



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO APLICADAS À
CONSERVAÇÃO DE MAMÍFEROS SILVESTRES**

Carolina Dias de Oliveira Conceição Silva
Orientadora: Carolina Madeira Lucci

BRASÍLIA-DF
JULHO/2017



CAROLINA DIAS DE OLIVEIRA CONCEIÇÃO SILVA

BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO APLICADAS À CONSERVAÇÃO DE MAMÍFEROS SILVESTRES

Trabalho de Conclusão de curso de
graduação em Medicina Veterinária
apresentado junto à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade de Brasília

Orientador(a): Carolina Madeira Lucci

BRASÍLIA-DF

JULHO/2017

D D541b Dias de Oliveira Conceição Silva, Carolina
Biotécnicas da Reprodução aplicadas à conservação de
mamíferos silvestres / Carolina Dias de Oliveira
Conceição Silva; orientador Carolina Madeira Lucci. -
Brasília, 2017.
73 p.

Monografia (Graduação - Medicina Veterinária) --
Universidade de Brasília, 2017.

1. Conservação Animal. 2. Biotecnologias da
Reprodução Animal. I. Madeira Lucci, Carolina,
orient. II. Título.

Cessão de Direitos

Nome do Autor: Carolina Dias de Oliveira Conceição Silva

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Biotécnicas da Reprodução aplicadas à conservação de mamíferos silvestres

Ano: 2017

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta monografia e para emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva-se a outros direitos de publicação e nenhuma parte desta monografia pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor.



Carolina Dias de Oliveira Conceição Silva

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: SILVA, Carolina Dias de Oliveira Conceição

Título: Biotécnicas da Reprodução aplicadas à conservação de mamíferos silvestres

Trabalho de conclusão do curso de graduação em Medicina Veterinária apresentado junto à Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília

Aprovado em 04/06/2017

Banca examinadora

Prof. CAROLINA M. LUCCI Instituição: UNB
Julgamento: APROVADO Assinatura: [Assinatura]

Prof. Rodrigo Acosta de Oliveira Instituição: UnB
Julgamento: Aprovada Assinatura: [Assinatura]

Prof. LUO PIVATO Instituição: UnB
Julgamento: APROVADA Assinatura: [Assinatura]

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida.

Agradeço à Mãe Natureza e tudo aquilo que a compõem por ter me possibilitado a paz e a serenidade.

Agradeço aos meus Orixás e aos meus Mentores espirituais por me darem força e saúde a cada dia.

Agradeço a minha família, principalmente meus pais, e amigos por me apoiarem e estarem presentes em cada momento de dificuldade e vitória.

Agradeço ao Corpo Docente e aos Médicos Veterinários pelos ensinamentos morais e profissionais.

Agradeço à minha Orientadora pela paciência e compreensão.

Agradeço, principalmente, a Marco Salmaso e a Luana Caldeira pelo apoio e companheirismo, colaborando com a conclusão deste trabalho.

SÚMARIO

1. RESUMO	VII
2. ABSTRACT	VIII
3. INTRODUÇÃO	1
4. REVISÃO DE LITERATURA	2
4.1 Degradação ambiental e a redução da população de animais silvestres	2
4.2 Estratégias de conservação <i>in situ</i> e <i>ex situ</i>	4
4.3 Biotecnologias da Reprodução destinadas à conservação de animais silvestres	6
4.4 Inseminação Artificial e manipulação de estro	7
4.4.1 Inseminação Artificial	7
4.4.2 Manipulação de estro	11
4.5 Criopreservação de gametas	14
4.6 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	17
4.7 Transferência de embriões (TE)	23
4.8 Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré antrais (MOIFOPA)	25
4.9 Clonagem	30
4.10 Produção artificial de gametas e transplante de células germinativas	34
4.11 Banco de Germoplasma	41
5. MÉTODOS NÃO INVASIVOS DE MONITORAMENTO HORMONAL	47
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

RESUMO

A degradação e a fragmentação de ambientes naturais reduzem o total de habitats disponíveis às espécies selvagens e aumentam o grau de isolamento entre suas populações, diminuindo o fluxo gênico entre estas, o que pode acarretar perdas de variabilidade genética e, eventualmente, a extinção de espécies. Diante disso, medidas emergenciais devem ser tomadas para evitar o aumento da degradação ambiental e, conseqüentemente, diminuir o declínio e a extinção de espécies animais. Para tanto, encontram-se à disposição vários métodos de preservação, que podem ser *in situ* ou *ex situ*. Diante das limitações das estratégias de conservação *in situ*, uma alternativa seria o emprego da conservação *ex situ*, as chamadas biotécnicas da reprodução; permitindo a manutenção da variabilidade genética e o aumento da taxa de reprodução em cativeiro. Além disso, são importantes ferramentas para compreensão da singularidade das espécies, adaptações e mecanismos fisiológicos das espécies estudadas. O presente trabalho discute aspectos da conservação dos recursos genéticos, enfatizando a descrição das biotecnologias da reprodução animal e abrangendo os desafios e perspectivas da aplicação dessas biotécnicas para a conservação do material genético de animais silvestres.

Palavras-chave: *ex situ*, extinção, variabilidade genética.

ABSTRACT

The degradation and fragmentation of natural environments reduce the total available habitats to wild species and increase the degree of isolation between their populations, reducing the gene flow between them, which can lead to losses of genetic variability and, eventually, the extinction. In view of this, emergency measures should be taken to avoid increasing environmental degradation and, consequently, to reduce the decline and extinction of species. In view of this, emergency measures should be taken to avoid increasing environmental degradation and, consequently, to reduce the decline and extinction of animal species. For this, a number of methods are available for this purpose, which may be in situ or ex situ. Faced with limitations of in situ conservation strategies, an alternative would be the maintenance of genetic variability and the increase of the rate of reproduction in captivity. In addition, they are important tools for understanding the species uniqueness adaptations and physiological mechanisms of the species studied. The present work discusses aspects of the conservation of genetic resources, emphasizing the description of the biotechnologies of animal reproduction and encompassing the challenges and perspectives of the application of these biotechniques for the conservation of the genetic material of wild animals.

Key-words: ex-situ, extinction, genetic variability.

3. INTRODUÇÃO

A ação antrópica causa mudanças significativas nos ecossistemas terrestres e marinhos, e tem levado à extinção diversas espécies de animais. A perda da diversidade biológica é motivada, principalmente, pela destruição de *habitats*, consequência direta do uso alternativo do solo pelo homem. Somam-se à supressão da vegetação nativa outras ações que potencializam a perda ou mudança nos habitats dos animais, tais como o uso do fogo, biopirataria e a caça indiscriminada. Além disso, ainda temos os efeitos imprevisíveis das mudanças climáticas regionais e globais em curso, que, sem dúvida, afetarão diretamente a vida selvagem.

Daí a importância e necessidade de se definirem estratégias e métodos para a preservação e uso sustentável da biodiversidade animal, simultaneamente, à conservação e restauração dos habitats naturais. Para tanto, encontram-se à disposição vários métodos de preservação, que podem ser *in situ* ou *ex situ*. A conservação *in situ* é a manutenção de pequenas populações em seu ambiente original, adaptado ou semelhante. A conservação *ex situ* permite a manutenção dos animais vivos fora do seu ambiente, promovendo a conservação de uma população geneticamente viável através de estratégias de reprodução assistida e criopreservação de material genético (ANDRABI & MAXWELL, 2007).

O presente trabalho discute aspectos da conservação dos recursos genéticos animais, enfatizando a descrição das biotecnologias da reprodução utilizadas, e ainda em pesquisa, destinadas à conservação de mamíferos silvestres. Abrangendo os desafios e perspectivas da aplicação dessas biotécnicas para a conservação do material genético de animais silvestres.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Degradação ambiental e a redução da população de animais silvestres

A Lei nº 6.938 de 31 de agosto de 1981, que institui a Política Nacional de Meio Ambiente, em seu artigo 3, inciso II, conceitua da seguinte forma o termo degradação ambiental: “*degradação da qualidade ambiental, a alteração adversa das características do meio ambiente*”. O conceito é abrangente, mas evidencia uma ação desfavorável (negativa) em relação ao meio ambiente. Note-se que a degradação pode ser causada tanto pela ação do homem, quanto por um fenômeno natural.

Muitas podem ser as consequências da degradação ambiental, entretanto, a perda da biodiversidade é uma das maiores preocupações atuais. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2017), tanto a comunidade científica internacional quanto governos e entidades não-governamentais ambientalistas alertam para a perda da diversidade biológica em todo o mundo, principalmente nas regiões tropicais. No Brasil, por exemplo, observa-se uma ocupação dos biomas de uma forma acelerada e, como consequência, houve a devastação de extensas áreas de vegetação nativas no Cerrado do Brasil Central, na Caatinga, na Mata Atlântica e na Amazônia.

O surgimento e extinção de espécies estão relacionados ao próprio processo evolutivo do planeta, mas, normalmente, demandam longos períodos de tempo. No entanto, o homem vem acelerando muito a taxa de extinção de espécies, a ponto de ter-se tornado, atualmente, o principal agente do processo de extinção. Em parte, essa situação deve-se ao mau uso dos recursos naturais, o que tem provocado um novo ciclo de extinção de espécies, sem precedentes na história geológica da terra (MMA, 2017).

Segundo o IPCC (2014), a exploração de unidades populacionais, a poluição, a eutrofização e as espécies exóticas invasoras irão corroborar com a extinção de um grande número de espécies terrestres devido às mudanças do seu habitat. Além disso, a agricultura em grande escala, a industrialização, a biopirataria, a construção de rodovias e a expansão urbana promovem mudanças nos ecossistemas e aumentam os riscos de extinção de espécies ameaçadas.

Também o Ministério do Meio Ambiente considera como principais

causas de extinção a degradação e a fragmentação de ambientes naturais, consequência da abertura de grandes áreas para implantação de pastagens ou agricultura convencional, extrativismo desordenado, expansão urbana, ampliação da malha viária, poluição, incêndios florestais, formação de lagos para hidrelétricas e mineração de superfície. Estes fatores reduzem o total de habitats disponíveis às espécies e aumentam o grau de isolamento entre suas populações, diminuindo o fluxo gênico entre estas, acarretando perdas de variabilidade genética e, posteriormente, a extinção de espécies (MMA, 2017).

A fragmentação de habitats promove a formação de populações isoladas que possuem uma variabilidade genética reduzida devido ao acasalamento de animais estreitamente relacionados e também a preferência de parceiros que aumentam a homozigose e a depressão endogâmica da população, contribuindo para a sua extinção (BAINBRIDGE&JABBOUR,1998).

A endogamia aumenta a probabilidade de defeitos congênitos e a susceptibilidade a infecções, diminuindo a capacidade de sobrevivência dos indivíduos. A consanguinidade também causa o comprometimento de funções fisiológicas como, por exemplo, a produção de espermatozoides férteis e a capacidade de sustentar prenhez normais (HOLT&PICKARD,1999). Por conseguinte, a endogamia promove a redução das populações de animais silvestres.

A conservação global da biodiversidade gera maior segurança para os programas relacionados à agricultura, à conservação biológica e à segurança alimentar, constituindo uma importante ferramenta para o desenvolvimento sustentável e para a própria manutenção da diversidade genética das espécies com importância socioeconômica atual e potencial. (MMA, 2017)

Diante de todo este cenário, medidas emergenciais devem ser tomadas para evitar o aumento da degradação ambiental e, conseqüentemente, diminuir o declínio e a extinção de espécies animais (PURVIS et al., 2000; PRIMACK; RODRIGUES, 2001).

4.2 Estratégias de conservação *in situ* e *ex situ*.

O homem, principal responsável pela atual perda da biodiversidade, também pode fazer a diferença na preservação das espécies. Medidas de conservação e restauração da fauna silvestre e também do seu habitat natural garantem a obtenção de recursos e a sobrevivência da fauna em risco (CULLEN JR et al., 2003).

Para a preservação e conservação dos recursos genéticos, estes podem ser mantidos em condições *in situ* e *ex situ*. A conservação *in situ* seria a manutenção da fauna e da flora em seu habitat natural, adaptado ou semelhante, permitindo a continuação dos processos evolucionários naturais e a conservação de espécies não descritas. É realizada, basicamente, em reservas genéticas, reservas extrativistas, reservas de desenvolvimento sustentável e, também, pode ser organizada em áreas protegidas, seja de âmbito federal, estadual ou municipal (MMA, 2017). No entanto, apresenta limitações quando são populações reduzidas e espécies em risco de extinção com grande número de indivíduos remanescentes em áreas desprotegidas. Nesse caso, corredores ecológicos e estratégias de conservação *ex situ* poderiam auxiliar na conservação desses animais (PRIMACK&RODRIGUES, 2002).

O corredor ecológico é uma medida estratégica para reverter a fragmentação do habitat e, conseqüentemente, o isolamento de populações. Essa estratégia consiste de interligar fragmentos de terras que originalmente eram conectadas. Desse modo, promove a colonização e a dispersão da fauna local, gerando o fluxo genético, e diminui a endogamia das populações, ou seja; o corredor ecológico garante a conservação da biodiversidade local (COSTA&MARTINS,2008).

No Brasil, existem dois corredores já reconhecidos pelo Ministério do Meio Ambiente, que são: Corredor Capivara-Confusões, que conecta o Parque Nacional da Serra da Capivara ao Parque Nacional da Serra das Confusões, no Piauí; e o Corredor Caatinga, cuja área engloba oito unidades de conservação entre os estados de Pernambuco, Bahia e Sergipe. Atualmente, existem outros sete corredores ecológicos em fase de implementação ou estudo pelo Ibama, sendo cinco deles na Amazônia (Corredor Central da Amazônia, Corredor Norte

da Amazônia, Corredor Oeste da Amazônia, Corredor Sul da Amazônia e Corredor dos Ecótonos Sul-amazônicos) e os outros dois na Mata Atlântica (Corredor Central da Mata Atlântica e Corredor Sul da Mata Atlântica).

A conservação *ex situ* se refere às medidas de conservação realizadas fora do habitat natural, sendo estes: bancos de germoplasma, zoológicos, criações em cativeiro, fazendas com criação de caça e aquários (SANTOS,2000; PRIMACK & RODRIGUES, 2002).

Os zoológicos têm como objetivos centrais a conservação de populações e espécies raras ameaçadas, e a educação ambiental. Os zoológicos e criadouros de animais silvestres possibilitam estudos básicos do comportamento animal e reprodutivo, auxiliando na progressão de técnicas de manejo e de recurso emergencial caso uma espécie tenha um número reduzido nos seus habitats naturais. Portanto, atuam como reservatórios genéticos e demográficos (COSTA&MARTINS,2008).

No entanto, a limitação de espaço físico dos zoológicos e cativeiros impossibilita a manutenção de uma grande quantidade de indivíduos da mesma espécie, podendo aumentar a endogamia. Mesmo com a transferência dos animais entre os zoológicos, outros problemas se evidenciarão como, por exemplo, as preferências por fêmeas específicas, a ligação entre casais e as incompatibilidades sexuais (WILDT, 1998; COSTA;MARTINS,2008). Desta forma, uma maneira de se evitar a deriva genética dessas populações, seria a implantação de banco de germoplasma. Um exemplo é o zoológico de San Diego, EUA, o *Frozen Zoo*, no qual são criopreservadas células viáveis em espaços reduzidos (COSTA&MARTINS,2008).

A conservação *ex situ* promove, portanto, a manutenção das espécies fora de seu habitat natural e tem como principais características: a preservação dos genes por tempo indeterminado e garantir a proteção da diversidade intraespecífica, principalmente de espécies com ampla distribuição geográfica. Entretanto, este método tem como consequência a não perpetuação dos processos evolutivos e a dependência das ações antrópicas permanentes, pois reúne grandes quantidades de germoplasmas em um mesmo local, tornando a coleção vulnerável. (MMA, 2017)

A conservação *in situ* e *ex situ* se complementam como, por exemplo, em programas de reintrodução de animais produtos da conservação *ex situ* em seus habitats naturais, auxiliando, assim, projetos de conservação *in situ* (NIJMAN,2006). Logo, é importante a integração da conservação *in situ* e *ex situ*, pois, em conjunto, potencializam a conservação e a manutenção de espécies ameaçadas de extinção.

4.3 Biotecnologias da Reprodução destinadas à conservação de animais silvestres

Diante das limitações das estratégias de conservação *in situ*, da limitada disponibilidade de espaço em zoológicos e criatórios conservacionistas e de pesquisa, e do comportamento sexual modificado ou infertilidade em cativeiros, uma alternativa é o emprego das chamadas biotécnicas da reprodução, que vêm sendo desenvolvidas e implementadas; permitindo, assim, a manutenção da variabilidade genética e o aumento da taxa de reprodução em cativeiro (DOMINGUES et al.,2011; WILSON,1997). Além disso, estas ferramentas da reprodução animal são úteis para a compreensão da singularidade das espécies, adaptações e mecanismos fisiológicos das espécies estudadas (WILDT&WEMMER, 1999).

Por meio das biotecnologias da reprodução são gerados novos indivíduos que podem ser introduzidos nos seus habitats naturais ou permanecer nos cativeiros para efeito de pesquisa e conservação de seu genótipo. No entanto, o sucesso dessas técnicas depende de maior conhecimento dos aspectos básicos da biologia reprodutiva. Infelizmente, existem poucos estudos sobre espécies selvagens, que diferem em relação à sua fisiologia, à anatomia e ao comportamento (COMIZZOLI et al.,2000).

Entretanto, segundo Figueiredo e Silva (2010), dependendo da forma como são empregadas, as biotécnicas reprodutivas podem diminuir a variabilidade genética e comprometer significativamente o bem-estar animal. Sendo assim, o profissional responsável deve diagnosticar o impacto das biotécnicas reprodutivas sobre a qualidade de vida dos animais, determinando objetivamente o grau de impedimento de bem-estar, sendo que este grau deve ser incluído nos processos de tomada de decisão ética quanto à biotécnica em questão.

As principais biotecnologias da reprodução são a inseminação artificial, superovulação, produção *in vitro* de embriões e transferência de embriões, clonagem, micromanipulação de gametas/embriões, banco de germoplasma (ANDRABI E MAXWELL, 2007).

4.4 Inseminação Artificial e manipulação de estro

4.4.1 Inseminação Artificial

A inseminação artificial (IA) é o método de reprodução animal, no qual o sêmen do macho é depositado através de instrumental adequado no trato reprodutivo de uma fêmea no cio com potencial de fecundá-la. Essa técnica consiste na coleta do sêmen, sua análise, e posterior utilização na inseminação. Este pode ser utilizado a fresco, refrigerado ou criopreservado.

O sêmen pode ser coletado por meio das técnicas de eletroejaculação, massagem retal e vagina artificial, entre outras, dependendo da espécie estudada (TROUNSON,1998, citado por COSTA; MARTINS,2008). Para a espécie *Callithrix jacchus*, a recuperação dos espermatozoides é feita por lavagem vaginal após a cópula. Segundo Comizzoli et al. (2000), a recuperação do sêmen pós-coito também tem sido descrita em macacos-saguís e em rinocerontes. Em contraste, é feito a coleta manual de sêmen com a ajuda da ultrassonografia em elefantes. Contudo, a eletroejaculação é o método mais indicado para a coleta na maioria dos animais silvestres(SILVA et al.,2004), devido aos riscos na manipulação e no manejo do animal, sendo feita uma contenção química adequada (DOMINGUES et al., 2011).

A eletroejaculação promove a indução do reflexo ejaculatório devido a estímulos no assoalho da ampola retal do animal, através da introdução de uma sonda transretal lubrificada e conectada a um estimulador elétrico (SILVA et al., 2004),representada na figura 1. A técnica pode ter efeitos indesejáveis como mudança de comportamento (dor, estresse), elevação na frequência cardíaca, na concentração plasmática do cortisol e da glicose (MARQUES FILHO et al., 2008). Assim, é preconizado o uso da sedação ou anestesia em animais silvestres, permitindo maior segurança para os manipuladores e para o animal (CASTELO&SILVA,2015).

Segundo Castelo e Silva (2015), os protocolos anestésicos devem promover uma boa analgesia, terem baixo custo e viabilizar a coleta sem a contaminação por urina. Os protocolos mais utilizados nas espécies mamíferas são: xilazina associada com a cetamina- um anestésico dissociativo, lidocaína administrada por via epidural.

A xilazina associada com cetamina obteve sucesso na eletroejaculação das seguintes espécies: leopardos indianos (*Panthera pardus*) (JAYAPRAKASH et al., 2001), lhamas (*Lama glama*) (GIULIANO et al., 2008), veados-vermelhos-ibéricos (*Cervus elaphus hispanicus*) (MARTINEZ et al., 2008), e quatis (*Nasua nasua*) (BARROS et al., 2009). A lidocaína administrada por via epidural teve sucesso em cutias (MARTINEZ et al., 2013).

A seleção adequada do fármaco é importante, pois este pode interferir nos mecanismos neuromusculares de controle da ereção e da ejaculação (MELTZER et al., 1988, citado por CASTELO;SILVA, 2015). Por exemplo, a xilazina, que é um agonista alfa-2-adrenérgico, pode intervir na concentração espermática final, pois proporciona maior estímulo nas inervações das glândulas acessórias, além de favorecer a ejaculação retrógrada durante a estimulação. Isto ocorre porque a xilazina participa da contração do trígono e do esfíncter da bexiga urinária durante a ejaculação (ZAMBELLI et al., 2007), e quando associada a outros fármacos pode promover o mau fechamento do esfíncter vesical, conseqüentemente, provoca um aumento da ejaculação retrógrada (DOOLEY et al.,1990). Porém, já foi relatada a contaminação da amostra seminal com urina, utilizando protocolo hormonal com tiletamina e zolazepam em gato-do-mato pequeno (MORAIS,1999) e ursos-negros-japoneses (OKANO et al.,2006). Para se evitar esse problema é preconizado à cateterização da uretra,(LUEDERS et al., 2012).Assim como, a indução à micção antes do início do protocolo hormonal e a troca dos tubos coletores após a ejaculação (WIRTUR et al.,2008).

Segundo Castelo e Silva (2015), na técnica de eletroejaculação, deverão ser considerados: as combinações anestésicas utilizadas nas diferentes espécies, os protocolos de estímulos elétricos e a variação individual como, por exemplo, o posicionamento e o tamanho da sonda, além da presença de fezes, para se obter o êxito na coleta.

Após a coleta do sêmen, este será avaliado quanto ao volume, ao aspecto, à motilidade, ao vigor, à concentração celular, à avaliação morfológica e pH. Os distúrbios na espermatogênese, a técnica e a frequência da colheita contribuem para a variação de qualidade da amostra seminal (MALMGREN,1997).Por isso, o exame andrológico deverá ser realizado e

interpretado com cautela.

Dependendo da anatomia da espécie estudada, diferentes técnicas de inseminação artificial podem ser utilizadas, como: inseminação vaginal, inseminação cervical superficial, Inseminação cervical profunda, inseminação intra-uterina por via transcervical e inseminação intra-uterina por laparoscopia. Por exemplo, a girafa (*Girafa girafa*) e okapi (*Okapia johnstoni*) possuem cérvix impenetráveis, sendo uma alternativa a técnica de laparoscopia nesses animais (LOSKUTOFF,1995, citado por COMIZZOLI et al.,2000). Essa técnica é também utilizada nos felídeos silvestres por ser uma técnica cirúrgica pouco invasiva, depositando o sêmen na porção cranial do útero próximo aos ovidutos, sendo anteriormente feito um tratamento hormonal ou assegurando que a fêmea tenha ovulado (SWANSON,2003).

Outras técnicas estão sendo desenvolvidas para a conservação da biodiversidade, como a recuperação de espermatozoides do epidídimo de animais mortos, sendo, posteriormente, criopreservados (COSTA;MARTINS, 2008). Os espermatozoides são extraídos da região proximal do ducto deferente de duas maneiras: pelo fluxo gerado pela injeção de meio de congelamento no canal deferente em direção ao epidídimo, e pela dissecação da região do corpo do epidídimo com posterior corte e pressão manual na região caudal do epidídimo (COSTA;MARTINS,2008).A criopreservação de espermatozóides epididimais teve sucesso na chinchila (*Chinchilla laniger*) e no veado vermelho (COMIZZOLI et al., 2000).

A aplicação da IA para a conservação de animais silvestres proporciona vantagens para a gestão da composição genética das populações em cativeiros e a campo, podendo ser utilizada em estudos colaborativos em várias instituições; pois permite avaliações pontuais de um grande número de indivíduos para verificar o seu potencial reprodutivo e identificar causas de subfertilidade quando é feita a análise espermática do machos reprodutores (SWANSON, 2003).

Além disso, essa técnica permite estudos reprodutivos entre populações em cativeiros e populações no seu habitat natural, revelando as acentuadas diferenças na qualidade do ejaculado, proporcionadas pelas

mudanças de comportamento atribuíveis às condições de criação em cativeiro (SWANSON,2003). Da mesma forma, pode-se analisar populações distintas em seus habitats naturais, principalmente quando a variabilidade genética é limitada entre certas populações isoladas. Como, por exemplo, populações de leões na Ásia e na África ou populações de puma na América do Norte e do Sul (BARONE et al.,1994, citado por SWANSON, 2003).

O comportamento animal também desempenha um papel fundamental na aplicação da inseminação artificial como, por exemplo, espécies de cervos que apenas podem ser coletadas amostras de sêmen dos machos dominantes, pois apenas estes indivíduos produzem sêmen de boa qualidade ((LOSKUTOFF,1995, citado por COMIZZOLI et al.,2000).

Holt & Pickard (1999) publicaram uma revisão na qual citam que a técnica de IA já obteve sucesso nas espécies: furão de patas pretas (*Musteça putorius*) , chita (*Acinonyx jubatus*) , veados , panda gigante , tigre siberiano , puma , gazelas de Mohor .

4.4.2 Manipulação de estro

O sucesso da inseminação artificial depende da detecção do estro na fêmea, sendo um dos principais entraves da utilização das biotécnicas reprodutivas em mamíferos silvestres (PEIXOTO et al., 2016). Portanto, o controle e a sincronização do estro oferecem uma solução para este problema.

A maioria dos protocolos hormonais utilizados na conservação de animais silvestres são aqueles estipulados para animais domésticos. Porém podem não ser aplicáveis devido às divergências fisiológicas entre as espécies como, por exemplo, os felídeos silvestres têm a ovulação induzida pelo coito, os mustelídeos, cervos, ursos e focas possuem diapausa embrionária, etc (COMIZZOLI et al., 2000). Além disso, existem variações reprodutivas dentro do mesmo gênero. Por exemplo, as espécies de cervos: *Cervos elaphus* e *Cervus nippon* têm ciclos estrais sazonais, enquanto as espécies: *Cervus timorensis* e *Cervus unicolor* não possuem ciclos estrais sazonais. O comprimento do ciclo estral também varia entre as espécies de cervos, sendo 18 dias para a espécie *Cervos elaphus* e 27 dias para *Odocoileus virgianus* (JABBOUR et al., 1997, citado por COMIZZOLI et al., 2000). Logo, são necessários estudos mais aprofundados da fisiologia reprodutiva de cada espécie para assim terem resultados mais efetivos.

A superovulação permite a propagação do material genético feminino por meio da administração de hormônios para superestimular os ovários, sendo realizada em diversas espécies como, por exemplo, antílope africano, girafa, veado, camelídeos, etc (COMIZZOLI et al., 2000). Nos protocolos de superovulação são utilizados hormônios exógenos derivados de animais domésticos. No entanto, a utilização repetida desses hormônios poderá gerar uma resposta de produção de anticorpos anti-gonadotrofina, além de uma resposta ovariana reduzida aos tratamentos posteriores nos animais tratados (MAGAREY et al., 2003). Esses efeitos já foram relatados na revisão de Magarey et al. (2003) no gato doméstico, macaco Rhesus e cabra.

Uma pesquisa realizada por Goodrowe e seus colaboradores (2007), utilizando a associação de progestina e PGF₂α ou estradiol e PGF₂α em fêmeas de bisões (*Bison bison athabasca*), obteve um total de 66% e 90% destas

apresentando estro após 2 a 4 dias após o final do tratamento. A taxa de ovulação foi entre 55% a 67%, respectivamente. Do mesmo modo, Toosi et al. (2013) obtiveram a sincronização em fêmeas de bisão, associando progesterona diluída em óleo de sésamo (2,0 mL) e estradiol 17 β (2,5 mg), sendo a primeira gestação proveniente de manipulação farmacológica nessa espécie.

No antílope sable (*Hippotragus niger*) e em outros ruminantes selvagens, foi induzida a ovulação com a utilização de PGF2 α ou pela utilização de implantes de progesterona (COMIZZOLI et al.,2000).

Em outros trabalhos com cervídeos, foi utilizado um dispositivo intravaginal com liberação de 0,3 g de progesterona (CIDR[®]), obtendo-se a sincronização do estro na espécie Jilin sika (*Cervus nippon hortulorum*). Posteriormente ao tratamento, foi analisada a ocorrência de até três ondas foliculares na maioria dos ciclos estrais dos animais tratados (CHEN et al., 2015). Além disso, Zanetti et al. (2010) promoveram uma sincronização efetiva de 83% das fêmeas de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*), utilizando CIDR[®] durante 8 dias, posteriormente a aplicação de 265 μ g de cloprostenol. Depois foi verificado a formação de corpo lúteo funcional após tratamento de superovulação na mesma espécie, utilizando- se eCG, estrógeno e progestina (ZANETTI et al., 2014). Fêmeas de cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) tiveram o estro sincronizado com cloprostenol e foram fertilizadas por um macho. Metade das fêmeas tornou-se gestante após o tratamento com cloprostenol e outras duas fêmeas foram fertilizadas em ciclos estrais naturais (POLEGATO, 2008).

Nos felídeos, a indução da ovulação pode ocorrer em qualquer fase do ciclo reprodutivo com a utilização de aplicações de eCG e hCG (COMIZZOLI,2000). Contudo, o eCG pode sensibilizar o sistema imunológico da fêmea quando são feitas sucessivas aplicações em intervalos de tempo curtos, formando imunocomplexos que interferirão na resposta ovariana, na eficiência da inseminação artificial e também da colheita oocitária (STEWART et al.2012, citado por PEIXOTO et al.,2016).

Trabalhos feitos com primatas obtiveram bons resultados com a utilização de cloprostenol, como, por exemplo, em saguis (*Callithrix jacchus*) aplicando-se uma dose de 0,5-0,8 μ g suficiente para gerar uma ação luteolítica e

a sincronização do estro nos animais tratados (WEBLEY et al.,2010). Também foi obtido a efetiva sincronização estral e obtenção de oócitos de macacos cinomolgos, associando implantes de agonista de GnRH (Leuplin 3,75 mg) durante duas semanas e aplicação de 25UI/kg de eCG (SUZUKI et al., 2012).

4.5 Criopreservação de gametas

A criopreservação do sêmen é a principal técnica voltada à conservação *ex situ*. Essa biotécnica consiste em congelar o espermatozoide, diminuindo, reversivelmente, a sua atividade metabólica, e em seguida armazenar por tempo indeterminado em nitrogênio líquido a -196°C , sendo utilizado, posteriormente, em programas de inseminação artificial, produção de embriões *in vitro*, etc. (MALHEIROS,2013). Essa técnica teve sucesso em diferentes espécies como, por exemplo: javalis (KIKUCHI et al.,1998, citado por COSTA;MARTINS, 2008), cervos (MARTINEZ-PASTOR et al.,2005), gazelas (BOGLIOLO et al.,2001),onças pintadas(PAZ et al., 2007), jaguatiricas (ÁVILA,2009),macacos prego (OLIVEIRA et al.,2011); entre outros.

Uma vez obtidos esses gametas, estes serão submetidos à criopreservação. A criopreservação possui as seguintes etapas: exposição ao agente crioprotetor, resfriamento, armazenamento, descongelação e remoção do agente crioprotetor.

Os crioprotetores maximizam a viabilidade celular e minimizam os efeitos prejudiciais causados pelo processo de congelamento e descongelamento das células. São substâncias que evitam a formação de gelo intracelular, reduzem o estresse osmótico por meio da reposição de água mantendo o volume celular, interagem com íons e macromoléculas, reduzem o ponto de congelamento da água e servem como tampão, ajustando as alterações de pH (MATTOS,2016). Estes são divididos em: crioprotetores extracelulares, que não conseguem penetrar na membrana celular e agem reduzindo os efeitos hiperosmóticos presentes no processo de congelamento (DAVIS et al., 1990), e os crioprotetores intracelulares, que penetram na célula e previnem a formação de cristais de gelo e também a ruptura da membrana celular (MATTOS,2016).

A eficácia da criopreservação, portanto, depende do crioprotetor utilizado e a taxa ideal de congelamento (SILVA et al., 2004).

Os crioprotetores extracelulares são moléculas de alto peso molecular, desse modo; não conseguem atravessar a membrana plasmática. Atuam aumentando a osmolaridade do meio extracelular, promovendo a passagem de água no interior da célula para o meio externo, portanto; impede a formação de

cristais de gelo em seu interior durante a criopreservação (AMANN&PICKETT,1987). São exemplos de crioprotetores extracelulares: a lactose, a glicose, a sacarose, a trealose, o manitol, o sorbitol e também substâncias encontradas na gema de ovo, no leite, entre outros (NIEMANN,1991;MOUSSA et al., 2002).

Os crioprotetores intracelulares são solventes orgânicos de baixo peso molecular que possuem a capacidade de penetrar na célula. Dentre os crioprotetores intracelulares destacam-se, o etilenoglicol, o dimetilsulfóxido (DMSO) e o propanodiol por apresentarem uma capacidade de penetração superior à do glicerol e baixa toxicidade (RALL et al., 1984).

A curva de resfriamento deve ser lenta para evitar o congelamento da água intracelular e suficientemente rápida para evitar o contato da célula desidratada com o meio hiperosmótico. Geralmente, é mais indicada uma taxa de resfriamento de 1°C por minuto. A perda de água e a desidratação da célula são eventos desejáveis, porque reduz a probabilidade de formar grandes cristais de gelo dentro das células, o que geraria danos às estruturas internas e à membrana plasmática. No entanto, a desidratação severa promove a desnaturação das macromoléculas e encolhimento excessivo da célula, levando a um colapso de membrana (DALIMATA & GRAHAM, 1997).

A criopreservação também pode ser dividida em: congelação lenta ou método convencional e vitrificação (LIMA, 2015).

Na congelação lenta utilizam-se baixas concentrações de agentes crioprotetores e a redução gradual da temperatura, sendo utilizado um freezer programável (NAIK et al., 2005, citado por LIMA, 2015). Essa técnica possui um custo elevado e o seu uso induz a formação de cristais de gelo intracelulares devido a um estado de alta instabilidade provocado pelo super-resfriamento da água intracelular, gerando a ruptura mecânica da membrana plasmática das células (ZHMAKIN, 2008).

Para se evitar os danos gerados pela técnica de congelação lenta, protocolos de vitrificação são utilizados, consistindo na solidificação de uma solução, utilizando baixas temperaturas, porém, sem formar os cristais de gelo intracelulares (LIEBERMANN et al., 2002, citado por LIMA, 2015). Na técnica de

vitrificação não ocorre à formação dos cristais de gelo devido à combinação de altas concentrações de agentes crioprotetores, dando alta viscosidade à solução e altas taxas de congelamento (MUKAIDA&OKA, 2012). Essa técnica é muito prática, com menores custos e maior rentabilidade econômica (LIMA, 2015).

Os diluentes utilizados na criopreservação de sêmen de animais silvestres são: Tris (trishidroximetil-aminometano), TES (ácido sulfônico N-tris-hidroximetil-metil-2-aminometano) (LI et al., 2005), água de coco em pó (SILVA et al., 2011) ou in natura (OLIVEIRA et al., 2011), gema de ovo (CASTELO et al., 2010). Os diluentes TRIS e TES tiveram bons resultados na criopreservação de sêmen de espécies de primatas não humanos, como: *Callithrix jacchus* (MORRELL et al., 1998, citado por MALHEIROS, 2013), *Ateles paniscus* e *Ateles marginatus* (SILVA, 2005). Já os crioprotetores normalmente utilizados são o glicerol e o DMSO (DANTAS et al., 2011).

O glicerol tem o efeito de ligação com a água e a baixa dissociação com sais, diminuindo a osmolaridade do meio de congelamento. Já o DMSO é uma molécula sem carga real, mas que possui um momento dipolar, permitindo à interação da molécula com as membranas fosfolipídicas e com o ambiente externo à membrana. Assim, impede fases de transição dos lipídeos de membrana durante o congelamento (DAVIS et al., 1990).

A criopreservação é uma importante ferramenta para a preservação do material genético e facilita a sua difusão. Porém, o seu sucesso depende da adequada utilização de um agente crioprotetor (MATTOS, 2016). As baixas taxas de sucesso das biotecnologias reprodutivas em animais não domésticos nem sempre está relacionada com a ineficiência na criopreservação de gametas e células ou por falhas na técnica e sim o maior fator limitante acaba sendo a insuficiência de informações e de conhecimento da biologia reprodutiva dessas espécies (LEIBO&SONGSASEN, 2002). Portanto, a criopreservação tem relevância para a reprodução assistida, instigando novos estudos para compreender e determinar novos protocolos para cada espécie, além de buscar por novos agentes crioprotetores que sejam eficientes e não prejudiciais às estruturas a serem criopreservadas (VATJA, 2007).

4.6 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) foi primeiramente uma ferramenta de pesquisa para os eventos relacionados à maturação e fecundação de oócitos, à capacitação espermática e ao desenvolvimento embrionário na fase de pré-implantação com a utilização de ovários de animais abatidos. Atualmente, é um importante instrumento de suporte para outras biotécnicas como, por exemplo, a clonagem e a transgenia (FIGUEIREDO et al, 2008). O procedimento se divide em: coleta de oócitos dos folículos ovarianos, maturação *in vitro* dos oócitos (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultura *in vitro* (CIV) dos embriões fecundados até o estágio de blastocisto, quando são então transferidos para o útero de fêmeas receptoras (HAFEZ,2011).

A coleta de oócitos dos folículos ovarianos é feita por meio da técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia. Essa técnica consiste na utilização de um transdutor setorial de pelo menos 6MHz acoplado a um guia-de-aspiração, sendo o transdutor adaptado à vagina da espécie trabalhada. Após a sedação do animal com uma anestesia epidural, é realizada a aspiração mediante a introdução de uma agulha no interior dos folículos ovarianos. A recuperação dos oócitos e do líquido folicular para o tubo coletor é realizada por meio de um sistema de bomba a vácuo e mantidos em DPBS(*Dulbecco's PBS*) ou TCM 199(GALLI,2003). Em seguida, efetua-se a procura e seleção dos oócitos de acordo com o número de camadas de células do cumulus e o aspecto do citoplasma do oócito em microscópio estereoscópico (NAGAI,2001). Os oócitos selecionados são transportados para o laboratório para o início do processo de PIVE.

Na maturação *in vitro*, o meio mais utilizado é TCM199 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino(SFB). A maturação é normalmente efetuada na presença de gonadotrofinas, como FSH (0,1 a 10 mg/mL) e LH (0,02 a 10 mg/mL), a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar. Depois de 20-24h de incubação, os oócitos com a extrusão completa do primeiro corpúsculo polar estão prontos para serem fertilizados (GALLI,2003).

Na fecundação *in vitro*, é utilizado sêmen congelado e o método sistema de gradiente de Percoll é comumente realizado para a separação da

fração móvel durante a descongelação devido à consistência, flexibilidade e confiabilidade desse método. Dois meios de capacitação são geralmente utilizados na FIV: um meio base TALP ou um meio base SOF tanto sem glicose quanto com concentração variável de heparina. A FIV é completada após 18-20h de co-incubação de espermatozoides e oócitos a 38,5-39°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ e o sêmen tem um papel fundamental no sucesso da FIV(GALLI, 2003).

O desenvolvimento de embriões *in vitro* é normalmente avaliado no dia 6 após a FIV, sendo observado o grau de compactação das células. Tal evento é diretamente relacionado ao desenvolvimento embrionário; aqueles que demonstram um claro processo de compactação são os que mais provavelmente desenvolvem. Normalmente, é efetuada a seleção de embriões para congelamento e transferência no dia 7 após a FIV, no qual estão, pelo menos, no estágio de blastocisto e blastocisto expandido(GALLI,2003).

A importância da PIV para a conservação de mamíferos silvestres, principalmente na reposição de espécies ameaçadas de extinção, seria possibilitar a utilização de indivíduos em diferentes estágios de maturidade sexual, animais com problemas reprodutivos ou mesmo animais que morreram recentemente. Além disso, gera um número maior de embriões *in vitro* obtidos a partir de uma grande variedade de doadores, mantendo a diversidade genética de pequenas populações com risco de endogamia (PTAK et al., 2002). Esta é a técnica mais eficiente para a propagação de pequenas populações, porém, também é um método com custos elevados (COMIZZOLI et al.,2000).

Esta técnica poderá ser uma ferramenta útil para questões relacionadas ao envelhecimento dos animais como, por exemplo, os guepardos com baixo sucesso reprodutivo em coleções *ex situ*, resultando em fêmeas mais velhas, mas geneticamente importantes. Contudo, essas fêmeas poderão passar os seus genes para a próxima geração através dessa biotécnica (COMIZZOLI et al., 2000).

Apesar disso, essa biotécnica ainda possui baixa eficiência por causa das diferentes exigências dos meios nutritivos para a cultura *in vitro* de oócitos, espermatozoides e embriões das diferentes espécies. Esses meios não foram

definidos para a maioria das espécies ameaçadas de extinção (COMIZZOLI et al., 2000).

Além disso, a alta prevalência de sazonalidade reprodutiva afeta os resultados da MIV e da FIV, pois os oócitos coletados durante as estações quiescentes do ano podem ser resistentes aos cultivos convencionais, diminuindo a produção de embriões nesses períodos. Como já observado nos cervos e nos gatos domésticos. Porém, as imposições sazonais podem ser evitadas modificando os cultivos *in vitro*. Por exemplo, a suplementação dos meios de maturação *in vitro* com antioxidantes e aumento das concentrações exógenas de gonadotrofina nos gatos domésticos, supera os desafios da sazonalidade e melhora a eficiência da PIV (COMIZZOLI et al., 2010).

Critérios de seleção dos oócitos têm se tornado úteis para assegurar o sucesso dessa biotécnica, servindo como indicadores da qualidade dos gametas femininos, tais como: traços morfológicos do oócito (homogeneidade da cor e do citoplasma, e o número de camadas de células do cúmulo), o tamanho do folículo, o metabolismo dos oócitos e análise dos metabólitos gerados por essa célula (COMIZZOLI et al., 2010).

Em 1997, foi reportado o nascimento de um gorila da planície ocidental (*Gorilla gorilla gorilla*) após a utilização da FIV e transferência de embrião no Zoológico de Cincinnati, nos Estados Unidos da América. A fêmea tinha 21 anos e recebeu um tratamento com hormônio folículo estimulante humano (hFSH) e gonadotrofina coriônica humana (hCG), passados 35 horas da última aplicação do hCG, foi realizada a aspiração por sucção controlada guiada por ultrassom transvaginal. Após 21 horas da FIV, foram observados oito embriões, sendo que cinco foram criopreservados e três foram colocados em meio de cultura e posteriormente transferidos por transferência uterina trans-cervical, que sucedeu 47 horas após a FIV (POPE et al., 1997).

Ptak et al. (2002) descreveu o primeiro resgate de uma espécie ameaçada de extinção, utilizando-se um pacote de biotecnologias reprodutivas. O seu estudo era com muflão europeu (*Ovis ammon musimon*), que habitam apenas as Ilhas da Sardenha e da Córsega na Itália. As fêmeas foram divididas em: grupo de fêmeas que não receberam tratamento hormonal e grupo de fêmeas

sincronizadas com os implantes de Norgestomet durante 12 dias e administradas seis doses de 4,8 mg de FSH ovina a cada 12h nos 10^o, 11^o e 12^o dias após a aplicação do implante. Foi feita a aspiração folicular utilizando uma agulha de calibre 20. Foram utilizados pools de sêmen criopreservados de quatro machos para a fertilização *in vitro*. Com 7 a 8 dias após a FIV, os embriões estavam no estágio de blastocisto, apresentados na Figura 4 e foram criopreservados ou imediatamente transferidos para as receptoras sincronizadas que eram ovelhas domésticas (*Ovis aries*). Não houve diferenças significativas na clivagem entre os grupos não tratados e tratados (67% vs 71%, respectivamente) e nem na taxa de blastocistos (33% vs 37%, respectivamente). No total, 10 pares de embriões foram transferidos 7 dias após o início do estro natural das ovelhas. A taxa de prenhez foi de 70% aos 40 dias e 50% aos 80 dias após a transferência. Obtiveram o nascimento de quatro muflões de três receptoras, tendo gêmeos uma receptora.

Lima (2011) descreveu a primeira FIV em macaco-prego (*Sapajus apella*), sendo o primeiro relato de PIV com primatas no Brasil. Com essa mesma espécie, foi realizado um protocolo de maturação *in vitro*, sendo uma alternativa da estimulação hormonal ovariana, que ainda possui resultados variáveis (DOMINGUES et al., 2010).

Em felídeos, o cultivo de embriões é realizado em grupo, ou seja; o cultivo de vários embriões na mesma gota ou poço. Isso proporciona melhores índices de crescimento e desenvolvimento embrionário, quando comparado aos cultivos de células isoladas (SPINDLER et al., 2006, citado por MICHELETTI et al., 2011). Os embriões dos felídeos possuem uma particularidade de serem sensíveis a aminoácidos essenciais presentes no meio de cultivo (HERRICK et al., 2007). Obtiveram-se melhores resultados, na produção *in vitro* de felídeos, no desenvolvimento de blastocistos com meios de cultivo com 25ng/mL de EGF (fator de crescimento epidermal) e 100ng/ml de IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina-1) (Pope et al., 2006).

Foram documentados nascimentos de filhotes através da técnica de fertilização *in vitro* das seguintes espécies: gato do Deserto indiano (*Felis margarita*), tigre (*Panthera tigris*), gauro (*Bos gaurus*), *klipspringer* (*Oreotragus*

oreotragus), bongo (*Tragelaphus euryceros*), addax (*Addax nasomaculatus*) (COMIZZOLI et al., 2010).

4.7 Transferência de embriões (TE)

A transferência de embriões (TE) é uma biotécnica que permite coletar embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras com a finalidade de completarem o período de gestação. Esta técnica permite também base técnica para viabilizar outras biotécnicas como, por exemplo, a clonagem e produção *in vitro* de embriões (FIGUEIREDO et al, 2008).

A transferência de embrião pode ser realizada pelas técnicas de laparotomia, laparoscopia e transcervical. A transferência transcervical é utilizada em bovídeos, cervídeos e equídeos. No entanto, a transferência laparoscópica de embriões é realizada em várias espécies, como: raposa de prata, urso americano, jaguatirica; quando métodos não cirúrgicos não são possíveis devido à anatomia de cada espécie (COMIZZOLI et al., 2000).

A TE tem sido importante para a preservação da diversidade genética pela criopreservação de embriões. O desenvolvimento das técnicas de criopreservação de embriões foi fundamental para esta técnica, possibilitando o transporte de embriões congelados entre populações geograficamente distantes e, ao mesmo tempo, a redução de transporte de animais vivos entre zoológicos ou criatórios de animais silvestres (FIGUEIREDO et al, 2008). Além disso, a TE pode ser utilizada para aumentar rapidamente as linhas de sangue raras, para obter uma progênie mais numerosa das fêmeas doadoras e acelerar o progresso genético, reduzindo, assim, o intervalo de gerações (HAFEZ, 2011).

A transferência de embriões ou IA podem não ser os métodos mais eficientes para o crescimento rápido de populações pequenas, porém, podem ser mais adequadas do que técnicas mais sofisticadas, por terem baixo custo e resultados mais consistentes (COMIZZOLI et al., 2000).

Porém, nas espécies de animais silvestres, o escasso conhecimento da cinética do desenvolvimento embrionário e do reconhecimento materno-fetal resultam na falta de sincronia entre o embrião transferido e a mãe receptora (COMIZZOLI et al., 2000), diminuindo os resultados dessa biotécnica.

Uma outra técnica de transferência utilizada para conservação de animais silvestres é a transferência interespecífica, no qual o trofoectoderma é da receptora e a massa celular interna ou disco germinativo é da espécie ameaçada.

Contudo, o reconhecimento materno e a barreira imunológica continuam sendo os entraves para as gestações interespecíficas (COMIZZOLI et al., 2000).

Stover et al. (1981) realizou a primeira transferência interespecífica de embriões gaur (*Bos gaurus*) em vacas Holstein nos Estados Unidos da América. Também tiveram êxito a transferência de embriões de animais silvestres de gatos do deserto indiano (*Felis silvestres*) no gato doméstico (*Felis catus*) e de muflão (*Ovis orientalis*) nas ovelhas domésticas.

4.8 Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré antrais (MOIFOPA)

O folículo é o elemento essencial para a manutenção da viabilidade oocitária, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas, sendo elas: células da granulosa e células tecais (FIGUEIREDO et al.,1998). A população folicular de um ovário é dividida em folículos não cavitários ou pré-antrais (folículos primordiais, primários e secundários) e folículos cavitários ou antrais (folículos terciários e folículos de De Graaf), devido à ausência ou existência de uma cavidade repleta de líquido folicular circundando o oócito (FIGUEIREDO et al.,1998; SANTOS et al.,2008). Os folículos pré-antrais promovem a renovação contínua dos folículos antrais no ovário (GUILBAULT et al., 1986, citado por FIGUEIREDO et al.,1998).

Segundo Figueiredo et al. (2008), os folículos ovarianos pré- antrais (FOPA) representam cerca de 90 a 95% de toda população folicular, armazenando a maioria dos oócitos presentes nos ovários dos mamíferos. Porém, a maioria destes folículos, cerca de 99,9%, não chegam até à ovulação, sucumbindo ao processo de atresia folicular.

Nesse contexto, foi desenvolvida a biotécnica de Manipulação de Ovócitos inclusos em FOPA (MOIFOPA) para impedir a perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, promovendo o crescimento e maturação *in vitro* de FOPAs (LIMA, 2015). No entanto, os meios de cultivo *in vitro* ainda não foram definidos para todas as espécies, sendo uma alternativa para o sucesso dessa técnica, a criopreservação de tecido ovariano (SANTOS et al.,2008), mantendo a viabilidade folicular até a realização do cultivo *in vitro* ou transplante do ovário (LIMA,2015).

A biotécnica tem relevância para a pesquisa básica, porque contribui para um melhor esclarecimento dos mecanismos envolvidos na foliculogênese na fase pré-antral. Também fornecerá um grande número de oócitos no mesmo estágio de desenvolvimento de um mesmo animal para as técnicas de fertilização *in vitro*, clonagem e transgenia; contribuindo, assim, para a padronização dessas técnicas e para a multiplicação de animais silvestres (FIGUEIREDO et al., 1998). Além disso, possui outras vantagens, como: aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico ou em perigo de extinção, redução do intervalo

entre gerações, recuperação de animais eliminados por problemas sanitários, uso de animais que não respondem a tratamentos de superovulação, obtenção de descendentes de um animal mesmo após sua morte e a formação de bancos de germoplasma com FOPAs isolados *in vitro* criopreservados de animais de alto valor genético ou ameaçados de extinção. Assim, esta técnica colaborará para o restabelecimento de populações de animais silvestres e ameaçados de extinção a partir de pequenos grupos de fêmeas (FIGUEIREDO et al., 2007).

Portanto, a MOIFOPA compreende o isolamento ou resgate de FOPA a partir de ovários, a sua conservação por curtos ou longos períodos e o seu posterior cultivo *in vitro* para as técnicas de FIV, clonagem ou transgenia (LIMA, 2015).

A obtenção dos oócitos pode ser conseguida, independentemente da idade, através de biópsias do tecido ovariano, ovariectomia uni ou bilateral ou colheita do ovário *post-mortem* (DOMINGUES et al. 2007). Métodos mecânicos e/ou enzimáticos têm permitido o isolamento de oócitos inclusos em FOPA (FIGUEIREDO, 1998). Estes podem ser preservados através da estocagem do tecido ovariano, dos folículos isolados ou dos oócitos maduros ou imaturos (LERMEN et al., 2009, citado por LIMA, 2015). A criopreservação de tecido ovariano é uma boa opção devido à sua ampla aplicação na reprodução animal associada ao transplante, à facilidade de manuseio do tecido e à possível retomada de função; (LIMA, 2015).

Segundo Comizzoli et al.(2010), a técnica de criopreservação de gametas femininos ainda não foi definida para os animais silvestres por causa da carência de informações básicas sobre a fisiologia e poucos estudos como tolerância osmótica dos oócitos ou testes de toxicidade.

O transplante ovariano constitui-se numa técnica em que um ovário ou parte dele é transferido de um doador para receptoras, podendo ser o mesmo indivíduo, outro indivíduo da mesma espécie ou ainda de espécie diferente, para locais próximos ou distantes da posição anatômica original. Esta técnica preserva a função deste órgão, pois se torna hormonalmente competente e capaz de ovular após um período de tempo (DISSEN et al., 1994). No entanto, fatores como a localização anatômica escolhida para o transplante, tamanho do transplante e

fatores angiogênicos afetam o número e a qualidade dos oócitos produzidos devido às injúrias sofridas pelo tecido transplantado pela isquemia e reperfusão provocadas por esses fatores (ISRAELY et al., 2003). Além disso, os processos de revascularização e reinervação do tecido ovariano desregulam processos intra-ovarianos e, conseqüentemente, o crescimento normal dos folículos e oócitos, promovendo um número menor de oócitos competentes (YANG et al., 2006). No entanto, esta técnica é promissora e novos estudos sobre transplante ovariano deverão ser estimulados para maior efetividade dessa técnica.

Estudos com animais silvestres e domésticos foram realizados para estimar parâmetros qualitativos e quantitativos da população folicular ovariana (bugio- preto- *Alouatta caraya* - LOPES et al., 2006; dromedário- *Camelus dromedarius*- NILI et al., 2004; gatas domésticas- *Felis catus*- CARRIJO et al., 2010), sendo estes relacionados com o potencial reprodutivo das fêmeas (LIMA, 2015). A população folicular pode ser afetada por fatores como idade, raça, níveis hormonais, status reprodutivo, nutrição e fatores genéticos (SCARAMUZZI et al., 1993, citado por LIMA, 2015). Esses dados fornecerão um conhecimento mais aprofundado sobre o desenvolvimento folicular, aumentando a eficiência das biotécnicas de reprodução animal (COMIZZOLI et al., 2010).

Estudos sobre população folicular demonstraram que a população folicular dos suínos domésticos, que são filogeneticamente mais próximos dos catetos, é cerca de 420.000 folículos (GOSDEN&TELFER, 1987, citado por LIMA, 2015). No entanto, estudos evidenciaram que a população folicular de catetos foi estimada em 33.273 por ovário, sendo 91% do total de folículos de FOPAs. O citoplasma dos catetos possui uma grande quantidade de lipídios, porém, não impediu a sua conservação sob baixas temperaturas (até 8°C) por curtos períodos (até 36h) (LIMA et al., 2015).

Jewgenow et al. (1997) compararam o desenvolvimento de FOPA de gatas domésticas com leas e tigresas. Houve uma equivalência da taxa de desenvolvimento de FOPA entre a leoa e a gata. Entretanto, os FOPAs de tigresa apresentaram baixas taxas de viabilidade *in vitro*. Pesquisas com marsupiais obtiveram efeito positivo do FSH sobre o crescimento *in vitro* de FOPAs de gambás sul-americanos (BUTCHER&ULLMANN, 1996).

Nayudu et al. (2003) descreveram pela primeira vez protocolos de cultivo de FOPAs em primatas neotropicais após a obtenção de fragmentos de córtex ovariano e folículos isolados de sagui-de-tufos-brancos (*Callithrix jacchus*).

O desenvolvimento de cultivos *in vitro* de FOPA é de grande importância para elucidar os fatores que controlam a foliculogênese nas diferentes espécies e promover o crescimento e a maturação oocitária dos FOPAs (HARTSHORNE, 1997, citado por LIMA, 2015). Os meios são constituídos de antibióticos, tampões, substratos nutricionais, diferentes fontes proteicas, antioxidantes, hormônios e fatores de crescimento, variando entre si por causa das concentrações dos aditivos (FIGUEIREDO et al., 2008).

Os métodos de cultivo utilizados são: o cultivo do ovário inteiro, de fragmentos do córtex ovariano, e de folículos isolados realizados nas formas bi ou tridimensional (LIMA, 2015). Nos pequenos mamíferos, é utilizado o cultivo do ovário para o estudo da foliculogênese inicial devido ao pequeno tamanho do ovário, permitindo esse tipo de cultivo (JIN et al., 2010). O cultivo com fragmentos de córtex ovariano possibilita manter o contato celular e facilitar a perfusão do meio para o tecido ovariano. Porém, foi demonstrado, neste tipo de cultivo, que a maioria dos folículos desenvolve-se até o estágio de folículo primário, mas poucos progridem para o estágio de folículo secundário (FIGUEIREDO et al., 2007). Por último, o cultivo na forma isolada permite a análise individual dos folículos durante o cultivo e também uma maior perfusão do meio para o folículo (Lima, 2015).

Além desses métodos, também existe a associação do CIV *in situ* e isolado. Sendo realizado, primeiramente, o cultivo *in situ*, gerando a ativação dos folículos, e posteriormente o isolamento e cultivo dos folículos secundários desenvolvidos *in vitro* (TELFER et al., 2008). Entretanto, ainda não foram definidas as condições necessárias para o desenvolvimento *in vitro* de FOPA dos animais silvestres, por não possuir informações suficientes sobre a regulação do crescimento folicular e oocitário destes (MATOS et al., 2007).

Pelo exposto, fica a certeza de que as pesquisas relacionadas aos folículos pré-antrais de animais silvestres são de grande importância para a compreensão de mecanismos envolvidos na foliculogênese inicial, possibilitando conhecimentos fundamentais para utilização de outras biotécnicas, tendo como

objetivo principal a conservação destas espécies e de animais ameaçados de extinção (LIMA, 2015).

4.9 Clonagem

A clonagem ou transferência nuclear (TN) é uma técnica que tem como objetivo principal a produção de um organismo com características físicas e biológicas idênticas à de outro ser vivo, a partir de um material biológico proveniente de qualquer célula somática de um indivíduo e um oócito não fecundado e enucleado (RISPOLI et al.,2014). Realiza-se a fusão de membranas plasmáticas por eletrofusão de um núcleo doador para um citoplasma receptor para a formação de zigotos (BORDIGNON&SMITH, 2008).

A transferência nuclear já foi realizada em diferentes espécies animais com a finalidade de estudos de reprogramação celular e epigenética. Além disso, a técnica permite o melhoramento genético com a rápida multiplicação de animais com características zootécnicas desejáveis, proporciona uma diminuição no intervalo de gerações e também a conservação e regeneração de recursos genéticos de animais em extinção (PERECIN, 2007).

Para os animais silvestres, a TN pode contribuir para a recuperação de espécies reduzidas a números criticamente baixos e que sejam incapazes de se reproduzir de forma natural ou por outras estratégias de reprodução assistida (PERECIN, 2007).

Uma vantagem da clonagem seria a relativa simplicidade e facilidade de obtenção de material genético, podendo ser: células embrionárias pré-implantação, células embrionárias diferenciadas, fibroblastos fetais, células do oviduto, células de glândulas mamárias, fibroblastos de pele, células de *cumulus*, células de Sertoli e testiculares fetais; células-tronco embrionárias(RISPOLI et al.,2014). Além disso, permite o conhecimento mais aprofundado das interações núcleo- citoplasmáticas de diferentes espécies e subespécies como, por exemplo, a incompatibilidade de componentes nucleares e mitocôndrias que podem prejudicar o desenvolvimento normal dos embriões reconstruídos e afetar a eficiência dessa técnica (MATTOS, 2016).

Diversas espécies em extinção já foram produzidas através da técnica de TN e também através da técnica de transferência nuclear interespecie (Figura 11) (MATTOS, 2016). A TN interespecie é efetuada com o oócito de uma receptora de espécie diferente do doador do núcleo (RISPOLI et al.,2014),

utilizando-se quando não existem oócitos suficientes, quando estes são limitados na espécie estudada (MURAKAMI et al., 2005). Segundo Mattos (2016), exemplos de estudos conduzidos com a técnica TN interespecies, que obtiveram sucesso, são: gato selvagem africano utilizando-se oócitos de gato doméstico (GOMÉZ et al., 2004); dois lobos cinzentos utilizando-se células de lobo e oócito de cão doméstico (KIM et al., 2007); mufão (LOI et al., 2001); cabra de montanha bucardo (*Cabra pyrenaica pyrenaica*), que foi já extinta, com oócitos enucleados de cabra doméstica; e coiotes utilizando-se oócitos de cães domésticos.

Hwang et al., relatou a clonagem bem sucedida de lobo cinzento (*Canis lúpus*) com a transferência de células somáticas isoladas de lobos mortos para oócitos enucleados de cães domésticos (*Canis lúpus familiaris*). Já o primeiro relato de carnívoro selvagem clonado foi, em Nova Orleans, EUA, com o material genético criopreservado de um gato-selvagem-africano com uma gata doméstica, em 2003 (GOMÉZ et al., 2004).

Apesar das vantagens da utilização dessa técnica, o sucesso da produção de clones ainda é baixo e existem frequentes variações nos resultados, mesmo utilizando as mesmas condições de clonagem (tipo de célula doadora de núcleo, preparação dos oócitos, ativação e cultivo dos embriões) (RISPOLI et al., 2014). Além disso, outros problemas podem causar a diminuição da eficiência da clonagem, tais como: cultivo laboratorial do embrião antes da implantação, o tempo de micromanipulação, o meio de cultivo, a temperatura adequada, as taxas de oxigênio/dióxido de carbono, a desmetilação das células autossômicas para reativação da embriogênese no feto, o que gera reprogramação nuclear falha, as alterações placentárias e as disfunções perinatais (Guimarães et al., 2012).

As alterações responsáveis pelas complicações seriam a menor taxa de apoptoses nas regiões centrais dos placentomas com a inadequada expressão dos genes BAX, BCL2 e GAPDH; a maior atividade de proliferação nas placentas no final da gestação (RICI et al., 2009) e a não diminuição das células binucleadas, que são o resultado da fusão das células maternas e fetais e responsáveis pela síntese de progesterona na placenta (WOODING, 1984, citado por RISPOLI et al., 2014).

O subdesenvolvimento do epitélio coriônico da placenta, ou seja,

menor número de vasos sanguíneos no alantoide; a diminuição do número de cotilédones nas espécies com placenta cotiledonária, diminuindo, assim, as trocas materno-fetal; e diminuição do número dos cotilédones e hiperplasia destes com edemas dos envoltórios fetais, são consideradas as alterações placentárias que promovem a perda fetal (BORDIGNON&SMITH,2008).

Segundo Guimarães et al (2012), apenas 10% dos clones sobrevivem por causa da ocorrência de disfunções cardiorrespiratórias, hepáticas, renais, articulares e alterações multissistêmicas nos neonatos. Sendo observado também no período pós-natal dos animais clonados o aumento das dimensões do cordão umbilical, alterações imunológicas, malformações congênitas, problemas de retenção placentária, hidroalantoide e macrossomia ou síndrome do feto gigante.

Portanto, a utilização dessa técnica permite aumentar o tamanho da população de mamíferos em perigo de extinção ou mesmo recuperar espécies extintas, além de possuir fins terapêuticos para a medicina veterinária, entretanto, mais estudos são necessários para solucionar os problemas ainda encontrados nessa técnica para melhorar o rendimento desta.

4.10 Produção artificial de gametas e transplante de células germinativas

As células germinativas são originadas do epiblasto proximal e são os precursores embrionários dos gametas (YOUNG et al.,2010). A origem exata da linhagem de células germinativas e o mecanismo de especificação dessas células ainda são indefinidos, principalmente, por causa da ausência de marcadores específicos que retratem os seus primeiros processos de especificação (SAITOU;YAMAJI, 2010).

Durante a fase proliferativa na crista genital, as células germinativas de ambos os sexos sofrem uma reprogramação epigenética, ou seja, uma desmetilação do DNA de todo o genoma, modificações de histonas e a inativação do imprinting genômico (SAITOU et al., 2012). Posteriormente a esse evento, as células germinativas continuam a proliferar. Em ovinos, por exemplo, as células germinativas proliferam até o 31º dia, em bovinos até o 42º dia de gestação, após este período, entram na prófase I das divisões meióticas (SPEED,1982, citado por COSTA,2016). Desse modo, o imprinting genômico pode ser necessário para restaurar a totipotência das linhagens de células germinativas (TILGNER et al., 2008).

Posteriormente, foi elucidado com a análise da expressão gênica da população de células germinativas, que esse evento anteriormente descrito é resultado da expressão gênica de diversos genes como, por exemplo, os genes *Homeobox*, *Oct4*, *Stella*, *Fragilis*, entre outros.

O gene *Homeobox* tem o papel de especificar a identidade das células somáticas específicas. Portanto, isto sugere que as células germinativas fundadoras adquirem a capacidade de evitar a especificação somática, prevenindo ou suprimindo a expressão dos genes *Homeobox*, podendo ser uma das principais características que as células germinativas de mamíferos possuem e lhes permite manter ou recuperar a totipotência (NIKOLIC et al., 2016). Este efeito é apoiado pela expressão continuada de *Oct4* (*Octamer- binding transcription factor 4*, também conhecido por *Pou5f1*), considerado um gene chave para pluripotência (NIWA,2007); e outros genes de pluripotência em células germinativas (YEOM et al., 1996).

Concomitantemente a essas descobertas científicas, houve pela

primeira vez, em 1981, o isolamento e cultivo *in vitro* de células-tronco embrionárias a partir de embriões de camundongos por Martin Evans na Universidade da Califórnia, em São Francisco, EUA. Em 1998, células-tronco embrionárias (CTE) humanas foram isoladas a partir da massa celular interna de blastocistos entre 5-7 dias do desenvolvimento embrionário, após a fertilização dos gametas (NASCIMENTO, 2014).

As células-tronco são células com menor grau de diferenciação comparado às células somáticas, e podem se dividir e originar uma nova cópia de si e outra diferenciada. Ou seja, além da auto-renovação, as células-tronco também podem diferenciar em outros tipos celulares (MUMMERY et al., 2010). Essas células podem ser encontradas nos tecidos embrionários e extraembrionários (SOUZA et al., 2010).

As células-tronco podem ser divididas de acordo com a sua plasticidade ou potência, como: totipotentes (capacidade de diferenciação em todos os tipos de células, incluindo placenta), pluripotentes (diferenciação em células das três camadas germinativas; ectoderme, mesoderme e endoderme, porém não em células trofoblásticas), multipotentes (diferenciação em mais de um tipo celular, mas não necessariamente em todas as células de uma determinada camada germinativa) e unipotentes (diferenciação em apenas um tipo celular) (ABDULRAZZAK et al., 2010). Podem também ser classificadas em quatro grupos correspondentes às suas diferentes origens: células-tronco embrionárias (ESC), células-tronco fetais, células-tronco adultas (ASC) e células-tronco de pluripotência induzidas (iPS) (KOZLIK; WOJCICKI, 2014).

As ESC possuem a característica de crescer indefinidamente *in vitro* (auto renovação) e potencial para diferenciar-se em praticamente todos os tipos celulares corporais (pluripotência) (WANG&COONEY, 2013). Foi demonstrado a pluripotência das ESC pela injeção em ratos imunodeficientes, contendo células de cada uma das três camadas germinativas primárias, para produção de teratomas (THOMSON et al., 1998). Além disso, foi realizada a injeção em blastocistos com formação de uma prole quimérica para a avaliação dos descendentes da quimera e a confirmação da incorporação destas células na linhagem germinativa (BRADLEY et al., 1984)

As células-tronco adultas (ASC) são específicas para cada órgão, e estão presentes em pequenas quantidades em todos os tecidos. Estas células-tronco foram previamente classificadas como multipotentes, mas atualmente são conhecidas por serem pluripotentes, por causa do fenômeno conhecido como “plasticidade” ou “transdiferenciação”, ou seja, algumas destas ASC podem produzir um novo tipo celular, quando transferidas para outros tecidos (KOZLIK&WÓJCICKI, 2014).

Atualmente, questões políticas, éticas e sociais associadas com células-tronco humanas embrionárias e fetais têm limitado a pesquisa com esses tipos de células, sendo restrito em muitos países o seu uso (ZARZECZNY&CAULFIELD, 2009). Porém, em 2006, foi descoberta a reprogramação biotecnológica, por Takahashi e Yamanaka, revelando que com apenas quatro fatores de transcrição (Oct4, Klf4, Sox2 e c-Myc) poderia se redefinir o estado epigenético de células somáticas, tais como, fibroblastos da pele, para células semelhantes ao estado embrionário (semelhantes às células ESC), sendo essas células chamadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) (GOULBURN et al., 2011). Estes experimentos foram realizados primeiro com fibroblastos de camundongos e posteriormente com fibroblastos humanos (COSTA, 2016).

Com a descoberta das iPSCs, tornou-se possível utilizar essas células para a formação de vários tecidos necessários para o tratamento de diversas doenças, principalmente, neurodegenerativas; sendo um importante avanço para esclarecimento dos mecanismos subjacentes às doenças e um progresso na medicina regenerativa (ITO et al., 2013). Porém, como as iPSCs possuem uma capacidade de proliferação elevada, a capacidade de formação de câncer também é considerada (KANNO et al., 2013).

Além desses tipos de células-tronco, diversos trabalhos indicam a existência das células-tronco ovarianas (OSC) nos ovários das fêmeas adultas (ZOU et al., 2009; WHITE et al., 2012; ZHANG et al., 2012; BHARTIYA et al., 2013; PARTE et al., 2014).

Bristol-Gouls et al.(2006) simularam a dinâmica da progressão folicular durante a vida útil de camundongos. Foi descrito a expressão de marcadores de

linhagens de células germinativas incluindo *Oct4*, *MVH*, *DAZL*, *Stella* e *Fragilis* na medula óssea de camundongos fêmeas adultas, e depois transplantadas para medula óssea de fêmeas adultas pré-esterilizadas com ciclofosfamida e bussulfan, detectando-se a geração significativa de novos folículos contendo oócitos e também a formação de corpo lúteo (COSTA,2016). Assim, essas observações preliminares deram origem a novos estudos que visam o isolamento das OSC e sua transferência para animais estéreis com o intuito de recuperar a sua fertilidade (SILVESTRIS et al., 2015).

Portanto, durante muitos anos, acreditou-se que a reserva folicular ovariana fosse formada na embriogênese e que não haveria a possibilidade de renovação. No entanto, com o avanço da ciência e o desenvolvimento de estudos da foliculogênese, a teoria se tornou alvo de controvérsias, porque demonstrou-se a possibilidade de renovação, contudo, ainda não se sabe se ela realmente ocorre naturalmente e quais as condições poderia ocorrer (TILLY&JOHNSON, 2007).

A possibilidade da formação dos mais variados tipos de tecidos a partir das células-tronco e também os progressos no isolamento e cultivo *in vitro* de células germinativas primordiais, obtidas de estágios fetais (MAGNÚSDÓTTIR&SURANI, 2014), possibilitaram a ideia da derivação de células germinativas primordiais (*primordial germ cell*- PGCs) a partir de células-tronco. Esses avanços na ciência gerarão grande impacto na conservação de espécies ameaçadas, porque independentemente da técnica utilizada para criopreservação de gametas, seja ela feita por congelamento lento ou vitrificação, haverá perdas celulares. Por isso, para aproveitamento máximo da genética de um indivíduo, principalmente em se tratando de espécies ameaçadas, deve-se considerar também a utilização de outras técnicas sofisticadas, como a produção artificial de células germinativas. Contudo, será necessário o desenvolvimento de protocolos próprios para as espécies selvagens (LIMA et al., 2017).

Diversos protocolos experimentais têm sido testados com ESCs e iPSCs, porém com resultados baixos em termos de produção de células PGCs-*like*. No entanto, Hayashi et al. (2012) relataram aumento da eficiência do processo de derivação de células PGCs-*like* a partir de iPSCs e ESCs, utilizando-se um protocolo de duas etapas. A primeira etapa seria a diferenciação das

células-tronco em células semelhantes a epiblasto, levando em consideração que naturalmente as PGCs derivam de células do epiblasto embrionário (HAYASHI et al., 2011); e a segunda etapa consiste na diferenciação final das células da primeira etapa em células PGCs-like que foram posteriormente agregadas a ovários de fêmeas receptoras.

Outro grupo de pesquisadores canadenses detectou uma população de células-tronco isoladas da pele de fetos suínos, que ao longo do cultivo *in vitro* formaram agregados similares a folículos que secretavam estradiol e progesterona e respondiam à estimulação por gonadotrofina. Além disso, foram relatadas células similares a oócitos que expressavam marcadores oocitários como o marcador de zona pelúcida e o marcador de meiose SCP3, que é uma proteína do complexo sinaptonêmico (DYCE et al., 2006). Posteriormente, indicaram que esta subpopulação celular além da morfologia distinta, também eram positivas para atividade da fosfatase alcalina e expressão de outros marcadores de células germinativas como o Oct4, Fragilis, Stella, Dazl e Vasa. Nesse mesmo estudo, demonstraram que mesmo sendo células de machos, formaram as células PGCs-like e estruturas semelhantes a oócitos (DYCE et al., 2011).

Yu et al.(2014), realizou um estudo com humanos para a produção de oócitos *in vitro* a partir de células pluripotentes isoladas de fluido amniótico. Estas células foram capazes de espontaneamente se desenvolver como estruturas semelhantes a oócitos, no entanto, foi verificado que estes não apresentaram qualidade adequada, demonstrando certa fragilidade quanto à zona pelúcida. Portanto, estas técnicas ainda são incipientes e limitadas em relação a animais silvestres, inicialmente pela necessidade de executar de forma segura a punção do líquido amniótico, procedimento este que demandaria a contenção química da fêmea gestante. Além disso, seria necessário verificar a qualidade dos oócitos produzidos artificialmente e seu potencial para fertilização e desenvolvimento embrionário (LIMA et al., 2017). Mesmo assim, a criação laboratorial de oócitos a partir de células-tronco tem grande potencial para a conservação de espécies ameaçadas.

Outra técnica para a produção de células germinativas é o transplante

de gônadas. A finalidade desta metodologia é fazer com que um macho receptor possa conduzir a espermatogênese de um doador de alto valor genético. Entretanto, trata-se de um método complexo, que exige gestão intensiva, já que as espermatogônias devem ser selecionadas e cultivadas por tempo prolongado, sendo identificadas por marcadores específicos (HE et al., 2015; OATLEY et al., 2016, citado por LIMA et al., 2017). Ressalta-se que, previamente, deve-se eliminar a linhagem germinativa do receptor, o que representa uma limitação da técnica de transplante. No entanto, a metodologia poderia ser empregada em animais silvestres, respeitando as particularidades de cada espécie, para otimizar a reprodução de machos (reprodutores desejáveis), incluindo indivíduos pré-púberes, considerando-se a possibilidade de coleta de animais de vida livre, e a consequente necessidade de protocolos de preservação tecidual (LIMA et al., 2017).

Essa biotecnologia cria oportunidades de aproveitamento de gônadas maduras ou pré-púberes criopreservadas para futura produção de gametas, ampliando a aplicação do ponto de vista de conservação de biodiversidade, já que gametas poderiam ser produzidos artificialmente de machos sexualmente imaturos e também de fêmeas, que poderiam assim contribuir para o pool genético de uma população, independentemente de sua sobrevivência até a idade adulta (LIMA et al., 2017).

Estudos já demonstraram a viabilidade de transplante de células germinativas entre felídeos silvestres e domésticos, visando o estoque genético de espécies valiosas. Silva et al. (2012) realizaram o primeiro estudo para padronização desta técnica abordando as jaguatiricas e tendo o gato doméstico como receptor. Para a depleção das células germinativas dos machos receptores, o experimento explorou a utilização de busulfan ou radiação, a qual provou ser mais segura que o fármaco. Apesar das limitações, o estudo obteve êxito. As limitações foram: semelhança morfológica entre os espermatozoides das duas espécies (sendo utilizados marcadores moleculares para diferenciação), dificuldades próprias da realização da técnica de microinjeção das células nos túbulos seminíferos, e necessidade de equipamentos específicos e onerosos como microinjetores.

Hayama et al.(2014) descreveu a produção de gametas após transplante de células germinativas primordiais obtidas das cristas genitais de embriões de camundongos para ratas receptoras imunodeficientes. Foi utilizado a bursa ovariana ou a região sob a cápsula renal como locais do transplante, sendo este último local teve maior sucesso na formação de uma estrutura equivalente a ovário. Portanto, sugere-se a utilização de método para a produção destas células em animais em extinção, já que o estudo mostrou que os oócitos produzidos artificialmente eram funcionais, pois houve produção de prole. Entretanto, para a preservação de espécies ameaçadas de extinção, a problemática permanece sendo a origem de embriões ou células primordiais e seus métodos de coleta (MORO et al., 2015).

As biotécnicas reprodutivas descritas apresentaram resultados laboratoriais promissores, portanto, poderão ser muito úteis à preservação das diversas espécies de animais silvestres em processo de extinção. Entretanto, destaca-se a importância de estudos detalhados sobre a fisiologia desses animais silvestres para obtenção de maiores avanços nessas biotécnicas.

4.11 Banco de Germoplasma

Os Bancos de Recursos Genéticos ou Bancos de Germoplasma são definidos como repositórios de materiais biológicos coletados (gametas, embriões, células somáticas e DNA), processados e armazenados em nitrogênio líquido a -196°C ou em sua fase de vapor a -150°C (HOLT & PICKARD, 1999; DOMINGUES et al.,2011). A formação de bancos de recursos genéticos é uma estratégia de reposição de germoplasma para programas de conservação (WILDY,1997) e são diretamente relacionados com as biotecnologias da reprodução, tais como clonagem, produção in vitro de embriões, transgênese, inseminação artificial, transferência de embriões, etc.

Os Bancos de germoplasma têm como principais objetivos: o resgate de populações que se extinguiram, populações que tenham importantes características biológicas a serem preservadas, ou a conservação *ex situ* de espécies localmente adaptadas ou em risco de extinção (SILVA et al.,2012).

A formação e constituição de bancos de germoplasma devem ser reguladas conforme as legislações específicas de cada país. O Brasil incorporou as recomendações da Convenção sobre a Diversidade Biológica (CDB), vinculada à Organização das Nações Unidas, a partir de sua promulgação por intermédio do Decreto Nº 2.519 de 16 de março de 1998 (WOLF,2009).

Em seu art. 1º a Convenção sobre Diversidade Biológica afirma:

“Os objetivos desta Convenção, a serem cumpridos de acordo com as disposições pertinentes, são a conservação da diversidade biológica, a utilização sustentável de seus componentes e a repartição justa e equitativa dos benefícios derivados da utilização dos recursos genéticos, mediante, inclusive, o acesso adequado aos recursos genéticos e a transferência adequada de tecnologias pertinentes, levando em conta todos os direitos sobre tais recursos e tecnologias, e mediante financiamento adequado”.

Neste sentido, no Brasil, foi criado o Sistema Nacional de Coleções Biológicas e Bancos de Germoplasma que possui como objetivos: a sensibilização do governo para o investimento da conservação de coleções biológicas e bancos de germoplasma como forma de combate à pirataria, formando, assim, uma rede brasileira com instituições públicas de pesquisa e com empresas do setor privado (Silva et al.,2012).

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia coordena os bancos de germoplasma através de um sistema denominado Plataforma Nacional de Recursos Genéticos e difundidos em várias instituições (universidades federais e estaduais, institutos estaduais de pesquisa e empresas estaduais) (Ferreira et al., 2005). No entanto, os bancos de germoplasma são principalmente voltados para a conservação de material genético de animais domésticos com potencial produtivo dentro da pecuária (MATTOS, 2016).

Em 2007, foi criado o Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA) no campus da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA) na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte. O LCGA realiza diversas pesquisas sobre criopreservação de gametas de diferentes espécies silvestres, entre elas: quatis (*Nasua nasua*), catetos (*Tayassu tajacu*), cutias (*Dasyprocta aguti*), tatus-peba (*Euphractus sexcinctus*) e preás silvestres da Caatinga (*Galea spixi spixi*). O Laboratório de Biologia e Medicina de Animais Silvestres da Amazônia (BIOMEDAM), da Universidade Federal do Pará, em parceria com o Centro Nacional de Primatas em Belém do Pará também contribuem para o estudo e desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas para a preservação e conservação de primatas neotropicais (MATTOS, 2016).

Em 2010, o Zoológico de Brasília criou o primeiro Banco de Germoplasma de Animais Silvestres da América Latina, com o objetivo de preservação da fauna brasileira e principalmente de espécies ameaçadas de extinção. O banco contém gametas, células somáticas e células-tronco (FJZB, 2012).

Atualmente, existe a preocupação com o estabelecimento e manutenção dos centros biológicos de pesquisa referentes às biotecnologias reprodutivas. Medidas devem ser tomadas para reduzir o risco de contaminação dos tecidos e também reduzir a possibilidade de transmissão de doenças (Silvestre et al., 2004). Deste modo, deverá ser feito uma triagem do doador e realizar boas práticas durante a coleta, transporte e armazenamento do material biológico para minimizar os riscos (Silva et al., 2012).

Uma alternativa para a preservação de animais silvestres é a formação de bancos de células somáticas associadas à técnica de clonagem, uma vez que

a obtenção de fibroblastos é simples, precisa de um pequeno fragmento de material e o cultivo de células fibroblásticas é considerado o mais apropriado para o uso de transferência nuclear de células somáticas (Leon-Quinto et al., 2011).

Para a formação de bancos de germoplasma com células somáticas é necessário realizar as seguintes etapas: isolamento, cultivo *in vitro* e criopreservação celular.

Dois métodos são utilizados para a desagregação do tecido isolado e formação da cultura primária, sendo eles: mecânico (dissecção com ou sem maceração) e enzimático. O primeiro método é mais adequado para quantidades muito pequenas de tecidos e funcionam bem com tecidos mole e alguns tecidos mais firmes (Freshney, 1994, citado por MATTOS, 2016); já a desagregação enzimática possui um melhor rendimento quando se tem tecido disponível (MATTOS, 2016).

Os cultivos celulares podem ser divididos em três tipos: cultivo primário, cultivo secundário (finito) e linhagem contínua (imortal). O cultivo primário é constituído de células diploides produzidas a partir de células isoladas diretamente de órgãos ou tecidos por processos de desagregação mecânica ou enzimática. São caracterizadas por um período de vida médio limitado e também são sensíveis às infecções pelos vírus da espécie do tecido (MATTOS, 2016). No cultivo secundário ou finito, as células continuam sendo diploides, entretanto, sofreram modificações no seu genoma que permitem a sua passagem (ou seja, o processo de renovação de células de uma garrafa para outra) de 60 a 80 subcultivos. Neste tipo de cultivo, as suas células irão morrer ou eventualmente adquirir uma mutação estável, conhecida como transformação ou imortalização, sendo associada à tumorigenicidade (QUIAGEN, 2000). No cultivo de linhagem contínua, as células são heteroplóides, com números irregulares de cromossomos, e variável permissividade para vários tipos de vírus; no entanto, elas são capazes de propagarem *in vitro* por números indefinidos de passagens (QUIAGEN, 2000).

As células submetidas ao cultivo contínuo em laboratório são propensas aos riscos de contaminações e de mutações genéticas, sendo uma alternativa a este problema a criopreservação do material

biológico(MATTOS,2016).

Mattos(2016) avaliou a possibilidade de recuperar, isolar e caracterizar fibroblastos de três espécies diferentes (lobo-guará, veado-catingueiro e cachorro-do-mato), provenientes de atropelamento nas rodovias, encontrados mortos ou do Hospital Veterinário do Jardim Zoológico de Brasília; assim como testou o efeito dos crioprotetores DMSO 10% e DMF 5% associados a uma curva de resfriamento lenta e não controlada, sobre a viabilidade celular destes animais. Foram feitos os cultivos celulares com os fragmentos de pele da orelha dos animais mortos e posteriormente a criopreservação destes. A solução de crioproteção contendo 10% de DMSO foi mais eficiente que o meio com DMF 5% para conservar a viabilidades dos fibroblastos das três espécies, sendo formado um banco de germoplasma com 508 amostras criopreservadas com fibroblastos de 19 animais de 11 espécies diferentes. Este reservatório biológico se configura no primeiro banco de germoplasma contendo células somáticas de mamíferos silvestres do bioma Cerrado do Brasil.

Desse modo, os Bancos de Recursos Genéticos são repositores de germoplasma (gametas, embriões, sangue, tecidos e DNA), auxiliando nas definições dos programas de conservação e diretamente ligados com a biotecnologia da reprodução animal. Sendo assim, a biotecnologia reprodutiva surge como uma ação emergencial para conservação de espécies silvestres, embora não possa reparar os danos causados pela ação antrópica, elas contribuem para a manutenção da variabilidade genética e o aumento da taxa de reprodução em cativeiro.

5. Métodos não invasivos de monitoramento hormonal

A eficiência das técnicas de reprodução assistida depende do conhecimento de alguns aspectos referentes à biologia reprodutiva da espécie estudada como, por exemplo, o início da puberdade, sazonalidade reprodutiva, ciclicidade ovariana e gestação (DUARTE & GARCIA, 1995). Portanto, é necessário o estabelecimento de métodos eficientes de monitoramento hormonal para a realização eficaz das biotecnologias da reprodução como a inseminação artificial e a transferência de embriões; auxiliando, assim, os programas de conservação animal (PICKARD et al., 2001).

Uma estratégia comumente adotada nos estudos reprodutivos de animais silvestres é a utilização de espécies menos ameaçadas como modelo para tais estudos, porém, a extrapolação dos resultados, na maioria das vezes, não é válida. Por exemplo, os cervídeos possuem variações genéticas, morfológicas e também biológicas muito marcantes devido à adaptação aos diferentes habitats nos quais estão distribuídos (ASHER et al., 1999). Desse modo, acaba sendo necessária a realização de experimentos em espécies ameaçadas para a obtenção de dados efetivos que poderão ser aplicados para a conservação dessas espécies.

A caracterização do perfil dos hormônios esteroides reprodutivos contribui para o conhecimento da fisiologia reprodutiva das espécies. Entretanto, métodos tradicionais como, a contenção e coletas periódicas de sangue para aferição dos níveis hormonais, são inadequados aos animais silvestres devido à grande resistência desses à manipulação e à sensibilidade ao estresse. Quando submetidos às condições de estresse, os animais podem apresentar interrupção ou falha na reprodução, prejuízos catabólicos, aumento das chances de traumas e de desenvolvimento de outras injúrias (SCHOENECKER et al., 2004).

Assim, os métodos não invasivos de monitoramento hormonal permitiram o manejo e o monitoramento reprodutivo de populações cativas e selvagens; auxiliaram também em estudos ecológicos e, principalmente, na avaliação da saúde reprodutiva de pequenas populações; possibilitando a identificação de problemas na concepção, perda embrionária e aborto. Desse modo, é uma importante ferramenta para a análise do sucesso reprodutivo, da

dinâmica populacional e da saúde da população, determinando a continuidade da espécie em longo prazo (BORJESSON et al., 1996), por meio da dosagem dos metabólitos dos hormônios esteroides, que são excretados nas fezes, urina e saliva (GRAHAM,2004);

O monitoramento endócrino não-invasivo deverá ser previamente validado para cada espécie antes de sua aplicação por causa da variação do metabolismo e excreção dos hormônios esteroides entre as espécies (PETER et al., 1996).

A utilização de fezes é uma alternativa prática e segura para assegurar o monitoramento hormonal. No entanto, alguns testes de validação (por exemplo, cromatografia líquida de alta pressão ou cromatografia gasosa) necessitam de uma infraestrutura laboratorial pouco disponível nas instituições brasileiras, restringindo o acesso dessa técnica a poucos centros de pesquisa (PEREIRA,2007).

Mesmo com as suas limitações, muitos trabalhos realizados com aplicações reprodutivas envolvem a análise de andrógenos, estrógenos e progestinas urinários e/ou fecais juntamente com observações comportamentais. Desta forma, dados endócrino-reprodutivos relativos aos grupos de animais de difícil manejo que eram até pouco tempo totalmente desconhecidos devido aos perigos e limitações vinculados a contenção físico-química, estão atualmente disponíveis em literatura (MORAIS et al., 2002), auxiliando, assim, no conhecimento básico da biologia reprodutivas dos animais silvestres.

6. Considerações finais

Uma consequência da degradação ambiental é a perda da biodiversidade animal, sendo uma das principais preocupações mundiais atuais. Medidas emergenciais são imprescindíveis para a manutenção e conservação da fauna, sendo uma delas a conservação *ex situ* com a formação de banco de germoplasmas e a utilização de biotecnologias da reprodução.

As biotecnologias da reprodução são importantes ferramentas para a manutenção da variabilidade genética e, conseqüentemente, evitar a endogamia das populações e as suas posteriores reduções. Porém, possuem limitações pelo desconhecimento das diferentes fisiologias reprodutivas e as diferenças anatômicas de cada espécie estudada. No entanto, o incentivo a novas pesquisas científicas sobre as biotecnologias da reprodução destinadas à conservação de animais silvestres promove uma maior compreensão da singularidade das espécies, além das adaptações e mecanismos fisiológicos dos animais estudados.

Os profissionais envolvidos têm a responsabilidade de determinar os impactos causados pelas biotécnicas reprodutivas sobre a qualidade de vida dos animais para não comprometer o bem-estar destes, e deve sempre ser incluída esta problemática nos processos de tomada de decisão ética quanto à biotécnica em questão.

7. Referências Bibliográficas

- ABDULRAZZAK, H. et al.. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. *Journal of the Royal Society Interface*, v.7, n. Suppl 6, p. S689-S706, 2010. ISSN 1742-5689
- ABIR, R.; NITKE, S.; BEN-HAROUSH, A.; FISCH, B. In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. *Histol. Histopathol.* 21, 887-898, 2006.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, v. 7, p. 145-173, 1987.
- ANDRABI, SMH; MAXWELL, WMC. A review of reproductive biotechnologies for conservation of endangered species. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.223-243, 2007.
- ASHER, G.W., VELDHUIZEN, F.A., MORROW, C.J., DUGANZICH, D.M., Effects of exogenous melatonin on prolactin secretion, lactogenesis and reproductive seasonality of adult female red deer (*Cervus elaphus*), *J. Reprod. Fertil.* 100 (1994) 11-19.
- BAINBRIDGE, D.R., JABBOUR, H.N. Potential of assisted breeding techniques for the conservation of endangered mammalian species in captivity: a review, *Vet. Rec.* 143 (1998) 159-168.
- Barone MA, Roelke ME, Howard JG, Brown JL, Anderson AE, Wildt D.E. 1994. Reproductive characteristics of male Florida panthers: Comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America and North American zoos. *J Mammal* 75:150-162.
- BARROS, FFPC, QUEIROZ, JPAF, FILHO, ACM, SANTOS, EAA, PAULA, VV, FREITAS, CIA, SILVA, AR. Use of two anesthetic combinations for semen collection by electroejaculation from captive coatis (*Nasua nasua*). *Theriogenology*, v.71, p.1261-1266, 2009.
- BOGLIOLO, L. et al. Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, [S.I.], v. 56, p. 955-967, 2001.
- BORDIGNON, V, SMITH, LC. Clonagem animal por transferência nuclear. In: Gonçalves PB D, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal*. 3.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.347-364.
- BRADLEY, A. et al Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, v.309, n.5965, p.255-256, 1984
- BUTCHER, L. & ULLMANN, S. L. 1996. Culture of preantral ovarian follicles in the grey, shorttailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 8:535-539.
- CARRIJO, JR., O.A.; MARINHO, A.P.S.; CAMPOS, A.A.; AMORIM, C.A.; BAÓ, S.N.; LUC C, C.M. Morphometry Estimation and Ultrastructure of Ovarian Preantral Follicle Population in Queens. *Cells Tissues Organs* 19, 152-160, 2010.
- CHEMINEAU, P., COGNIE, Y., GUERIN, Y., ORGEUR, P., Vallet J.C., Collection and preservation of spermatozoa, in: *Training manual on artificial insemination in sheep and goats*, Rome, FAO Animal Production and Health Paper 83 (1991) 115-130.
- CHEN, XM, WEI, HJ, YANG, YF, XUE, HL, ZHAO, WG, ZHAO, M. Serum hormone concentrations and ovarian follicular wave emergence in Jilin sika deer

(*Cervus nippon hortulorum*) after synchronization of estrous cycles. *Anim Reprod Sci*, v.153, p.44-49, 2015.

COMIZZOLI, P; MERMILLOD P; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod Nutr Dev*, v.40, p.493-504, 2000.

COMIZZOLI, P;SONGSAGEN,N;WILDT,D.E. Protecting and Extending Fertility for Females of Wild and Endangered Mammals. *Cancer Treatment and Research* 156,87-100,(doi:10.1007/978-1-4419-6518-9_7), 2010.

CULLEN JR, L. Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo silvestre.

DALIMATA, A. M.; GRAHAM, J. K. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamida in combination with trehalose and methyl cellulose. *Theriogenology*, v. 48, p. 831-841, 1997.

DAVIS, J. M., ROWLEY SD, BRAINE HG, PIANTADOSI S, SANTOS GW Clinical toxicity of cryopreserved bone marrow graft infusion. *Blood Journal*, Baltimore, v. 75, n. 3, p. 781-786, 1990.

Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-in-situ,-ex-situ-e-on-farm>. Acesso em 23/05/2017.

Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-global/impactos>. Acesso em 23/05/2017

Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/1998/decreto-2519-16-marco-1998-437336-publicacaooriginal-1-pe.html> decreto n 2519 16 de março de 1998. Acesso em 07 de Março de 2017.

Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/agrobiodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-in-situ,-ex-situ-e-on-farm>. Acesso em 23/05/2017.

Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/especies-ameacadas-de-extincao>, acesso em 23/05/2017.

Dissen, G. A.; Lara, E. H.; Fahrenbach, W. H.; Costa, M. E.; Ojeda, S. R. Immature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology*, v. 134, p. 1146-1154, 1994.

DOMINGUES, S. F. S.; CALDAS-BUSS IEREIERE, M.C.; PETRETSKI PETRETSKI PETRETSKI, M.D.A. et al Effects of follicular phase and oocyte cumulus complexes quality on the protein profile and in vitro oocyte meiosis competence profile and in vitro Cebus. *Fertil Steril*. v.93, p.1662 -1667. 2010.

DOMINGUES, S. F. S. Semen coagulum liquefaction; sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. *Animal Reproduction Science*, v.123, p.75-80, 2011.

DOMINGUES, S.F.S.; CALDAS-BUSSIÉRE, M.C.; MARTINS, N.; CARVALHO, R.A. Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (Capuchin monkeys). *Theriogenology*, v.68, p 1251-1259, 2007.

DOMINGUES,S.F.S.;LIMA, J.S.;OLIVEIRA, K.G.;SANTOS, R.R. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.124-129, abr./jun. 2011.

- DONOGHUE, AM, JOHNSTON, LA, SEAL, US, ARMSTRONG, DL, SIMMONS, LG,
DOOLEY, MP, PINEDA, MH, HOPPER, JG, HSU, WH. Retrograde flow of spermatozoa into urinary bladder of dogs during ejaculation or after sedation with xylazine. *Am J Vet Res*, v.51, p.1574-1579, 1990.
- DYCE, P.W. et al., 2011. Analysis of Oocyte-Like Cells Differentiated from Porcine Fetal Skin-Derived Stem Cells. *dx.doi.org*, 20(5), pp.809–819.
- DYCE, P.W., WEN, L. & LI, J., 2006. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature cell biology*, 8(4), pp.384–390.
- FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; ROSSETTO, R.; RODRIGUES, G.Q.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A. P.R. Estado atual e desafios da criopreservação de tecidos ovariano em mamíferos. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, Belo Horizonte, v.35, n.1, p.3-15, jan/mar. 2011.
- FERREIRA, M. A. J. F.; WETZEL, M. M. V. S.; VALOIS, A. C. C. El estado del arte de los recursos genéticos en las Américas: conservación, caracterización y utilización. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnología e Programa Cooperativo de Investigación y Transferencia de Tecnología para los Trópicos Suramericanos (procitropicos)*. 2005.
- FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H; RODRIGUES, A.P.R; SILVA, J.R.V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. *Rev Bras Reprod Animal*, Belo Horizonte, v.31,n2. p.143-152, abr./jun. 2007
- FIGUEIREDO, J.R; RODRIGUES, A.P.R; AMORIM, C. A; SILVA, J.R.V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais- MOIFOPA. In *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*, p.303-327. Eds PBD Golçalves, J.R.Figueiredo&V.J.F. Freias. São Paulo: Rocca,2008.
- FIGUEIREDO, J.R, AMORIM, C.A, LUCCHI, C.M. , GONÇALVES, P.B.D. Utilização do potencial de oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais na reprodução de mamíferos. *Ciência Animal* 1998,8(1):23-29
- FILHO, E.S. Biotecnologias da reprodução na conservação de espécies animais selvagens: São realmente importantes? São realmente importantes? selvagens: São realmente importantes? selvagens: São realmente importantes? (Especialização em 2004. 94f. Monografia (Especialização em Manejo de Animais Silvestres) – Pontifícia Universidade Católica de São Paulo.
- FRESHNEY R. I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. Wiley, Toronto, 2000.
- FRESHNEY, R. IAN. *Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique*; 3rd edition; WILEY-LISS Pub. New York. 1994.
- FUNDAÇÃO JARDIM ZOOLOGICO DE BRASÍLIA. Disponível em: <http://www.zoo.df.gov.br/>. Acesso em 07 de Março de 2017.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PODERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v.59, p 599-616, 2003.
- GIULIANO, S, DIRECTOR, A, GAMBAROTTA, M, TRASORRAS, V, MIRAGAYA, M. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Llama glama*). *Anim Reprod Sci*, v.104, p.354-358, 2008.

- GÓMEZ, MC, POPE, CE, GIRALDO, A, LYONS, L, HARRIS, RF, COLE, A, GODKE, A, DRESSER, BL. Birth of African Wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Cloning and Stem Cells*, v.6, p.247-258, 2004.
- GONÇALVES, P.B.D.; DE FIGUEIREDO, J.R.; DE FIGUEIREDO FREITAS, V.J. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. Editora Roca, 2008.
- GOSDEN, R.G.; TELFER, E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. *J. Zool, Lond.* 211, 169-175, 1987.
- GOULBURN, A.L. et al. A targeted NKX2.1 human embryonic stem cell reporter line enables identification of human basal forebrain derivatives. *Stem Cells*, v.29, n.3, p.462-473, 2011. ISSN 1540-4918
- GRAHAM, L.H. Non-invasive monitoring of Reprod in zoo and wildlife species. *Ann Rev Biomed Sci*, v.6, p.91-98, 2004.
- GROSS, T, TILSON, RL; WILDT, DE (1992) Ability of thawed tiger (*Panthera tigris*) spermatozoa to fertilize conspecific eggs and bind and penetrate domestic cat eggs in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility* 96 555–564
- GUILBAULT, L. A., DUFOUR, J. J., THATCHER, W. W., DROST, M. & HAIBEL, G. K. 1986. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fert.*, 78:127- 135.
- GUIMARAES, CF, MEIRELLES, MG, OLIVEIRA, BMM, POGLIANI, FC, FERNANDES, CB. Clonagem em ruminantes: anomalias placentárias e disfunções perinatais. *Vet Foco*, v.9, n.2, p.100-109, 2012.
- HARTSHORNE, G. In vitro culture of ovarian follicles. *Rev Reprod*, v.2, p94-104, 1997.
- HAYASHI, K. et al., 2011. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *cell*, 146(4), pp.519–532.
- HAYASHI, K. et al., 2012. Offspring from Oocytes Derived from in Vitro Primordial Germ Cell-like Cells in Mice. *Science*, 338(6109), pp.971–975.
- HERRICK, JR, BOND, JB, MAGAREY, GM, BATEMAN, HL, KRISHER, RL, DUNFORD, AS, SWANSON, WF. Toward a feline optimized culture medium: impact of ions, carbohydrates, essential amino acids, vitamins, and serum on development and metabolism of in vitro fertilization-derived feline embryos relative to embryos grown in vivo. *Biol Reprod*, v.76, p.858-870, 2007.
- HIEMSTRA, SJ; VAN DER LENDE, T; WOELDERS, H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. The role of biotechnology. Villa Gualino, Turin, Italy -5-7 March, 2005.
- HILDEBRANDT, T.B., HERMES, R.; JEWGENOW, K.; GORITZ, F. Ultrasonography as an important tool for the development and application of reproductive technologies in non-domestic species, *Theriogenology* 53 (2000) 73–84.
- HOLT, W.; PICKARD, A. R. Role of reproduction technologies and genetic resource banks
- HOLT, WV, ABAIGAR, T ; JABBOUR, HN (1996b) Oestrous synchronisation, semen preservation and artificial insemination in the Mohor gazelle (*Gazella dama mhorr*) for the establishment of a genome resource bank programme *Reproduction, Fertility and Development* 8 1215–1222
- HOWARD, JG; WOLF, KN; MARINARI, PE, KREEGER, JS; ANDERSON, TR, VARGAS, A; WILDT, D.E (1998) Delayed onset of sperm production in one year-

- old male black-footed ferrets. Proceedings of the Society for the Study of Reproduction, Biology of Reproduction (Suppl. 1) 58: 124–125 in animal conservation. Reviews of Reproduction. Institute of Zoology, Regent's Park:London NW1 4RY, UK 143-150, 1999
- Israely, T.; Dafni, H.; Granot, D.; Nevo, N.; Tsafiriri, A.; Neeman, M. Vascular remodeling and angiogenesis in ectopic ovarian transplants: a crucial role of pericytes and vascular smooth muscle cells in maintenance of ovarian grafts. Biology of Reproduction, v. 68, p. 2055-2064, 2003.
- ITO,D.;YAGI,.;SUZUKI,N. Progress in Induced Pluripotent Stem Cell Research for Age-related Neurodegenerative Diseases. Brains and nerve Shinkei kenkyu no shimpo,v65,n3,p.283-288,2012.ISSN 1881-6096
- JABBOUR, H.N., HAYSEN, V., BRUFORD, W. Conservation of deer: contributions from molecular biology, evolutionary ecology, and reproductive physiology, J. Zool. Lond. 243 (1997)461–484.
- JABBOUR, H.N., HAYSEN, V., BRUFORD, W., Conservation of deer: contributions from molecular biology, evolutionary ecology, and reproductive physiology, J. Zool. Lond. 243 (1997) 461–484.
- JAYAPRAKASH, D, PATIL,SB, KUMAR, MN, MAJUMDAR, KC, SHIVAJI, S. Semen characteristics of the captive Indian Leopard, Panthera pardus. J Androl, v.22, p.25-33, 2001.
- JEWGENOW, K. & STOLTE, M. 1996. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats -viability and ultrastructural investigations. Anim. Reprod. Sci., 44:183-193.
- JEWGENOW, K., BLOTTNER, S., LENGWINAT, T. & MEYER, H. H. D. 1997. New methods for gamete rescue from gonads of nondomestic felids. J. Reprod. Fert., 51:33-39.
- JIN,S.Y.;LEI,L.;SHIKANOV,A.;SHEA,L.D.;WOODRUFF,D.T.K. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. Fertil. Steril. v.93(8), 2633-9, 2010.
- KANNO,Hiroshi. Regenerative therapy for neuronal diseases with transplantation of somatic stem cells. World Journal of Stem Cells, v.5,n.4,p.163,2013
- KIDSON, A., LOSKUTOFF, N.M., RAATH, C., WOOD, C.A., WILLIAMS, K.R., VAN SCHALKWYK, J.O.,DYCHE, W.K., BARRY, D.M., BARTELS, P., Age and parity-dependent differences in ovarian activity and oocyte maturity in the African elephant (*Loxodonta africana*), Theriogenology 43 (1995)246.
- KIKUCHI, K. Cryopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. Theriogenology, [S.I.], v. 50, p. 615-623,1998.
- LEIBO SP, SONGSASEN N. Cryopreservation of gametes and embryos of nondomestic species. Theriogenology. 57:303–326. 2002.
- LEON-QUINTO, T.; SIMON, M. A.; SANCHEZ, A.; MARTIN, F.; SORIA, B. Cryobankingthe genetic diversity in the critically endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*) from skin biopsies. Investigating the cryopreservation and culture ability of highly valuable explants and cells. Cryobiology 62:145–151, 2011.
- LERMEN,D.;BLOMEKE,B.;BROWNE,R.;CLARKE,A.;DYCE,P.W.;FIXEMER,T.;FU H,G.R.;HOLT,W.V.;JEWGENOW,K.;LLOYD,R.E.;LOTTERS,S.;PAULUS,M.;MCG REGORREID,G.;RAPOPORT,D.H.;RAWSON,D.;RINGLEB,J.;RYDER,O.A.;SPOR L,G.;SCHMITT,T.;VEITH,M.;MULLER,P. Cryobanking of viable biomaterials

implementation of new strategies for conservation purposes. *Molecular ecology*, v.18, p.1030-1033,2009.

LIEBERMANN,J.; TUCKER, M.J. Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction* 124(4), 483-489,2002.

LOI, P., PTAK, G., FULKA, J., JR., et al. Genetic rescue of an endangered mammal by crossspecies nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 962–964. 2001.

LOPES,L.H.R.;LUCCI,C.M.;GARCIA,M.P.;AZEVEDO,R.B.;BAÓ,S.N.Light Microscopical and Ultrastructural Characterization of Black Howler Monkey (*Alouatta caraya*) Ovarian Follicles. *Anat. Histol. Embryol.* 35, 196-201, 2006.

LOSKUTOFF, N.M., BARTELS, P., MEINTJES, M., GODKE, R.A., SCHIEWE, M.C. Assisted reproductive technology in nondomestic ungulates: a model approach to preserving and managing genetic diversity, *Theriogenology* 43 (1995) 3–12.

LUERDERS, I, LUTHER, I, SCHEEPERS, G, VAN DER HORST,G. Improved semen collection method for wild felids: Urethral catheterization yields high sperm quality in African lions (*Panthera leo*). *Theriogenology*, v.78, p.696-70, 2012.

MAGAREY,G. M., RODGER, J. C.;BUIST, J. M.;MATE, K. E. Effects of repeated superovulation and surgical oocyte collection on ovarian response and natural breeding ability of the tammar wallaby (*Macropus eugenii*).*Reproduction* (2003) 125, 701–707

MARTINEZ, AC, OLIVEIRA, FS, ABREU, CO, MARTINS, LL, PAULONI, AP, MOREIRA, N. Colheita de sêmen por eletroejaculação em cutia-parda (*Dasyprocta azarae*). *Pesq Vet Bras*, v.33, p.86-88, 2013.

MARTINEZ, F, ALVAREZ, M, MORATO-MORALES, A, GARCIA-ALVAREZ,O, SOLER, AJ, GARDE, JJ, PAZ, P, ANEL, L. Sperm parameters of Iberian red deer: electroejaculation and post-mortem collections. *Theriogenology*, v.70, p.216-226, 2008.

MARTINEZ-PASTOR, F.. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology*, [S.l.], v. 60, p. 24-40,2005

MATOS,M.H.T.;SILVA,J.R.V.;RODRIGUES,A.P.R.;FIGUEIREDO,J.R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. *Rev Bras Reprod Anim.*, Belo Horizonte,v.31, n.4,p.433-442, out/dez, 2007.

MEINTJES, M., BEZUIDENHOUT, C., BARTELS, P., VISSER, D.S., MEINTJES, J., LOSKUTOFF, N.M., FOURIE, F.L.,BARRY, D.M., GODKE, R.A. In vitro maturation and fertilization of oocytes recovered from freeranging Burchell's zebra (*Equus burchelli*) and Hartmann's zebra (*Equus zebra hartmannae*),*J. Zoo. Wildl. Med.* 28 (1997) 251–259.

MELTZER, DGA, VAN VUUREN, M, BORNEAN, MS. The suppression of electroejaculation in the chacma baboon (*Papio ursinus*) by azaperone. *J S Afr Vet Assoc*, v.59, p.53, 1988.

MICHELETTI,T.;CUBAS,Z.S.,MORAES,W;OLIVEIRA,MJ.;KOZICKI,L.E;WEISS,R. R.,MOREIRA,N. Reprodução assistida em felídeos selvagens .*Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.408-417, out./dez. 2011.

MOORE, H, BONNEY, RC;JONES, DM (1981) Successful induced ovulation and artificial insemination in the puma (*Felis concolor*) *Veterinary Record* 108 282–283

- MORAIS, RN. Fisiologia reprodutiva de pequenos felinos *Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758; *Leopardus weidii*, Schinz, 1821; e *Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775: sobre a função testicular (gametogênica e esteroidogênica) de machos em cativeiro, incluindo variações sazonais. 1999. Tese - São Paulo, Brazil: Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1999.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TAINURIER, D.; ANTON, M. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen – thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1695-1706, 2002.
- MUKAIDA, T.; OKA, C. Vitrification of oocytes, embryos and blastocysts. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 26, 789-803, 2012.
- MURAKAMI, M, OTOI, T., WONGRIKEAO, P, AGUNG, B., SAMUU, R., SUZUKI, T. Development of interspecies cloned embryos in yak and dog. *Cloning Stem Cells*, v.7, p.77-81, 2005.
- NAIK, B.R.; RAO, B.S.; VAGDEVI, R.; GNANPRAKASH, M.; AMARNATH, D.; RAO, V.H. Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (ops) vitrification of rabbit embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 86(3-4), 329-228, 2005.
- NAYUDU, PL, WU, J, MICHELMANN, HW. In vitro development of marmoset monkeys oocytes by pre-antral follicle culture. *Reprod Domest Anim*, v.38, p.90-96, 2003.
- NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and
- NIJMAN, V. In-Situ and Ex-Situ status of the Javan Gibbon and the role of zoos in conservation of the species. *Contribution to Zoology*, [S.l.], v. 75, n.3-4, 2006.
- NILI, H.; MESBAH, F.; KAFI, M.; NASR ESFAHANI, M.H. Light and Transmission Electron Microscopy of Immature *Camelus Dromedarius* Oocyte. *Anat. Histol. Embryol.* 33, 196-199, 2004.
- OKANO, T, MURASE, T, YAYOTA, C, KOMATSU, T, MIYAZAWA, K, ASANO, M, TSUBOTA, T. Characteristics of captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*) semen collected by electroejaculation with different voltages for stimulation and frozen-thawed under different conditions, *Anim Reprod Sci*, v.95, p.134-143, 2006.
- Paraná: Universidade Federal do Paraná, 2003. 667 p.
- PERECIN, F. Epigenética do desenvolvimento em bovinos: DNA metiltransferases e genes “imprinted” em embriões, fetos e placentas / Felipe Perecin. – Tese (doutorado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.
- POPE, C.E., DRESSER, B.L., CHIN, N.W., LIU, J.H., LOSKUTOFF, N.M., BEHNKE, E.J., BROWN, C., MCRAE, M.A., SINOWAY, C.E., CAMPBELL, M.K., CAMERON, K.N., OWENS, O.M., JOHNSON, C.A., EVANS, R.R., CEDARS, M.I. Birth of a western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) following in vitro fertilization and embryo transfer, *Am. J. Primatol.* 41 (1997) 247–260.
- PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. *Biologia da conservação*. Londrina: Planta, RALL, W.F., REID, D.S., POLGE, C. 1984. Analysis of slow-warming injury of mouse embryos by cryomicroscopical and physiochemical methods. *Cryobiology*. 21: 106-121
- research needs. *Theriogenology*, v. 35, p. 109-124, 1991.

- RICI, R.E.G., FACCIOTTI, P.R., AMBROSIO, C.E, MARIA, D.A, KFOURY Jr., JR, BERTOLINI, M, MIGLINO, MA. Cell cycle and apoptosis in normal and cloned bovine near-term placenta. *Anim Reprod Sci*, v.115, p.29-38, 2009.
- RISPOLI,V.F.P.;CASTRO, A.L.,AMBROSIO, C.E. Avanços da clonagem em carnívoros.*Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.38, n.1, p.43-48, jan./mar. 2014.
- SANKAI, T.. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, [S.I.], v. 55, p.1759-1768, 2000.
- SANTOS, I.R.I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, [S.I.], v. 12, ed.especial, p. 70-84, 2000.
- SANTOS,R.R.;AMORIM,C.;CECCONI,S.;FASSBENDER,M;IMHOF,M.;LORNAGE ,J;PARIS,M.;SCHOENFELDT,V.; MARTINEZ-MADRID,B. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germine preservation of endangered species and breeds. *Animal Reproduction Science* 122, 151-163, 2010.
- SANTOS,R.R.;CELESTINO,J.J.H.;LOPES,C.A.P;MELO,M.A.P.;RODRIGUES,A.P. R;FIGUEIREDO,J.R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos, *Rev Bras Reprod Animal*, Belo Horizonte, v.32,n.1, p9-15, jan/mar.2008.
- SCARAMUZZI,R.J.;ADAMS,N.R.;BAIRD,D.T;CAMPBELL,B.K.;DOWNING,J.A;FIN DLAY,J.K.;HENDERSON,K.M.;MARTIN,G.B.;MCNATTY,K.P.;MCNEILLY,A.S.;TS ONIS,C.G. A model for follicle selection and the determination of ovulations rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev.*, v.5,p.459-78, 1993.
- SILVA, AR, MORATO, RG, SILVA, LDM. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim Reprod Sci*, v.81, p.159-175, 2004.
- SILVA, M. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SANTOS, E. A. A.; CASTELO, T. S.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology*, v.76, p. 1084–1089, 2011.
- SILVA,A.R.; SOUZA,A.L..P.; SANTOS,E.A.A.; LIMA,G.L.; PEIXOTO,G.C.X.; SOUZA,P.C; CASTELO,T.S. Formation of germplasm banks and its contribution to the wildlife conservation in Brazil.*Ciência Animal*, 22(1): 219-234, 2012 – Edição Especial*Ciência Animal*, 22(1), 2012
- SILVESTRE, M. A.; SANCHEZ, J. P.; GOMEZ, E. A. Vitrification of goat, sheep and cattle skin samples from whole ear extirpated after death and maintained at different storage times and temperatures. *Cryobiology*, V.49, P.221–229, 2004.
- SOUZA, V.F.D. et al . Células-tronco: uma breve revisão. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v.2,n.2, 2010. ISSN 22365222.
- SPIMDLER, RE, CRICHTON, EG, AGCA, Y, LOSKUTOFF, NM, CRITSER, J, GARDNER, DK, WILDT, DE. Improved felid embryo development by group culture is maintained with heterospecific companions. *Theriogenology*, v.66, p.82-92, 2006.
- STEWART, RA, PELICAN, KM, CROISER, AE, PUKAZHENTHI, BS, WILDT, DE, OTTINGER, MA, HOWARD, J. Oral progestin priming increases ovarian sensitivity to gonadotropin stimulation and improves luteal function in the cat. *Biol Reprod*, v.87, p.137, 2012.

- STOVER, J., EVANS, J., DOLENSEK, E.P. Inter species embryo transfer from the gaur to domestic Holstein, Proc. Ann. Meet. Am. Assoc. Zoo Vet. Woodland Park Zoo USA (1981) 122–124.
- SUZUKI, N., HASHIMOTO, S., IGARASHI, S., TAKAE, S., YAMANAKA, M., YAMACHI, T., TAKENOSHITA, M., HOSOI, Y., MORIMOTO, Y., ISHIZUKA, B. Assessment of long-term function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkeys. *Hum Reprod*, v. 27, p.2420-2429, 2012.
- TELFER, E.E.; McLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K.J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction*, v.23, p.1151-1158, 2008.
- THE QUIAGEN Transfection Resource Book. QUIAGEN GMBH. , 2000.
- TOOSI, BM, TRIBULO, A, LESSARD, C, MASTROMOACO, GF, MCCORKELL, RB, ADAMS, GP. Superovulation and embryo transfer in wood bison (*Bison bison athabasca*) *Theriogenology*, v.1, p.1-10, 2013.
- TROUNSON, A. Manipulation of development: opportunitites for animal breeding. *Gametes: development and function*, [S.I.], p. 485-498, 1998.
- VATJA G., KUWAYAMA M. e VANDERZWALMEN P. Disadvantages and benefits of vitrification. In: *Vitrification in assisted reproduction A user's manual and troubleshooting guide*. London: Informa UK, pp.33-44. 2007.
- WANG, Q.; COONEY, A.J. The Role of Nuclear Receptors in Embryonic Stem Cells. In: (Ed.) *Transcriptional and Translational Regulation of Stem Cells*: Springer, 2013. p.287-306.
- WEBLEY, GE, MICHAEL, AE, ABAYASEKARA, DRE. The relationship between the production and the anti-gonadotrophic action of prostaglandin F2a in luteal cells from the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*) in the early and mid-luteal phase. *Gen Comp Endocr*, v.166, p.436-442, 2010.
- WILDT, D. E. ; WEMMER, C. Sex and wildlife: the role of reproductive science in conservation. *Biodiversity and Conservation* 8: 965–976, 1999
- WILDT DE, RALL WF, CRITSER JK, MONFORT SL, SEAL US. Genome resource bank *BioScience*. v.47, p.689-698, 1997.
- WILDT, D.E; MONFORT, S.L; DONOGHUE, A.M, JOHNSTON, L.A; HOWARD, J.G (1992) Embryogenesis in conservation biology – or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology* 37: 161–184
- WILDT, D.E; RALL, W.F, CRITSER, J.K; MONFORT, S.L ; SEAL, U.S (1997) Genome resource banks: living collections' for biodiversity conservation. *BioScience* 47: 689–698
- WILSON, E. O. *Biodiversidade*. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. 657 p.
- WIRTU, G, EARLE, POPE, C, MACLEAN, RA, GODKE, RA, PACCAMONTI, DL, DRESSER, BL. Reversal of motility loss in bongo antelope (*Tragelaphus eurycerus isaaci*) spermatozoa contaminated with hyposmotic urine during electroejaculation, *Anim Reprod Sci*, v.103, p.392-397, 2008.
- WOLF, S. Subsídios ao IV Relatório Nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica - CDB: Diagnóstico sobre a Legislação Ambiental Brasileira. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (Secretaria de Biodiversidade e Florestas - Departamento de Conservação da Biodiversidade). 121P, 2009.
- WOODING, F.B.P. Role of binucleate cells in fetomaternal cell fusion at implantation in the sheep. *Am J Anat*, v.170, p.233-250, 1984.

Yang, H.Y.; Cox, S.L.; Jenkin, G.; Findlay, J.; Trounson, A.; Shaw, J. Graft site and gonadotrophin stimulation influences the number and quality of oocytes from murine ovarian tissue grafts. *Reproduction*, v. 131, p. 851-859, 2006.

ZAMBELLI, D; CUNTO, M; PRATI, F; MERLO, B. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology*, v.68, p.796-83, 2007.

ZANETTI, E.S, MUNERATO, M.S, CURSINO, M.S, DUARTE, J.M. Comparing two different superovulation protocols on ovarian activity and fecal glucocorticoid levels in the brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). *Reprod Biol Endocr*, v.12, p.24, 2014.

ZANETTI, ES; POLEGATO, BF; DUARTE, J.M.B. Comparison of two methods of synchronization of estrus in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). *Anim Reprod Sci*, v.117, p.266-274, 2010.

ZHMAKIN, A.I. Physical aspects of cryobiology. *Uspekhi Fizicheskikh Nauk* 178,243-266, 2008.