



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

“Genotipificación de ocelotes (*Leopardus pardalis*) en apoyo a programas de conservación en cautiverio”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

Mauricio Gutiérrez Sánchez Rued

Tutor Principal:

Fernando Gual Sill

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Comité Tutoral:

Bertha Patricia Escalante Pliego

Instituto de Biología

Rogelio Alonso Morales

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Asesoría:

Rocío del Pilar Rueda Zozaya

Universidad Abierta y a Distancia de México

Marco Tulio Solano De la Cruz

Instituto de Ecología

Ciudad Universitaria, CDMX, febrero de 2023.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM por aceptarme en el posgrado y formarme desde la licenciatura.

Al CONACyT por apoyarme como becario durante el desarrollo de mi posgrado.

A Marco y Pilar, por su incondicional apoyo en todos los sentidos requeridos durante la elaboración del proyecto. Gracias a los dos, porque sin ustedes no sé qué habría hecho.

A la Dra. Patricia Escalante, por brindarme su apoyo y facilidades para desarrollar el proyecto.

Al Dr. Fernando Gual, por permitirme desarrollar este proyecto bajo su asesoría y apoyo para los procedimientos anestésicos.

A mi Comité Tutoral por asesorarme en la realización de este trabajo.

A Danae Arizbeth por apoyarme en todos los manejos para la toma de muestras, el procesamiento de las muestras en el laboratorio hasta que anocheciera o Marco nos dijera "ya vámonos" y en el análisis y escrito de la tesis. ¡Gracias Flaca, eres increíble!

A la Dra. Laura Márquez y la M. en C. Nelly López del LaNaBio por analizar las muestras en el secuenciador.

A Enrique Ramírez de la Estación de Biología Chamela, a Livia León del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias y a Consuelo Lorenzo y Jorge Bolaños de El Colegio de la Frontera Sur, por facilitarme muestras.

A Celeste Martínez por correr algunos de los análisis presentados en el trabajo.

A los Zoológicos y Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre, así como a todo su personal por brindar la facilidad y el apoyo para la toma de muestras y por participar en los esfuerzos para la conservación del ocelote:

- Centro de Interpretación y Convivencia con la Naturaleza YUMKA´.
 - Centro de Rescate, Rehabilitación y Reubicación de Grandes Carnívoros: Invictus.
 - Croco Cun Zoo.
 - Dirección General de Zoológicos y Conservación de la Fauna Silvestre: Zoológico de Chapultepec y Zoológico San Juan de Aragón.
 - Hacienda Noc-Ac.
 - Parque Museo La Venta.
 - Parque Zoológico del Centenario.
 - Reserva de Fauna Silvestre Vallazoo.
 - Zoológico de Guadalajara.
 - Zoológico Miguel Álvarez del Toro.
 - Al MVZ. Mario Buil por recibirnos y facilitarnos la muestra del ocelote Tepache.
- A A. E. por ayudarme con una gran cantidad de artículos.

A mi familia por siempre estar presente en las buenas y en las malas.

Ocelote

Con lentitud dibuja la estela de muerte sobre el polvoso camino en la sabana, arrastrando el cadáver de la delicadeza.

Que los conejos se escondan, víctimas del dolor en la quijada.



Que se remonten días, sueños, ateridas cargas de suplicio inquebrantable.

La maquinaria de manchas recorre pastos tras la erosión de los de las cactáceas.

Suda posibilidades inhóspitas en esta agreste agonía de la tierra. Pero la soledad abarca hasta las nubes que derraman angustia sobre las bromelias incrustadas en los árboles, olvidadas, alrededor de la sabana abierta.

Debajo de la frescura se esconde la muerte.

El ocelote marcha, necesario, estridente, pegajoso, por las innumerables dobleces de la noche, hasta verter sangre en este polvoriento hábitat.



Anónimo.

Índice	
Resumen	6
Abstract	7
Introducción	9
Felinos en México	9
El ocelote	9
Genética para la conservación de la vida silvestre	12
Marcadores moleculares	14
Cebador universal CAG tag	17
Antecedentes	18
Estado de conservación y efectos de la reducción poblacional	18
Los zoológicos como centros de conservación	20
Variabilidad genética del ocelote	21
Justificación	22
Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
Hipótesis	24
Material y Métodos	24
Colecta del material biológico	24
Estudio genético: procesamiento y análisis de muestras	26
Extracción de ADN	26
Amplificación de Microsatélites	26
Condiciones de la PCR	28
Obtención de genotipos	30
Estructura genética	30
Variabilidad genética	32
Parentesco entre pares de individuos y cuellos de botella	34
Cruzamientos dirigidos	36
Resultados	37
Obtención de genotipos	37
Estructura genética	38

Variabilidad genética	41
Análisis de parentesco y cuellos de botella	43
Cruzamientos dirigidos	47
Discusión	49
Estructura y variabilidad genética	49
Parentesco y Cruzamientos dirigidos	57
Conclusiones	59
Referencias	61

Resumen

El manejo de ejemplares *ex situ* de especies silvestres bajo cuidado humano es una herramienta importante para la conservación, principalmente en especies que se encuentra en peligro de extinción, como el ocelote (*Leopardus pardalis*). En el presente trabajo se realizó la genotipificación de ocelotes mantenidos bajo cuidado humano en México con base en nueve marcadores microsatélites. Se evaluó la estructura genética de 21 individuos mantenidos bajo cuidado humano de diferentes localidades. Se calcularon algunos parámetros de variabilidad genética como heterocigosis esperada, heterocigosis observada, número medio de alelos, alelos efectivos y riqueza alélica. Los ejemplares de ocelote *ex situ* en México (se tuvo acceso a 21 muestras de ejemplares) mediante un análisis discriminario de componentes principales, mostró una estructura genética heterogénea. Se encontraron valores de diversidad genética altos ($He = 0.79$ y $Na = 9.89$) y no se detectaron cuellos de botella reciente. Con base en la estimación de relaciones de parentesco entre pares de individuos y tomando en cuenta el sexo de cada ejemplar, se proponen cruzamientos dirigidos entre ejemplares bajo un protocolo de minimización de parentesco medio (*Minimizing kinship*), con el cual se podría maximizar la retención de la diversidad genética y diversidad alélica. A pesar del escaso número de individuos analizados, se determinó que los niveles de diversidad genética para los ocelotes bajo cuidado humano en México son altos, sin embargo, estos datos pueden estar sobreestimados debido a que se cuenta con ejemplares de diversas ubicaciones geográficas dentro del país. Es necesario realizar estudios adicionales para conocer la diversidad genética de los ocelotes en vida silvestre de distintas poblaciones y poder comenzar con programas de conservación que

integren las poblaciones silvestres y los ejemplares bajo cuidado humano como reservorio genético a través de una adecuada gestión en México.

Palabras clave: *Leopardus pardalis*, microsatélites, genética de la conservación, genotipificación.

Abstract

The management of *ex situ* specimens of wild species under human care is an important tool for conservation, mainly for endangered species, such as the ocelot (*Leopardus pardalis*). We genotyped ocelots under human care in Mexico using nine microsatellite markers. We determined the genetic structure of the *ex situ* population, parameters of genetic variability such as expected heterozygosity, observed heterozygosity, medium allele, number effective alleles, and allele richness. *Ex situ* ocelot specimens in Mexico (21 individuals) through a discriminant analysis of principal components showed a heterogeneous genetic structure, high genetic diversity values ($H_e = 0.79$ and $N_a = 9.89$) and no recent bottlenecks. With kinship relationships among individuals and taking into account sex information, directed breeding between specimens is proposed under a minimizing kinship protocol to maximize the retention of genetic diversity and allelic diversity. Despite the low number of individuals analyzed, it was determined that the levels of genetic diversity for ocelots in human care in Mexico are high. However, these data should be taken with caution because analyzed specimens come from different geographic areas within the country, for which it is necessary to carry out additional studies to know

the genetic diversity of wild ocelots and their population structure, to be able to start with conservation programs that integrate wild populations and specimens under human care as genetic reservoirs by means of an adequate management in Mexico.

Keywords: *Leopardus pardalis*, microsatellites, genetics of conservation, genotyping.

Introducción

Felinos en México

Los felinos se encuentran clasificados dentro de la familia Felidae (Carnivora) la cual se subdivide en dos subfamilias, Pantherinae que se conforma principalmente por los llamados grandes felinos y Felinae que agrupa principalmente a los llamados pequeños felinos, con un total de 14 géneros de felinos, con aproximadamente 40 especies dentro de la familia (Wilson y Reeder, 2005; Kitchener *et al.*, 2017; Bellani, 2020). Los felinos son animales hipercarnívoros, que se caracterizan por tener miembros delanteros cortos, miembros posteriores musculosos, cuerpo ágil, columna flexible, bulla auditiva de doble cámara, cara acortada, cráneo abovedado, muelas carniceras y garras retráctiles (Sunquist y Sunquist, 2002).

Dentro del territorio mexicano se distribuyen seis especies pertenecientes a cinco géneros: *Herpailurus*, *Leopardus*, *Lynx*, *Panthera* y *Puma* (Ramírez *et al.*, 2008; Servín, 2013; Ceballos, 2014). El puma (*Puma concolor*) y el jaguar (*Panthera onca*) son considerados grandes felinos, mientras que el jaguarundi (*Herpailurus yaguaroundi*), el lince (*Lynx rufus*), el tigrillo (*Leopardus wiedii*) y el ocelote (*Leopardus pardalis*) son considerados medianos y pequeños (Aranda, 2012; Servín, 2013).

El ocelote

El ocelote (*Leopardus pardalis* Linnaeus, 1758), es un felino neotropical endémico del continente americano, con gran relevancia en la dinámica de comunidades, dentro de la cual funge un importante papel como mesodepredador dentro de los hábitats en donde se distribuye (Oliveira *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2019).

A diferencia de la mayoría de los felinos, el ocelote posee 36 cromosomas, lo que es característico de las especies pertenecientes al género *Leopardus* (Wurster-Hill y Centerwall, 1982; Modi y O'Brien, 1988). Su aspecto tiene una coloración amarilla-parda y blanco grisáceo en la parte interior de las extremidades, con manchas negras a café en su pelaje, que en los costados toman la forma de rosetas alargadas con el interior de color café. Presenta orejas redondeadas, erectas, de color negro y con una mancha blanca en la parte posterior, cola anillada y relativamente corta en comparación con sus miembros posteriores, que oscila de los 270 a los 450 mm de longitud. La longitud total del ocelote fluctúa de 700 a 1000 mm, mientras que su peso corporal varía de los 6 a los 16 kg, en donde, regularmente las hembras son de menor talla y peso que los machos (Hall, 1981; Leyhausen, 1990; Murray y Gardner, 1997; Aranda, 2012).

Es un carnívoro solitario, con hábitos terrestres de caza, con actividad diurna y nocturna. Su alimentación consta principalmente de pequeños y medianos mamíferos, como roedores y lagomorfos; además puede alimentarse en menores proporciones de aves, peces, reptiles e insectos. El ocelote es depredado por grandes felinos, serpientes y cocodrilos principalmente (Murray y Gardner, 1997; De Villa Meza *et al.*, 2002; Sunquist y Sunquist, 2002; Aranda, 2005, Briones-Salas *et al.*, 2016).

La distribución de la especie en el continente es muy amplia, abarcando desde los Estados Unidos de América y México a través de América Central, hasta Uruguay y el norte de Argentina (Figura 1) (Stangl y Young, 2011; Avila-Villegas y Lamberton-Moreno, 2013). En México se distribuye por toda la costa del Pacífico y

la costa del Golfo de México, desde el norte de Sonora y Tamaulipas hacia el sur, incluyendo toda la Península de Yucatán (Figura 1) (Hall, 1981; Ceballos, 2014).



Figura 1. Distribución continental del ocelote. Basado en Paviolo *et al.*, 2015.

La presencia del ocelote se asocia a climas cálidos y húmedos, además de tener una clara preferencia por ambientes conservados con densa cobertura vegetal (Aranda, 2005; Ceballos, 2014). Sin embargo, se tienen registros de su presencia en áreas perturbadas con escasa cobertura vegetal (Paviolo *et al.*, 2015). Así mismo, se han observado ocelotes en distintos tipos de hábitat, desde pastizales, selvas tropicales, manglares, hasta bosques de pino-encino (Nowell y Jackson

1996; Sunquist y Sunquist, 2002; Bárcenas y Medellín, 2010). Por otra parte, en algunos trabajos se sugiere que la densidad y abundancia del ocelote está relacionada a otros factores ambientales, como la precipitación, que da como resultado el aumento de la producción primaria de la selva o bosque y esto favorece el aumento en el número de presas disponibles (biomasa de presas) para los depredadores (Di Bitetti *et al.*, 2008; Rocha *et al.*, 2016).

El notable decremento de las poblaciones de ocelotes, así como de otras especies es uno de los más graves problemas del Antropoceno derivado del crecimiento demográfico exponencial humano y la utilización irresponsable de los recursos naturales (Ceballos *et al.* 2017). La extinción masiva de especies sucede a un ritmo acelerado y cada vez es mayor el número de especies que requieren de la intervención humana para optimizar su manejo y asegurarles la supervivencia (Tellería, 1999; Galetti y Dirzo, 2013; Ceballos *et al.* 2017; Díaz *et al.* 2019).

Genética para la conservación de la vida silvestre

La genética de la conservación es la aplicación de la genética para preservar las especies como entidades dinámicas capaces de hacer frente al cambio ambiental ante la disminución de la diversidad genética (Templeton, 1991; Frankham *et al.*, 2002; Exposito-Alonso *et al.*, 2022) y tiene como objetivo central la necesidad de reducir las tasas actuales de extinción y preservar la biodiversidad (Tellería, 1999; Exposito-Alonso *et al.*, 2022). La genética de la conservación se ocupa de los factores genéticos que afectan el riesgo de extinción y los programas de manejo de la diversidad genética necesarios para minimizar dichos riesgos (Frankham, 1999; Tellería, 1999). Frankham (2003), destaca como aspectos genéticos importantes en

la biología de la conservación: la depresión por endogamia y exogamia; la deriva génica; la fragmentación de poblaciones y reducción del flujo de genes; la pérdida y acumulación de mutaciones perjudiciales; la pérdida de variación genética y de la adecuación; el descenso de la variabilidad genética y de la eficacia biológica (*fitness*); la adaptación al manejo bajo cuidado humano y sus efectos adversos; el uso de análisis moleculares para vislumbrar aspectos relevantes para la delimitación de unidades de manejo y conservación de especies.

Los efectos del tamaño poblacional reducido, así como los impactos del cambio climático, pérdida y fragmentación del hábitat sobre dichas poblaciones, se traducen en una preocupación importante en la biología de la conservación, ya que las especies en peligro de extinción tienen poblaciones pequeñas y en continuo declive a lo largo del tiempo (Vrijenhoek, 1994; Frankham, 1999; Pauls *et al.*, 2013). Así, la variación genética sustenta la aptitud de la población y el potencial de adaptación, que cuando estas poblaciones sufren de endogamia y por lo tanto pérdida de diversidad genética se genera un incremento en el riesgo de extinción (Reed y Frankham, 2003; Hoffmann, Sgrò y Kristensen, 2017; Leigh *et al.*, 2019). Debido a todos estos factores, un objetivo importante del manejo de la diversidad genética es minimizar la endogamia y la pérdida de diversidad (Brook *et al.*, 2002; Charlesworth, 2003; Frankham, 2003; Lino *et al.*, 2019).

El manejo de la diversidad genética y el uso de marcadores moleculares han recibido un impulso significativo en las últimas décadas en la ecología, la biología de la conservación y en el manejo de especies, especialmente aquellas en peligro de extinción (González, 2003; Godoy, 2009; Ottewell *et al.*, 2014). Estudios teóricos

y experimentales en poblaciones y comunidades han documentado los cambios que se producen en la diversidad genética a medida que estas se fragmentan y reducen su tamaño; confirmando las consecuencias negativas que esto ocasiona en la viabilidad de la población y la adaptación (Savolainen, 1994; Vrijenhoek, 1994; Hedrick, 2001; Kristensen y Sørensen, 2005; Godoy, 2009; Leigh *et al.*, 2019; Exposito-Alonso *et al.*, 2022). Adicionalmente, la aplicación de marcadores moleculares junto con la teoría evolutiva facilita la comprensión de información demográfica, ecológica, evolutiva y de comportamiento de especies particulares (Godoy, 2009; Avise, 2012; Exposito-Alonso *et al.*, 2022). Toda esta información proporciona métodos que se convierten en herramientas efectivas para la gestión, manejo, diseño de estrategias y programas de conservación de especies en peligro de extinción (Arif y Khan, 2009; Godoy, 2009; Li *et al.*, 2020; Fazzi-Gomes *et al.*, 2021). La importancia demostrada de los estudios genéticos y el uso de marcadores moleculares para la persistencia de las especies y la contribución significativa de las técnicas genéticas a la práctica de conservación las hacen una herramienta clave para la formulación de políticas y gestión de la vida silvestre (Arif y Khan, 2009; Li *et al.*, 2020).

Marcadores moleculares

La identificación genética o molecular que se ha utilizado ampliamente en la investigación, manejo y conservación de la vida silvestre, es el uso de marcadores moleculares para determinar a qué especie o población pertenece un individuo, así como su identidad o la de una muestra biológica (Arif y Khan, 2009; Li *et al.*, 2020; Fazzi-Gomes *et al.*, 2021).

Gracias a la genética de la conservación y al uso de técnicas de biología y genética molecular, los estudios genéticos se han visto revolucionados en las últimas décadas, con el surgimiento de nuevas técnicas y sus aplicaciones se ha hecho posible dilucidar complejas funciones del ADN a nivel molecular (Haig, 1998; Wayne y Morin, 2004; García-Merchán *et al.*, 2021). En especial, desde el descubrimiento de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), la cual ha potenciado el estudio y la medición de la variabilidad genética (Aranguren *et al.*, 2005; Grisolia *et al.*, 2007). En la actualidad existen distintos marcadores moleculares, destacan los loci de microsatélite que, debido a sus propiedades, se han convertido en marcadores de elección para estudiar la estructura genética de poblaciones y para la conservación de especies (Aranguren *et al.*, 2005). Los microsatélites son repeticiones en tándem de 1 a 6 nucleótidos que se encuentran con alta frecuencia en los genomas nucleares y se obtienen mediante PCR. Requiriendo de iniciadores (oligonucleótidos con aproximadamente 20 pares de bases), que flanquean los segmentos deseados, en donde la ADN polimerasa añade nucleótidos en el extremo 3' al reconocer las secuencias complementarias del ADN molde (Selkoe y Toonen, 2006). Dado su elevado nivel de polimorfismo, los microsatélites resultan ser útiles para definir genotipos multilocus de particular interés en estudios donde se requiere una escala de resolución fina, diferenciando entre genotipos muy cercanos, siendo especialmente estos estudios los referidos a análisis de paternidades, parentescos, asignación de individuos a raza o grupo, planificación de apareamientos y otros aspectos de índole reproductivo (Selkoe y Toonen, 2006; Faleiro, 2007). Por otra parte, los microsatélites tienen una amplia distribución en el genoma, herencia mendeliana, son codominantes (Selkoe y Toonen, 2006; Alcántara, 2007) y son de

utilidad para estimar la pérdida de variabilidad genética, al compararlos con ADN de ejemplares provenientes de colecciones científicas a través de la evaluación del número de alelos y los niveles de heterocigocidad (Bi *et al.*, 2013; Janečka *et al.*, 2014).

A partir del mapeo genético de microsatélites en *Felis catus* desarrollado por Menotti-Raymond *et al.* (1999) se han desarrollado un gran número de trabajos basados en microsatélites en diversas especies de la familia Felidae con distintos fines. Por ejemplo, conocer estructuras poblacionales, variabilidad genética, estimaciones de tamaño poblacional, flujo de genes entre poblaciones, hibridación entre felinos silvestres y reconocimiento de subespecies (Spong *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004; Buckley-Beason *et al.*, 2006; Ruíz-García *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008; Trigo *et al.*, 2008; Charruau *et al.*, 2011; Janečka *et al.*, 2011; Joshi *et al.*, 2013; Trigo *et al.*, 2013; Rueda, 2015; Van De Kerk *et al.*, 2019; Naude *et al.*, 2020; Kantek *et al.*, 2021).

Una constante amenaza de las poblaciones pequeñas y aisladas es la pérdida de la diversidad genética debido a la deriva, en donde se fijan los alelos más frecuentes y se pierden los poco frecuentes (Lacy, 1987; Kristensen y Sørensen, 2005). Sin embargo, con un manejo adecuado, se puede mantener la diversidad genética en poblaciones bajo cuidado humano (Arthofer *et al.*, 2018). Una forma de identificar cambios en la diversidad genética es mediante microsatélites (Jarne y Lagoda, 1996) y un factor fundamental en todo estudio depende de los costos derivados del número de loci utilizados (Schuelke, 2000). Existen casos documentados como del lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*), el lobo

ibérico (*Canis lupus signatus*) y el lince ibérico (*Lynx pardinus*), en donde se han realizado estudios basados en marcadores moleculares como los microsatélites, que han servido como base de los programas de cría dentro de colecciones zoológicas para la reintroducción y reforzamiento de poblaciones silvestres de dichas especies (García-Moreno *et al.*, 1996; Ramírez *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2007; Vargas, 2009; Jaramillo-Jaimes *et al.*, 2011; Casas-Marce *et al.*, 2013).

Para el análisis de la variabilidad genética existe una gran diversidad de indicadores de diversidad para cuantificar y resumir la información a términos manejables. Los parámetros más empleados son: el número de alelos por locus, el número de alelos efectivos por locus, la riqueza alélica, la heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) (Aranguren *et al.*, 2001, 2005).

Cebador universal CAG tag

El uso de cebadores universales ha sido una técnica desarrollada con base en la aplicación de la prueba de PCR anidada (Guo y Milewicz, 2003), que disminuye considerablemente costos en el marcaje de cebadores con fluoróforos (Schuelke, 2000; Boutin-Ganache *et al.*, 2001; Guo y Milewicz, 2003). La reacción de PCR se realiza mediante el uso de tres cebadores de ADN, el primero es un cebador específico de la secuencia blanco que en su extremo 5' contiene la secuencia del cebador universal CAG tag; el segundo es el cebador inverso de la secuencia específica; mientras que el tercero es el cebador universal, en este caso con la secuencia CAG y un tag marcado con algún fluoróforo. Las condiciones de termociclado durante los primeros ciclos deben permitir que el cebador directo con la secuencia del cebador universal en su extremo 5' se incorpore a los productos

de PCR, y posteriormente cuando se agote el cebador directo se reduce la temperatura para facilitar el apareamiento del cebador universal CAG tag marcado con el fluoróforo, y continúe así, como si fuese el cebador directo e incorpore el fluoróforo a los productos de la PCR (Schuelke, 2000; Boutin-Ganache *et al.*, 2001).

Antecedentes

Estado de conservación y efectos de la reducción poblacional

Los felinos son especies vulnerables ante las actividades antropogénicas, que ocasionan la pérdida y la fragmentación del hábitat, reduciendo a niveles críticos las poblaciones de plantas y animales (Ceballos *et al.*, 2017). La pérdida y fragmentación del hábitat, entre otras amenazas, ha ocasionado que varias especies de felinos se encuentran catalogadas dentro de alguna categoría de riesgo (Nowell y Jackson, 1996; Pope, 2000; Swanson, 2003). Existen casos documentados y contundentes como del chita (*Acinonyx jubatus*) (Merola, 1994; Munson *et al.*, 2005; Castro-Prieto *et al.*, 2011), el jaguar (*Panthera onca*) (Paviolo *et al.*, 2008; Haag *et al.*, 2010; Rabinowitz y Zeller, 2010) y el lince ibérico (*Lynx pardinus*) (Gaona *et al.*, 1998; Delibes *et al.*, 2000), cuyas poblaciones se han reducido drásticamente producto de la fragmentación y pérdida del paisaje.

Al igual que otras especies de felinos, el ocelote se ve amenazado por la reducción de la diversidad genética de sus poblaciones silvestres, con respecto a la diversidad genética poblacional histórica (Janečka *et al.*, 2014). Esta reducción de la diversidad se ha dado gradual y principalmente por la pérdida y fragmentación del hábitat, comercio legal desmedido de pieles en las décadas de los cincuenta a los setenta, el tráfico ilegal de pieles, la caza ilegal y cada vez más común

atropellamientos de individuos (Sunquist y Sunquist, 2002; Ceballos y Eccardi, 2003; Haines *et al.*, 2005; Di Bitetti *et al.*, 2006; Pérez y Santos, 2015; SEMARNAT, 2018). En su conjunto, estos hechos han provocado una reducción de sus poblaciones y de la distribución geográfica del ocelote en México y en los otros países donde originalmente se distribuye (Nowell y Jackson, 1996; Sunquist y Sunquist, 2002; Aranda, 2005; Di Bitetti *et al.*, 2008). Por tales motivos, en México de acuerdo con la normatividad nacional, *Leopardus pardalis* se encuentra en peligro de extinción como lo establece la NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010) quedando su caza prohibida desde el año 2002 (SEMARNAT, 2002). En el marco internacional, se considera una especie en peligro de extinción en los Estados Unidos de América a partir del 2010 (U.S. Fish and Wildlife Service, 2016). Por otra parte, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN), clasifica a esta especie como de preocupación menor desde el año 2008, clasificación otorgada por su amplia distribución dentro del continente, sin embargo, la UICN menciona que las poblaciones de ocelote se encuentran en decremento (Paviolo *et al.*, 2015). Su comercialización se encuentra regulada por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), ubicándola en el Apéndice I (CITES, 2015).

Al existir una reducción de las poblaciones, existe una alta probabilidad de deriva génica (Lacy, 1987; Kristensen y Sørensen, 2005; Caballero, 2014), produciendo pérdida de la variabilidad genética (Frankham, 1995; Lino *et al.*, 2019). Esta pérdida de la variabilidad afectará la capacidad de los individuos para adaptarse a entornos adversos y disminuirá su capacidad reproductiva, afectando

la eficacia biológica de la especie (Savolainen, 1994; Vrijenhoek, 1994; Hedrick, 2001), y por lo tanto aumentará su probabilidad de extinción. En contraparte, si se mantiene la diversidad genética, las posibilidades de supervivencia de los individuos serán mayores, lográndose adaptar a ambientes adversos y teniendo mayores posibilidades de transmitir sus genes a la descendencia, potenciando la permanencia y la evolución de la especie (Frankham, 1995; Piyasatian y Kinghorn, 2003; Crawford y Whitney, 2010)

Esta situación sucede también en animales bajo cuidado humano, llegando a presentarse con mayor frecuencia, debido a los pocos individuos bajo este estatus, de las cuales se espera una variabilidad genética reducida debido al alto grado de consanguinidad presente en estas poblaciones (Mellen, 1991; Nowell y Jackson, 1996; Rabb, 2004).

Los zoológicos como centros de conservación

Las instituciones zoológicas en términos de conservación realizan esfuerzos para mantener ejemplares de especies silvestres *ex situ* de especies amenazadas o en peligro de extinción, debido a que esos individuos son potencialmente útiles para realizar futuras reintroducciones o reforzamientos de poblaciones silvestres extintas o debilitadas (Nowell y Jackson, 1996; Keulartz, 2015). Sin embargo, por motivos logísticos, técnicos y administrativos, como la movilidad e intercambio de ejemplares para reproducción, las actividades de conservación en los zoológicos no se han realizado históricamente de la manera más adecuada (Kitchener, 1997; Keulartz, 2015). Las nuevas tendencias e iniciativas de las instituciones zoológicas, las instituciones de investigación y académicas son trabajar en conjunto para la

planeación, desarrollo y ejecución de programas enfocados a la medicina, la reproducción y el manejo de la diversidad genética de los zoológicos y de las poblaciones silvestres para la conservación de especies (Nowell y Jackson, 1996). Hoy en día, puede ser que los acercamientos a la conservación *in situ* y *ex situ* por separado, no sean suficientes para las necesidades de conservación de ciertas especies. Una perspectiva de conservación integrada o *sorta situ* (que promueve la vinculación entre las citadas formas tradicionales de conservación), refleja de mejor manera la evolución del papel que juegan los zoológicos en la conservación de la vida silvestre (Wolfe *et al.*, 2012). Esta visión es muy semejante al concepto de la conservación integrada a través del cual se entrelaza la brecha entre las poblaciones silvestres y aquellas manejadas intensivamente bajo cuidado humano (Byers *et al.*, 2013).

Variabilidad genética del ocelote

La variabilidad genética de las poblaciones de ocelotes ha sido poco estudiada, Grisolia *et al.* (2007) estudiaron la variabilidad genética en *Leopardus pardalis*, *L. wiedii* y *L. tigrinus* de ejemplares de zoológicos en Brasil a través de cuatro marcadores microsatélites, con el objetivo de determinar la utilidad potencial de los microsatélites de *Felis catus* para verificar la diversidad a nivel genético inter e intragrupal de especies bajo cuidado humano, donde obtuvieron la heterocigosidad observada (H_o) de 0.64 y la heterocigosidad esperada (H_e) de 0.84 para el ocelote. Ruíz-García *et al.* (2012) realizaron un estudio de diferenciación genética entre subespecies putativas de ocelotes, de acuerdo con la clasificación de Eizirik *et al.* (1998), para diez países de Latinoamérica, sin incluir México, en su mayoría de

ejemplares de Colombia, quienes mencionan que por medio de los diez microsatélites que utilizaron, se observó una elevada diversidad genética ($H_o=0.58$, $H_e=0.90$). Por otra parte, Wultsch *et al.* (2016), realizaron un estudio en Belice para conocer la diversidad genética y la estructura en cuatro poblaciones de ocelotes, con 14 microsatélites, en donde muestran una H_o de 0.61 y H_e de 0.63. En este estudio observaron que dentro de las cuatro localidades estudiadas se compartían alelos y que los individuos analizados pertenecían a una misma población genética. En México, la variabilidad genética de los ocelotes ha sido poco analizada o estudiada, solo se cuenta con el trabajo en Los Ébanos, Tamaulipas ($H_o=0.63$, $H_e=0.63$), que se realizó con la finalidad de realizar translocaciones para aumentar el número de individuos de las poblaciones remanentes de Texas (Willacy y Cameron) en Estados Unidos de América (Janečka *et al.*, 2011; Janečka *et al.*, 2014).

Justificación

En México, el ocelote (*Leopardus pardalis*) se encuentra catalogado como especie en peligro de extinción y actualmente no existen programas de conservación para sus poblaciones en vida silvestre o bajo cuidado humano y sus poblaciones silvestres continúan en constante decremento. Dada la visión actual de los zoológicos como centros de conservación de especies y reservorios genéticos, los ocelotes mantenidos bajo cuidado humano en México tienen el potencial para reintroducciones o reforzamientos de poblaciones silvestres debilitadas. Sin embargo, no se cuenta con datos de diversidad genética de los ejemplares, lo que limita el potencial de éstos para crear programas de reproducción y conservación

de la especie. Al genotipificar a la población de ocelotes bajo cuidado humano en México y al evaluar la variabilidad genética de estos, se conocerá la diversidad genética de los ejemplares mantenidos bajo cuidado humano, como ha sucedido en la genotipificación de como el lobo mexicano (*Canis lupus baileyi*), el hurón de patas negras (*Mustela nigripes*), el antílope órix (*Oryx leucoryx*) y el lince ibérico (*Lynx pardinus*) y que sirven de base para el desarrollo de programas de cruzamientos dirigidos para la conservación de las especies en vida libre como bajo cuidado humano (Marshall *et al.*, 1999; Wisely *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2007; Jaramillo-Jaimes *et al.*, 2011).

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la diversidad genética de los ocelotes (*Leopardus pardalis*) que se encuentran bajo cuidado humano en México para determinar su estructura genética y su viabilidad para la posible implementación en programas de cruzamiento.

Objetivos específicos

Determinar la estructura genética de los ocelotes bajo cuidado humano.

Evaluar la diversidad genética de los ocelotes mantenidos bajo cuidado humano con base en loci de microsatélites.

Elaborar una propuesta de programa de cruzamientos con base en estos resultados para mantener la diversidad genética.

Hipótesis

La diversidad genética de los ejemplares de *Leopardus pardalis* bajo cuidado humano en México es alta y viable para implementar programas de reproducción y conservación de la especie.

Material y Métodos

Colecta del material biológico

Se obtuvieron muestras de tejido sanguíneo de *Leopardus pardalis* mantenidos bajo cuidado humano (Tabla 1, Anexo 1, Figura 2); sin embargo, la procedencia de los ejemplares es de origen silvestre, en su mayoría pertenecientes a las zonas cercanas a las Unidades de Manejo para la Conservación de la Vida Silvestre (UMAs) que actualmente los mantienen *ex situ*, con la excepción de dos individuos nacidos bajo cuidado humano. Cabe destacar que ninguno de los ejemplares contemplados en este estudio lleva más de una generación de ancestros mantenidos bajo cuidado humano. Para la colecta de las muestras biológicas se solicitó la aprobación del muestreo al Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, quedando registrado el presente proyecto ante dicha instancia bajo el protocolo número: MC-2018/2-17 (Anexo 2). Durante los procedimientos de contención para la obtención de muestras biológicas, los animales en todo momento recibieron trato digno y respetuoso bajo estricta ética y buenas prácticas profesionales del personal participante.

Las muestras de tejido sanguíneo colectadas fueron mantenidas en tubos de colecta al vacío con EDTA (1.8mg/ml de sangre) como aditivo, conteniendo entre 2 y 5 ml de sangre obtenidos a partir de cada ejemplar muestreado. Las muestras se

colectaron bajo anestesia y fueron extraídas a partir de la vena yugular o de la vena cefálica con agujas de calibre 22G-23G. El protocolo anestésico que se utilizó en los ejemplares consta de ketamina a dosis de 3 mg/kg, combinado en la misma jeringa con dexmedetomidina a dosis de 0.03 mg/kg (Herrera y Gual, 2018) vía intramuscular, utilizando atipamezol a dosis de 500 µg/kg vía intramuscular como antagonista. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su procesamiento.

Tabla 1. Origen de las muestras colectadas.

Entidad	UMA	Muestras
Ciudad de México	Zoológico de Chapultepec	3
Ciudad de México	Zoológico de San Juan de Aragón	2
Cobá, Quintana Roo	Coba	1
Guadalajara, Jalisco	Zoológico Guadalajara	1
Mérida, Yucatán	Hacienda Noc-Ac	1
Mérida, Yucatán	Parque Zoológico del Centenario	2
Pachuca, Hidalgo	Fundación Invictus	1
Puerto Morelos, Quintana Roo	Crococun Zoo	2
Tuxtla Gutiérrez, Chiapas	Zoológico Miguel Álvarez del Toro	4
Valladolid, Yucatán	Vallazoo	2
Villahermosa, Tabasco	Parque Museo La Venta	1
Villahermosa, Tabasco	Yumka´	1



Figura 2. Mapa de la República Mexicana donde se pueden observar los lugares donde se colectaron las muestras.

Estudio genético: procesamiento y análisis de muestras

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Genética de la Conservación en el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en la Unidad de Genética Molecular del Instituto de Ecología de la UNAM.

Extracción de ADN

Se realizó la extracción de ADN a partir de las muestras de sangre, bajo el protocolo modificado utilizado por Rueda (2015) con muestras de jaguar (Anexo 3).

Amplificación de Microsatélites

En el presente estudio se seleccionaron nueve microsatélites con alta variabilidad en especies de la familia Felidae (Tabla 2). Estos microsatélites fueron diseñados para el gato doméstico (*Felis catus*) por Menotti-Raymond *et al.* (1999) y

optimizados en ocelotes por Janečka *et al.* (2007; 2011) y Ruíz-García *et al.* (2012). De acuerdo con los datos obtenidos a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), en felinos como *Puma concolor*, *Panthera leo*, *Panthera uncia* y *Felis catus*, y Ruíz-García *et al.* (2012) con ocelotes, los nueve microsatélites constan de repeticiones de dinucleótidos repetidos (CA)_n o (GT)_n.

Tabla 2. Microsatélites utilizados con los cebadores empleados.

Locus	Cromosoma	**Fluoróforo	Cebador Directo	Cebador Inverso	*Pares de bases
FCA035	D2	PET	CTTGCTCTGAAAAA TGAAAATG	AAACGTAGGTGGG GTTAGTGG	136-150
FCA043	C2	NED	GAGCCACCCTAGCAC ATATACC	AGACGGGATTGCAT GAAAAG	116-128
FCA075	A2	VIC	ATGCTAATCAGTGGC ATTTGG	GAACAAAAATTCCA GACGTGC	103-143
FCA077	C2	PET	GGCACCTATAACTAC CAGTGTGA	ATCTCTGGGGAAAT AAATTTTGG	143-155
FCA082	E1	VIC	TCCCTTGGGACTAAC CTGTG	AAGGTGTGAAGCTT CCGAAA	238-246
FCA090	A1	***	ATCAAAAGTCTTGAA GAGCATGG	TGTTAGCTCATGTTC AT*GTGTCC	93-120
FCA117	C2	FAM	AGCTCTTTAACCATG GGAAATG	CCCTTTTTCAGCATT AGTCCC	159-163
FCA126	B1	***	GCCCCTGATACCCTG AATG	CTATCCTTGCTGGCT GAAGG	139-145
FCA229	A1	FAM	CAAAGTACAAGCTT AGAGGGC	GCAGAAGTCCAATC TCAAAGTC	160-170

*Fragmento esperado en pares de bases tomando de referencia al gato doméstico (Menotti-Raymond *et al.*, 1999); **El fluoróforo fue añadido al cebador directo; ***El fluoróforo FAM se añadió al cebador universal CAG tag.

Para dos microsatélites se utilizó el cebador universal CAG tag (etiqueta) (5'-CAGTCGGGCGTCATCA-3') con el fluoróforo añadido en el extremo 5'. Dicho cebador, ha sido previamente utilizado para amplificar microsatélites en mamíferos como *Urocyon cinereoargenteus* (Canidae; Weston *et al.*, 2004), *Ursus americanus* (Urisidae; Sanderlin *et al.*, 2009) y *Lynx rufus* (Felidae; Faircloth *et al.*, 2005).

Condiciones de la PCR

Posteriormente se realizó la amplificación independiente de siete microsatélites polimórficos nucleares sin cebador universal a partir de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo las condiciones típicas de una reacción de amplificación, con un volumen final de 25ul por reacción y utilizando los siguientes reactivos: 2X Taq Master Mix Vivantis®, el cual contiene ADN polimerasa Taq (0.05 u / µl), 2X ViBuffer A (KCl 100 mM, TrisHCl 20 mM (pH 9.1 a 20 ° C) y (Triton™ X-100 al 0.02%), dNTP 0.4 mM y MgCl₂ 3.0 mM; agua libre de nucleasas; cebador directo (*Forward*) 10mM; cebador inverso (*Reverse*) 10mM y ADN de la muestra 25ng/ul. Adicionalmente, se utilizaron los fluoróforos NED, PET, VIC y 6 FAM en el extremo 5' del cebador directo para obtener las lecturas de las curvas patrón de los diferentes alelos resultantes.

El programa de amplificación para microsatélites fue tomado de Ruíz-García (2012) y se aplicó para los siete microsatélites empleados sin cebador universal, bajo las siguientes temperaturas: 95 °C durante 5 min para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C de desnaturalización, 2 min a 55 °C para la hibridación y 2 min a 72 °C para la extensión, aplicando una extensión final de 5 min a 72 °C.

Para la amplificación de los dos microsatélites polimórficos nucleares con cebador universal CAG tag a partir de la PCR anidada, se utilizaron los siguientes reactivos: con un volumen de reacción final de 20ul, 2X Taq Master Mix Vivantis®, el cual contiene ADN polimerasa Taq (0.05 u / µl), 2X ViBuffer A (KCl 100 mM, TrisHCl 20 mM (pH 9.1 a 20 ° C) y (Triton TM X-100 al 0.02%), dNTP 0.4 mM y MgCl₂ 3.0 mM; agua libre de nucleasas; cebador directo (*Forward*) 10 mM; cebador inverso (*Reverse*) 10 mM, cebador universal CAG tag 10mM y ADN de la muestra. Adicionalmente, se utilizó el fluoróforo 6 FAM en el extremo 5' del cebador universal CAG tag para obtener las lecturas de las curvas patrón de los diferentes alelos resultantes.

El programa de amplificación para microsatélites con cebador universal se aplicó de igual manera para los dos microsatélites empleados, con un programa de *Touchdown* bajo las siguientes condiciones: en un intervalo de temperatura de 52.5-60 °C, 15 ciclos de 20 s a 95 °C, 20 s con la temperatura más alta (60 °C), menos 0.5 °C por cada ciclo, 30 s a 72 °C, seguido de 15 ciclos de 20 s a 95 °C, 30 s a 52.5 °C y 30 s a 72 °C para la extensión, aplicando una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 0.8-1.0%, con un marcador molecular de 100pb y un control negativo, por medio de luz ultravioleta en un fotodocumentador (Figura 3).

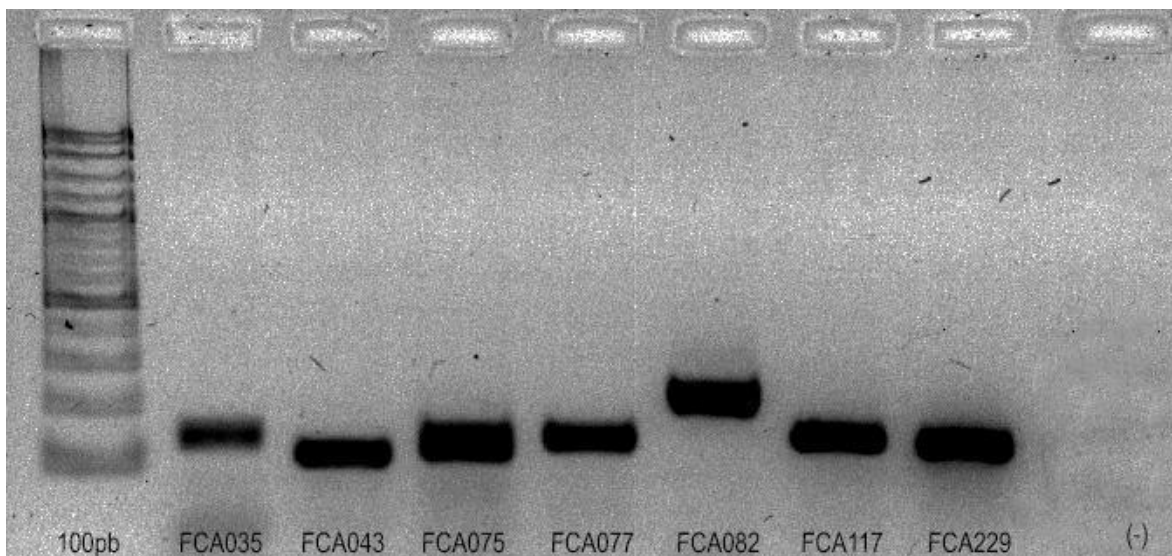


Figura 3. Productos de PCR visualizados en gel de agarosa para siete microsatélites.

Las muestras con la amplificación esperada y la visualización óptima de los productos amplificados en gel de agarosa fueron refrigeradas a 4°C y posteriormente se remitieron al Laboratorio Nacional de Biodiversidad por medio del Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, para la lectura del tamaño del fragmento por electroforesis capilar a través de un secuenciador 3730xl y utilizando 500 LIZ Size standard.

Obtención de genotipos

A partir de los datos obtenidos por electroforesis capilar se utilizó Peak Scanner software v1.0® (Applied Biosystems, 2004) y GeneMarker® (Holland y Parson, 2011) para visualizar los electroferogramas resultantes y determinar los genotipos.

Estructura genética

Se utilizó el software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003) para asignar a los individuos en distintas poblaciones. Mediante probabilidad por análisis bayesiano, el programa realiza el método de cadena de Markov-Monte Carlo y un método de agrupamiento que se basa en modelos para inferir la

estructura poblacional a través de datos de genotipo para identificar poblaciones distintas y asignar a los individuos dentro de dichas poblaciones. Así, el programa asume un modelo en donde los loci se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg y sin desequilibrio de ligamiento, en donde se tiene K poblaciones, en el cual K puede ser desconocido y se van a caracterizar por un conjunto de frecuencias alélicas en cada locus, para asignar por probabilidad cada genotipo a una población o conjuntamente a más de una población en caso de estar mezclados. Cada corrida se llevó a cabo con 250 000 repeticiones antes de comenzar a tomar los datos para el análisis, con objeto de minimizar el efecto de la configuración inicial y con 1 000 000 repeticiones para el método de cadena de Markov-Monte Carlo, bajo el modelo de admixia y frecuencias alélicas correlacionadas entre los grupos.

Con el objetivo de determinar el número de poblaciones más probable se determinó la probabilidad logarítmica de K con Structure Harvester 0.6.94 (Earl y Von Holdt, 2012). El programa analiza valores de probabilidad en múltiples valores de K y cientos de iteraciones para la detección del número de grupos genéticos que se ajustan a los datos.

Debido a que, es posible que los algoritmos de agrupamiento bayesiano basados en modelos genéticos de población predefinidos, como el software STRUCTURE, pueden no reflejar las estructuras de grupos por la cantidad de datos proporcionados al programa (Jombart *et al.*, 2010). y a que los individuos analizados no corresponden a una población definida al encontrarse bajo cuidado humano, se realizó además un análisis discriminante de componentes principales (DAPC) con la paquetería Adegenet (Jombart, 2008) en lenguaje R, utilizando la función *dapc*

con una varianza del 100%, este análisis multivariado combina el análisis discriminante (DA) con el análisis de componentes principales (PC) (Miller *et. al.*, 2020). El DAPC infiere la cantidad de grupos de individuos relacionados genéticamente. En este enfoque estadístico multivariable, la varianza en la muestra se divide en un componente entre grupos y dentro de un grupo, en un esfuerzo por maximizar la discriminación entre estos. Estos grupos se construyen como combinaciones lineales de las variables originales, correspondientes a los alelos, que tienen la varianza entre grupos más grande y la varianza dentro de un grupo más pequeña. Sin embargo, los grupos suelen ser desconocidos o inciertos, y es necesario identificar los grupos genéticos antes de describirlos. Esto se puede lograr usando k-means, un algoritmo de agrupamiento que encuentra un número dado de grupos maximizando la variación entre grupos (Jombart y Collins, 2015).

Para identificar el número óptimo de conglomerados, k-means se ejecuta secuencialmente con valores crecientes de k, y diferentes soluciones de conglomerados se comparan utilizando el criterio de información bayesiano (BIC). Idealmente, la solución de agrupamiento óptima debería corresponder al BIC más bajo. El principal activo de PCA es su capacidad para identificar estructuras genéticas en conjuntos de datos y la ausencia de cualquier suposición sobre el modelo genético de población subyacente (Jombart *et al.*, 2010).

Variabilidad genética

A partir de los genotipos obtenidos para cada individuo en cada locus se obtuvo el número total de alelos por locus (N_a), el número de alelos efectivos (N_e), la heterocigosis observada (H_o), la heterocigosis esperada (H_e), el coeficiente de

endogamia (Fis), que mide la reducción en la heterocigosidad de un individuo debido a la existencia de cruzamientos no aleatorios (Falconer y Mackay, 1996), y las frecuencias alélicas para cada locus, para lo cual se utilizó lenguaje R, con las paqueterías Pegas (Paradis, 2010), Adegnet (Jombart, 2008), Hierfstat (Goudet, 2005) y Genepop (Rousset, 2008). Además del programa GenAlEx 6.503 (Peakall y Smouse, 2012), para determinar el índice de información de Shannon (I) y la heterocigosidad esperada insesgada (uHe), tomando en cuenta los siguientes principios:

Na = Número de alelos diferentes

I = índice de información de Shannon = $-1 * \sum (p_i * \ln (p_i))$

He = Heterocigosidad esperada = $1 - \sum p_i^2$ = proporción esperada de loci heterocigóticos por individuo en una población con cruzamientos al azar ($1 - \sum q_i^2$, donde q_i es la frecuencia del alelo i). $He = 1 - \sum q_i^2 = 1 - (q_a^2 + q_b^2 + q_c^2 + q_d^2 + \dots + q_k^2)$.

Ho = Heterocigosidad observada = Número de heterocigóticos / N = proporción observada de loci heterocigóticos por individuo = Número de genotipos heterocigóticos/nº total de genotipos analizados.

uHe = Heterocigosidad esperada insesgada = $(2N / (2N-1)) * He$

Fis = coeficiente de consanguinidad = $(He - Ho) / He = 1 - (Ho / He)$.

Donde p_i es la frecuencia del i-ésimo alelo para la población y $\sum p_i^2$ es la suma de las frecuencias alélicas de la población al cuadrado.

Para el cálculo de desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) en cada locus y pruebas de desequilibrio de ligamiento se utilizó el programa Genepop (Raymond, 1995; Rousset, 2008). El cálculo de HW se realizó mediante una prueba exacta de Fisher a partir de la estimación del coeficiente de endogamia (Fis) a través de la estimación de p-values exactos por el método de la cadena de Markov (Guo y Thompson, 1992) con los siguientes parámetros: 10000 demorizaciones, 100 batches y 1000 iteraciones. Las pruebas de desequilibrio de ligamiento por pares de loci se realizaron mediante el método de cadena de Markov con una prueba exacta de Fisher, bajo la hipótesis nula de que los genotipos en un locus son independientes de los genotipos en el otro locus, con los siguientes parámetros: 10000 demorizaciones, 100 batches y 1000 iteraciones.

Parentesco entre pares de individuos y cuellos de botella

Los datos genéticos son útiles para estimar la relación o parentesco entre individuos, a partir de los genotipos de cada individuo, mediante el programa ML-Relate (Kalinowski *et al.*, 2006), que está diseñado para datos de microsatélites que calcula estimaciones de máxima verosimilitud de parentesco y relación entre individuos de ascendencia desconocida. El programa realiza las relaciones a partir de probabilidades matemáticas de que los genotipos entre individuos compartan cero (k_0), uno (k_1) o dos (k_2) alelos por locus idénticos por descendencia.

Si dos individuos son padres-descendientes, k_0 será igual a 1, k_1 será igual a 0 y k_2 será igual a 0. Si dos individuos son hermanos completos, k_0 , k_1 y k_2 , serán iguales a 0,25, 0,5 y 0,25, respectivamente, partiendo de la suposición de que ninguno de los individuos comparados es endogámico y asumiendo una población

cerrada. La relación de máxima verosimilitud entre un par de individuos se encuentra insertando diferentes valores de K en la ecuación de verosimilitud y determinando cuál produce la mayor probabilidad (Figura 4).

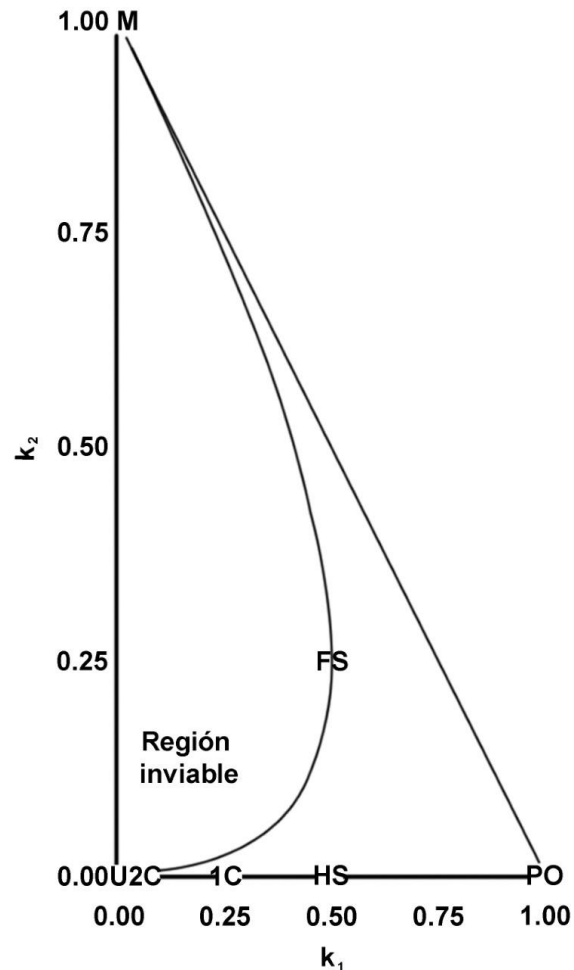


Figura 4. Modificado de Kalinowski *et al.* (2006). Coeficientes k de relaciones genealógicas comunes (U, no relacionados; HS, medios hermanos; 1C, primos hermanos; 2C, primos segundos; FS, hermanos completos; PO, padre-descendiente; M, gemelo monocigótico). La relación aumenta hacia la derecha y hacia la parte superior de la figura.

Para determinar si existe algún evento de cuello de botella reciente dentro de los ocelotes bajo cuidado humano se utilizó el programa BOTTLENECK 1.2.02 (Luikart y Cornuet, 1998; Piry *et al.*, 1999), que parte del principio de que las poblaciones con reducciones recientes en el tamaño de la población muestran correlación entre

la reducción de alelos y heterocigosidad en los loci, sin embargo, la pérdida de alelos se reduce más rápido que la heterocigosidad. Este exceso de heterocigosidad persiste un cierto número de generaciones hasta que se establece un nuevo equilibrio (Cornuet y Luikart, 1996). Este método realiza simulaciones para detectar distorsiones en las frecuencias de alelos después de cuellos de botella, aún con menos de 20 individuos cuando se analizan de 8 a 10 microsatélites (Luikart *et al.*, 1998). El programa calcula para la población y para cada locus la distribución de la heterocigosidad esperada del número observado de alelos, dado el tamaño de la muestra bajo el supuesto de equilibrio mutación-deriva (tamaño efectivo constante en el pasado), mediante la simulación del proceso de coalescencia de n genes bajo tres posibles modelos de mutación, el modelo de alelos infinitos (IAM), el modelo de mutación escalonada (SMM) y el modelo de dos fases (TPM) que permite mutaciones de varios pasos. Esto permite el cálculo de H_e , que se compara con la H_o , para establecer si existe un exceso o déficit de heterocigosidad. Además, la desviación estándar (SD) de la distribución de equilibrio de mutación-deriva de la heterocigosidad se utiliza para calcular la diferencia estandarizada para cada locus ($(H_o - H_e) / SD$). Una vez procesados todos los loci se establece la distribución de frecuencias alélicas para ver si tiene forma de L (en el equilibrio de mutación-deriva) o no (los cuellos de botella recientes). Los parámetros utilizados fueron de 30 para la varianza TPM y 70% de proporción de SMM en TPM, con 10000 iteraciones.

Cruzamientos dirigidos

De acuerdo con el análisis de los programas STRUCTURE, los resultados del DAPC y ML-Relate, con base en la estructura de agrupamientos de individuos y los grados de relación por pares entre individuos y tomando en cuenta el sexo de cada

ejemplar, se propusieron cruzamientos entre ejemplares bajo un protocolo de minimización de parentesco medio (*Minimizing kinship*), con el cual se busca maximizar la retención de la diversidad genética y diversidad alélica (Montgomery *et al.*, 1998), evitando cruzamientos entre individuos que muestran los siguientes grados de parentesco: medios hermanos; hermanos completos; padre-descendiente.

Resultados

Obtención de genotipos

Se obtuvieron 105 genotipos para el grupo de ocelotes muestreados (Tabla 3), con un intervalo de 5 – 16 genotipos por locus (Media = 12). El locus con mayor número de genotipos fue el FCA035 y el locus con menor número de genotipos fue el FCA090. Los loci con mayor número de genotipos homocigotos fueron el FCA043, FCA082, FCA117, FCA126 y FCA229, con 3 y el locus con menor número de genotipos homocigotos fue el FCA090 con 1. Por otra parte, el locus con el mayor número de genotipos heterocigotos fue el FCA035 con 14 y el locus con el menor número de genotipos heterocigotos fue el FCA090 con 4.

Tabla 3. Genotipos homocigotos, heterocigotos y totales por locus.

Locus	Genotipos	Homocigotos	Heterocigotos
FCA035	16	2	14
FCA043	8	3	5
FCA075	14	2	12
FCA077	13	2	11
FCA082	13	3	10
FCA090	5	1	4

FCA117	14	3	11
FCA126	11	3	8
FCA229	11	3	8
Total	105	22	83
Media	11.67	2.44	9.22

Tabla 3. Número de genotipos que fueron diferentes en los 21 individuos por cada microsatélite.

Estructura genética

Para conocer si existía más de un grupo genético dentro de los ocelotes estudiados, se utilizó el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003). Los resultados mostraron un solo grupo genético (Figura 5 y Figura 6) y el programa Structure Harvester 0.6.94 (Earl y Von Holdt, 2012) indicó que la mayor probabilidad de conglomerados o grupos es de uno (Figura 7).

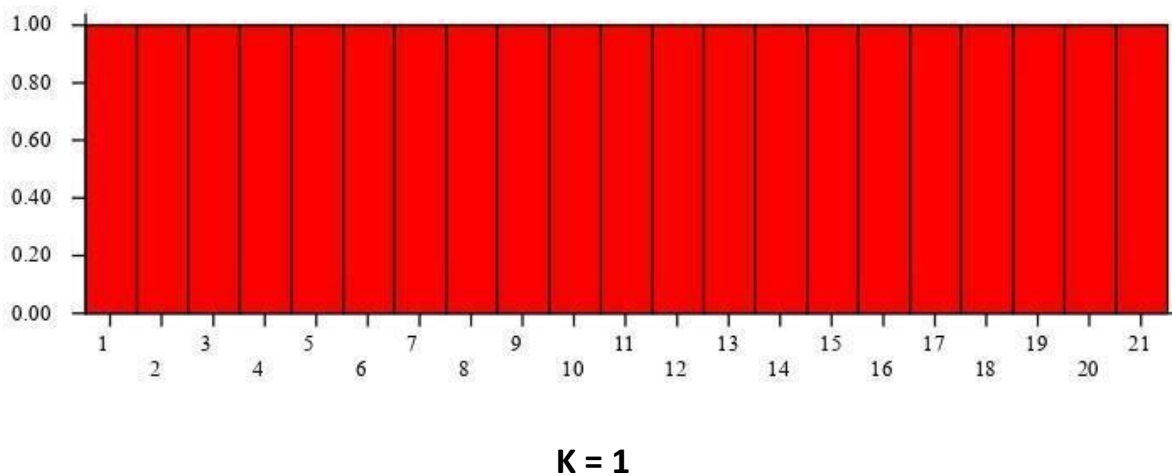


Figura 5. Estimación de los grupos genéticos de los 21 ocelotes mantenidos bajo cuidado humano, analizando 9 marcadores microsatélites, resultado de la asignación a grupos genéticos (K) con el programa Structure 2.3.4. El color vertical en rojo representa la proporción del grupo inferido para cada individuo representado con un número de identificación en el eje horizontal.

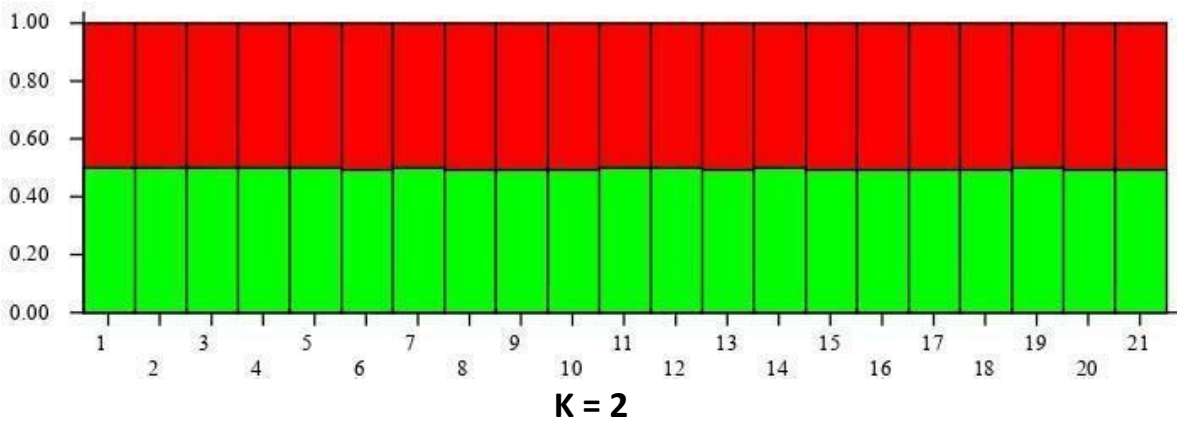


Figura 6. Estimación de los grupos genéticos de los 21 ocelotes mantenidos bajo cuidado humano, analizando 9 marcadores microsatélites, resultado de la asignación a grupos genéticos (K) con el programa Structure 2.3.4. El color vertical en rojo y verde representa la proporción del grupo inferido para cada individuo representado con un número de identificación en el eje horizontal.

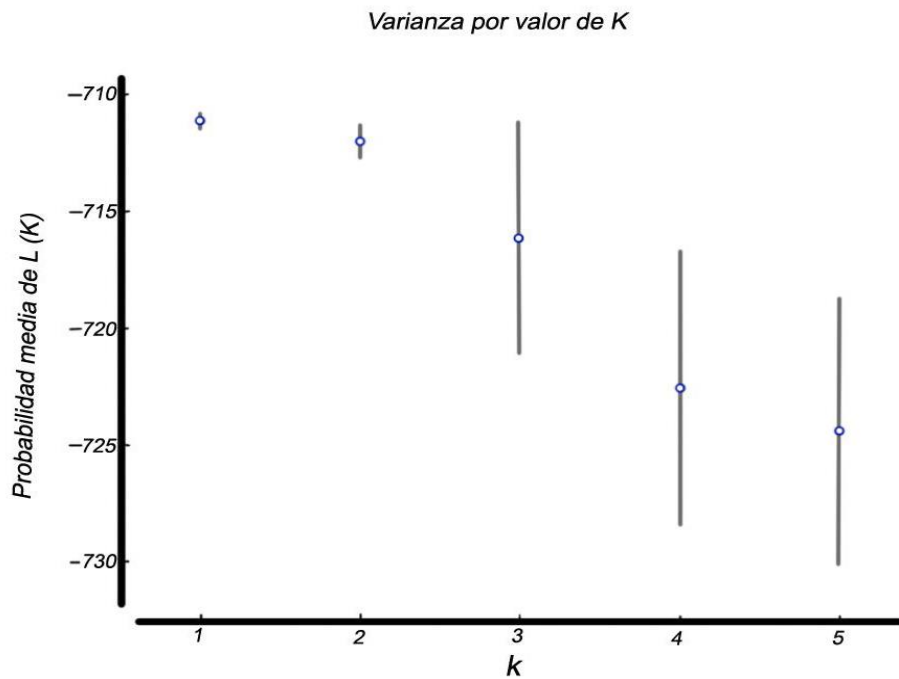


Figura 7. Probabilidad media $L(K)$ y varianza por valor de K de STRUCTURE para los 21 individuos de ocelote genotipados para un conjunto de 9 loci de microsatélites polimórficos.

Para determinar si el número de grupos obtenido por el programa STRUCTURE, debido a la cantidad de datos y al tipo de individuos analizados, se obtuvo el análisis de DAPC con la paquetería Adegnet (Jombart, 2008) para conocer la estructura genética correspondiente al número de grupos identificados mediante un análisis multivariado. En donde se obtuvo que el número óptimo de conglomerados (K) corresponde a 20, mediante el análisis de criterio de información bayesiana (Figura 8). Bajo dicho criterio se corrió la función *dapc*, en donde se obtuvieron 20 grupos con una varianza del 100% (Figura 9).

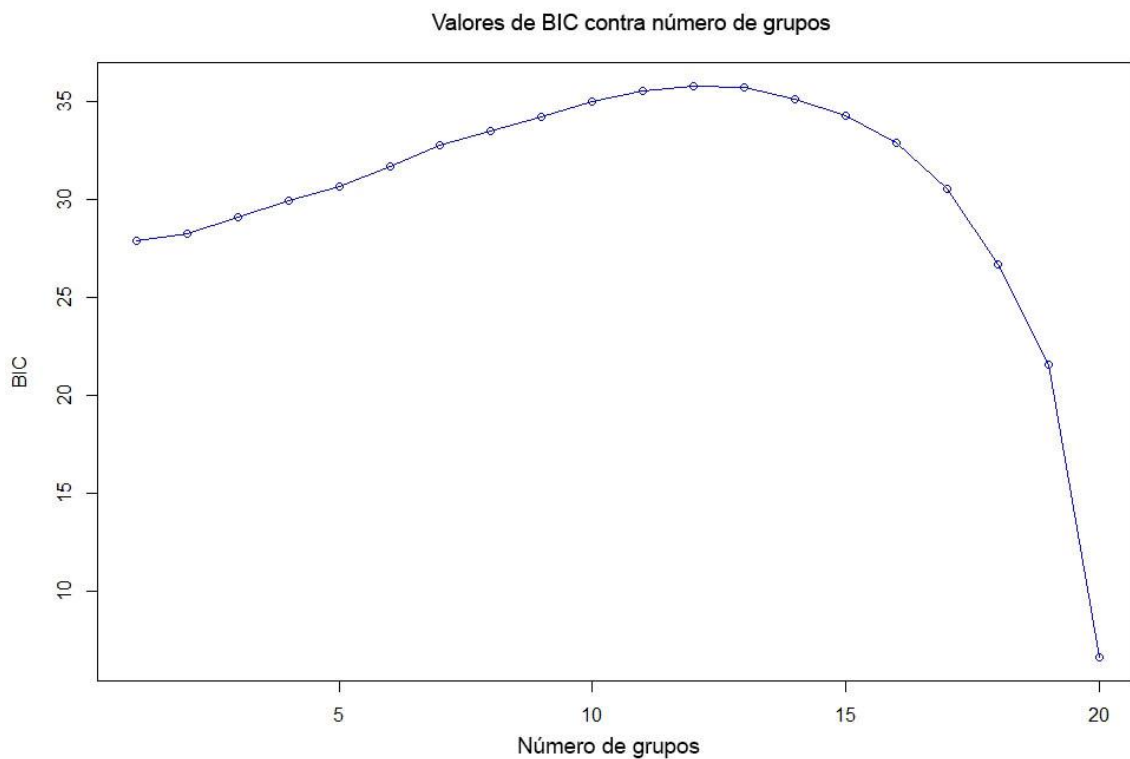


Figura 8. Número óptimo de conglomerados (K) mediante el criterio de información bayesiano (BIC), para los 21 individuos de ocelote genotipados para un conjunto de 9 loci de microsatélites polimórficos, a través de la paquetería Adegnet.

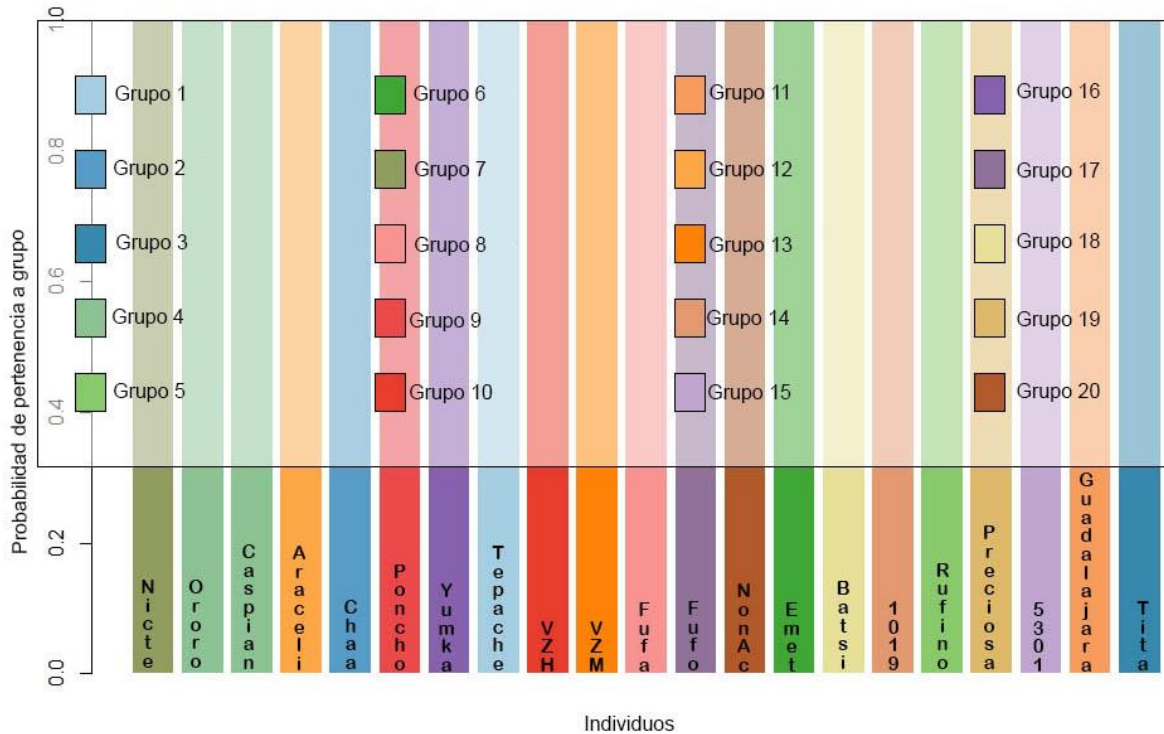


Figura 9. Estimación de los grupos genéticos de los 21 ocelotes mantenidos bajo cuidado humano, analizando 9 marcadores microsatélites, resultado de la asignación a grupos genéticos (K) con la paquetería Adegenet mediante DAPC. El color vertical representa la proporción del grupo inferido para cada individuo y el color dentro de los cuadros con la leyenda “Grupo n” corresponde al grupo correspondiente de cada individuo.

Variabilidad genética

El número de alelos observados (N_a) por locus tuvo un intervalo de 5 – 14 (Media = 9.89). El número de alelos efectivos (N_e) de 2.59 – 8.60 (Media = 5.45). El índice de información de Shannon (I) mostró valores en un intervalo de 1.15 – 2.33 (Media = 1.87). La menor heterocigosidad observada (H_o) fue de 0.53 para el locus FCA043 y la mayor fue de 0.95 para el locus FCA090, el promedio de H_o y H_e para todos los locus fue igual a 0.79 (Figuras 10 y 11). El índice de fijación mostró un intervalo de -0.58 – 0.28 (Media = -0.02) (Tabla 4). Las frecuencias alélicas para cada locus se muestran en el anexo 4.

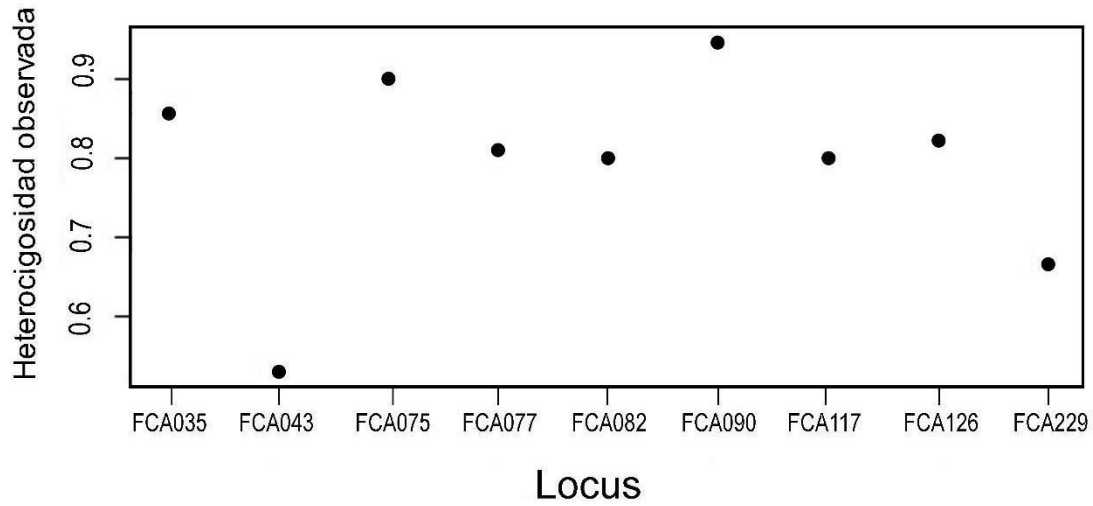


Figura 10. Heterocigosidad observada por locus.

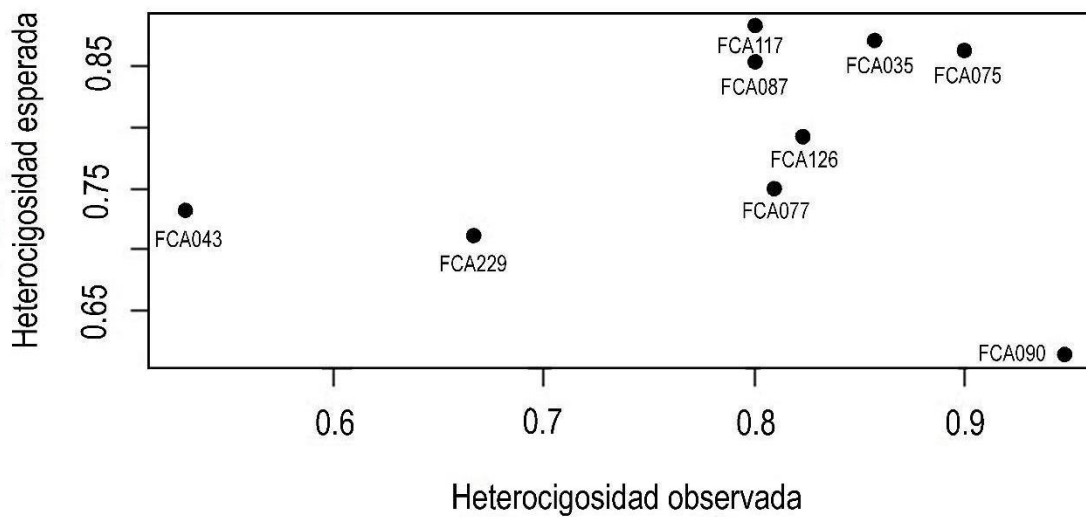


Figura 11. Heterocigosidad esperada en función de la observada por locus.

Tabla 4. Parámetros de variabilidad genética.

Locus	N	Na	Ne	Ar	I	Ho	He	uHe	Fis
FCA035	21	14	7.74	13	2.33	0.86	0.87	0.89	0.02
FCA043	17	6	3.73	6	1.50	0.53	0.73	0.75	0.28

FCA075	20	12	7.27	11	2.19	0.90	0.86	0.88	-0.04
FCA077	21	12	3.99	10	1.85	0.81	0.75	0.77	-0.08
FCA082	20	10	6.84	9	2.07	0.80	0.85	0.88	0.06
FCA090	19	5	2.59	4	1.15	0.95	0.61	0.63	-0.54
FCA117	20	13	8.60	12	2.33	0.80	0.88	0.91	0.09
FCA126	17	10	4.82	10	1.87	0.82	0.79	0.82	-0.04
FCA229	21	7	3.46	6	1.54	0.67	0.71	0.73	0.06
Promedio		9.89	5.45	9	1.87	0.79	0.79	0.81	-0.02

N= número de muestras analizadas Na= número de alelos observados Ne = Número de alelos efectivos; Ar= Riqueza alélica; I = índice de información de Shannon; Ho = Heterocigosidad observada; He = Heterocigosidad esperada; uHe = Heterocigosidad esperada insesgada; Fis = Coeficiente de endogamia.

El análisis de desequilibrio de ligamiento no detectó desviaciones significativas para los locus, excepto en los loci FCA126 y FCA229 ($p = 0.036$), sin embargo, estos loci se encuentran en distintos cromosomas y por tal motivo no se encuentran ligados (Frankham *et al.*, 2010). Por otra parte, el cálculo de desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg en cada locus mostró desviaciones para cuatro loci: FCA043, FCA082 y FCA117 dado por déficit de heterocigotos y el FCA090 por exceso de heterocigotos.

Análisis de parentesco y cuellos de botella

Con el análisis de parentesco basado en el estimador de máxima verosimilitud a partir de los genotipos entre individuos (Tabla 5), se obtuvo que, dentro del total de relaciones entre pares de individuos el 89.05% no están emparentados; el 0.95% son individuos que tienen una relación de hermanos completos (1 hermanos

completos); el 9.52% son individuos que tienen relación de medios hermanos (20 medios hermanos); y el 0.48% son individuos con una relación de padre-descendencia (1 padre/descendencia) (Tabla 6).

De acuerdo con la distribución de frecuencias alélicas y la clasificación de Luikart *et al.* (1998), se observan alelos con distribución de baja frecuencia, por lo que no se observa una distorsión a la forma de L dada en eventos de cuello de botella por alelos de frecuencia intermedia (Figura 12).

Tabla 5. Coeficiente de k entre pares de individuos.

	Nicté	Oro	Caspian	Araceli	Chaa	Poncho	Yumka	Tepache	VZH	VZM	Fufa	Fufo	Nocac	Emmet	Batsi	1019	Rufino	Preciosa	5301	GDL	Tita	
Nicté	1																					
Oro	0.37	1																				
Caspian	0	0.5	1																			
Araceli	0.08	0.07	0	1																		
Chaa	0	0	0	0	1																	
Poncho	0	0	0	0	0.16	1																
Yumka	0	0.11	0	0	0.13	0.12	1															
Tepache	0	0.06	0	0.07	0	0.11	0	1														
VZH	0.18	0.21	0	0	0	0.06	0	0	1													
VZM	0	0	0	0	0.12	0	0	0	0	1												
Fufa	0	0.23	0	0	0.08	0.14	0.14	0.3	0	0	1											
Fufo	0	0	0	0.02	0	0.09	0.09	0.12	0.09	0	0.02	1										
Nocac	0	0	0.29	0	0	0	0	0	0.3	0.34	0	0	1									
Emmet	0	0.29	0.28	0	0	0	0	0.27	0	0	0	0	0	1								
Batsi	0.43	0.39	0	0	0.11	0	0	0	0.11	0.11	0	0	0	0.12	1							
1019	0	0.08	0	0.39	0	0.09	0	0.1	0.09	0	0.1	0.09	0	0	0	1						
Rufino	0.12	0.02	0.26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.13	0.04	0	0	1					
Preciosa	0	0	0.09	0.02	0	0	0	0.09	0	0.01	0.09	0.03	0	0	0	0	0	1				
5301	0	0	0	0.08	0	0	0.09	0.1	0	0	0	0.02	0	0.22	0	0.15	0.09	0	1			
GDL	0.07	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.01	0.23	0	0	0.01	0.18	0	0	0	1		
Tita	0	0	0	0	0.2	0.13	0.37	0	0	0	0.09	0	0	0	0	0	0	0	0.11	0	1	

Tabla 6. Relación de parentesco entre pares de individuos.

	Nicté	Ororo	Caspian	Araceli	Chaa	Poncho	Yumka	Tepache	VZH	VZM	Fufa	Fufo	Nocac	Emmet	Batsi	1019	Rufino	Preciosa	5301	GDL	Tita	
Nicté	-																					
Ororo	HS	-																				
Caspian	U	PO	-																			
Araceli	U	U	U	-																		
Chaa	U	U	U	U	-																	
Poncho	U	U	U	U	HS	-																
Yumka	U	U	U	U	HS	HS	-															
Tepache	U	U	U	U	U	U	U	-														
VZH	U	U	U	U	U	U	U	U	-													
VZM	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-												
Fufa	U	U	U	U	U	U	HS	HS	U	U	-											
Fufo	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-										
Nocac	U	U	HS	U	U	U	U	U	HS	HS	U	U	-									
Emmet	U	HS	HS	U	U	U	U	HS	U	U	U	U	U	-								
Batsi	FS	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-							
1019	U	U	U	FS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-						
Rufino	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-					
Preciosa	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	-				
5301	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	HS	U	U	-			
GDL	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	U	HS	U	U	U	U	-	
Tita	U	U	U	U	HS	U	HS	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	U	HS	U	U	-

U = No relacionados; HS = Medios hermanos; FS = Hermanos; PO = Padre / Descendencia.

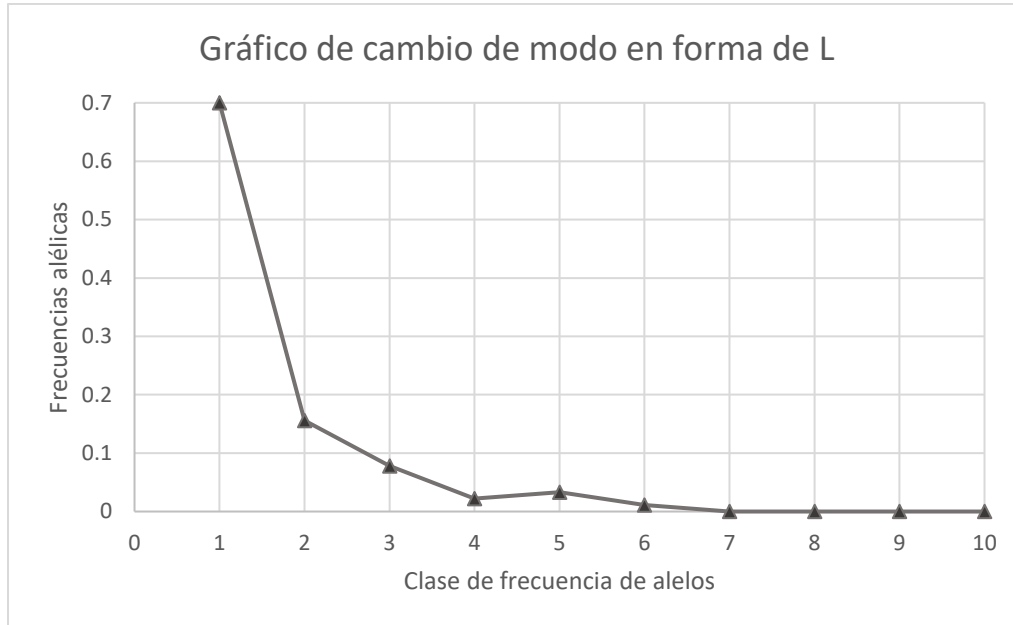


Figura 12. Distribución de frecuencias alélicas que muestra una distribución normal en forma de L sin cuellos de botella recientes con el programa BOTTLENECK.

Cruzamientos dirigidos

De los 21 ocelotes muestreados, 10 fueron hembras y 11 machos (Anexo 1). Se obtuvieron 110 cruzamientos posibles de acuerdo con la proporción de machos y hembras. Del total de posibles cruzamientos, el 10.91% se consideraron no viables al tratarse de individuos emparentados (medios hermanos, hermanos completos o padre-descendiente). El 24.55% se consideraron viables al tratarse de individuos no emparentados, pero que mostraban un grado de relación mayor a cero; el 64.55% se consideraron cruzamientos altamente viables al tratarse de individuos no emparentados con grados de relación igual a cero (Tabla 7).

Tabla 7. Propuesta de cruzamientos dirigidos.

♂/♀	Nicté	Ororo	Batsi	GDL	Fufa	Tita	Araceli	5301	Preciosa	VZH
Caspian	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
Emmet	+++	-	+	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++
Tepache	+++	+	+++	+++	-	+++	+	+	+	+++
Nocac	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
Fufo	+++	+++	+++	-	+	+++	+	+	+	+
Chaa	+++	+++	+	+++	+	-	+++	+++	+++	+++
1019	+++	+	+++	-	+	+++	-	-	+++	+
Rufino	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++

Tabla 7. Continúa

♂/ ♀	Nicté	Ororo	Batsi	GDL	Fufa	Tita	Araceli	5301	Preciosa	VZH
VZM	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
Poncho	+++	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	+++	+
Yumka	+++	+	+++	+++	-	-	+++	+	+++	+

El eje X muestra los nombres asignados a las hembras de ocelote y el eje Y muestra los nombres asignados a los machos de ocelote muestreados en el análisis. En el anexo 1 se muestra una lista de la institución donde se encuentra resguardado cada individuo. +++ = cruzamiento altamente viable (individuos con grado de relación igual a cero); + = cruzamiento viable (individuos con grado de relación mayor a cero, pero no emparentados); - = cruzamiento no viable (individuos emparentados).

Discusión

Estructura y variabilidad genética

La caracterización de la población generalmente está basada en el origen geográfico de los individuos o fenotipos, sin embargo, la estructura genética de las poblaciones no siempre se refleja en la proximidad geográfica de los individuos (Petit, *et al.*, 2001; Evanno *et al.*, 2005; Yoshio *et al.*, 2009). A pesar de que, de acuerdo con el personal de las instituciones, la mayoría de los ocelotes muestreados fueron capturados en vida silvestre (17 de los individuos), cercanos a las localidades donde se encuentran bajo cuidado humano, ninguno cuenta con datos exactos de su origen (coordenadas geográficas). Actualmente la mayoría de los ejemplares

muestreados aún se encuentran bajo cuidado humano y no forman parte de una población silvestre. Los ejemplares mostraron una única estructura genética (Figura 5), lo cual se corroboró con la probabilidad media de $L(K)$ que reflejó un sólo grupo (Figura 7), que asigna el número de conglomerados más probable dentro de una población, de acuerdo con los resultados del programa STRUCTURE. En cambio, las poblaciones silvestres más grandes soportan niveles significativamente más altos de diversidad genética (Harper *et al.*, 2003), en consecuencia, se deben integrar a más ejemplares al estudio, tanto de vida silvestre como de ejemplares bajo cuidado humano que no han sido muestreados, tomando como base el presente trabajo para integrar periódicamente a nuevos individuos, que ayuden a comprobar que se trata de una sola estructura poblacional, similar a lo encontrado por Wultsch *et al.* (2016), quienes encontraron para cuatro distintas poblaciones de ocelotes en Belice una única estructura poblacional con un mayor número de muestras, lo cual reflejaría una variabilidad genética reducida, al tomar en cuenta que se trata de individuos de diferente origen geográfico, no emparentados y de recién ingreso a las instituciones zoológicas o en contraparte que puedan integrar a estos individuos a distintos grupos genéticos. Sin embargo, al realizar el análisis de DAPC, se observan 20 grupos que corresponden a diferentes estructuras genéticas, en donde agrupa a los individuos “Ororo” y “Caspian” dentro de una misma estructura genética (Figura 9). Dichos individuos, de acuerdo con la información proporcionada por el personal de las instituciones donde se encuentran alojados, corresponden a individuos emparentados como madre e hijo, lo cual se corrobora a través del análisis de parentesco (Tabla. 7). De acuerdo con el número de datos analizados, el tipo de individuos analizados y la historia genealógica de cada uno

de estos, la estructura poblacional con un análisis más robusto es la que se obtiene mediante el análisis discriminante de componentes principales.

Para el análisis de la variabilidad genética se utilizaron nueve microsatélites, que de acuerdo con Arthofer *et al.* (2018), el número de microsatélites suficientes para reflejar la estructura de una población es de ocho, quienes además mencionan que esta estructura puede ser visible, aún si se utilizan dos loci altamente polimórficos. En los ocelotes bajo cuidado humano encontramos altos niveles de heterocigosidad, con un valor de $He=0.79$, al contrastar con lo reportado por Janečka *et al.* (2007) para dos poblaciones remanentes (en Cameron y Willacy) en los Estados Unidos de América, con valores de 0.37 y 0.43 respectivamente para la He en el año 2005, quienes muestran una reducción histórica en el tamaño poblacional, reflejado en la baja diversidad genética. En otros felinos, como el leopardo (*Panthera pardus*) se han observado los mismos valores de He (0.37), que muestran una baja diversidad genética y se han asociado a poblaciones que han sufrido cuellos de botella recientes (Uphyrkina *et al.*, 2002), lo cual es contrario a lo obtenido con los ocelotes bajo cuidado humano en México, que no muestra eventos de cuello de botella recientes de acuerdo con las frecuencias alélicas, donde se observa la distribución de frecuencias alélicas en forma de L, en el equilibrio de mutación-deriva, dado que no se presenta exceso de heterocigotos (Figura 12).

Debido a que se trabajó con ejemplares bajo cuidado humano, los ejemplares forman parte de diversas procedencias, y a pesar de que el nivel de heterocigosidad fue relativamente alto ($He=0.79$), este hecho puede deberse a la presencia de

individuos provenientes de diferentes lugares y es necesario realizar estudios integrando a las poblaciones silvestres de diversas regiones para determinar la asignación de individuos a grupos silvestres y conocer si la diversidad genética de las poblaciones silvestres de México se refleja en los individuos mantenidos bajo cuidado humano.

Se presentan los comparativos de H_o y H_e media y de cada locus obtenida para los ocelotes bajo cuidado humano en México, en comparación con las obtenidas en otros estudios en dos poblaciones silvestres en los Estados Unidos de América, una población silvestre en Tamaulipas, México, ejemplares silvestres de diversos países en Centroamérica y Sudamérica y con la población de ocelotes bajo cuidado humano específicamente de Brasil (Tabla 8). Cabe destacar que el trabajo realizado por Wulsch *et al.* (2016) comparte tres microsatélites estudiados en este trabajo, sin embargo, no muestran los datos obtenidos por loci, mostrando únicamente la heterocigosidad media de todos los microsatélites analizados, por tal motivo no se muestra en la tabla.

Tabla 8. Comparativa de H_o y H_e por microsatélites de los ocelotes bajo cuidado humano en México con otros estudios.

	México (bajo cuidado humano)		Los Ébanos, México (Jânecka <i>et al.</i> , 2014)		Cameron, Texas (Jânecka <i>et al.</i> , 2014)		Willacy, Texas (Jânecka <i>et al.</i> , 2014)		Centro y Sudamérica		Brasil (bajo cuidado humano) (Grisolia <i>et al.</i> , 2007)	
	H_o	H_e	H_o	H_e	H_o	H_e	H_o	H_e	H_o	H_e	H_o	H_e

FCA035	0.86	0.87	0.80	0.80	0.65	0.65	0.83	0.65				
FCA043	0.53	0.73	0.56	0.59	0	0	0.43	0.42	0.63	0.87		
FCA075	0.90	0.86										
FCA077	0.81	0.75	0.70	0.71	0.27	0.23	0.27	0.23			0.80	0.87
FCA082	0.80	0.85	1	0.66	0.54	0.57	0.83	0.66				
FCA090	0.95	0.61										
FCA117	0.80	0.88	0.40	0.70	0.52	0.50	0.61	0.54				
FCA126	0.82	0.79	0.90	0.70	0.88	0.74	0.87	0.76	0.50	0.84		
FCA229	0.67	0.71										
Media*	0.79	0.79	0.63	0.63	0.42	0.39	0.65	0.56	0.58	0.90	0.64	0.84
Media**	0.77	0.81	0.73	0.69	0.48	0.43	0.64	0.54				
	0.68	0.76							0.57	0.86		
	0.81	0.75									0.80	0.87
Loci	9		11		11		11		10		4	
N	21		10		26		23		292		77	

Loci = número de loci analizados para la Ho y He media en el estudio; n = número de muestras analizadas; Media* = Ho y He media con el total de loci analizados en cada estudio; Media = Ho y He media de los loci analizados en común con el presente estudio.**

Al contrastar los valores de He de los ejemplares bajo cuidado humano en México con las poblaciones mencionadas anteriormente, considerando únicamente

este parámetro de variabilidad podemos inferir que existe variabilidad genética alta en los ocelotes bajo cuidado humano en México respecto a las poblaciones de vida silvestre de México y Estados Unidos de América en donde las poblaciones de los Estados Unidos de América han sufrido un notable decremento de sus poblaciones en las últimas décadas. Cabe destacar que, con el trabajo realizado por Jânecka *et al.* (2014) y el desarrollado en el presente estudio se comparten seis loci analizados (FCA035, FCA043, FCA077, FCA082, FCA117 y FCA126), dentro de los cuales en todos se obtuvo mayor diversidad genética en los ocelotes de México. Si se comparan únicamente estos seis loci para determinar la H_e media (Tabla 8), se obtiene que, para los ocelotes bajo cuidado humano $H_e=0.81$, la población de Cameron $H_e=0.43$ y la población de Willacy $H_e=0.54$, en donde se refleja la alta heterocigosidad en los ocelotes bajo cuidado humano en México respecto a las silvestres de los Estados Unidos de América, dado por una mayor diversidad genética. Además, las H_e medias con el total de loci analizados en cada estudio, refleja también una mayor diversidad genética dada por la H_e en los ocelotes bajo cuidado humano, esto muestra un comportamiento similar para los loci no compartidos en cada estudio. Por otra parte, respecto a la población silvestre de Los Ébanos, México, que muestra mayor diversidad que las poblaciones de los Estados Unidos de América, los ocelotes bajo cuidado humano de México muestran una $H_e=0.81$ respecto a la población de Los Ébanos con una $H_e=0.69$, con lo que se obtiene una mayor diversidad genética para los ocelotes bajo cuidado humano. De igual forma que sucede con las poblaciones de los Estados Unidos de América, las H_e medias con el total de loci analizados en cada estudio ($H_e=0.81$ y $H_e=0.69$), se refleja un comportamiento similar para los loci no compartidos entre los estudios,

con una mayor diversidad genética para los ocelotes bajo cuidado humano, no obstante se requiere una revisión histórica de la diversidad en las poblaciones de ocelotes mexicanos, tanto para conocer la H_e en ejemplares de vida silvestre, como para conocer el estado de las poblaciones silvestres de ocelote y sus cambios históricos. Respecto a los ocelotes silvestres de Centro y Sudamérica, el presente trabajo comparte dos loci analizados (FCA043 y FCA126) con el estudio de Ruíz-García *et al.* (2012), para los cuales, los ocelotes bajo cuidado humano mostraron valores menores de H_e , con medias de H_e entre loci compartidos de $H_e=0.76$ y $H_e=0.86$ respectivamente, lo cual puede deberse al número de individuos muestreados y a la diversidad de origen de los ocelotes en dicho trabajo. Al comparar a los ocelotes bajo cuidado humano en México con los ocelotes bajo cuidado humano en Brasil, observamos que se comparte un locus analizado (FCA077) con el trabajo de Grisolia *et al.* (2007), para lo cual, los ocelotes bajo cuidado humano de México mostró una menor diversidad genética, $H_e=0.75$ y $H_e=0.87$ respectivamente, lo cual puede atribuirse a las mismas razones expuestas al comparar con los ejemplares de Centro y Sudamérica. Sin embargo, a pesar de que la H_e media es mayor en los ocelotes bajo cuidado humano de Brasil, es difícil comparar la diversidad genética mediante la H_e media obtenida a través del total de loci analizados en cada estudio, ya que en el trabajo de Grisolia *et al.* (2007) utilizaron únicamente cuatro microsatélites y de acuerdo con Arthofer *et al.* (2018), podría no mostrar con claridad la diversidad genética de dicha población. Finalmente, el trabajo de Wultsch *et al.* (2016) muestra una $H_e=0.63$ para el total de los 14 microsatélites utilizados en cuatro poblaciones silvestres que muestran una

única estructura poblacional, que al comparar con los ocelotes bajo cuidado humano de México muestran una menor heterocigosidad.

Otro estimador de la diversidad genética es la diversidad alélica, que para los ocelotes de México bajo cuidado humano fue de $N_a=9.89$, dado que el estimador de diversidad alélica es altamente sensible al tamaño de la muestra (Frankham *et al.*, 2010) se presenta también la riqueza alélica para poder ser comparada con otras muestras ($A_r=9$). De acuerdo con los datos presentados por Jânecka *et al.* (2014), podemos determinar que tomando en cuenta los seis loci compartidos con el presente estudio, la diversidad genética medida a través de la diversidad alélica por medio de N_a , dado que los tamaños de muestra son similares, en los ocelotes bajo cuidado humano de México es de $N_a=10.83$, para la población de Los Ébanos de $N_a=4.83$, para la población de Cameron de $N_a=2.67$ y para la población de Willacy de $N_a=3.67$. Con los datos obtenidos observamos que la diversidad genética de los ocelotes bajo cuidado humano fue claramente mayor respecto a las poblaciones silvestres de México y Estados Unidos de América, sin embargo, se debe tener en cuenta que para los ejemplares bajo cuidado humano se puede estar sobreestimando dicho valor al tener individuos de distintas poblaciones, al no existir entrecruzamientos entre dichos individuos y al ser además en su mayoría individuos de reciente cautiverio.

Otro parámetro importante que se ha utilizado como medida para la diversidad genética es el número de alelos efectivos (N_e) (Zouros, 1979; Nielsen *et al.*, 2003), que corresponde al número de alelos con frecuencias iguales necesarios

para obtener la misma heterocigosidad que en la población estudiada (Kimura y Crow, 1964; Frankham *et al.*, 2010), en donde los alelos de baja frecuencia tienen poca contribución al número efectivo de alelos. En el presente trabajo se observó un N_e promedio de 5.45, con un valor máximo de $N_e=8.60$ para el microsatélite FCA117 y un valor mínimo de $N_e=2.59$ para el FCA090 (Tabla 4). Estos datos muestran la dominancia, que se observa en el índice de Shannon para ciertos alelos con mayor frecuencia para cada locus (Anexo 4), por lo cual es importante dentro de un programa de reproducción bajo cuidado humano localizar a los individuos que presenten los alelos con baja frecuencia con la finalidad de mantener la diversidad genética al máximo.

Parentesco y Cruzamientos dirigidos

Los programas de reproducción bajo cuidado humano con regularidad se llevan a cabo para prevenir la extinción de especies hasta que puedan realizarse reintroducciones en la naturaleza (Utter y Epifanio, 2002; Frankham, 2010). Sin embargo, los grupos de animales bajo cuidado humano a menudo evolucionan a través de la endogamia, deriva y selección, que afectan la eficacia biológica (Spielman *et al.*, 2004; Frankham *et al.*, 2010; Willoughby *et al.*, 2014), por lo que es fundamental el mantenimiento de la diversidad genética en la gestión de los animales bajo cuidado humano para tener mayores posibilidades de reintroducciones exitosas.

A través de las estimaciones de máxima verosimilitud de parentesco, se determinó la relación entre todos los ejemplares muestreados (Tabla 5 y 6) para

poder determinar con base en dichos resultados los posibles cruzamientos viables. Para los ocelotes bajo cuidado humano se obtuvo un par de individuos con relación de hermanos, 20 con relación de medios hermanos, sin embargo, dicha asignación hace referencia a que entre esos individuos comparten el 25% de material genético, con lo que no necesariamente corresponde a medios hermanos, pudiendo tratarse de primos, tío-sobrino o abuelo-nieto, y se encontró una relación de padre-cría. El resto de las relaciones mostraron niveles muy bajos o ningún grado de estimación de parentesco (cero o cercanos a cero), con lo cual se determina que son individuos no relacionados. Al conocer las relaciones de parentesco entre los ocelotes bajo cuidado humano, se elaboró una propuesta de cruzamientos dirigidos bajo el protocolo de minimización de parentesco medio (*Minimizing kinship*), el cual busca disminuir la pérdida de alelos debido a la endogamia y reduce los efectos de la selección, los cuales influyen directamente con la eficacia biológica, al maximizar la diversidad genética y la diversidad alélica (Tabla 7), respecto a otros protocolos como apareamiento aleatorio (RAN) o selección de comportamientos dóciles (DOC), para los cuales se ha demostrado que respecto al protocolo de minimización de parentesco medio, este último reduce significativamente la pérdida de la diversidad genética en comparación a los otros protocolos (Montgomery *et al.*, 1998; Willoughby *et al.*, 2015; Willoughby *et al.*, 2017).

Con los datos obtenidos, es importante mencionar que se puede comenzar una base de datos genéticos de individuos, tanto silvestres como aquellos bajo cuidado humano y crear a partir de esta un banco de recursos genéticos organizado y con

fines meramente conservacionistas, en donde se coleccionen y almacenen biomateriales.

Conclusiones

El manejo adecuado de ejemplares de especies silvestres bajo cuidado humano en zoológicos es una herramienta importante para la conservación de especies, principalmente aquellas que se encuentran bajo alguna categoría de riesgo. A pesar del número limitado de individuos analizados en el presente trabajo, se determinó que los niveles de diversidad génica para los ocelotes bajo cuidado humano en México son altos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que estos datos pueden reflejar que existe alto flujo genético entre los individuos dentro del territorio nacional, como se ha observado en otros trabajos, o que pueden estar sobreestimados debido a que se cuenta con ejemplares de diversas ubicaciones geográficas dentro del país. Es necesario realizar estudios adicionales para conocer la diversidad genética de los ocelotes de vida silvestre en México a través de distintas poblaciones y comenzar con programas de conservación que integren las poblaciones silvestres y los ejemplares bajo cuidado humano como reservorio genético bajo una adecuada gestión.

Con el presente estudio se obtuvieron los primeros datos disponibles de diversidad genética para los ocelotes bajo cuidado humano en México y se presenta una propuesta de reproducción de individuos mediante cruzamientos dirigidos para comenzar un programa de conservación con los ocelotes bajo cuidado humano en UMAs, incluyendo los zoológicos, con el objetivo de mantener al máximo la

diversidad genética y minimizar la endogamia, además de llevar a cabo un proceso adecuado de selección para aumentar la probabilidad de reintroducir individuos aptos en la naturaleza, si en algún momento futuro es necesario, bajo un programa integral de genética, comportamiento y rehabilitación de individuos.

Para lograr el objetivo que se plantea en este estudio, es necesario crear una red de instituciones serias y comprometidas para el desarrollo de programas de conservación integral, tanto con individuos bajo el cuidado humano como poblaciones de vida silvestre, que garanticen el acceso a la información y el desarrollo adecuado del programa, entre las cuales deben integrarse zoológicos y centros de conservación, instituciones académicas y científicas, así como organismos gubernamentales, con la finalidad de desarrollar estudios con poblaciones silvestres en todo el territorio nacional y continuar con el muestreo de ejemplares de diversas instituciones y aquellos decomisados, para sumar individuos que aporten a la base de datos genética de individuos bajo cuidado humano y poder, en conjunto con los datos de las poblaciones silvestres, asignarlos a distintos grupos genéticos e implementar con el programa de reproducción dirigida.

Referencias

Alcántara, M. R. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. En Eguiarte, L. E., *et al.* (Ed). *Ecología molecular* (pp. 541-566). D.F., México: Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Applied Biosystems. (2004). *Evaluating genetic analysis systems: microsatellite analysis*. Foster City, CA.: Applied Biosystems

Aranda, M. (2005). Ocelote. En Ceballos, G., y G. Oliva (Ed). *Los mamíferos silvestres de México* (pp. 359-361). Ciudad de México, México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Fondo de Cultura Económica.

Aranda, M. (2012). *Manual para el rastreo de mamíferos silvestres en México*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., y Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR´ s), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión (Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review). *Asociacion Latinoamericana de Produccion Animal*, 13 (1).

Arif, I. A., y Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal biodiversity and conservation*, 32(1), 9-17.

Arthofer, W., Heussler, C., Krapf, P., Schlick-Steiner, B. C., y Steiner, F. M. (2018). Identifying the minimum number of microsatellite loci needed to assess population genetic structure: a case study in fly culturing. *Fly*, 12(1), 13-22.

Avila-Villegas, S., y Lamberton-Moreno, J. (2013). Wildlife survey and monitoring in the Sky Island region with an emphasis on neotropical felids. En Gottfried, Gerald J., Ffolliott, P., Gebow, B., Eskew, L. Collins, L. *Merging science and management in a rapidly changing world: Biodiversity and management of the Madrean Archipelago III and 7th Conference on Research and Resource Management in the Southwestern Deserts*; 2012 May 1-5 (pp. 441-447). Tucson, Arizona, E.U.: US Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station.

Avise, J. C. (2012). *Molecular markers, natural history and evolution*. Nueva York, E.U.: Springer Science y Business Media.

Bárcenas, H., y Medellín, R. A. (2010). Ocelot (*Leopardus pardalis*) in Aguascalientes, Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 55(3), 447-449.

Bellani, G. G. (2020). *Felines of the World: Discovery in Taxonomic Classification and History*. Londres, Reino Unido: Academic Press.

Bi, K., Linderoth, T., Vanderpool, D., Good, J. M., Nielsen, R., y Moritz, C. (2013). Unlocking the vault: Next-generation museum population genomics. *Molecular ecology*, 22(24), 6018-6032.

Boutin-Ganache, I., Raposo, M., Raymond, M., y Deschepper, C. F. (2001). M13-tailed primers improve the readability and usability of microsatellite analyses performed with two different allele-sizing methods. *Biotechniques*, 31(1), 25-28.

Briones-Salas, M., Lira-Torres, I., Carrera-Treviño, R., y Sánchez-Rojas, G. (2016). Relative abundance and activity patterns of wild felids in Chimalapas rainforest, Oaxaca, Mexico. *Therya*, 7(1), 123-134.

Brook, B. W., Tonkyn, D. W., O'Grady, J. J., y Frankham, R. (2002). Contribution of inbreeding to extinction risk in threatened species. *Conservation Ecology*, 6(1).

Buckley-Beason, V. A., Johnson, W. E., Nash, W. G., Stanyon, R., Menninger, J. C., Driscoll, C. A., ... y O'Brien, S. J. (2006). Molecular evidence for species-level distinctions in clouded leopards. *Current Biology*, 16(23), 2371-2376.

Byers O, Lees C, Wicken J, Schwitzer C (2013) The One Plan Approach: The Philosophy and Implementation of CBSG's Approach to Integrated Species Conservation Planning. WAZA Magazine, Towards Integrated Species Conservation 14: 2-5.

Caballero, A. (2014). Genètica de la conservació: l'aplicació dels conceptes de l'evolució a la conservació de la diversitat biològica. Universidad de Valencia. *MÈTODE Science Studies Journal*, 78(4), 54-59.

Casas-Marce, M., Soriano, L., López-Bao, J. V., y Godoy, J. A. (2013). Genetics at the verge of extinction: insights from the Iberian lynx. *Molecular ecology*, 22(22), 5503-5515.

Castro-Prieto, A., Wachter, B., y Sommer, S. (2011). Cheetah paradigm revisited: MHC diversity in the world's largest free-ranging population. *Molecular biology and evolution*, 28(4), 1455-1468.

Ceballos, G. (2014). *Mammals of Mexico* (pp.497-561). Baltimore, E.U.: John

Hopkins University Press.

Ceballos, G. y Eccardi, F. (2003). *Animales de México en peligro de extinción*. México, Fundación Ing. Alejo Peralta y Díaz Ceballos.

Ceballos, G., Ehrlich, P. R., y Dirzo, R. (2017). Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. *Proceedings of the national academy of sciences*, 114(30), E6089-E6096.

Charlesworth, D. (2003). Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1434), 1051-1070.

Charruau, P., Fernandes, C., Orozco-Ter Wengel, P., Peters, J., Hunter, L., Ziaie, H., ... y Burger, P. A. (2011). Phylogeography, genetic structure and population divergence time of cheetahs in Africa and Asia: evidence for long-term geographic isolates. *Molecular Ecology*, 20(4), 706-724.

CITES. Apéndice I (2015) [Citado 2019 Junio14]. Disponible en: URL : <https://cites.org/sites/default/files/esp/app/2017/S-Appendices-2017-10-04.pdf>

Cornuet, J. M., y Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144(4), 2001-2014.

Crawford, K. M., y Whitney, K. D. (2010). Population genetic diversity influences colonization success. *Molecular Ecology*, 19(6), 1253-1263.

De Villa Meza, A., Martínez Meyer, E. y López González, C. A. (2002). Ocelot (*Leopardus pardalis*) food habits in a tropical deciduous forest of Jalisco, Mexico. *The American Midland Naturalist*, 148 (1), 146-154.

Delibes, M., Rodríguez, A., y Ferreras, P. (2000). *Action plan for the conservation of the Iberian lynx in Europe (Lynx pardinus)*. Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats. WWF International - Mediterranean Program. Council of Europe.

Di Bitetti, M. S., Paviolo, A., De Angelo, C. D., y Di Blanco, Y. E. (2008). Local and continental correlates of the abundance of a neotropical cat, the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Journal of tropical ecology*, 24(2), 189-200.

Di Bitetti, M. S., Paviolo, A., y De Angelo, C. D. (2006). Density, habitat use and activity patterns of ocelots (*Leopardus pardalis*) in the Atlantic Forest of Misiones, Argentina. *Journal of Zoology*, 270(1), 153-163.

Díaz, S., Settele, J., Brondízio, E. S., Ngo, H. T., Agard, J., Arneth, A., ... y Zayas, C. N. (2019). Pervasive human-driven decline of life on Earth points to the need for transformative change. *Science*, 366(6471).

Earl, D. A. y Von Holdt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361.

Eizirik, E., Bonatto, S. L., Johnson, W. E., Crawshaw Jr, P. G., Vié, J. C., Brousset, D. M., ... y Salzano, F. M. (1998). Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two Neotropical cats (Mammalia, Felidae). *Journal of Molecular Evolution*, 47(5), 613-624.

Evanno, G., Regnaut, S., y Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.

Exposito-Alonso, M., Booker, T. R., Czech, L., Gillespie, L., Hateley, S., Kyriazis, C. C.,... y Zess, E. (2022). Genetic diversity loss in the Anthropocene. *Science*, 377(6613), 1431-1435.

Faircloth, B. C., Reid, A., Valentine, T., Eo, S. H., Terhune, T. M., Glenn, T. C., ... y Carroll, J. P. (2005). Tetranucleotide, trinucleotide, and dinucleotide loci from the bobcat (*Lynx rufus*). *Molecular Ecology Notes*, 5(2), 387-389.

Falconer, D. S., y Mackay, T. F. C. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. (4ª ed.). Pearson Education India.

Faleiro, F. G. (2007). *Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos*. Planaltina: Embrapa Cerrados.

Falush, D., Stephens, M., y Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), 1567-1587.

Fazzi-Gomes, P., Aguiar, J., Cabral, G. F., Marques, D., Palheta, H., Moreira, F., ... y Santos, S. (2021). Genomic approach for conservation and the sustainable management of endangered species of the Amazon. *Plos one*, 16(2), e0240002.

- Frankham, R. (1995). Conservation genetics. *Annual review of genetics*, 29(1), 305-327.
- Frankham, R. (1999). Quantitative genetics in conservation biology. *Genetics Research*, 74(3), 237-244.
- Frankham, R. (2003). Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies*, 326, 22-29.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A., y McInnes, K. H. (2010). *Introduction to conservation genetics*. (2a ed). Nueva York, Estados Unidos: Cambridge University Press.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A., y Ballou, J. D. (2002). *Introduction to conservation genetics*. Nueva York, Estados Unidos: Cambridge University Press.
- Galetti, M., y Dirzo, R. (2013). Ecological and evolutionary consequences of living in a defaunated world. *Biological Conservation*, 163, 1-6.
- Gaona, P., Ferreras, P., y Delibes, M. (1998). Dynamics and viability of a metapopulation of the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Ecological monographs*, 68(3), 349-370.
- García-Merchán, V. H., Calle, C. A., Sosa-Arango, C. C., Castaño-Castro, P., y Chacón-Vargas, K. (2021). Conservation Genetics in the Neotropical Carnivorous Mammals: A Systematic Review. *Molecular Ecology and Conservation Genetics of Neotropical Mammals*, 277-295.
- García-Moreno, J., Matocq, M. D., Roy, M. S., Geffen, E., y Wayne, R. K. (1996). Relationships and genetic purity of the endangered Mexican wolf based on analysis of microsatellite loci. *Conservation Biology*, 10(2), 376-389.
- Godoy, J. A. (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas*, 18(1), 22-33.
- González, E. G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2-3), 377-388.
- Goudet, J. (2005). Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 184-186.
- Grisolia, A. B., Moreno, F., Campagnari, V. R., Milazzotto, M. P., Garcia, J. F., Adania, C. H., y Souza, E. B. (2007). Genetic diversity of microsatellite loci in *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii* and *Leopardus tigrinus*. *Genetics and*

molecular research, 382-389.

Guo, D. C., y Milewicz, D. M. (2003). Methodology for using a universal primer to label amplified DNA segments for molecular analysis. *Biotechnology letters*, 25(24), 2079-2083.

Guo, S. W., y Thompson, E. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 48(2), 361-372.

Haag, T., Santos, A. S., Sana, D. A., Morato, R. G., Cullen Jr, L., Crawshaw Jr, P. G., ... y Eizirik, E. (2010). The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). *Molecular Ecology*, 19(22), 4906-4921.

Haig, S. M. (1998). Molecular contributions to conservation. *Ecology*, 79(2), 413-425.

Haines, A. M., Tewes, M. E., y Laack, L. L. (2005). Survival and sources of mortality in ocelots. *The Journal of wildlife management*, 69(1), 255-263.

Hall, E. R. (1981). *The mammals of North America*. (2a ed). Nueva York, E.U.: Wiley.

Harper, G. L., Maclean, N., y Goulson, D. (2003). Microsatellite markers to assess the influence of population size, isolation and demographic change on the genetic structure of the UK butterfly *Polyommatus bellargus*. *Molecular Ecology*, 12(12), 3349-3357.

Hedrick, P. W. (2001). Conservation genetics: where are we now?. *Trends in Ecology y Evolution*, 16(11), 629-636.

Herrera, J. A., y Gual, F. (2018). *Métodos para contención de felinos silvestres en cautiverio. Contención física y química*. México: Universidad Autónoma Metropolitana.

Hoffmann, A. A., Sgrò, C. M., y Kristensen, T. N. (2017). Revisiting adaptive potential, population size, and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(7), 506-517.

Holland, M. M., y Parson, W. (2011). GeneMarker® HID: A reliable software tool for the analysis of forensic STR data. *Journal of forensic sciences*, 56(1), 29-35.

Janečka, J. E., Munkhtsog, B., Jackson, R. M., Naranbaatar, G., Mallon, D. P., y Murphy, W. J. (2011). Comparison of noninvasive genetic and camera-trapping techniques for surveying snow leopards. *Journal of Mammalogy*, 92(4), 771-783.

Janečka, J. E., Tewes, M. E., Laack, L. L., Caso, A., Grassman, Jr, L. I., Haines, A. M., ... y Honeycutt, R. L. (2011). Reduced genetic diversity and isolation of remnant ocelot populations occupying a severely fragmented landscape in southern Texas. *Animal Conservation*, 14(6), 608-619.

Janečka, J. E., Tewes, M. E., Laack, L., Caso, A., Grassman, L. I., y Honeycutt, R. L. (2014). Loss of genetic diversity among ocelots in the United States during the 20th century linked to human induced population reductions. *PloS one*, 9(2), e89384.

Jaramillo-Jaimes, M. T., Sifuentes-Rincon, A. M., Sánchez Torres-Esqueda, M. T., Mendoza-Martínez, G. D., Clemente-Sánchez, F., Olivera-López, J. I., ... y Martínez-Tripp, S. C. (2007). Genetic variability in six Mexican gray wolf (*Canis lupus baileyi*) populations determined by microsatellite markers. *Journal of Applied Animal Research*, 31(2), 131-136.

Jarne, P., y Lagoda, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in ecology y evolution*, 11(10), 424-429.

Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403-1405.

Jombart T, Collins C (2015) A tutorial for discriminant analysis of principal components (DAPC) using adegenet 2.0.0.

Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*, 11(1), 1-15.

Johnson, W. E., Godoy, J. A., Palomares, F., Delibes, M., Fernandes, M., Revilla, E., y O'Brien, S. J. (2004). Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian lynx populations. *Journal of Heredity*, 95(1), 19-28.

Joshi, A., Vaidyanathan, S., Mondol, S., Edgaonkar, A., y Ramakrishnan, U. (2013). Connectivity of tiger (*Panthera tigris*) populations in the human-influenced forest mosaic of central India. *PloS one*, 8(11), e77980.

Kalinowski, S. T., Wagner, A. P., y Taper, M. L. (2006). ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6(2), 576-579.

Kantek, D. L. Z., Trinca, C. S., Tortato, F., Devlin, A. L., de Azevedo, F. C. C., Cavalcanti, S., ... y Eizirik, E. (2021). Jaguars from the Brazilian Pantanal: Low genetic structure, male-biased dispersal, and implications for long-term conservation. *Biological Conservation*, 259, 109153.

Keulartz, J. (2015). Captivity for conservation? Zoos at a crossroads. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 28(2), 335-351.

Kimura, M., y Crow, J. F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49(4), 725.

Kitchener, A. C. (1997). The role of museums and zoos in conservation biology. *International Zoo Yearbook*, 35(1), 325-336.

Kitchener, A. C., Breitenmoser-Würsten, Ch., Eizirik, E., Gentry, A., Werdelin, L., Wilting, A., ... y Tobe, S. (2017). *A revised taxonomy of the Felidae. The final report of the Cat Classification Task Force of the IUCN/ SSC Cat Specialist Group*. Cat News Special Issue 11, 80 pp.

Kristensen, T. N., y Sørensen, A. C. (2005). Inbreeding—lessons from animal breeding, evolutionary biology and conservation genetics. *Animal Science*, 80(2), 121-133.

Lacy, R. C. (1987). Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation biology*, 1(2), 143-158.

Leigh, D. M., Hendry, A. P., Vázquez-Domínguez, E., y Friesen, V. L. (2019). Estimated six per cent loss of genetic variation in wild populations since the industrial revolution. *Evolutionary Applications*, 12(8), 1505-1512.

Leyhausen, P. (1990). Cats. En: Parker, S.P. (Ed.). *Grzimek's encyclopedia of mammals* (pp. 576-632). New York, Estados Unidos: McGraw-Hill.

Li, Y., Liu, C., Wang, R., Luo, S., Nong, S., Wang, J., y Chen, X. (2020). Applications of molecular markers in conserving endangered species. *Biodiversity Science*, 28(3), 367.

Lino, A., Fonseca, C., Rojas, D., Fischer, E., y Pereira, M. J. R. (2019). A meta-analysis of the effects of habitat loss and fragmentation on genetic diversity in mammals. *Mammalian Biology*, 94(1), 69-76.

Luikart, G., Allendorf, F. W., Cornuet, J. M., y Sherwin, W. B. (1998). Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of heredity*, 89(3), 238-247.

Luikart, G., y Cornuet, J. M. (1998). Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation biology*, 12(1), 228-237.

Marshall, T. C., Sunnucks, P., Spalton, J. A., Greth, A., y Pemberton, J. M. (1999). Use of genetic data for conservation management: the case of the Arabian oryx. In Animal Conservation forum. *Cambridge University Press*, 2(4), 269-278.

Mellen, J. D. (1991). Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felis spp.*): a multiple regression analysis. *Zoo biology*, 10(2), 95-110.

Menotti-Raymond, M., David, V. A., Lyons, L. A., Schäffer, A. A., Tomlin, J. F., Hutton, M. K., y O'Brien, S. J. (1999). A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics*, 57(1), 9-23.

Merola, M. (1994). A Reassessment of Homozygosity and the Case for Inbreeding Depression in the Cheetah, *Acinonyx jubatus*: Implications for Conservation. *Conservation Biology*, 8(4), 961-971.

Miller, J. M., Cullingham, C. I., & Peery, R. M. (2020). The influence of a priori grouping on inference of genetic clusters: simulation study and literature review of the DAPC method. *Heredity*, 125(5), 269-280.

Modi, W. S., y O'Brien, S. J. (1988). Quantitative cladistic analyses of chromosomal banding data among species in three orders of mammals: Hominoid primates, Felids and Arvicolid rodents. En Gustafson J.P., Appels R. (Eds). *Chromosome structure and function*. (pp. 215-242). Boston, MA, E.U.: Springer.

Montgomery, M. E., Ballou, J. D., Nurthen, R. K., England, P. R., Briscoe, D. A., y Frankham, R. (1998). Minimizing kinship in captive breeding programs. *Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, 16(5), 377-389.

Munson, L., Terio, K. A., Worley, M., Jago, M., Bagot-Smith, A., y Marker, L. (2005). Extrinsic factors significantly affect patterns of disease in free-ranging and captive cheetah (*Acinonyx jubatus*) populations. *Journal of wildlife diseases*, 41(3), 542-548.

Murray, J. L., y Gardner, G. L. (1997). *Leopardus pardalis*. *Mammalian Species*, 548, 1-10.

Naude, V. N., Balme, G. A., O'Riain, J., Hunter, L. T., Fattebert, J., Dickerson, T., y Bishop, J. M. (2020). Unsustainable anthropogenic mortality disrupts natal dispersal and promotes inbreeding in leopards. *Ecology and evolution*, 10(8), 3605-3619.

NCBI (22 de noviembre de 2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Nielsen, R., Tarpay, D. R., y Reeve, H. K. (2003). Estimating effective paternity number in social insects and the effective number of alleles in a population. *Molecular ecology*, 12(11), 3157-3164.

Nowell, K., y Jackson, P. (1996). *Wild cats: status survey and conservation action plan* (Vol. 382). Gland, Suiza: IUCN.

Oliveira, R., Godinho, R., Randi, E., Ferrand, N., y Alves, P. C. (2008). Molecular analysis of hybridisation between wild and domestic cats (*Felis silvestris*) in Portugal: implications for conservation. *Conservation Genetics*, 9(1), 1-11.

Oliveira, T. G., Tortato, M. A., Silveira, L., Kasper, C. B., Mazim, F. D., Lucherini, M., ... y Sunquist, M. (2010). Ocelot ecology and its effect on the small-felid guild in the lowland neotropics. *Biology and conservation of wild felids*, 559-80.

Ottewell, K., Dunlop, J., Thomas, N., Morris, K., Coates, D., y Byrne, M. (2014). Evaluating success of translocations in maintaining genetic diversity in a threatened mammal. *Biological Conservation*, 171, 209-219.

Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26(3), 419-420.

Pauls, S. U., Nowak, C., Bálint, M., y Pfenninger, M. (2013). The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular ecology*, 22(4), 925-946.

Paviolo, A., Crawshaw, P., Caso, A., de Oliveira, T., Lopez-Gonzalez, C.A., Kelly, M., De Angelo, C. y Payan, E. (2015). *Leopardus pardalis* (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T11509A97212355. Disponible en: URL: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T11509A50653476.en>.

Paviolo, A., De Angelo, C. D., Di Blanco, Y. E., y Di Bitetti, M. S. (2008). Jaguar *Panthera onca* population decline in the upper Paraná Atlantic forest of Argentina and Brazil. *Oryx*, 42(4), 554-561.

Peakall, R. O. D., y Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.

Pérez, G., y Santos, A. (2015). El ocelote: el que está marcado con manchas. CONABIO. *Biodiversitas*, 117:7-5.

Petit, E., Balloux, F., y Goudet, J. (2001). Sex-biased dispersal in a migratory bat: a characterization using sex-specific demographic parameters. *Evolution*, 55(3), 635-640.

Piry, S., Luikart, G., y Cornuet, J. M. (1999). BOTTLENECK: a program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. *J Hered*, 90(4), 502-503.

Piyasatian, N., y Kinghorn, B. P. (2003). Balancing genetic diversity, genetic merit and population viability in conservation programmes. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(3), 137-149.

Pope, C. E. (2000). Embryo technology in conservation efforts for endangered felids. *Theriogenology*, 53(1), 163-174.

Pritchard, J. K., Stephens, M., y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.

Rabb, G. B. (2004). The evolution of zoos from menageries to centers of conservation and caring. *Curator: The Museum Journal*, 47(3), 237-246.

Rabinowitz, A., y Zeller, K. A. (2010). A range-wide model of landscape connectivity and conservation for the jaguar, *Panthera onca*. *Biological conservation*, 143(4), 939-945.

Ramirez, O., Altet, L., Ensenat, C., Vila, C., Sanchez, A., y Ruiz, A. (2006). Genetic assessment of the Iberian wolf *Canis lupus signatus* captive breeding program. *Conservation Genetics*, 7(6), 861-878.

Ramírez, P.J., J. Arroyo y N. González. 2008. Catálogo taxonómico de especies de México, Mamíferos. En: Ocegueda, S. y J. Llorente-Bousquets (Coords.). *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. CD 1. México: CONABIO.

Raymond, M. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, 86, 248-249.

Reed, D. H., y Frankham, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation biology*, 17(1), 230-237.

Rocha, D. G. D., Sollmann, R., Ramalho, E. E., Ilha, R., y Tan, C. K. (2016). Ocelot (*Leopardus pardalis*) density in central Amazonia. *PloS one*, 11(5), e0154624.

Rousset, F. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1), 103-106.

Rueda, R. P. (2015). *Estimación de la variabilidad genética del jaguar (Panthera onca) en cautiverio*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana.

Ruíz-García, M., Corrales, C., y Pinedo-Castro, M. (2012). *Craniometric and microsatellite genetic differentiation among putative ocelot subspecies (Leopardus pardalis) throughout Latin America*. Evolutionary Biology and Conservation of the Neotropical Carnivores Hauppauge, New York: Nova Science Publishers.

Ruíz-García, M., Payán, E., Murillo, A., & Alvarez, D. (2006). DNA microsatellite characterization of the jaguar (*Panthera onca*) in Colombia. *Genes & genetic systems*, 81(2), 115-127.

Sanderlin, J. S., Faircloth, B. C., Shamblin, B., y Conroy, M. J. (2009). Tetranucleotide microsatellite loci from the black bear (*Ursus americanus*). *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 288-291.

Savolainen, O. (1994). Genetic variation and fitness: conservation lessons from pines. En Loeschcke V., Jain SK, y Tomiuk J. (Eds). *Conservation Genetics* (pp. 27-36). Birkhäuser, Basel.

Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR

fragments. *Nature biotechnology*, 18(2), 233-234.

Selkoe, K. A., y Toonen, R. J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters*, 9(5), 615-629.

SEMARNAT. (2002). Norma Oficial Mexicana NOM059-ECOL-2001. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestre-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación, marzo 2002.

SEMARNAT. (2010). NORMA OFICIAL MEXICANA (2010) NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categoría de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio. Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación. Distrito Federal, México.

SEMARNAT. (2018). *Programa de Acción para la Conservación del Ocelote (Leopardus pardalis), Margay (Leopardus wiedii) y Jaguarundi (Puma yagouarundi)*, SEMARNAT/CONANP, México.

Servín, J. 2013. Perspectivas de estudio, conservación y manejo de los carnívoros en México. *Therya*, 4(3), 427-430.

Spong, G., Stone, J., Creel, S., y Björklund, M. (2002). Genetic structure of lions (*Panthera leo* L.) in the Selous Game Reserve: implications for the evolution of sociality. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(6), 945-953.

Stangl Jr, F. B., y Young, J. H. (2011). The ocelot (*Leopardus pardalis*) in northern Texas, with comments on its northern biogeography. *Western North American Naturalist*, 71(3), 412-417.

Sunquist, M. y F. Sunquist. (2002). *Wild Cats of the world*. Chicago, E. U.: The University of Chicago Press.

Swanson, W. F. (2003). Research in nondomestic species: experiences in reproductive physiology research for conservation of endangered felids. *ILAR journal*, 44(4), 307-316.

Tellería, J. L. (1999). Biología de la Conservación: balance y perspectivas. *Ardeola*, 46(2), 239-248.

Templeton, A. R. (1991). Genetics and conservation biology. En Seitz A., y Loeschcke V. (Eds). *Species Conservation: A Population-Biological Approach. Advances in Life Sciences.* (pp. 15-29). Birkhäuser, Basel.

Trigo, T. C., Freitas, T. R. O., Kunzler, G., Cardoso, L., Silva, J. C. R., Johnson, W. E., ... y Eizirik, E. (2008). Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Molecular Ecology*, 17(19), 4317-4333.

Trigo, T., Schneider, A., Lehugeur, L., Silveira, L., Freitas, T. O., y Eizirik, E. (2013). Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat. *Current Biology*, 23(24), 2528-2533.

U.S. Fish and Wildlife Service. (2016). *Draft Ocelot (Leopardus pardalis) Recovery Plan, First Revision.* U.S. Fish and Wildlife Service, Southwest Region, Albuquerque, Nuevo México.

Uphyrkina, O., Miquelle, D., Quigley, H., Driscoll, C., y O'Brien, S. J. (2002). Conservation genetics of the Far Eastern leopard (*Panthera pardus orientalis*). *Journal of heredity*, 93(5), 303-311.

Utter, F., y Epifanio, J. (2002). Marine aquaculture: genetic potentialities and pitfalls. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 12(1), 59-77.

Vargas, A. (2009). *Conservación Ex situ del Lince Ibérico: Un Enfoque Multidisciplinar Iberian Lynx Ex situ Conservation: An Interdisciplinary Approach.* Huelva, España: Fundación Biodiversidad.

Van De Kerk, M., Onorato, D. P., Hostetler, J. A., Bolker, B. M., y Oli, M. K. (2019). Dynamics, persistence, and genetic management of the endangered Florida panther population. *Wildlife Monographs*, 203(1), 3-35.

Vargas, A., Sánchez, I., Godoy, J., Roldán, E., Martínez, F., y Simón, MA. (2007). *Plan de Acción para la cría en cautividad del lince ibérico. (Iberian Lynx Captive Breeding Action Plan).* (4ª ed). Madrid, España: Ministerio de Medio Ambiente, Madrid.

Vrijenhoek, R. C. (1994). Genetic diversity and fitness in small populations. En Loeschcke V., Jain SK, y Tomiuk J. (Eds). *Conservation Genetics* (pp. 37-53). Birkhäuser, Basel.

Wang, B., Rocha, D. G., Abrahams, M. I., Antunes, A. P., Costa, H. C., Gonçalves, A. L. S., ... y Tan, C. K. W. (2019). Habitat use of the ocelot (*Leopardus pardalis*) in Brazilian Amazon. *Ecology and evolution*, 9(9), 5049-5062.

Wayne, R. K., y Morin, P. A. (2004). Conservation genetics in the new molecular age. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2(2), 89-97.

Weston, J. L., Schable, N. A., y Glenn, T. C. (2004). Characterization of six microsatellite primers for the grey fox (*Urocyon cinereoargenteus*). *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 503-505.

Willoughby, J. R., Fernandez, N. B., Lamb, M. C., Ivy, J. A., Lacy, R. C., y DeWoody, J. A. (2015). The impacts of inbreeding, drift and selection on genetic diversity in captive breeding populations. *Molecular Ecology*, 24(1), 98-110.

Willoughby, J. R., Ivy, J. A., Lacy, R. C., Doyle, J. M., y DeWoody, J. A. (2017). Inbreeding and selection shape genomic diversity in captive populations: Implications for the conservation of endangered species. *PLoS One*, 12(4), e0175996.

Wilson, D.E. y D.M. Reeder. (2005). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. (3ª ed). John Hopkins University Press. Baltimore, Estados Unidos de América.

Wisely, S. M., McDonald, D. B., y Buskirk, S. W. (2003). Evaluation of the genetic management of the endangered black-footed ferret (*Mustela nigripes*). *Zoo Biology: Published in affiliation with the American Zoo and Aquarium Association*, 22(3), 287-298.

Wolfe BA, Aguilar RF, Aguirre AA, Olsen GH, Blumer ES (2012) *Sorta situ*. The New Reality of Management Conditions for Wildlife Populations in the Absence of "Wild" Spaces. En: Aguirre AA, Ostfeld RS, Daszak P (eds) *New Directions in Conservation Medicine. Applied Cases of Ecological Health*. Oxford University Press, USA, pp 576-589.

Wultsch, C., Waits, L. P., y Kelly, M. J. (2016). A comparative analysis of genetic diversity and structure in jaguars (*Panthera onca*), pumas (*Puma concolor*), and ocelots (*Leopardus pardalis*) in fragmented landscapes of a critical Mesoamerican linkage zone. *PloS one*, 11(3), e0151043.

Wurster-Hill, D. H., y Centerwall, W. R. (1982). The interrelationships of chromosome banding patterns in canids, mustelids, hyena, and felids. *Cytogenetic*

and Genome Research, 34(1-2), 178-192.

Yoshio, M., Asada, M., Ochiai, K., Goka, K., Miyashita, T., y Tatsuta, H. (2009). Evidence for cryptic genetic discontinuity in a recently expanded sika deer population on the Boso Peninsula, central Japan. *Zoological science*, 26(1), 48-53.

Zouros, E. (1979). Mutation rates, population sizes and amounts of electrophoretic variation of enzyme loci in natural populations. *Genetics*, 92(2), 623-646.

Anexos.

Anexo 1. Ejemplares muestreados por sexo en cada UMA.

UMA	Ejemplar	Sexo
Zoológico de Chapultepec	Nicté	H
	Ororo	H
	Caspian	M
Zoológico de San Juan de Aragón	Emmet	M
	Batsi	H
Coba	Tepache	M
Zoológico de Guadalajara	GDL	H
Hacienda Noc Ac	Nocac	M
Parque Zoológico del Centenario	Fufa	H
	Fufo	M
Fundación Invictus	Tita	H
CrocoCun Zoo	Araceli	H
	Chaa	M
Zoológico Miguel Álvarez del Toro	1019	M
	5301	H
	Preciosa	H
	Rufino	M
Vallazoo	VZH	H
	VZM	M
Parque Museo La Venta	Poncho	M
YUMKA´	Yumka	M

H = Hembra; M = Macho.

Anexo 2. Registro de protocolo aceptado ante el SICUAE.



**Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias
de la Producción y de la Salud Animal**
*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Instituto de Investigaciones Biomédicas*

**SICUAE - SUBCOMITÉ INSTITUCIONAL PARA EL CUIDADO Y USO DE
ANIMALES EXPERIMENTALES**

Protocolo Número: MC-2018/2-17

Título del Proyecto: Genotipificación de ocelotes (*Leopardus pardalis*) en apoyo a programas de conservación en cautiverio.

Investigador Responsable: Fernando Gual Sill

Tesista: Mauricio Gutiérrez Sánchez Rued

Después de haber revisado el proyecto de investigación el día 5 de octubre del presente, el SICUAE consideró que reúne los requisitos que marcan las normas para el cuidado y uso de animales en experimentación, por lo cual, no tiene objeción en que se realicen los procedimientos planteados tal y como fueron descritos en el protocolo.

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, CDMX. a 6 de marzo del 2019

EL COORDINADOR

DR. JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT

- Unidad de Posgrado, Edificio B, Primer Piso, B107. Circuito del Posgrado. Ciudad Universitaria. Del. Coyoacán, CDMX, C.P. 04510. Tels.: 01 (55) 5623-7005 y 01 (55) 5623-0222 ext.: #80023, #80005, #80024.
- Edificio 4 Posgrado, Planta alta. Fac de Med Vet y Zoot. Circuito Escolar S/N, Ciudad Universitaria, Del Coyoacán, CDMX, C.P. 04510. Tels.: 01 (55) 5622-5854 al 57, Fax: 01 (55) 5616-7197 y 5616-2342.
- Secretaría Técnica de Producción y Salud Animal, FES-Cuautitlán: Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Campo 4, Km. 2.5 Carretera Cuautitlán Teloayuacan, Col. San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, C.P. 54714, Tel.: 5623-1939 ext.: 39405.
- Edificio A, planta baja de la Secretaría de Enseñanza del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Nueva Sede, Circuito Maestro Mario de la Cueva (pasando el Jardín Botánico) Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, CDMX, C.P. 04510, Tel.: 01 (55) 5622-8908 ext.: 47985.

Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN utilizado para las muestras de ocelote:

- Homogeneizar las muestras de sangre en tubo EDTA por inversión y tomar 500µl con una micropunta. Colocar en microtubos de centrífuga de 1.5-2ml, cada muestra con su respectiva identificación.
- Centrifugar por 5 minutos a 1500rpm a temperatura ambiente. Añadir 2ml de solución SRL y agitar la muestra por inversión durante 15 segundos.
- Centrifugar por 5 minutos a 1500rpm a temperatura ambiente y retirar el sobrenadante. Añadir nuevamente 2ml de solución SRL y mezclar con la punta de la micropipeta, homogeneizando el sedimento y el SRL.
- Centrifugar por 5 minutos a 1500rpm a temperatura ambiente y retirar el sobrenadante. Añadir 900ul de solución TE, 15ul de Proteinasa K, 60ul de solución SDS al 10% y agitar suavemente.
- Incubar los tubos a 56°C por dos horas con agitación suave.
- Añadir 400ul de NaCl 5M, agitar con vórtex y centrifugar a 12800rpm por 21 minutos a 4°C. Recoger el sobrenadante en tubos de centrífuga de 1.5ul para cada muestra, añadir 1ml de etanol absoluto frío a cada tubo y mezclar por inversión.
- Mantener en temperaturas de congelación las muestras durante una hora y posteriormente centrifugar a 12800rpm por 21 minutos a 4°C. Mantener las muestras en temperaturas de congelación durante una noche.
- Descongelar tubos por 5 minutos a 56°C y centrifugar a 12800rpm por 21 minutos a 4°C. Recoger el sobrenadante en tubos de centrífuga de 1.5ul, añadir 1ml de etanol absoluto frío, mezclar por inversión y mantener en temperaturas de congelación por 30 minutos.
- Centrifugar a 12800rpm por 21 minutos a 4°C. Decantar el etanol y dejar secar el sedimento en incubadora a 36°C. Añadir 100ul de TE y 1ml de fenol-cloroformo (1:1), mezclar con vórtex.
- Centrifugar durante dos minutos a 9400rpm a temperatura ambiente. Recuperar el sobrenadante, añadir 1ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar con vórtex.
- Centrifugar durante dos minutos a 9400rpm a temperatura ambiente. Recuperar el sobrenadante, añadir 400ul de isopropanol y dejar en congelación durante 1 hora.
- Centrifugar a 12800rpm por 21 minutos a 4°C. Decantar e incubar a 36°C para secar el sedmiento.
- Resuspender el sedimento en 20ul de TE dando ligero vórtex.
- Correr un gel de agarosa al 0.8% a 80V por 45 minutos para observar las extracciones y almacenar a -20°C.

Anexo 4. Gráficas de frecuencias alélicas por locus.

