero, principalmente, por el tiempo transcurrido entre la recolección de las muestras y el inicio del cultivo, resultando subóptimo un intervalo mayor de 12 horas para procesar los tejidos, observación que se ha realizado en otras especies (Silvestre *et al.* 2004). En el caso de lince ibérico, especie en la que se ha podido comparar el éxito de crecimiento de células en cultivo, según se obtuvieran las muestras de piel mediante biopsia o procedente de necropsia, se observó que se desarrolla una proporción mayor de muestras a partir de biopsias que de necropsias, fenómeno que se debe en parte a

la contaminación de las muestras. Las muestras de necropsias, sin embargo, permiten criopreservar tejidos antes de cultivar ya que, en general, se puede recoger mayor cantidad de tejido (piel).

Con el fin de disminuir la contaminación de las muestras se examinaron diversos tratamientos antibióticos, así como diversas concentraciones de los mismos. Se ha visto que con un incremento en las concentraciones de antibióticos, y la adición de antifúngicos, se mejora notablemente el éxito de los cultivos, observación que también se ha realizado en otras especies silvestres (Caamaño *et al.* 2005). Se observó también que los episodios de contaminación procedentes de las necropsias ocasionan también la contaminación de cultivos que proceden de biopsias cuando se cultivan en el mismo incubador. Por este motivo, se sugiere la criopreservación rutinaria de la mitad del material procedente de necropsias o, en ocasiones, la criopreservación completa de las muestras con cultivo posterior, cuando la posibilidad de contaminación de otras muestras sea mínima.

En otros estudios (Caamaño *et al.* 2005) se ha procedido a disgregar el tejido muestreado mediante tratamiento enzimático con colagenasa. En nuestro estudio, se ha preferido no realizar esta manipulación para permitir el explante espontáneo de las células. En trabajos futuros se realizará una comparación de las características de las células obtenidas según estos diferentes procedimientos.

El desarrollo de este trabajo también ha permitido poner en evidencia la necesidad de un transporte rápido de las muestras al laboratorio, especialmente en el caso de las necropsias. Si bien el tiempo de transporte en sí puede no ser prolongado (por ejemplo, durante la noche, por mensajería), a esto se ha de sumar el tiempo que puede haber transcurrido hasta detectar un cadáver, más el tiempo necesario para el transporte del cadáver y la necropsia del mismo. Este tiempo adicional incrementa la contaminación del material y afecta negativamente a las posibilidades de éxito en el crecimiento de células.

En conclusión, este estudio demuestra la posibilidad de conservar tejidos y células vivas a partir de biopsias y necropsias de lince modelo y de lince ibérico, y resalta el enorme valor del rescate y conservación de biomateriales de individuos de especies amenazadas para usos futuros en estudios de biología de estas especies y aplicación mediante biotecnologías reproductivas.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece enormemente la colaboración de las instituciones que nos han facilitado acceso a animales, Zoobotánico de Jerez, Zoo de Almería, Zoo de Barcelona, Valwo (Valladolid), Centro de Recuperación de Fauna de Los Hornos (Cáceres) y el Programa de Conservación *Ex-Situ* del Lince Ibérico. Este estudio ha sido financiado mediante Convenio entre el Ministerio de Medio Ambiente y el CSIC para el “Banco de Germoplasma de Especies Silvestres Amenazadas”.

## REFERENCIAS

- CAAMAÑO, J. N., M. HERMSEN, J. MARCOS, A. MEANA, C. ALONSO, F. GOYACHE, M. PRIETO, A. ESPÍ, L. J. ROYO, C. DIEZ, G. PAJARES, D. VILLANÚA, S. BORRAGÁN, R. S. PRATHER Y E. GÓMEZ (2005). A procedure to obtain fibroblasts from wild animals. *Reproduction, Fertility and Development*, 17: 245.
- CIBELLI, J., L. P. LANZA, K. H. S. CAMPBELL Y M. D. WEST (2002). *Principles of Cloning*. Academic Press, San Diego.
- DAVIS, J. M. (2002). *Basic cell culture*. 2nd edition, Oxford University Press, Oxford. 381 pp.
- GÓMEZ, M. C., J. A. JENKINS, A. GIRALDO, R. F. HARRIS, A. KING, B. L. DRESSER Y C. E. POPE (2003). Nuclear transfer of synchronized african wild cat somatic cells into enucleated domestic cat oocytes. *Biology of Reproduction*, 69: 1032-1041.
- GÓMEZ, M. C., C. E. POPE, A. GIRALDO, L. A. LYONS, R. F. HARRIS, A. L. KING, A. COLE, R. A. GODKE Y B. L. DRESSER (2004). Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning and Stem Cells*, 6: 247-258.
- GUZMÁN, J. N., F. J. GARCÍA-GONZÁLEZ, G. GARROTE-ALONSO, R. PÉREZ DE AYALA Y M. C. IGLESIAS-LLAMAS (2004). *El lince ibérico (Lynx pardinus) en España y Portugal. Censo-diagnóstico de sus poblaciones*. Dirección General para la Biodiversidad, Madrid. 184 pp.
- IUCN (2004). *2004 IUCN Red List of Threatened Species*. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Downloaded on 15 March 2006.
- KAROW A. M. Y J. K. CRITSER (1997). *Reproductive Tissue Banking*. Academic Press, San Diego.
- LANZA R. P., J. B. CIBELLI, F. DÍAZ, C. T. MORAES, P. W. FARIN, C. E. FARIN, C. J. HAMMER, M. D. WEST Y P. DAMIANI (2000). Cloning of an endangered species (*Bos gaurus*) using interspecies nuclear transfer. *Cloning and Stem Cells*, 2: 79-90.
- LOI, P., G. PTAK, B. BARBONI, J. FULKA JR., P. CAPPAL Y M. CLINTON (2001). Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nature Biotechnology*, 19: 962-964.

- NAGY, A., M. GERTSENSTEIN, K. VINTERSTEN Y R. BEHRINGER (2003). *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- NOWELL, K. Y P. JACKSON (1996). *Wild Cats. Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Cat Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland.
- SILVESTRE, M. A., A. M. SAEED, R. P. CERVERA, M. J. ESCRIBA Y F. GARCÍA-XIMÉNEZ (2003). Rabbit and pig ear skin sample cryobanking: effects of storage time and temperature of the whole ear extirpated immediately after death. *Theriogenology*, 59: 1469-1477.
- SILVESTRE, M. A., A. M. SAEED, M. J. ESCRIBA Y F. GARCÍA-XIMÉNEZ (2002). Vitrification and rapid freezing of rabbit fetal tissues and skin samples from rabbits and pigs. *Theriogenology*, 58: 69-76.
- SILVESTRE, M. A., J. P. SÁNCHEZ Y E. A. GÓMEZ (2004). Vitrification of goat, sheep, and cattle skin samples from whole ear extirpated after death and maintained at different storage times and temperatures. *Cryobiology*, 49: 221-229.
- WATSON, P. F. Y W. V. HOLT (eds.) (2001). *Cryobanking the genetic resource. Wildlife conservation for the future?* Taylor and Francis, London.
- WILDT, D. E., W. F. RALL, J. K. CRISTEER, S. L. MONFORT Y U. S. SEAL (1997). Genome Resorce Bank. Living collections for biodiversity conservation. *Bioscience*, 47: 689-698.