

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**CAMPUS SÃO GABRIEL**

**JOSÉ VICTOR CARDOSO BRAGA**

**BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO E SUAS APLICAÇÕES NA CONSERVAÇÃO  
DE ESPÉCIES: UMA REVISÃO**

**São Gabriel  
2016**

**JOSÉ VICTOR CARDOSO BRAGA**

**BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO E SUAS APLICAÇÕES NA CONSERVAÇÃO  
DE ESPÉCIES: UMA REVISÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Biotecnologia da Universidade Federal  
do Pampa, como requisito parcial para obtenção do  
Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Luís Fabiano Santos da Costa

**São Gabriel  
2016**

**JOSÉ VICTOR CARDOSO BRAGA**

**BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO E SUAS APLICAÇÕES NA  
CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES: UMA REVISÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Biotecnologia da  
Universidade Federal do Pampa -  
Unipampa, *Campus* São Gabriel, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia.

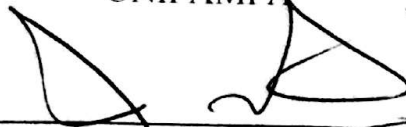
Trabalho de conclusão de curso defendido e aprovado em 01 de dezembro de 2016

Banca examinadora:



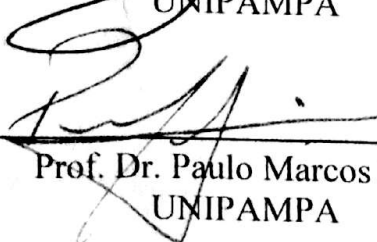
---

Prof. Dr. Luís Fabiano Santos da Costa  
Orientador  
UNIPAMPA



---

Prof. Dra. Analia Del Valle Garnero  
UNIPAMPA



---

Prof. Dr. Paulo Marcos Pinto  
UNIPAMPA

Dedico este trabalho aos meus pais, a toda minha família, a Deus, a meus amigos, e, de forma geral, a todos que sempre me acompanharam e me incentivaram a seguir batalhando.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Luís Fabiano Santos da Costa, por incentivar e apoiar todas as ideias científicas que tive durante a graduação.

A todos os colegas de curso e amigos que aqui se fizeram presente, mas em especial a Mara, Alexandre e Luiz Fernando, por constituírem uma família de coração.

A Nanaia, Dra. Dilma Moraes e Dr. Raúl Rossi, por algo que palavras não podem descrever.

Aos familiares, de ambos os lados, por serem mais que família.

Ao meu falecido avô Valdemar, e minha falecida avó Leda, que de alguma forma sempre estiveram presentes.

E, por fim, aos meus pais. Estes que não foram somente pais. Foram guerreiros. Insistentes, trabalhadores, incentivadores, cobradores. Estes que em toda adversidade imposta pela vida, nunca deixaram de acreditar em mim, de me ensinar a subir os degraus da vida, um por vez. A estes, agradeço por ensinarem que estudo e dedicação sempre nos levam adiante.

“E o que eu mais queria, era provar para todo mundo, que eu não precisava provar nada para ninguém.”

Legião Urbana

## RESUMO

Tecnologias de reprodução assistida (TRA), tais como a inseminação artificial (IA), a fecundação *in vitro* (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), tem sido de grande importância para a humanidade por proporcionarem maior rapidez e eficácia quanto a seleção genética em animais de produção ou de alto valor comercial, principalmente bovinos, equinos, ovinos e suínos. Além do seu uso em animais de produção, estas mesmas técnicas também se destacam quanto a reprodução humana, possibilitando que casais com problemas de fertilidade possam superar os obstáculos encontrados na reprodução natural e desta forma obter descendentes saudáveis. Atualmente, muitas espécies de animais selvagens têm entrado em declínio populacional devido a ações humanas em relação a caça e destruição do seu habitat natural. Isto impede que muitos animais consigam se reproduzir de forma natural e, quando conseguem, não há variabilidade genética suficiente para manter uma população saudável e geneticamente diferente das gerações anteriores. Sabendo do risco de extinção que estes animais enfrentam, zoológicos e centros de pesquisa do mundo inteiro têm procurado formas de reproduzir estes animais em cativeiro. É neste ponto em que as TRA se tornam uma ferramenta auxiliar de grande valor, pois com elas é possível reproduzir estes animais em níveis populacionais seguros para sua reinserção na natureza. Aqui, será revisado algumas das técnicas aplicadas a diferentes tipos de animais, como felinos selvagens, ursos, primatas não humanos, equinos selvagens, elefantes, cães selvagens, aves e até mesmo peixes, para melhor entendimento da situação atual quanto ao uso de TRA em animais ameaçados de extinção.

Palavras-Chave: Biotecnologia reprodutiva, conservação, *Companion Animals, Non-Domestic and Endangered Species* (CANDES).

## ABSTRACT

Assisted reproduction techniques (ART), such as artificial insemination (AI), *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI), have been of great importance for humanity by proportioning greater speed and efficacy in regards to genetic selection in farm or high commercial valuable animals, especially bovine, equine, ovine, and porcine. Beyond its use in farm animals, these same techniques also stand out in regards to human reproduction, making possible that couples with fertility problems may overcome the obstacles found during natural reproduction and thus obtain healthy descendants. Nowadays, many wild animals' species are facing a population decline caused by human actions in regards to hunting and destruction of its natural habitats. These actions prevent that many animals can reproduce in a natural way, and, when they do, there is not enough genetic variability to maintain a healthy population and genetically different from previous generations. Knowing the extinction risk that those animals face, zoological institutions and research centers all over the world are looking for ways to reproduce those animals in captivity. This is the point where ART became an auxiliary tool of great value, because with them it is possible to reproduce these animals to safe population levels for their reinsertion into nature. Here, we review some of the techniques applied to different animal kinds, such as wild feline, bears, non-human primates, wild equines, elephants, wild dogs, birds and even fish, to better understand the actual situation about the use of ART in extinction threatened animals.

Keywords: Reproductive biotechnology, conservation, *Companion Animals, Non-Domestic and Endangered Species* (CANDES).



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia de ovários e oócitos de urso pardo.....	21
Figura 2 - Filhote de panda produzido por inseminação artificial.....	23
Figura 3 - Estágios de maturação e desenvolvimento de oócitos de jumentas.....	28
Figura 4 - Inseminação Artificial em Ararinha-Azul.....	33
Figura 5 – Ultrassonografia tridimensional de feto de elefante.....	36

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Maturação in vitro, fertilização e desenvolvimento embrionário de oócitos de <i>Panthera leo</i> .....	18
Tabela 2 – Demonstração da eficiência de transdução (%), número de colônias formadas, eficiência das células capazes de se diferenciar (%) e sua sobrevivência após passagem 4 (%).....	19
Tabela 3 - Parâmetros de qualidade do esperma após descongelamento.....	26
Tabela 4 - Produto da inseminação artificial em Sagui-de-Tufos-Branços.....	30
Tabela 5 - Combinação de crioprotetores utilizados para criopreservar embriões de Surubim-da-Paraíba.....	32
Tabela 6 - Demonstrativo das técnicas utilizadas.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ l - microlitro

BSA – Albumina Sérica Bovina

cMYC – Gene regulador de transcrição

FCS – *Fetal calf serum*

FIV – Fecundação *in vitro*

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GnRH – Hormônio Liberador da Gonadotrofina

IA – Inseminação Artificial

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

iPS – Células-tronco Pluripotentes Induzidas

IUCN – *International Union for Conservation of Nature*

KLF4 – Fator de transcrição relacionado a pluripotência

LH – Hormônio Luteinizante

LPC - Lisofosfatidilcolina

NANOG – Fator de transcrição relacionado a pluripotência

OCT4 – Fator de transcrição relacionado a pluripotência

RT-PCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

SOX2 – Fator de transcrição relacionado a pluripotência

SSP - *Black-footed Ferret Species Survival Plan*

TE – Transferência de Embriões

TRA – Técnicas de Reprodução Assistida

WWF – *World Wildlife Fund*

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	METODOLOGIA .....	14
3	JUSTIFICATIVA.....	15
4	OBJETIVOS GERAIS .....	15
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
5	DESENVOLVIMENTO .....	16
5.1	Felinos .....	16
5.2	Ursos.....	19
5.3	Equinos .....	24
5.4	Primatas não humanos .....	28
5.5	Outros animais.....	31
5.5.1	Surubim-do-Paraíba.....	31
5.5.2	Ararinha-Azul.....	32
5.5.3	Lobo-Guará.....	33
5.5.4	Elefantes .....	35
6	DISCUSSÃO.....	37
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	40
	REFERÊNCIAS .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

O número de espécies em risco de extinção aumenta a cada ano. Segundo dados do *World Wildlife Fund* (WWF), estima-se que algo em torno de 1,4 a 1,8 milhões de espécies animais foram descritas pela ciência, e que, em base nos relatos de extinções, estima-se que a cada ano cerca de 0,01% a 0,1% destes animais são extintos. Traduzindo isto em números estimados, o número de espécies extintas varia de 200 a 2000 espécies por ano, isso se levarmos em conta somente os animais conhecidos e descritos pela ciência até então. Dentre a lista de animais catalogados em risco de extinção (WWF, 2016) encontram-se peixes, felinos, aves, anfíbios, reptéis, primatas entre outros.

Muitas instituições de proteção animal, zoológicos e centros de pesquisa têm procurado formas de reverter esta situação e proporcionar uma chance a estas espécies para que possam recuperar um número populacional estável a ponto de não serem mais ameaçadas de extinção. As alternativas encontradas para tal incluem a proteção, manutenção e restauração dos habitats naturais; a reprodução natural destes animais em cativeiro, seja entre os animais mantidos no próprio cativeiro ou animais transportados de um cativeiro a outro a fim de gerar maior variabilidade genética; e ultimamente, o uso de biotecnologias de reprodução artificial tem sido uma alternativa promissora para a manutenção e restauração populacional de espécies ameaçadas de extinção. (DURRANT, 2009)

Do ponto de vista histórico, as biotecnologias de reprodução assistida descritas na literatura tiveram início no século XVIII, quando o monge e cientista italiano Lazzaro Spallanzani observou a cópula e a fertilização em sapos, antes de inseminar uma fêmea canina com sucesso (DURRANT, 2009). A janela de possibilidades aberta por Spallanzani se difundiu a ponto de que em apenas um século já era possível inseminar animais de fazenda, cães, raposas e coelhos. Outro fator que auxiliou para a difusão da inseminação artificial (IA) foram as técnicas de coleta, avaliação e preservação de sêmen, além da superovulação de fêmeas em meados de 1950 (DURRANT, 2009).

Atualmente, as tecnologias de reprodução assistida (TRA) possibilitam a IA; onde o sêmen fresco ou criopreservado é depositado na cavidade intrauterina; a fertilização *in vitro* (FIV), onde vários oócitos são maturados e fertilizados em laboratório se mantendo até desenvolverem embriões; a transferência de embriões (TE), onde oócitos de fêmeas superovuladas são fecundados

e transferidos a fêmeas receptoras; a clonagem, seja ela por células somáticas ou por partição embrionária onde é possível gerar indivíduos com a mesma carga genética; a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), na qual a cabeça de espermatozoides é inserida dentro de um oócito maturado através do auxílio de pipetas de micromanipulação; o desenvolvimento de quimeras e até mesmo a produção de animais transgênicos.

Do ponto de vista da preservação de espécies, as técnicas de IA, TE, FIV e ICSI se tornam as mais úteis por já serem melhor estudadas e adaptadas às mais variadas espécies. Tendo em vista a preservação de espécies para que se mantenha a biodiversidade nos mais diversos habitats, e o conhecimento científico já proporcionado e ainda em desenvolvimento em relação as TRA para as mais variadas espécies, este trabalho tem como objetivo revisar as pesquisas de vanguarda nas quais o uso de TRA estejam possibilitando novos horizontes para as espécies ameaçadas de extinção e, especificamente, o que estas TRA tem possibilitado para primatas, mamíferos de grande porte, animais marinhos e animais silvestres do território brasileiro.

## 2 METODOLOGIA

Revisão de literatura a fim de obter dados mais recentes sobre o uso das Tecnologias de Reprodução Assistida em animais silvestres, mantidos em cativeiro ou livres em habitat natural, de preferência ameaçados de extinção e suas consequências sobre a manutenção ou recuperação destas espécies. Estão incluídos nesta revisão trabalhos publicados em revistas científicas voltadas a reprodução animal, assim como a conservação de espécies. As palavras-chave utilizadas para a pesquisa foram *assisted reproduction*, *wildlife* e *endangered species*, nos bancos de dados do PubMed, Science Direct e Scielo. Também foram coletados dados de organizações, tais como a *World Wildlife Fund* (WWF) e a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN). Os trabalhos revisados se encontram em um período de até 40 anos. Não foram citados trabalhos provenientes de fontes não reconhecidas pela ciência, tais como blogs ou outras páginas da internet.

### **3 JUSTIFICATIVA**

Tendo em vista que existem animais selvagens ameaçados de extinção como resultado da ação humana e em alguns casos por eventos naturais, este trabalho procura demonstrar quais pesquisas, incluindo métodos de reprodução artificial, têm sido utilizados para tentar reverter este quadro e qual a atual situação perante os desafios encontrados para recuperar estas espécies.

### **4 OBJETIVOS GERAIS**

Obter informações sobre o uso de biotecnologias e técnicas de reprodução assistida em animais ameaçados de extinção.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Demonstrar quais biotecnologias têm sido aplicadas atualmente em espécies animais ameaçadas de extinção, visando a conservação destas espécies.

Comparar, dentro da mesma família, gênero e em alguns casos até mesmo espécies de animais, quais métodos têm sido mais eficazes para sua reprodução.



## 5 DESENVOLVIMENTO

### 5.1 FELINOS

Membros da família Felidae apresentam uma pequena vantagem em relação a sua conservação através de técnicas de reprodução assistida devido ao fato de possuírem o gato doméstico (*Felis catus*) como um modelo animal muito bem descrito e estudado. Através de estudos em *Felis catus* foi possível obter a base para tratamentos em felinos selvagens.

Em um estudo realizado com suçuaranas (*Puma concolor*), foi possível criopreservar sêmen em um meio contendo TRIS (3,025g), ácido cítrico (1,70g), de frutose (1,25g), gema de ovo (20%), estreptomicina (1mg/L) e água destilada (100mL), além de concentrações de 5% ou 7,5% de glicerol, obtendo resultados promissores quanto aos índices espermáticos e a probabilidade de fecundação dos mesmos (DECO-SOUZA et al., 2013). Segundo os autores (DECO-SOUZA et al., 2013), a motilidade do sêmen descongelado variou entre 30 a 50%, o vigor espermático entre 2 a 3. Os índices espermáticos citados acima variaram entre 37,2 a 52,5% nos meios contendo 5% de glicerol, e entre 35 e 55% nos meios contendo 7,5% de glicerol. Todavia, o percentual de espermatozoides com membrana funcional pós descongelamento apresentou uma variação de 8 a 52%, dentre o sêmen dos animais avaliados, demonstrando que a qualidade do sêmen de cada animal pode ter influenciado nos resultados; ainda de acordo com os autores, as amostras de sêmen descongelado possuem patamares viáveis para inseminação artificial em pelo menos 20 minutos após o descongelamento (DECO-SOUZA et al., 2013).

Cabe destacar que dois trabalhos recentes (FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2015; LUTHER et al., 2016) se utilizaram de um mesmo protocolo para criopreservação de esperma de gato doméstico e aplicaram-no em esperma de leões (*Panthera leo*).

O protocolo em questão é o descrito por Lengwinat e Blottner (1994), onde o meio de criopreservação em um volume de 600µl consiste em *buffer* TEST com adição de 7,5% de glicerol e 15% da fração solúvel em água da gema do ovo de galinha onde as amostras são resfriadas em banho-maria a 4°C e equilibradas por 3 horas antes de serem submetidas a resfriamento abaixo de zero e submetidas a nitrogênio líquido.

Um dos trabalhos em questão (LUTHER et al., 2016), realizado entre os anos de 2012 e 2014, objetivava adaptar esta metodologia para sêmen de leões coletados por cateterismo uretral ou eletroejaculação. E os resultados indicaram que a qualidade de 17 amostras criopreservadas foi

variável, porém, a motilidade espermática variou de 20% a 95%, a motilidade progressiva, de apenas 5% a no máximo 60% e a percentagem de espermatozoides considerado morfologicamente normais variou de 11% a 64%. Uma possibilidade para tal variação foi o estresse oxidativo, desconsiderado após medições da degradação de lisofosfatidilcolina (LPC) em esperma e em eritrócitos, de cada animal respectivamente, onde o resultado indicou que a redução da capacidade do fluido seminal não estava relacionada ao acúmulo de LPC nos eritrócitos. Sendo assim, o método se mostra efetivo para a criopreservação de esperma de leão e as variações nas avaliações espermáticas são atribuídas ou ao ejaculado, ou ao macho especificamente (LUTHER et al., 2016).

Interessantemente, o outro trabalho (FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2015) que também se utilizou do método de criopreservação de Lengwinat e Blottner (1994) ocorreu na mesma época. Porém, este trabalho envolveu outras técnicas além da criopreservação. Fernandez-Gonzalez e colaboradores (2015) foram capazes de gerar blastocistos através da ICSI após maturarem, *in vitro*, oócitos de quatro leões jovens, que passaram por um processo de eutanásia. Os oócitos foram capturados através de cortes na superfície externa do ovário em meio de lavagem contendo Meio 199 com sais de Earle, suplementado com albumina sérica bovina (BSA), cisteína, HEPES, piruvato de sódio, lactato de sódio L-glutamina e gentamicina. A maturação dos oócitos ocorreu em dois meios de lavagem, um contendo hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) de origem ovina e outro contendo os mesmos hormônios de origem suína, ambos os meios continham  $\beta$ -estradiol e foram maturados por 32 a 34 horas a 38,5°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O procedimento de ICSI foi realizado com os oócitos maturados e espermatozoides descongelados e contou com o auxílio de uma pipeta para firmar os oócitos por pressão negativa e uma pipeta de injeção para inserir os espermatozoides. Após, os oócitos foram transferidos para meios de cultura de embriões.

O resultado final demonstrou o primeiro relato da produção de blastocistos de leões em laboratório, porém, dos 68 oócitos utilizados no experimento, 25 atingiram a maturação desejada, 11 clivaram e apenas 4 atingiram o estágio de mórula e posteriormente blastocisto (FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2015), conforme tabela 1. Um resultado ainda abaixo do desejado e que, segundo os autores, pode ser devido tanto ao fato de os ovários em questão serem retirados de fêmeas jovens que ainda não haviam atingido a puberdade, ou porque o protocolo utilizado ainda não é específico o suficiente para a espécie.

**Tabela 1** – Maturação *in vitro*, fertilização e desenvolvimento embrionário de oócitos de *Panthera leo*. Adaptado de Fernandez-Gonzales e colaboradores (2015).

Número de oócitos	Maduros	Clivados	Mórulas	Blastocistos
68	25 (36,7%)	11 (16,1%)	4 (5,8%)	4 (5,8%)

Uma outra forma de promover a reprodução de felinos selvagens é a estimulação do estro. Pensando nisso, Barnes e colaboradores (2016) optaram por estimular o estro de fêmeas de jaguar (*Panthera onca*). Para tal, se utilizaram de gonadotropina equina e humana, como hormônios exógenos administradas intramuscularmente, além de estimulantes exógenos, estímulos físicos vaginais também foram realizados em animais treinados a entrarem em calhas durante um período de estro comportamental. Ao final do experimento, todas as fêmeas apresentaram estro independente do tratamento, porém não houve sinal de ovulação em fêmeas que não tiveram contato com machos, além do mais, fêmeas apresentaram pseudo gravidez avaliadas pelo pico de progesterona e duas fêmeas mantiveram níveis elevados de progesterona após cópula natural, resultando no nascimento de um filhote saudável para cada fêmea (BARNES et al., 2016).

Outro trabalho importante, embora não envolva biotecnologia reprodutiva, demonstra a produção de células tronco pluripotentes induzidas, através da inserção de fatores de transcrição em amostras de fibroblastos de leopardo das neves (*Panthera uncia*), abrindo assim novas possibilidades para a conservação desta e outras espécies por meio da biotecnologia.

Takahashi e Yamanaka (2006) descreveram a indução de células tronco pluripotentes a partir de fatores de transcrição. Partindo deste princípio, Verma e colaboradores (2012) utilizaram um tipo de vetor retroviral codificando fatores de transcrição humanos, sendo estes OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC e NANOG, onde o último foi selecionado por ser de crítica importância para a pluripotência em grandes animais. Após isolarem com sucesso fibroblastos a partir de amostras doadas de animais que morreram de causas naturais, e utilizarem o vetor retroviral pMX-GFP para a transfecção dos fatores de transcrição, os autores obtiveram células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) em suas colônias contendo 5 fatores de transcrição; NANOG foi o fator diferencial em comparação ao estudo de Takahashi e Yamanaka (2006). A eficiência de reprogramação celular para as células que continham 5 fatores foi de 0,000517%, superando os 0,000308% das células

contendo 4 fatores. Além do mais, estas colônias obtiveram taxas de sobrevivência superior a 80%, conforme tabela 2.

**Tabela 2** - Demonstração da eficiência de transdução (%), número de colônias formadas, eficiência das células capazes de se diferenciar (%) e sua sobrevivência após passagem 4 (%). Adaptado de Verma e colaboradores (2012).

<b>Experimento</b>	<b>Número de fatores</b>	<b>Eficiência de transdução (%)</b>	<b>Número de colônias</b>	<b>Eficiência (%)</b>	<b>Sobrevivência após P4 (%)</b>
1	4 fatores	96,33	37/120.000	0,000308	0
2	5 fatores	96,33	62/120.000	0,000517	80

Os testes que comprovaram a eficiência da reprogramação celular foram as análises por RT-PCR, onde se pode avaliar a expressão ou não dos fatores, e a formação de teratoma em músculos de ratos. Os resultados do RT-PCR confirmaram a expressão endógena OCT4 e NANOG por um período mais prolongado, além da expressão exógena de OCT4, SOX2 e NANOG por período menor. A expressão dos genes c-MYC e KLF4 foi detectada durante todos os testes de RT-PCR. A formação de teratomas foi de extrema importância pois após a retirada e análise dos tumores, foi possível confirmar a formação de células e tecidos das camadas germinativas primárias, sendo estas queratinócitos (ectoderma), cartilagem (mesoderma) e epitélio secretor (endoderma) (VERMA et al., 2012).

## 5.2. URSOS

A família Ursidae é outra família com grandes ameaças de extinção, destacando-se principalmente o urso polar (*Ursus maritimus*), o urso pardo (*Ursus arctos*) e o panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*). Trabalhos publicados desde o ano 2000 indicam boas alternativas de recuperação destas espécies, assim como resultados promissores.

Para o urso pardo, foi possível criopreservar esperma sob condições consideradas ideais (PAZ et al., 2012), otimizar as condições de resfriamento para armazenamento e transporte pré-criopreservação (LÓPEZ-URUEÑA et al., 2015) e realizar a maturação de oócitos *in vitro* (YIN et al., 2007).

O uso de 15 ejaculados provenientes de nove machos adultos durante dois anos (entre 2008 e 2009) sob diferentes concentrações de glicerol e diferentes taxas de resfriamento demonstrou qual combinação se aplica melhor para esta espécie. Para tal, Paz e colaboradores (2012) testaram as concentrações de glicerol em 2%, 4%, 6%, 8%, e 10% sendo estas resfriadas a -10°C, -20°C e -40°C por minuto e concluíram que, após as análises de motilidade; velocidade; amplitude do deslocamento da cabeça; espermatozoides viáveis e danos no acrossoma, a combinação de 6% de glicerol e a taxa de resfriamento de -20°C por minuto se tornou a mais viável. Isso se deve muito ao fato de as mais extremas (2% e 10%) serem insuficientes para proteger os espermatozoides (2%) ou apresentarem toxicidade (10%); quanto as taxas de resfriamento, os autores indicam que as mesmas aparentam não possuir grande importância, desde que a taxa de glicerol esteja entre 4% e 8%, considerada a faixa ideal, ainda assim os autores indicam que a taxa de -10°C por minuto apresenta resultados negativos (PAZ et al., 2012).

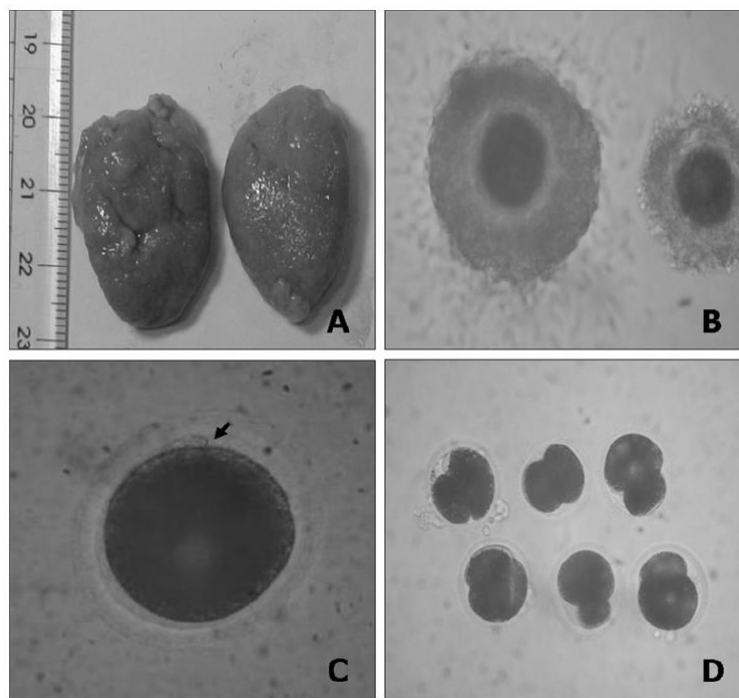
A importância de otimizar as condições de resfriamento se deve ao fato de que amostras recém coletadas podem se manter sob condições viáveis para o transporte de um local até o laboratório. Em termos de espécies selvagens em que por muitas vezes o acesso ao animal é limitado, este tipo de procedimento bem estabelecido se torna fundamental em processos de biotecnologia reprodutiva para espécies ameaçadas. Pensando nisto, López-Urueña e colaboradores (2015) utilizaram ejaculados de 24 machos adultos e avaliaram os efeitos da temperatura (5°C, 15°C e temperatura ambiente por 24 e 48 horas), da concentração de glicerol (0%, 3% e 6%) e da taxa de diluição (alta ou baixa) sob a motilidade, viabilidade, status do acrossoma e apoptose antes e depois do congelamento em nitrogênio líquido e após teste de estresse térmico.

Os efeitos da temperatura pré-congelamento demonstraram que quanto a integridade do acrossoma, motilidade total e a motilidade progressiva, os espermatozoides armazenados a 5°C por 24 ou 48 horas apresentaram melhores resultados em comparação aos outros grupos, incluindo o teste de estresse térmico, e resultados mais próximos ao do grupo controle, sendo assim, este grupo de espermatozoides foi utilizado como base para os outros testes. A concentração de glicerol apresentou diferenças significativas em amostras resfriadas a 5°C, sendo que quanto maior a concentração (de 0% a 6%) e menor o tempo, melhores os resultados de viabilidade, integridade do acrossoma, células não apoptóticas e motilidade. Por último, as taxas de diluição não demonstraram efeitos significativos após 24h de resfriamento, porém após 48h a grande maioria dos parâmetros foram

afetados negativamente em amostras de baixa diluição. Sendo assim, os autores concluem que o armazenamento de amostras a 5°C, em uma concentração de glicerol a 6% por um período de até 48 horas e taxa de diluição alta para amostras armazenadas até 24 horas (LÓPEZ-URUEÑA et al., 2015).

Quanto aos gametas femininos, já houve o relato de maturação dos mesmos *in vitro*. Isto ocorreu após a recuperação de ovários, e conseqüentemente oócitos, de fêmeas eutanasiadas. Os oócitos foram maturados em meio contendo TCM-199 suplementado de soro fetal bovino (SFB), estradiol, FSH, cisteína e piruvato de sódio em incubadora contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 38,5°C por 24 ou 48 horas (YIN et al., 2007), conforme figura 1.

**Figura 1** - Morfologia de ovários e oócitos de urso pardo. A) Ovários. B) Oócitos cultivados *in vitro* por 48h. C) Oócitos maturados com primeiro corpo polar (seta). D) Embriões 2 e 4 células de oócitos ativados. Fonte: Yin e colaboradores (2007).



As taxas de maturação demonstraram 17,6% e 59,4% para as amostras maturadas por 24h e 48h, respectivamente. Além do mais, 31,6% destes oócitos maturados por 48h apresentaram clivagem, embora tenham apresentado lise total após 7 dias. Isto indica que oócitos podem ser maturados *in vitro* e atingirem estágio de embrião 2 a 4 células (YIN et al., 2007). Porém, os autores ressaltam a importância de estudos focando a fertilização *in vitro* destes animais, tendo em vista que a maturação dos gametas femininos já se torna viável.

O panda gigante é uma das espécies mais ameaçadas do mundo, sendo inclusive o símbolo de órgãos tais como o WWF, e contando com uma população de aproximadamente 1600 indivíduos (ZHAN et al., 2006) se torna de extrema importância para estudos visando a recuperação de espécies. De fato, inseminações artificiais foram reportadas (HUANG et al., 2012; LIU, 1981; MASUI et al., 1989) e resultaram no nascimento de filhotes saudáveis.

A primeira inseminação com sucesso ocorreu na China em 1981 (LIU, 1981), porém a primeira descrição experimental encontrada pelo nosso grupo pertence a Masui e colaboradores, publicada em 1989. Estes pesquisadores optaram pela inseminação artificial após um casal de pandas no Zoológico Ueno, no Japão, apresentarem cópula natural sem resultar em prenhez devido a rejeição da fêmea. Para tal, utilizaram espermatozoides frescos obtidos através de eletroejaculação e cateteres para inseminação artificial de vacas durante o período em que mudanças comportamentais indicavam o estro da fêmea e que os níveis de estrógeno na urina indicavam o tempo correto para as inseminações. Duas inseminações ocorreram com a fêmea anestesiada, resultando em duas gestações completas e no nascimento de um filhote por gestação. Entretanto, o primeiro filhote veio a óbito 43 dias após o parto por ter sido rejeitado pela mãe, e o segundo filhote foi aceito e devidamente cuidado pela mesma (MASUI et al., 1989), assim mostrado na figura 2.

**Figura 2** - Filhote de panda produzido por inseminação artificial aos 174 dias pós-parto. Fonte: Masui e colaboradores (1989).



Mais recentemente, em um artigo publicado no ano de 2012 (HUANG et al., 2012), a identificação do estro através de níveis de estrógeno em amostras de urina possibilitou o uso de sêmen criopreservado para a inseminação artificial de fêmeas. O sêmen dos machos foi criopreservado após diluição em buffer TEST em uma mistura contendo 5% de glicerol onde as amostras foram resfriadas a 4°C e inseridas em nitrogênio líquido. As amostras foram descongeladas e avaliadas quanto ao volume, a quantidade total de espermatozoides e a motilidade antes de cada inseminação. As inseminações ocorreram em animais anestesiados, no período mais próximo ao pico de estrógeno e quando sinais comportamentais eram vistos.

Os resultados indicaram que apenas 25% das inseminações obtiveram sucesso, os cinco filhotes foram produto de quatro fêmeas, sendo que a fêmea que produziu dois filhotes foi a mais velha a dar luz através da inseminação artificial até então. Interessantemente, a proximidade da IA com o pico dos níveis de estrógeno foi de extrema importância, tendo em vista que as IA resultantes em filhotes foram realizadas ou no dia de pico, ou até um dia após; todas as IA que ocorreram dois ou mais dias após o pico de estrógeno, falharam. Outro ponto é que o sêmen de apenas quatro machos obteve sucesso, sendo que três destes não obtiveram sucesso em outras fêmeas, o que segundo os autores indica que a qualidade do sêmen de cada macho não foi um fator primordial para os resultados (HUANG et al., 2012).

O urso polar também enfrenta sérios riscos de extinção, principalmente pela perda de seu habitat natural em razão do aquecimento global. Devido ao difícil acesso e a necessidade de reprodução destes animais antes que sejam extintos, zoológicos tem tentado a cópula natural entre quase todos individuais saudáveis e aptos a reproduzir, porém os resultados têm ficado abaixo das expectativas (CURRY et al., 2014). Sendo assim, o desenvolvimento de um programa de inseminação artificial se torna muito importante para superar estes obstáculos.

O uso de hormônios exógenos, sendo estes a gonadotropina coriônica equina e o hormônio luteinizante suíno, induziram a ovulação de uma única fêmea de urso polar. Para o procedimento de IA, ambos fêmea e macho foram anestesiados. A coleta de sêmen se deu por eletroejaculação e o sêmen, contendo 85% de motilidade progressiva e 89% de morfologia normal, foi utilizado a fresco. Um cateter específico foi utilizado devido a impossibilidade de alcançar a cérvix e posteriormente depositar o sêmen na cavidade uterina (CURRY et al., 2014).

Apesar da análise fecal indicar um aumento de pregnanodiol-3-glucuronido (PdG), um hormônio relacionado a prenhez, nenhum filhote foi produzido. Os níveis de testosterona também



indicaram uma possível prenhez, porém os autores não conseguiram distinguir se ocorreu um caso de aborto ou pseudoprenhez. Além do mais, os autores destacam que as administrações exógenas de hormônios demonstram potencial para inseminações futuras (CURRY et al., 2014).

### 5.3. EQUINOS

Apesar do uso de biotecnologias reprodutivas, principalmente em cavalos (*Equus caballus*) de alto valor comercial, tais como inseminação artificial, fertilização *in vitro*, clonagem, transferência de embriões e ICSI já apresentarem relatos na literatura (CARNEVALE, 2016; GODKE; SANSINENA; YOUNGS, 2014; HINRICHS et al., 2014), pouco se sabe sobre o uso das mesmas em equinos selvagens ou que não apresentem valores comerciais significativos.

Um estudo recente demonstra que é possível criopreservar espermatozoides provenientes do epidídimo de onagro persa (*Equus hemionus onager*) em boas condições para aplicação em inseminações artificiais ou FIV. Se estima que a população selvagem de onagro esteja restrita a números em torno de 600 animais, em duas regiões protegidas, e a falta de contato entre estes animais os torna isolados tanto geograficamente quanto geneticamente, fazendo com que a população cativa possa ser usada como reserva genética (PABLOS et al., 2015).

Através da remoção *post mortem* de gônadas de onagros, as mesmas foram levadas a laboratório sob duas condições de temperatura, sendo elas 4°C e 22°C. A motilidade espermática foi medida após a recuperação pelo epidídimo, antes do congelamento, imediatamente após o descongelamento e em até 3 horas após o descongelamento em incubação a 37°C ou a 22°C; a viabilidade espermática foi obtida por coloração, onde espermatozoides que continham coloração vermelha ou rosa foram classificados como mortos. Quanto a criopreservação das amostras, duas técnicas foram utilizadas, sendo elas o resfriamento direcional e o resfriamento convencional; para o descongelamento, amostras foram submetidas a banho maria por 30 segundos em uma temperatura de 37°C (PABLOS et al., 2015).

Os resultados indicaram que não houve diferença na qualidade do esperma em relação a temperatura de transporte das amostras provenientes do epidídimo quando as mesmas foram avaliadas a fresco, assim que chegaram ao laboratório. Todavia, após os métodos de congelamento as amostras transportadas a 4°C demonstraram maior motilidade quando comparadas as amostras transportadas a 22°C, porém, a viabilidade, integridade do acrossoma e morfologia do esperma se

demonstraram similares. Também em relação aos métodos de congelamento, amostras congeladas através de congelamento direcional apresentaram melhor motilidade após o descongelamento, independentemente da temperatura de transporte, entretanto, também não houve diferenças em relação a morfologia do espermatozoide e a integridade do acrossoma quando as duas técnicas de congelamento foram comparadas de acordo com a tabela 3 (PABLOS et al., 2015).

Entretanto, a motilidade foi afetada devido à combinação do método de congelamento e a temperatura de incubação pós descongelamento. Amostras congeladas por resfriamento direcional e incubadas a 22°C apresentaram melhor motilidade do que amostras congeladas por resfriamento convencional e incubadas a 37°C ao final de 3 horas. Em suma, os autores definem que para espermatozoide de onagro, o melhor método de criopreservação se passa pelo transporte a 4°C e o congelamento por resfriamento direcional, além do mais, as amostras mantidas a temperatura ambiente (22°C) apresentaram boa motilidade ao final de 3 horas, demonstrando que o uso destes espermatozoides não necessita ser realizado imediatamente após o descongelamento. Outro fator importante se deve ao número escasso de amostras, o que não possibilitou uma análise estatística necessariamente significativa ao estudo (PABLOS et al., 2015).

**Tabela 3** – Parâmetros de qualidade do espermatozoide após descongelamento. Temperatura de transporte a 4°C ou a 22°C e técnica de resfriamento direto (RD) ou convencional (RC). Adaptado de Pablos e colaboradores (2015).

Temperatura de transporte (°C)	Técnica de resfriamento	Motilidade (%)	Viabilidade (%)	Acrossoma intacto (%)	Morfologia normal (%)
4	RD	43,3	52,3	69,6	90,3
	RC	27,5	43,0	75,8	90,9
22	RD	20,0	40,3	68,6	86,6
	RC	10,8	38,1	74,8	85,1

Um outro estudo, realizado no Brasil, propôs novas estratégias de preservação de sêmen de jumentos (*Equus asinus*), tendo em vista que existe interesse em procriação comercial de híbridos deste animal em cruzamento com cavalos, e que o uso deste sêmen criopreservado é uma alternativa para a reprodução de raças de burro ameaçadas de extinção (OLIVEIRA et al., 2016). Oliveira e colaboradores (2016) procuraram avaliar dois métodos de congelamento, sendo estes o método convencional, onde a amostra é resfriada em vapor de nitrogênio líquido e um método

automatizado onde há um controle da redução de temperatura, além de determinar a dose de sêmen fresco necessária para a inseminação de jumentas e éguas, e a influência do local de deposição do sêmen descongelado sobre a prenhez de jumentas. Para tal, o sêmen coletado através de vagina artificial foi dividido entre os dois processos de congelamento, armazenados e descongelados por 20 segundos a 46°C previamente a avaliação dos parâmetros de motilidade por análise computacional. Quanto a dose de sêmen fresco utilizada para inseminar jumentas e éguas, as concentrações de  $500 \times 10^6$  ou  $1 \times 10^9$  foram utilizadas. Já para o sêmen descongelado, a dose de  $1 \times 10^9$  foi utilizada para deposição de sêmen, ou no corpo uterino, ou na ponta do corno uterino.

Os resultados indicaram que quanto ao método de congelamento, apenas a motilidade progressiva e os parâmetros de células rápidas demonstraram diferenças significativas, onde o método automatizado obteve melhores resultados do que o método convencional. Da mesma forma, as doses de sêmen fresco utilizadas tanto em jumentas quanto em éguas não demonstraram diferenças significativas, porém, quando comparadas as taxas separadamente entre jumentas e entre éguas, éguas apresentaram maiores taxas de prenhes com sêmen em concentração de  $500 \times 10^6$ . Por último, a deposição de sêmen descongelado no corpo uterino não resultou em prenhez, já o sêmen depositado na ponta do corno uterino resultou em taxas de concepção de 28,26%. Sendo assim, o congelamento automatizado de sêmen, a maior concentração de espermatozoides a fresco durante a inseminação e a inseminação no corno uterino resultaram em taxas melhores tanto para a criopreservação de sêmen quanto para as taxas de prenhes de jumentas (OLIVEIRA et al., 2016).

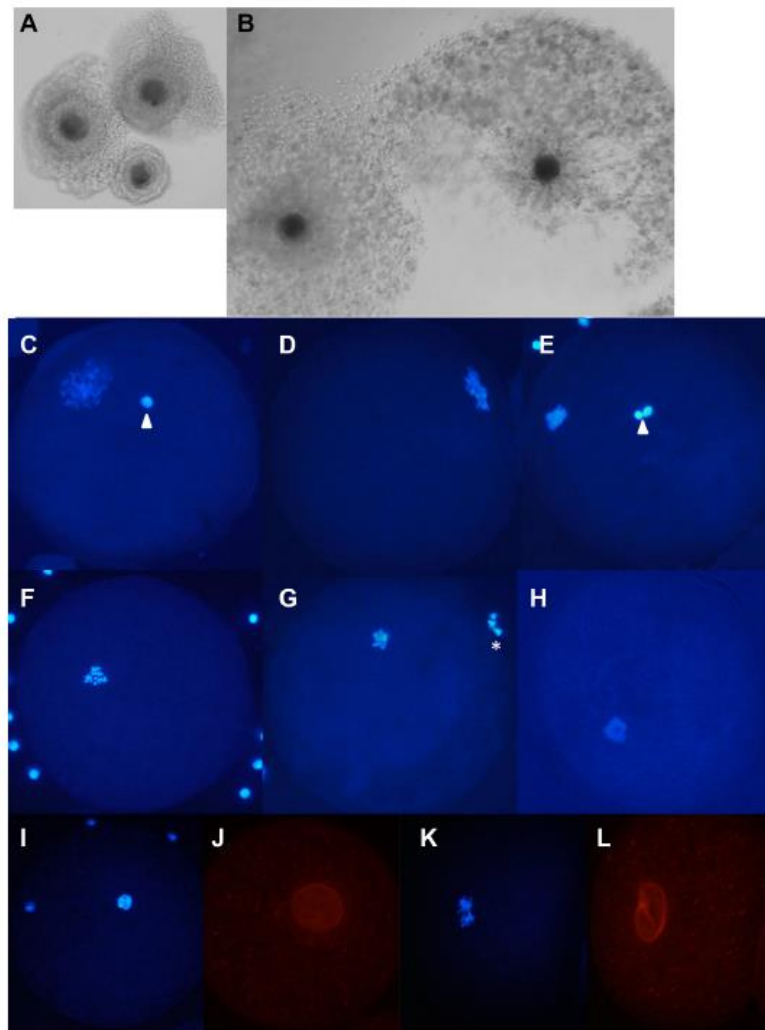
Seguindo na tentativa de recuperar raças de jumentos, Goudet e colaboradores (2016) foram além nas TRA e realizaram um trabalho que conta com aspiração e posterior maturação de oócitos *in vitro* previamente a fertilização *in vitro* utilizando sêmen congelado.

Oócitos de jumentas foram coletados através de aspiração guiada por ultrassom e oócitos de éguas foram obtidos por aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouro. Ambos oócitos foram submetidos ao mesmo meio de maturação contendo TCM 199, soro fetal de bezerro, *fetal calf serum* (FCS) e fator de crescimento da epiderme, e submetidos as mesmas condições de maturação, sendo estas a temperatura de 38.5°C em umidade saturada e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, a única diferença é em relação ao tempo de cultivo, onde oócitos de jumentas foram cultivados por até 38 horas enquanto oócitos de éguas foram cultivados por 24 ou 30 horas. Sêmen de jumentos férteis fora coletado através do uso de vagina artificial, resfriado e armazenado em nitrogênio líquido até sua posterior avaliação e uso; assim como o trabalho de Oliveira et al., o

sêmen foi avaliado através de análises computacionais. Após o descongelamento a 37°C por 30 segundos, o sêmen foi incubado juntamente com os oócitos por 18 horas sob as mesmas condições de maturação dos oócitos. Após este período, zigotos foram transferidos para outro meio por 30 horas contendo atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>.

Os resultados indicaram que após 24 horas, todos os oócitos, tanto de jumentas quanto de éguas, se encontravam expandidos. Foi possível observar que alguns oócitos de jumentas apresentaram cromatina condensada e outros se encontravam em metáfase I após 30h. O meio de maturação foi eficiente para manter a expansão do cumulus, devido a total expansão de todos os complexos cumulus-oócito ao final de 24 horas de incubação. Também se notou que a maturação de oócitos de jumentas ocorre de forma mais demorada do que quando comparada com oócitos de éguas e que após 38h, 25% dos oócitos de jumentas em metáfase II começaram a descondensar e outros 25% estavam degenerados. Assim sendo, o meio foi eficiente para a expansão do cumulus, mas não para a maturação total destas células. Além do mais, apenas 15% dos oócitos incubados como sêmen de jumentos apresentaram dois pronúcleos (GOUDET et al., 2016). Os estágios de maturação e desenvolvimento são mostrados abaixo, na figura 3.

**Figura 3** – Estágios de maturação e desenvolvimento de oócitos de jumentas. A) Complexo cumulus-oócito (COC) com cumulus compacto. B) COC com cumulus expandido. C) Oócito contendo vesícula germinal e filamentos de cromatina distintos. D) Oócito contendo vesícula germinal e cromatina parcialmente condensada. E) Oócito contendo cromatina condensada. F) Oócito em metáfase I. G) Oócito em metáfase II com presença de corpo polar. H) Oócito descondensando em metáfase II. I e J) Oócito contendo pronúcleo. K e L) Oócito contendo dois pronúcleos.



#### 5.4 PRIMATAS NÃO HUMANOS

Apesar das biotecnologias reprodutivas serem designadas para aprimorar a genética de animais de produção, suas aplicações em primatas não humanos possuem objetivos diferentes, incluindo administração de animais cativos e propagação de espécies em extinção ou animais de valor. Além do mais, estes animais servem como modelos de pesquisa para doenças que atingem humanos. Uma das maiores vantagens do uso de técnicas de reprodução assistida é a não

necessidade da introdução de novos machos em uma colônia estabelecida, tendo em vista que a introdução destes machos pode levar a efeitos adversos devido a disputa entre os mesmos. Em geral, experiências com primatas não humanos são limitadas em grande parte pelos custos de manutenção destes animais e a escassez de animais disponíveis para o mesmo (WOLF, 2009).

A grande maioria dos trabalhos com primatas não humanos são realizados em macaca mulata (*Rhesus macaque*), por apresentarem grande semelhança reprodutiva com seres humanos e também servirem como modelo experimental para a reprodução de outros primatas (NEUBER et al., 2002; PIOTROWSKA-NITSCHKE et al., 2009; TELFER; ZELINSKI, 2013). Entretanto, não foram encontrados trabalhos recentes em que técnicas de reprodução assistida baseadas nos trabalhos com este modelo foram utilizadas em outros primatas não humanos.

O sagui-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*) é uma espécie nativa da mata atlântica brasileira e atualmente não se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção segundo a *International Union for Conservation of Nature* (IUCN). Todavia, um estudo realizado por Morrell e colaboradores (1998) demonstrou que é possível reproduzir este animal com sucesso através da IA utilizando sêmen fresco, criopreservado e proveniente do epidídimo de animais mortos, caso o mesmo se encontre ameaçado de extinção em um futuro próximo. Amostras de sêmen fresco coletadas por lavagem vaginal de fêmeas castradas ou criopreservadas em meio contendo 5% de glicerol foram depositadas na cérvix de fêmeas sedadas, onde as mesmas foram divididas em três grupos correspondentes as amostras de sêmen disponíveis (fresco, criopreservado e criopreservado proveniente do epidídimo) e inseminadas de duas a três vezes.

Os resultados foram surpreendentes, tendo em vista que todas as fêmeas inseminadas com sêmen fresco apresentaram gestação e geraram 16 filhotes ao total. Três fêmeas inseminadas com sêmen criopreservado apresentaram gestação, embora uma destas tenha abortado o feto. O mais interessante é que o sêmen criopreservado proveniente do epidídimo e em concentrações bem menores foi capaz de fertilizar uma fêmea e gerar três filhotes (MORRELL et al., 1998), conforme tabela 4.

**Tabela 4** - Produto da inseminação artificial em Sagui-de-Tufos-Brancos utilizando esperma fresco (grupo 1) ou esperma congelado (grupos 2-3). \*Filhote prematuro que não sobreviveu. \*\*Vasectomizado. Adaptado de Morrell e colaboradores (1998).

Número de fêmeas	Resultado	Prole	Duração da gestação (dias)	Condições do macho
<b>Grupo 1</b>				
2	Prenhe	Trigêmeos, trigêmeos	144, 143	Vasectomizado
2	Prenhe	Trigêmeos, gêmeos	134*, 143	Íntegro
2	Prenhe	Trigêmeos, gêmeos	141, 141	Castrado
<b>Grupo 2</b>				
3	Sem prenhez			1 íntegro, 2 vas**
1	Prenhe	Única	141	Castrado
1	Prenhe	Gêmeos	100	Íntegro
1	Prenhe	Trigêmeos	149	Íntegro
<b>Grupo 3</b>				
5	Sem prenhez			4 íntegros, 1 vas**
1	Prenhe	Trigêmeos	140	Íntegro

O macaco-aranha (*Ateles geoffroyi*), primata proveniente da América Central, encontra-se ameaçado de extinção de acordo com o IUCN. Muitos animais desta espécie são capturados enquanto jovens e vendidos como animais de estimação, o que os priva do contato com membros da própria espécie, limitando seu comportamento social-sexual (HARLOW, 1971) e sua reprodução quando em cativeiro. Em razão da ameaça de extinção e da não reprodução natural destes animais em cativeiro, Hernández-López e colaboradores (2007) procuraram desenvolver uma técnica de IA adequada para a espécie.

Desta forma, quando análises hormonais de fêmeas demonstraram a fase fértil das mesmas, machos e fêmeas anestesiados foram utilizados para o procedimento de inseminação. Através do uso de um eletroejaculador, o sêmen fresco foi coletado e posteriormente depositado na cérvix de cada fêmea com o auxílio de um tubo plástico, onde a parte sólida do sêmen foi forçada até atingir o final do tubo.

Quanto aos resultados, das 14 IA realizadas, em 5 ocasiões ocorreram pausas no ciclo menstrual. A gestação de uma fêmea veio a termo, resultando no nascimento de um filhote em boas condições de saúde, todavia, o mesmo veio a óbito uma semana após o nascimento devido a

infecção por *Herpes simplex*. Outra fêmea resultou prenhe, detectada por ultrassonografia, entretanto abortou o feto três dias após esta detecção. Outras duas fêmeas não apresentaram sangramentos menstruais por dois e três períodos menstruais, entretanto as ultrassonografias não indicaram o desenvolvimento de gestação (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2007).

## 5.5 OUTROS ANIMAIS

### 5.5.1 SURUBIM-DO-PARAÍBA

Um experimento com surubim-do-paraíba (*Steindachneridion parahybae*), um peixe nativo do estado de São Paulo e na lista de animais em extinção da IUCN, demonstra que a técnica de resfriamento de embriões pode ser útil para a preservação da espécie, porém, ajustes são necessários.

Neste caso, embriões obtidos de reprodutores mantidos na Estação de Hidrologia e Aquicultura da Companhia de Energia de São Paulo foram submetidos a seis condições de resfriamento e de diferentes crioprotetores (tabela 5), onde seus resultados demonstraram que para esta espécie os crioprotetores mais indicados são aqueles que contém metanol ou etileno glicol como crioprotetor externo e sacarose como interno, sendo que, no caso do metanol, a concentração de 10% é mais indicada do que a de 20% devido a taxa de larvas defectivas que podem ser resultado de toxicidade embrionária. Além do mais, também se recomenda o resfriamento de embriões no estágio de cauda-livre, onde posteriormente observou-se as maiores taxas de eclosão. Sendo assim, os autores concluem que o uso de metanol 10%, sacarose em embriões de cauda-livre resfriados a 0,5°C/min por um período de 6 horas abaixo de zero é mais recomendado para esta espécie em questão (SILVA LOPES et al., 2015).

**Tabela 5** – Combinação de crioprotetores utilizados para criopreservar embriões de Surubim-da-Paraíba. Adaptado de Silva Lopes e colaboradores (2015).

10% metanol + 0,5M lactose	10% metanol + 0,5M sacarose	10% etileno glicol + 0,5M lactose	10% etileno glicol + 0,5M sacarose	10% DMSO + 0,5M lactose	10% DMSO + 0,5M sacarose
-------------------------------	--------------------------------	---	--	----------------------------	-----------------------------



### 5.5.2 ARARINHA-AZUL

A ararinha-azul (*Cyanapsitta spixii*) é um dos animais mais ameaçados do mundo. E desde 2000, não foi mais encontrada na natureza. Atualmente, restam apenas 79 indivíduos cativos que integram um programa de reprodução em cativeiro em cinco centros de reprodução no Brasil e no exterior (BARROS et al., 2012).

Com a necessidade de reproduzir esta espécie, Fischer e colaboradores (2014) optaram por realizar a IA em algumas destas aves. Sendo assim, amostras de sêmen coletadas através da eletroejaculação, onde, em caso de sucesso, as mesmas foram coletadas em capilares de vidro armazenadas a temperatura ambiente até o momento da aplicação. Para a IA, fêmeas que haviam depositado ovos em um curto período anterior ou aparentavam depositar ovos brevemente foram imobilizadas manualmente e tiveram sua cloaca aberta com o auxílio de um espécúlo nasal, onde o sêmen foi depositado ou na própria cloaca, ou dentro do oviduto como mostrado na figura 3. Após a deposição dos ovos pelas fêmeas, os mesmos foram incubados a 37,4°C com umidade relativa de 40 a 45%. Ao sétimo dia de incubação, os ovos foram expostos a luz de vela a fim de identificar algum sinal de desenvolvimento embrionário; se no décimo dia não houvesse nenhum sinal de desenvolvimento, os ovos eram retirados da incubadora.

Ao final do experimento, os autores relataram que em 44,3% das tentativas de coleta de sêmen, foi possível obter amostras provenientes de 46% dos machos utilizados de uma forma não dolorosa a nenhum dos animais. Além do mais, análises das amostras de sêmen não demonstraram diferenças significantes entre o ejaculado de cada animal quanto a motilidade, motilidade progressiva, percentagem de espermatozoides vivos, concentração e números totais de espermatozoides; todavia, mais de 50% das anomalias foram encontradas na cabeça dos espermatozoides e 20,5% na região da cauda.

**Figura 4** - Inseminação Artificial em Ararinha-Azul. A) Fêmea gentilmente contida; cloaca aberta com auxílio de espêculo nasal. B) Sêmen inserido diretamente do capilar dentro do oviduto com o auxílio de um pistão. Adaptado de Fischer e colaboradores (2014).



Quanto a fertilização, nenhum desenvolvimento embrionário foi observado e apenas dois ovos de uma única fêmea apresentaram esperma na camada perivitelina, mesmo assim, não houve penetração destes espermatozoides e divisões celulares não foram observadas (FISCHER et al., 2014). Sendo assim, embora a inseminação não tenha resultado em nenhum filhote, a coleta e avaliação de sêmen determinaram valores de referência; além do mais, esta foi a primeira tentativa de reprodução assistida na espécie e serve como modelo para pesquisas futuras.

### 5.5.3 LOBO-GUARÁ

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) é uma espécie nativa da América do Sul e atualmente se encontra listado na IUCN como “quase ameaçado”, em relação a sua extinção. Isto se deve ao declínio do seu habitat natural, assim como doenças e atropelamentos (JOHNSON et al., 2014).

Visando uma ação preventiva para a manutenção desta espécie, o conhecimento sobre seu ciclo reprodutivo se torna essencial para a aplicação de biotecnologias reprodutivas. Desta forma, Johnson e colaboradores (2014) propuseram a indução do estro a partir do uso de deslorelinina e LH recombinante. O experimento contou com oito fêmeas divididas em dois grupos de igual número, onde o primeiro grupo foi mantido com a presença de machos, e o segundo grupo foi mantido ausente de machos. Ambos os grupos iniciaram o tratamento com a implementação de deslorelinina, um agonista de hormônio liberador de gonadrofina (GnRH), no dia 0. Os implantes foram

removidos de 3 fêmeas após 7 dias; de 5 fêmeas após 9 dias e das 3 fêmeas restantes após 11 dias. A administração de LH recombinante ocorreu no nono dia após a aplicação de GnRH em apenas três das fêmeas que não tiveram contato com machos, devido ao fato de que a maioria dos caninos apresentam ovulação espontânea.

As análises endócrinas, realizadas através de amostras de fezes, indicaram que as fêmeas mantidas na presença de machos apresentaram os maiores níveis de estrógeno durante o tratamento com deslorelina, comparando os níveis pré e pós tratamento. Quanto aos níveis de prostágeno, as maiores e menores concentrações ocorreram pós e pré aplicação de deslorelina, respectivamente. Todavia, mesmo com a presença de machos e observação de comportamento sexual, nenhuma das fêmeas apresentou gestação (JOHNSON et al., 2014).

Quanto ao grupo de fêmeas mantidas sem a presença de machos, o tratamento contendo somente deslorelina resultou em um pico de estrógeno no sétimo ou oitavo dia após o implante do mesmo em três das quatro fêmeas, onde as mesmas mantiveram concentrações basais de prostágeno. A outra fêmea apresentava níveis elevados de estrógeno mesmo antes do tratamento, onde o nível aumentou após a aplicação de deslorelina, porém a concentração de prostágenos apresentou apenas um leve aumento em sua concentração. Dentre estas fêmeas, as três que receberam LH recombinante subsequentemente após a aplicação de deslorelina apresentaram pico na concentração de estrógeno no oitavo dia, seguido de um aumento na concentração de prostágeno no décimo dia, se mantendo acima das concentrações basais por um período médio de 65 dias (JOHNSON et al., 2014).

Desta forma, os autores concluem que apesar de ambos os grupos apresentarem níveis elevados de estrógeno em razão da administração de deslorelina, o convívio com machos se torna fundamental para que ocorra a ovulação tendo em vista que os níveis de prostágeno se mantiveram basais para as fêmeas que não tiveram esta convivência e destas fêmeas, somente as tratadas com LH recombinante demonstraram níveis maiores de prostágeno em suas amostras fecais, indicando a ovulação. Entretanto, a fêmea solteira que apresentava níveis maiores de estrógeno também apresentou níveis maiores de prostágeno, o que aparenta ser um indicativo de que a aplicação de um agonista de GnRH enquanto os folículos estiverem em crescimento pode ser suficiente para suportar tanto o crescimento folicular, quanto a ovulação (JOHNSON et al., 2014).

#### 5.5.4 ELEFANTES

A família *Elephantidae* é composta pelos gêneros *Loxodonta* e *Elephas*, contendo apenas três espécies, o Elefante-da-Savana (*Loxodonta africana*), o Elefante-da-Floresta (*Loxodonta cyclotis*) e o Elefante-Asiático (*Elephas maximus*), sendo que a sobrevivência de ambas em habitat natural está ameaçada, de acordo com a IUCN.

Um dos grandes problemas envolvendo a reprodução destes animais em cativeiro é o número limitado de machos aptos a reproduzirem, limitando a diversidade genética em cativeiro. Uma das estratégias mais comumente usadas é a substituição de animais mortos por animais selvagens (HILDEBRANDT et al., 2012), o que também pode causar problemas devido a adaptação destes animais ao novo ambiente. Alternativamente a isto, a importação de sêmen criopreservado de animais selvagens para a IA em animais mantidos em cativeiros pode enriquecer a variabilidade genética da população cativa sem a necessidade de deslocar os animais de seu habitat natural. E seguindo esta lógica, Hildebrandt e colaboradores (2012) utilizaram dois exemplares de Elefante-da-Savana, uma fêmea de cativeiro e um macho selvagem, ambos com histórico de sucesso reprodutivo.

Para o propósito deste experimento, o sêmen foi coletado por eletrojaculação após anestesia geral, avaliado quanto ao volume total, concentração espermática, motilidade, integridade do acrossoma e morfologia espermática e criopreservado por congelamento direcional em uma concentração final de glicerol a 7% previamente ao armazenamento em nitrogênio líquido, onde o mesmo se manteve por 19 meses. Previamente ao uso para IA, o sêmen foi descongelado após ficar 90 segundos em temperatura ambiente e 60 segundos em banho-maria a 37°C. Através de análises hormonais provenientes de amostras de sangue da fêmea, foi possível entender o ciclo estral da mesma e programar o período no qual a IA ocorreria, sem o uso de hormônios exógenos. Sendo assim, a IA ocorreu quatro vezes, 19 dias após detecção do pico de LH, com o auxílio de visualizações endoscópicas e ultrassom para melhor guiar o cateter até a abertura cervical (HILDEBRANDT et al., 2012).

Os resultados para a análise espermática demonstram parâmetros de boa qualidade, onde o esperma criopreservado apresentou motilidade de 61%, morfologia normal em 84% e 88% dos acrossomas estavam intactos. Quanto a IA, além das análises hormonais, a ultrassonografia indicou uma gestação em andamento, conforme figura 1, onde é possível ver claramente o desenvolvimento

de um filhote 141 dias após IA. Este trabalho apresentou com sucesso a primeira IA utilizando sêmen criopreservado de um macho selvagem em uma fêmea cativa, demonstrando que a técnica de criopreservação juntamente com a IA também pode proporcionar variabilidade genética em espécies ameaçadas de extinção (HILDEBRANDT et al., 2012).

**Figura 5** - Ultrassonografia tridimensional de feto de elefante. Imagem coletada 141 dias após IA. Tromba, cabeça, membros dianteiros e traseiros estão claramente visíveis. Adaptado de Hildebrandt e colaboradores (2012)



## 6 DISCUSSÃO

As biotecnologias reprodutivas, ou técnicas e análises relacionadas as mesmas, já foram aplicadas em diversos animais selvagens, além dos aqui descritos. Dentre estes, incluem-se camelídeos (GIULIANO et al., 2012; NIASARI-NASLAJI et al., 2009; SKIDMORE; MORTON; BILLAH, 2013; TRASORRAS; GIULIANO; MIRAGAYA, 2013), doninhas (HOWARD et al., 2016; SANTYMIRE, 2016), rinocerontes (HERMES et al., 2009a, 2009b; HILDEBRANDT et al., 2007; ROTH et al., 2016; STOOPS et al., 2010, 2016), veados (BERACOCHEA et al., 2014; PANYABORIBAN et al., 2016; PRIETO-PABLOS et al., 2016), bovinos (GOEL et al., 2011), gazelas (BERLINGUER et al., 2008), morsas (MURACO et al., 2012), marsupiais (RODGER et al., 2009), pinguins (O'BRIEN et al., 2016), e até mesmo em golfinhos (O'BRIEN; STEINMAN; ROBECK, 2009; ROBECK et al., 2013).

Dentre os trabalhos apresentados nesta revisão, poucos apresentaram o desenvolvimento, aprimoramento ou até mesmo aplicação de alguma biotecnologia reprodutiva capaz de gerar novos indivíduos. Em geral, a maioria dos experimentos aqui relatados se utilizaram de inseminações artificiais (CURRY et al., 2014; FISCHER et al., 2014; HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2007; HILDEBRANDT et al., 2012; HUANG et al., 2012; MASUI et al., 1989; MORRELL et al., 1998) e criopreservação de sêmen (DA SILVA LOPES et al., 2015; DE DECO-SOUZA et al., 2013; FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2015; HILDEBRANDT et al., 2012; LÓPEZ-URUEÑA et al., 2015; MORRELL et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2016; PABLOS et al., 2015) por se tratarem dos métodos mais conhecidos e baratos atualmente. Entretanto, alguns trabalhos se aprofundaram em técnicas mais avançadas, tais como a maturação e a fecundação *in vitro* (FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2015; GOUDET et al., 2016; YIN et al., 2007), a ICSI (FERNANDEZ-GONZALEZ et al., 2015) e até mesmo a produção de células tronco (VERMA et al., 2012).

Todavia, em apenas oito experimentos foi possível obter gestações e em um, envolvendo Elefantes-da-Savana (HILDEBRANDT et al., 2012), demonstrou apenas a confirmação da gestação e não há informações sobre o possível nascimento do filhote em questão. Seis destes experimentos se utilizaram ou de IA, ou de criopreservação de sêmen, ou ainda da combinação de ambos (HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2007; HILDEBRANDT et al., 2012; HUANG et al., 2012; MASUI et al., 1989; MORRELL et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2016), um (BARNES et al., 2016) se utilizou de indução do estro e cópula natural e o outro (SILVA LOPES et al., 2015) contou com

a criopreservação de embriões previamente fecundados. Isto nos leva a crer que a aplicação das biotecnologias reprodutivas mais simples possam ser as mais eficazes no momento.

Técnicas como a fecundação *in vitro* e posterior transferência de embriões são frequentemente utilizadas para selecionar características genéticas desejadas em animais de produção, e desta forma acelerar a seleção genética para maior produção e ganho financeiro. Ao nosso entendimento, estas técnicas não devem ser aplicadas em animais com risco de extinção com o mesmo propósito. Estas espécies já possuem diversidade genética diminuta devido a sua redução populacional e seu isolamento geográfico, assim sendo, a utilização de técnicas visando a seleção de características específicas afunilaria ainda mais o grupo genético e poderia causar problemas quanto a reprodução natural destas espécies, como ocorre em populações cativas de rinocerontes (HERMES et al., 2009a). Além do mais, estas técnicas geralmente são mais caras e dependem de tratamentos hormonais e procedimentos cirúrgicos que também podem trazer riscos à saúde e à fertilidade (DURRANT, 2009).

Leon-Quinto e colaboradores (2009) descrevem que o objetivo de qualquer plano de conservação animal inclui manter e, se possível, aumentar a biodiversidade. A criação de bancos genéticos tem se tornado uma alternativa interessante para a restauração da variabilidade genética de espécies ameaçadas de extinção. Segundo Silva e colaboradores (2012), bancos de germoplasma consistem na criopreservação de gametas e células somáticas em nitrogênio líquido, de forma que o material biológico possa ser tolerante ao processo de criopreservação. Além do mais, estes bancos possuem a finalidade de proporcionar material para a aplicação de TRA, tendo em vista que as amostras podem ser mantidas por longo período de tempo e ainda estarem viáveis, como foi o caso do elefante-da-savana (HILDEBRANDT et al., 2012) aqui reportado.

Um dos grandes impasses em relação ao uso de TRA em espécies ameaçadas de extinção se deve a não colaboração entre biólogos mais conservadores e cientistas da reprodução dispostos a utilizá-las. Isso se deve ao fato de que muitos conservadores acreditam que novas tecnologias possam ser prejudiciais e de que a melhor forma de conservar uma determinada espécie é também conservar e proteger seu habitat natural, enquanto biotecnologistas propõem esquemas exóticos tais como clonagem e ICSI, sendo que as técnicas mais simples que incluem detecção de ovulações, coleção de sêmen e IA ainda não apresentam resultados satisfatórios (HOLT, 2009).

Até o momento, apenas um programa de recuperação de espécies, denominado *Black-footed Ferret Species Survival Plan* (SSP), utiliza TRA e se mostra, de certa forma, promissor. O

uso de inseminação artificial em doninhas-de-patas-pretas (*Mustela nigripes*) foi capaz de mudar o status desta espécie de “extinto na natureza” para “ameaçado”, de acordo com a IUCN (2016). Isto ocorreu devido a um programa específico para recuperar esta espécie, considerada extinta nas décadas de 60 e 80. Através do trabalho colaborativo de seis instituições distribuídas no Canadá, Estados Unidos e México, foi possível compreender a fisiologia reprodutiva deste animal e desenvolver métodos para a coleta e criopreservação do sêmen, a detecção do estro, a indução artificial do estro, e a inseminação artificial. Todavia, atualmente a IA é utilizada somente em animais que não apresentam gestação de forma natural a fim de proporcionar mais indivíduos quando a cópula natural não se torna viável (SANTYMIRE, 2016).



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas de reprodução assistida, extensivamente utilizadas em animais de produção e animais domésticos, podem sim auxiliar no combate a extinção de espécies. Todavia, há uma necessidade urgente de conciliação entre cientistas conservadores e inovadores a fim de propor um plano real de recuperação destas espécies, tendo em vista que em muitas delas, os exemplares não são suficientes para pesquisas extensivas e que a degradação do habitat natural dos mesmos torna esta missão cada vez mais complicada.

Demonstramos aqui que vários grupos de pesquisa alcançaram algum resultado, seja através de criopreservação, inseminação artificial, estímulo do estro, fecundação *in vitro* ou até mesmo indução de pluripotencia em células de animais adultos. Um resumo das técnicas utilizadas se encontra abaixo, na tabela 6. Estes trabalhos, embora nem todos sejam de vanguarda, abriram janelas de possibilidades científicas onde um maior conhecimento sobre os ciclos reprodutivos destes animais e a adaptação de técnicas de reprodução artificial, juntamente com programas de preservação a médio e longo prazo bem elaborados, pode ser fundamental para que a biotecnologia seja vista de uma forma de auxílio a restauração da biodiversidade do planeta Terra.

**Tabela 6** – Demonstrativo das técnicas utilizadas e a geração ou não de descendentes. \*Descendente veio a óbito. \*\*Número de descendentes não especificado.

Espécie	Técnicas utilizadas	Descendentes (n°)	Referência
Suçarana ( <i>Puma concolor</i> )	Criopreservação de sêmen	Não	Deco-Souza et al., 2013
Leão ( <i>Panthera leo</i> )	Criopreservação de sêmen Fecundação <i>in vitro</i>	Não Não	Luther et al., 2016 Fernandez-Gonzales et al., 2015
Jaguar ( <i>Panthera onca</i> )	Estimulação do estro	Sim (2)	Barnes et al., 2016
Leopardo das Neves ( <i>Panthera uncia</i> )	Indução de células pluripotentes	Não	Verma et al., 2012
Urso Pardo ( <i>Ursus arctos</i> )	Criopreservação de sêmen Resfriamento e criopreservação de sêmen Maturação de oócitos <i>in vitro</i>	Não Não Não	Paz et al., 2012 López-Urueña et al., 2015 Yin et al., 2007
Panda Gigante ( <i>Ailuropoda melanoleuca</i> )	Inseminação Artificial Inseminação Artificial Criopreservação de semen e Inseminação Artificial	Sim** Sim (2*) Sim (5)	Liu, 1981 Masui et al., 1989 Huang et al., 2012
Urso Polar ( <i>Ursus maritimus</i> )	Indução do estro e Inseminação Artificial	Não	Curry et al., 2014

Onagro Persa ( <i>Equus hemionus onager</i> )	Resfriamento e criopreservação de sêmen	Não	Pablos et al., 2015
Jumento ( <i>Equus asinus</i> )	Criopreservação e Inseminação artificial	Sim (13)	Oliveira et al., 2015
	Maturação e fecundação de oócitos <i>in vitro</i>	Não	Goudet et al., 2016
Sagui-de-tufos-brancos ( <i>Callithrix jacchus</i> )	Criopreservação e Inseminação artificial	Sim (16)	Morrell et al., 1998
Macaco-Aranha ( <i>Ateles geoffroyi</i> )	Inseminação Artificial	Sim (1*)	Hernández-López et al, 2007
Surubim-do-Paraíba ( <i>Steindachneridion parahybae</i> )	Resfriamento de embriões	Sim**	Silva Lopes et al., 2015
Ararinha-Azul ( <i>Cyanapsitta spixii</i> )	Inseminação Artificial	Não	Fischer et al., 2014
Lobo-Guará ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> )	Indução do Estro	Não	Johnson et al., 2014
Elefante-da-Savana ( <i>Loxodonta africana</i> )	Criopreservação e Inseminação artificial	Gestação confirmada	Hildebrandt et al., 2012

## REFERÊNCIAS

- BARNES, S. A. et al. **Characterization and manipulation of reproductive cycles in the jaguar (*Panthera onca*)**. *General and Comparative Endocrinology*, v. 225, p. 95–103, 2016.
- BARROS, Y. M. et al. **Plano de ação nacional para a conservação da ararinha-azul: *Cyanopsitta spixii***. [s.l: s.n.]. v. 9, 2012
- BERACOCHEA, F. et al. **Sperm characterization and identification of sperm sub-populations in ejaculates from pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*)**. *Animal Reproduction Science*, v. 149, n. 3–4, p. 224–230, 2014.
- BERLINGUER, F. et al. **In vitro oocyte maturation, fertilization and culture after ovum pick-up in an endangered gazelle (*Gazella dama mhorr*)**. *Theriogenology*, v. 69, n. 3, p. 349–359, 2008.
- CARNEVALE, E. M. **Advances in Collection, Transport and Maturation of Equine Oocytes for Assisted Reproductive Techniques**. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v. 32, n. 3, p. 379–399, 2016.
- CURRY, E. et al. **Ovulation Induction and Artificial Insemination of a Captive Polar Bear (*Ursus Maritimus*) Using Fresh Semen**. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 45, n. 3, p. 645–649, 2014.
- DECO-SOUZA, T. et al. **Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*)**. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 33, n. 4, p. 512–516, 2013.
- DURRANT, B. S. **The importance and potential of artificial insemination in CANDES (companion animals, non-domestic, endangered species)**. *Theriogenology*, v. 71, n. 1, p. 113–122, 2009.

FERNANDEZ-GONZALEZ, L. et al. **Production of lion (*Panthera leo*) blastocysts after in vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection.** *Theriogenology*, v. 83, n. 6, p. 995–999, 2015.

FISCHER, D. et al. **The use of semen evaluation and assisted reproduction in Spix's macaws in terms of species conservation.** *Zoo Biology*, v. 33, n. 3, p. 234–244, 2014.

GIULIANO, S. M. et al. **Development of an artificial insemination protocol in llamas using cooled semen.** *Animal Reproduction Science*, v. 131, n. 3–4, p. 204–210, 2012.

GODKE, R. A.; SANSINENA, M.; YOUNGS, C. R. **22 - Assisted Reproductive Technologies and Embryo Culture Methods for Farm Animals.** [s.l.] Elsevier Inc., 2014.

GOEL, S. et al. **Spermatogonial stem cells in the testis of an endangered bovid: Indian black buck (*Antilope cervicapra* L.).** *Animal Reproduction Science*, v. 126, n. 3–4, p. 251–257, 2011.

GOUDET, G. et al. **Establishment of conditions for ovum pick up and IVM of jennies oocytes toward the setting up of efficient IVF and in vitro embryos culture procedures in donkey (*Equus asinus*).** *Theriogenology*, v. 86, n. 2, p. 528–35, 2016.

HARLOW, M. K. **and rehabilitation From Thought from a Primate to Therapy : Lessons.** 1971.

HERMES, R. et al. **Ovarian superstimulation, transrectal ultrasound-guided oocyte recovery, and IVF in rhinoceros.** *Theriogenology*, v. 72, n. 7, p. 959–968, 2009a.

HERMES, R. et al. **First successful artificial insemination with frozen-thawed semen in rhinoceros.** *Theriogenology*, v. 71, n. 3, p. 393–399, 2009b.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, L. et al. **Artificial insemination in black-handed spider monkey**

(*Ateles geoffroyi*). *Theriogenology*, v. 67, n. 2, p. 399–406, 2007.

HILDEBRANDT, T. B. et al. **Artificial insemination in the anoestrous and the postpartum white rhinoceros using GnRH analogue to induce ovulation.** *Theriogenology*, v. 67, n. 9, p. 1473–1484, 2007.

HILDEBRANDT, T. B. et al. **Enriching the captive elephant population genetic pool through artificial insemination with frozen-thawed semen collected in the wild.** *Theriogenology*, v. 78, n. 6, p. 1398–1404, 2012.

HINRICHS, K. et al. **Use of in vitro maturation of oocytes, intracytoplasmic sperm injection and in vitro culture to the blastocyst stage in a commercial equine assisted reproduction program.** *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 34, n. 1, p. 176, 2014.

HOLT, W. V.; LLOYD, R. E. **Artificial insemination for the propagation of CANDES: the reality!** *Theriogenology*, v. 71, n. 1, p. 228–235, 2009.

HOWARD, J. G. et al. **Recovery of gene diversity using long-term cryopreserved spermatozoa and artificial insemination in the endangered black-footed ferret.** *Animal Conservation*, v. 19, n. 2, p. 102–111, 2016.

HUANG, Y. et al. **Factors Affecting the Outcome of Artificial Insemination Using Cryopreserved Spermatozoa in the Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*).** *Zoo Biology*, v. 31, n. 5, p. 561–573, 2012.

JOHNSON, A. E. M. et al. **Induction of ovarian activity and ovulation in an induced ovulator, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), using GnRH agonist and recombinant LH.** *Theriogenology*, v. 82, n. 1, p. 71–79, 2014.

LENGWINAT, T.; BLOTTNER, S. **In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa.** *Animal Reproduction Science*, v. 35,

n. 3–4, p. 291–301, 1994.

LEON-QUINTO, T. et al. **Developing biological resource banks as a supporting tool for wildlife reproduction and conservation. The Iberian lynx bank as a model for other endangered species.** *Animal Reproduction Science*, v. 112, n. 3–4, p. 347–361, 2009.

LIU, W. **A note on the artificial insemination of giant panda.** *Acta Zoologica Sinica*, v. 12, p. 73-76, 1981.

LÓPEZ-URUEÑA, E. et al. **Optimization of conditions for long-term prefreezing storage of brown bear sperm before cryopreservation.** *Theriogenology*, v. 84, n. 7, p. 1161–1171, 2015.

LUTHER, I. et al. **Semen cryopreservation and radical reduction capacity of seminal fluid in captive African lion (*Panthera leo*).** *Theriogenology*, 2016.

MASUI, M. et al. **Successful Artificial Insemination in the Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*) at Ueno Zoo.** *Zoo Biology*, v. 8, n. 1, p. 17–26, 1989.

MORRELL, J. M. et al. **Artificial insemination in *Callithrix jacchus* using fresh or cryopreserved sperm.** *Animal Reproduction Science*, v. 52, n. 2, p. 165–174, 1998.

MURACO, H. S. et al. **Use of human chorionic gonadotropin in a male Pacific walrus (*Odobenus rosmarus divergens*) to induce rut and achieve a pregnancy in a nulliparous female.** *Journal of andrology*, v. 33, n. 5, p. 789–97, 2012.

NEUBER, E. et al. **Cell allocation and cell death in blastocysts from nonhuman primates generated during in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection [3].** *Fertility and Sterility*, v. 77, n. 5, p. 1083–1085, 2002.

NIASARI-NASLAJI, A. et al. **Interspecies embryo transfer in camelids: The birth of the first Bactrian camel calves (*Camelus bactrianus*) from dromedary camels (*Camelus***

**dromedarius**). *Reproduction, Fertility and Development*, v. 21, n. 2, p. 333–337, 2009.

O'BRIEN, J. K. et al. **Male Reproductive Physiology and the Development of Artificial Insemination in the Magellanic Penguin ( Spheniscus Magellanicus ) Using Chilled-Stored Semen**. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 47, n. 1, p. 206–222, 2016.

O'BRIEN, J. K.; STEINMAN, K. J.; ROBECK, T. R. **Application of sperm sorting and associated reproductive technology for wildlife management and conservation**. *Theriogenology*, v. 71, n. 1, p. 98–107, 2009.

OLIVEIRA, J. V. DE et al. **Strategies to improve the fertility of fresh and frozen donkey semen**. *Theriogenology*, v. 85, n. 7, p. 1267–1273, 2016.

PABLOS, M. T. P. et al. **Cryopreservation of Onager (Equus Hemionus Onager) Epididymal Spermatozoa**. *Journal of zoo and wildlife medicine*, v. 46, n. 3, p. 517–525, 2015.

PANYABORIBAN, S. et al. **Reproductive seasonality and sperm cryopreservation in the male tufted deer (Elaphodus cephalophus)**. *Theriogenology*, v. 86, n. 4, p. 914–923, 2016.

PAZ, P. et al. **Optimization of glycerol concentration and freezing rate in the cryopreservation of ejaculate from brown bear (Ursus arctos)**. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. 1, p. 105–112, 2012.

PIOTROWSKA-NITSCHKE, K. et al. **Assisted fertilization and embryonic axis formation in higher primates**. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 18, n. 3, p. 382–390, 2009.

PRIETO-PABLOS, M. T. et al. **Cryopreservation of captive roe deer (Capreolus capreolus) semen**. *Theriogenology*, v. 86, n. 3, p. 695–703, 2016.

ROBECK, T. R. et al. **Development and evaluation of deep intra-uterine artificial insemination using cryopreserved sexed spermatozoa in bottlenose dolphins (Tursiops**

**truncatus**). *Animal Reproduction Science*, v. 139, n. 1–4, p. 168–181, 2013.

RODGER, J. C. et al. **Artificial insemination in marsupials**. *Theriogenology*, v. 71, n. 1, p. 176–189, 2009.

ROTH, T. L. et al. **Factors impacting the success of post-mortem sperm rescue in the rhinoceros**. *Animal Reproduction Science*, v. 167, p. 22–30, 2016.

SANTYMIRE, R. **Implementing the use of a biobank in the endangered black-footed ferret (*Mustela nigripes*)**. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 8, p. 1097–1104, 2016.

SILVA, A. R. et al. **Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil**. *Ciência Animal*, v. 22, n. Vi, p. 219–234, 2012.

SILVA LOPES, T. et al. **Chilling of *Steindachneridion parahybae* (siluriformes: Pimelodidae) embryos**. *Theriogenology*, v. 84, n. 4, p. 538–544, 2015.

SKIDMORE, J. A.; MORTON, K. M.; BILLAH, M. **Artificial insemination in dromedary camels**. *Animal Reproduction Science*, v. 136, n. 3, p. 178–186, 2013.

STOOPS, M. A. et al. **Semen cryopreservation in the Indian rhinoceros (*Rhinoceros unicornis*)**. *Theriogenology*, v. 73, n. 8, p. 1104–1115, 2010.

STOOPS, M. A. et al. **Enhancing captive Indian rhinoceros genetics via artificial insemination of cryopreserved sperm**. *Animal Reproduction Science*, v. 172, p. 60–75, 2016.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. **Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors**. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.

TELFER, E. E.; ZELINSKI, M. B. **Ovarian follicle culture: Advances and challenges for**



**human and nonhuman primates.** *Fertility and Sterility*, v. 99, n. 6, p. 1523–1533, 2013.

TRASORRAS, V.; GIULIANO, S.; MIRAGAYA, M. **In vitro production of embryos in South American camelids.** *Animal Reproduction Science*, v. 136, n. 3, p. 187–193, 2013.

VERMA, R. et al. **Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid.** *Theriogenology*, v. 77, n. 1, p. 220–228.e2, 2012.

WOLF, D. P. **Artificial insemination and the assisted reproductive technologies in non-human primates.** *Theriogenology*, v. 71, n. 1, p. 123–129, 2009.

YIN, X. et al. **In Vitro Maturation of Oocytes Derived from the Brown Bear (*Ursus Arctos*).** v. 53, n. 3, p. 3–8, 2007.

ZHAN, X. et al. **Molecular censusing doubles giant panda population estimate in a key nature reserve.** *Current Biology*, v. 16, n. 12, p. 451–452, 2006.