



Desafios para a reprodução assistida em animais de vida livre *Challenges for assisted reproduction in free-living animals*

Thyara de Deco-Souza^{1,2*}, Cristiane Schilbach Pizzutto^{1,3}, Larissa Schneider Brandão Souza²,
Pedro Nacib Jorge-Neto^{1,3}, Antonio Carlos Csermak-Jr², Gediendson Ribeiro de Araújo^{1,2,4}

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,
Campo Grande, MS, Brasil

²Instituto Reprocon, Campo Grande, MS, Brasil

³Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

⁴Instituto de Biociências, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

*Av. Sen. Filinto Müller, 2443 - Pioneiros, 79074-460, Campo Grande - MS, Brasil

Resumo

A reprodução assistida se faz necessária em programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção, sendo um facilitador de transporte e troca de material genético. Neste contexto, o acesso ao material de animais de vida livre é essencial para incrementar o banco genético da espécie em questão, no entanto adaptar os métodos possíveis à realidade do campo torna essa área de pesquisa desafiadora. Ainda hoje os espermatozoides são os gametas mais acessados em animais de vida livre, porém com pouco uso efetivo para criopreservação e produção de filhotes. É pungente a necessidade de mais pesquisas nesta área, uma vez que há centenas de espécies brasileiras ameaçadas, com especificidades fisiológicas e que habitam habitats variados, o que demanda adaptações espécie-específicas e hábitat específicas.

Palavras-chave: conservação única, biobanco, FIV, fibroblasto, tecido gonadal

Abstract

Assisted reproduction is necessary for conservation programs for endangered species, facilitating transport and exchange of genetic material. In this context, access to material from free-living animals is essential to increase the genetic bank of the species in question. However, adapting the possible methods to the reality of the fieldwork makes this area of research a challenge. Even today, sperm are the most accessed gametes in free-living animals, but with little effective use for cryopreservation and production of offspring. The need for more research in this area is acute, as there are hundreds of Brazilian species under threat, with physiological specificities, and that inhabit varied habitats, which demand species-specific adaptations and specific habitats.

Keywords: One conservation, biobank, IVF, fibroblast, gonadal tissue

Introdução

A reprodução assistida (TRA) é uma ferramenta chave no revigoramento genético de espécies ameaçadas de extinção. Além disto, a manutenção e ampliação de habitats, somados à mitigação de conflitos humano vs animais selvagens é imprescindível para que as populações se mantenham viáveis. No entanto, em situações mais extremas essas ações não são suficientes para favorecer o incremento genético necessário. Nesses casos, a associação de outras estratégias é mandatória para otimizar a conexão estratégica de indivíduos de genética desejável.

O primeiro desafio para se desenvolver a RA em espécies selvagens é adaptar os métodos disponíveis às variações fisiológicas e comportamentais espécie-específicas, que muitas vezes ainda nem conhecidas são. Considerando que há, no Brasil, 112 táxons de mamíferos, 236 de aves, 85 de répteis, 42 de anfíbios e 98 de peixes com algum grau de ameaça entre vulnerável e extinto, podemos ter uma visão do volume de trabalho que temos pela frente (ICMBio/MMA 2018a; ICMBio/MMA 2018b; ICMBio/MMA 2018c; ICMBio 2018). De uma forma geral, esses métodos são desenvolvidos inicialmente em animais mantidos sob cuidados humanos, em ambientes artificiais (*ex situ*), pela relativa facilidade de acesso aos espécimes. No entanto, fatores a serem discutidos a seguir justificam a necessidade de evoluir com os métodos para serem aplicados em animais de vida livre (*in situ*).

¹Correspondência: thyara.araujo@ufms.br

Recebido: 21 de outubro de 2021

Aceito: 23 de novembro de 2021

O ambiente *ex situ* impõe ao indivíduo a necessidade de adaptação a um ambiente para o qual a espécie não evoluiu, o que demanda mobilização de vias de resposta ao estresse que podem culminar com falhas reprodutivas (Dickens and Bentley 2014; Munson et al. 1996). Neste caso, a qualidade do ambiente *ex situ* – recintos, manejo nutricional, manejo sanitário etc. – influencia diretamente no sucesso do protocolo das TRA. No entanto, ainda enfrentamos a realidade de que muitos animais são mantidos em condições aquém das necessárias para um bem-estar adequado. Outro ponto a se considerar é o recurso financeiro necessário para a manutenção de uma população *ex situ* viável para uso em tais programas (Swanson et al. 2007). Além disso, muitas instituições realizam procedimentos cirúrgicos – principalmente a vasectomia – como forma de controle reprodutivo para a manutenção de casais, otimizando assim o uso do espaço. A vasectomia como método contraceptivo de eleição dificulta ou impossibilita a colheita de espermatozoides desses indivíduos, inviabilizando seu uso nos programas de reprodução assistida. Além disso, há variações genéticas dentro da espécie que devem ser consideradas no momento da escolha dos casais, o que dificulta ainda mais a manutenção da população *ex situ* como única fonte genética para a reprodução assistida.

Desta forma, a manutenção de animais sob cuidados humanos associada ao acesso de material genético de animais de vida livre, torna-se uma estratégia mais completa para o revigoramento genético de animais ameaçados e reforça a teoria de conservação integrada “*One Conservation*” (Pizzutto et al, 2021). Neste artigo discutimos as perspectivas e desafios para o efetivo acesso ao material genético em animais de vida livre.

Acesso ao material genético de animais de vida livre

Atualmente o material genético para reprodução mais acessado em animais de vida livre são os espermatozoides. Ainda assim, seu uso efetivo para produção de filhotes é insuficiente (Benham et al. 2021; Hermes et al. 2013; Hildebrandt et al. 2012; Hildebrandt et al. 2009; Penfold et al. 2005), isso porque os métodos de colheita e criopreservação de espermatozoides aplicados em animais sob cuidados humanos nem sempre são viáveis para os indivíduos em vida livre (Araujo et al. 2020a).

Um dos métodos possíveis é a recuperação de espermatozoides do epidídimo e/ou ducto deferente em animais submetidos à orquiectomia, *in vivo* ou *post mortem*. Esta técnica permite o aproveitamento de material genético de animais que foram atropelados, vieram a óbito por catástrofes ambientais ou antrópicas, ou mesmo que foram abatidos ou castrados para controle populacional. Nesses casos, os testículos, juntamente com o epidídimo e ducto deferente, são enviados sob refrigeração (5°C) para processamento em laboratório. O tempo decorrido entre o óbito, a remoção das gônadas para refrigeração e o processamento em laboratório influenciam diretamente na viabilidade e congelabilidade dos espermatozoides recuperados (Fernández-Santos et al. 2009). Em uma espécie de caprino selvagem (*Rupicapra pyrenaica parva*), por exemplo, a motilidade progressiva (MP) caiu (queda em média de 37%) nas amostras em que os espermatozoides foram colhidos do epidídimo após 72 e 96h de armazenamento a 5°C (animais de caça). Por outro lado, a MP das amostras mantidas a 5°C por até 48h não diferiram em relação àquelas processadas entre 6 e 24h de armazenamento (Álvarez-Rodríguez et al. 2018). Resultados observados em uma espécie de cervo, indicaram que não houve diferença na motilidade total e na motilidade progressiva de espermatozoides colhidos do epidídimo após 96h de armazenamento do órgão a 5°C em relação àqueles processados logo após o óbito (Fernández-Santos et al. 2009). O ponto chave entre esses trabalhos é que os testículos e epidídimos foram armazenados sob refrigeração logo após o óbito dos animais, o que limita o uso da técnica para situações mais controladas como abates ou castrações para controle populacional, abates em fazendas de caça e animais eutanasiados (Bento et al. 2019; Iolchiev et al. 2017; Keeley et al. 2012). O desafio é então recuperar espermatozoides mesmo após algumas horas de óbito do animal, viabilizando assim a recuperação genética de animais atropelados e vítimas de catástrofes, por exemplo.

Em se tratando de animais vivos, a eletroejaculação (EE) ainda é o método mais usado para obtenção de sêmen. Este método tem por vantagens a possibilidade de aplicação em animais anestesiados e sem a necessidade de treinamento prévio, o que viabiliza o uso em animais de vida livre. A EE é usada em mamíferos (Wildt et al. 1983), répteis (Assumpção et al. 2017) e aves (Gee et al. 2004), porém em relativamente pouca das oportunidades o sêmen colhido de animais de vida livre foi criopreservado (Hermes et al. 2013; Hildebrandt et al. 2012; Hildebrandt et al. 2009; Okano et al. 2004; Oliveira et al. 2016; Penfold et al. 2005). A possibilidade de contaminação por urina e a obtenção de amostras mais diluídas, somadas a estimulação ao retorno do plano anestésico (pela estimulação elétrica) e a necessidade de técnicos altamente treinados, são fatores que dificultam o efetivo uso da EE em animais

de vida livre (Araujo *et al.* 2018). Soma-se ainda aos fatores citados a necessidade de energia elétrica, recurso não disponível em habitats remotos onde populações chave encontram-se isoladas geograficamente. No entanto, esta foi até poucos anos a opção de escolha pela falta de um método alternativo eficaz.

Nas últimas décadas os métodos farmacológicos para colheita de sêmen vêm emergindo como substituto à EE (Araujo *et al.* 2020b; Araujo *et al.* 2018; Lueders *et al.* 2012; Silva *et al.* 2019). Esse método consiste em usar de fármacos que estimulam a liberação de espermatozoides na uretra, com ou sem ereção ou ejaculação. Os fármacos mais usados em mamíferos selvagens são os alfa-2-Agonistas ($\alpha 2$ -A) como a detomidina, medetomidina e dexmedetomidina (Araujo *et al.* 2018; Curry and Roth 2016; Franklin *et al.* 2018; Kheirkhah *et al.* 2017; Lueders *et al.* 2012; Silva *et al.* 2021). Seu uso é crescente e promissor para diversas espécies ameaçadas e vem sendo um divisor de águas pra viabilizar a criopreservação de sêmen em animais de vida livre (Araujo *et al.* 2018; Silva 2020; Silva *et al.* 2019).

O refinamento para a criopreservação de sêmen, como o tipo e a concentração do crioprotetor a ser usado, a melhor fonte de energia, curva de resfriamento, tempo de equilíbrio e curva de congelamento, são espécie dependentes (Nagashima and Songsasen 2021). Porém alguns aspectos devem ser considerados para viabilizar a criopreservação de sêmen / espermatozoides em animais de vida livre. Cabe salientar que as condições de campo não são uniformes e vão desde áreas preservadas com acesso à energia elétrica e até internet, até áreas isoladas sem qualquer acesso à energia (nem mesmo a possibilidade de deslocamento de geradores). Obviamente todo o protocolo a ser usado dependerá da logística disponível. Em situações em que a energia elétrica é inexistente ou instável o uso de meios mais estáveis é fundamental. Neste caso a gema de ovo, é uma barreira a ser transposta por ser perecível e ter variações em sua composição, uma vez que é um produto de origem animal não purificado. Meios com lecitina de soja ou lipoproteínas extraídas da gema de ovo têm sido usados ainda que de forma discreta em animais selvagens – com a vantagem de reduzir contaminação e transmissão de doenças, reduzindo barreiras para o transporte do material, e de serem mais estáveis – sendo assim a alternativa de escolha para as situações de campo (Saragusty *et al.* 2006; Silva 2020). Outro ponto é o acesso a equipamentos e materiais que dispensem a energia elétrica para a etapa de refrigeração. Uma alternativa é a congelamento em nitrogênio líquido blocos de gelo reciclável a serem usados em caixas térmicas para a refrigeração e estabilização das amostras – visto que o nitrogênio líquido é indispensável à criopreservação (Araujo *et al.* 2020a). Outra opção é o uso de equipamentos com bateria que já estão disponíveis no mercado (Jorge-Neto *et al.* 2020). Sendo assim, a portabilidade e autonomia dos equipamentos assim como a estabilidade dos meios de criopreservação, aliados a um método prático e seguro de colheita de sêmen, são cruciais para viabilizar os procedimentos de criopreservação de sêmen em animais de vida livre.

Um desafio ainda maior é acessar o material de fêmeas de vida livre, visto que para fazê-lo com animais vivos seria necessário realizar procedimentos cirúrgicos a campo, com pouco ou nenhum controle pós-cirúrgico, o que pode ser eticamente questionável. Sendo assim, as ações são focadas em recuperar material post-mortem de fêmeas abatidas para controle populacional (Benham *et al.* 2021; Herrick *et al.* 2004; Meintjes *et al.* 1997). Uma alternativa a se explorar é a manutenção temporária em ambiente *ex situ*. Apesar de parecer um contrassenso retirar animais de espécies ameaçadas da natureza, estamos considerando aqui situações críticas em que a população está em declínio e os métodos para conservação *in situ* não estão sendo eficazes no curto prazo. Apenas alguns meses em ambiente *ex situ* podem ser suficientes para pareamento de casais e nascimento de filhotes e colheita de oócitos após estimulação hormonal. Essas técnicas isoladas ou em conjunto podem ser usadas para a fixação de uma genética desejável *ex situ*, sem causar impacto na população *in situ*.

Métodos ainda mais incipientes são a congelamento de gônadas e a clonagem a partir de fibroblastos. A partir de ovários obtidos após procedimentos de eutanásia ou castração é possível obter oócitos para maturação *in vitro* e criopreservação de fragmentos da gônada para posterior xenotransplante em camundongos imunossuprimidos (Wiedemann *et al.* 2013; Wiedemann *et al.* 2012; Wolvekamp *et al.* 2001). De forma semelhante, tecido testicular pode ser criopreservado para posterior xenotransplante em camundongos e obtenção de espermatozoides (Silva *et al.* 2020). A criopreservação e cultivo de gônadas tem a vantagem de recuperar genética de animais que vieram a óbito mesmo antes de atingirem maturidade sexual. Ainda assim, são métodos limitados a animais que vieram a óbito há pouco tempo e ainda estão em fase de aprimoramento das tecnologias, não sendo uma realidade para animais de vida livre no momento. A clonagem a partir de fibroblastos é uma alternativa aplicável a animais que não estejam produzindo gametas (por idade avançada, degeneração patológica, ou mesmo imaturidade sexual) e em situações de campo em que não há a possibilidade de acesso aos gametas. Neste caso, um fragmento



de tecido cutâneo é cultivado para produção de fibroblastos, que posteriormente serão fundidos a oócitos nucleados para produção de embriões (Kim *et al.* 2007).

Conclusão

O acesso ao material genético de animais de vida livre é um passo crucial para a conservação de espécies ameaçadas de extinção. Porém, as dificuldades de acessibilidade aos locais de captura aliadas aos equipamentos necessários ao processamento do material exigem adaptações dos métodos disponíveis para situações *ex situ*. Os métodos alternativos que vêm surgindo aparecem como aditivos estratégicos para a obtenção desses materiais. No entanto, tudo isso requer o refinamento de técnicas, o que demanda tempo que talvez não tenhamos visto que algumas espécies precisam de intervenções urgentes. Nesse sentido, o foco do trabalho deve ser tentar aproveitar os possíveis materiais, mesmo com baixa qualidade, e aprimorar em paralelo as técnicas para obter melhores resultados posteriormente. Se não tivermos genética armazenada hoje, podemos não ter animais suficientes para acessá-la quando os protocolos estiverem estabelecidos.

Referências

- Álvarez-Rodríguez M, Álvarez M, Anel-López L, Guerra C, Chamorro CA, Anel L, Paz P, Martínez-Pastor F. Effect of length of time post-mortem on quality and freezing capacity of Cantabric chamois (*Rupicapra pyrenaica parva*) epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.198, p.184–92, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2018.09.018>
- Araujo GR, Deco-Souza T, Bergo LCF, Silva LC, Morato RG, Jorge-Neto PN, Silva MCC, Macedo GG, Paula TAR. Field friendly method for wild feline semen cryopreservation. *J Threat Taxa*, v.12, n.5, p.15557–64, 2020a. <https://doi.org/10.11609/jott.5744.12.5.15557-15564>
- Araujo GR, Paula TAR, Deco-Souza T, Morato RG, Bergo LCF, Silva LC, Costa DS, Braud C. Comparison of semen samples collected from wild and captive jaguars (*Panthera onca*) by urethral catheterization after pharmacological induction. *Anim Reprod Sci*, v.195, p.1–7, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.019>
- Araujo GR, Paula TAR, Deco-Souza T, Morato RG, Bergo LCF, Silva LC, Jorge-Neto PN, Sampaio BFB. Colheita farmacológica de sêmen de onças-pardas (*Puma concolor*: Mammalia: Carnivora: Felidae). *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.72, n.2, p.437–42, 2020b. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-11030>
- Assumpção TI, Santos ALQ, Canelo EA. Semen collection techniques in spectacled caiman *Caiman crocodilus* Linnaeus, 1758. *Herpetol Notes*, v.10, n.0, p.697–701, 2017.
- Benham HM, McCollum MP, Nol P, Frey RK, Clarke PR, Rhyan JC, Barfield JP. Production of embryos and a live offspring using post mortem reproductive material from bison (*Bison bison bison*) originating in Yellowstone National Park, USA. *Theriogenology*, v.160, p.33–39, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.10.022>
- Bento HJ, Vieira RLA, Iglesias GA, Kuczmarski AH, Dias SMND, Paz RCR. Coleta e avaliação de espermatozoides epididimários obtidos pela técnica de squeezing em Puma concolor de vida livre. *Nat Online*, v.17, n.2, p.82–88, 2019.
- Curry E, Roth TL. 118 A rapid, minimally invasive method of collecting semen from polar bears. *Reprod Fertil Dev*, v.28, n.2, p.189, 2016. <https://doi.org/10.1071/RDv28n2Ab118>
- Dickens MJ, Bentley GE. Stress, captivity, and reproduction in a wild bird species. *Horm Behav*, v.66, n.4, p.685–93, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2014.09.011>
- Fernández-Santos MR, Martínez-Pastor F, Matias D, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC, Montoro V, Garde JJ. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.111, n.1, p.93–104, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.02.001>
- Franklin AD, Waddell WT, Goodrowe KL. Red wolf (*Canis rufus*) sperm quality and quantity is affected by semen collection method, extender components, and post-thaw holding temperature. *Theriogenology*, v.116, p.41–8, 2018. <https://doi.org/10.1016/J.Theriogenology.2018.05.007>
- Gee GF, Bertschinger H, Donoghue AM, Blanco J, Soley J. Reproduction in nondomestic birds: Physiology, semen collection, artificial insemination and cryopreservation. *Avian Poult Biol Rev*, v.15, n.2, p.47–101, 2004. <https://doi.org/10.3184/147020604783637435>
- Hermes R, Saragusty J, Göritz F, Bartels P, Potier R, Baker B, Streich WJ, Hildebrandt TB.



- Freezing African elephant semen as a new population management tool. *PLoS One*, v.8, n.3, p.e57616, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057616>
- Herrick JR, Bartels P, Krisher RL.** Postthaw evaluation of in vitro function of epididymal spermatozoa from four species of free-ranging African bovinds. *Biol Reprod*, v.71, n.3, p.948–58, 2004. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.026831>
- Hildebrandt TB, Hermes R, Saragusty J, Potier R, Schwammer HM, Balfanz F, Vielgrader H, Baker B, Bartels P, Göritz F.** Enriching the captive elephant population genetic pool through artificial insemination with frozen-thawed semen collected in the wild. *Theriogenology*, v.78, n.6, p.1398–404, 2012. <https://doi.org/10.1016/J.Theriogenology.2012.06.014>
- Hildebrandt TB, Roellig K, Goeritz F, Fassbender M, Krieg R, Blottner S, Behr B, Hermes R.** Artificial insemination of captive European brown hares (*Lepus europaeus* PALLAS, 1778) with fresh and cryopreserved semen derived from free-ranging males. *Theriogenology*, v.72, n.8, p.1065–72, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.026>
- Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume III – Aves. 1ª ed. Livro. Brasília: ICMBio/MMA; 2018a. ICMBio/MMA.
- Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume IV – Répteis. 1ª ed. Livro. Brasília: ICMBio/MMA; 2018b. ICMBio/MMA.
- Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume V – Anfíbios. 1ª ed. Livro. Brasília: ICMBio/MMA; 2018c. ICMBio/MMA.
- Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II – Mamíferos 1ª ed. Livro. Brasília: ICMBio/MMA; 2018. ICMBio/MMA.
- Iolchiev BS, Abilov AI, Tadzhiyeva AV, Bagirov VA, Nasibov SN, Shaidullin IN, Klenovitskiy PM, Kombarova NA, Zhilinskiy MA.** Biological integrity of bison epididymal sperm under cryoconservation and long storage. *Sel'skokhozyaistvennaya Biol*, v.52, n.2, p.282–90, 2017. <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2017.2.282eng>
- Jorge-Neto PN, Silva MCC, Csermak-Júnior AC, Salmão-Júnior JA, Araújo GR, Oliveira G, Leuzinger L, Pizzutto CS, Deco-Souza T.** Cryptorchidism in free-living jaguar (*Panthera onca*): first case report. *Anim Reprod*, v.17, n.4, 2020. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2020-0555>
- Keeley T, McGreevy PD, O'Brien JK.** Cryopreservation of epididymal sperm collected postmortem in the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). *Theriogenology*, v.78, n.2, p.315–25, 2012. <https://doi.org/10.1016/J.Theriogenology.2012.02.005>
- Kheirkhah MS, Mollapour sisakht M, Mohammadsadegh M, Moslemi HR.** Sperm evaluation of Jungle Cat (*Felis chaus*) obtained by urethral catheterization (CT) after medetomidine administration. *Theriogenology*, v.91, p.17–20, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.12.034>
- Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda, F Kim, HJ Hwang WS, Hossein MS, Kim JJ, Shin NS, Kang SK, Lee BC.** Endangered Wolves Cloned from Adult Somatic Cells. *Cloning Stem Cells*, v.9, n.1, p.130–7, 2007. <https://doi.org/10.1089/clo.2006.0034>
- Lueders 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, n.3, p.696–701, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.02.026>
- Meintjes M, Bezuidenhout C, Bartels P, Visser DS, Loskutoff NM, Fourie FLR, Barry DM, Godke RA.** In vitro maturation and fertilization of oocytes recovered from free-ranging Burchell's zebra (*Equus burchelli*) and Hartmann's zebra (*Equus zebra hartmannae*). *J Zoo Wildl Med*, v.28, n.3, p.251–9, 1997.
- Munson L, Brown JL, Bush M, Packer C, Janssen D, Reiziss SM, Wildt DE.** Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera leo*) of the Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *J Reprod Fertil*, v.108, n.1, p.11–5, 1996 <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1080011>
- Nagashima JB, Songsasen N.** Canid Reproductive Biology: norm and unique aspects in strategies and mechanisms. *Animals*, v.11, n.3, p.653, 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11030653>
- Okano T, Murase T, Tsubota T.** Electroejaculation and semen cryopreservation of free-ranging Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*). *J Vet Med Sci*, v.66, n.11, p.1371–6, 2004. <https://doi.org/10.1292/jvms.66.1371>
- Oliveira KG, Santos RR, Leão DL, Brito AB, Lima JS, Sampaio WV, Domingues SFS.** Cooling and freezing of sperm from captive, free-living and endangered squirrel monkey species. *Cryobiology*, v.72, n.3, p.283–9, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.03.004>
- Penfold LM, Monfort SL, Wolfe BA, Citino SB, Wildt DE.** Reproductive physiology and artificial insemination studies in wild and captive genenuk (*Litocranius walleri walleri*). *Reprod Fertil Dev*, v.17, n.7, p.707–14, 2005. <https://doi.org/10.1071/RD05077>



- Saragusty J, Gacitua H, King R, Arav A.** Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species (*Gazella gazella* and *Gazella dorcas*) and one subspecies (*Gazella gazelle acaiae*). *Theriogenology*, v.66, n.4, p.775–84, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.01.055>
- Silva AM, Pereira AF, Comizzoli P, Silva AR.** Cryopreservation and culture of testicular tissues: an essential tool for biodiversity preservation. *Biopreserv Biobank*, v.18, n.3, p.235–43, 2020. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0010>
- Silva MCC.** *Desenvolvimento de técnicas de coleta e criopreservação de sêmen de cachorro-do-mato (Cerdocyon thous) aplicáveis para uso a campo.* 2020. p.61. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2020.
- Silva MCC, Araujo GR, Kersul MG, Jorge-Neto PN, Aguiar ACB, Miranda FR, Deco-Souza T.** Pharmacological semen collection and cryopreservation of the Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) in the wild. *Rev. Bras. Reprodução Anim.*, v.43, n.2, p.705, 2019.
- Silva MCC, Ullony KM, Araújo GR, Jorge-Neto PN, Albuquerque VB, Caramalac SM, Oliveira AR, Zanella R, Marques MG, Luczinski TC, Frazílio FO, Silva EVC, Deco-Souza T.** Can detomidine replace medetomidine for pharmacological semen collection in domestic cats? *Anim Reprod*, v.18, n.2, p.e20210017, 2021. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2021-0017>
- Swanson WF, Stoops MA, Magarey GM, Herrick JR.** Sperm cryopreservation in endangered felids: developing linkage of *in situ-ex situ* populations. *Soc Reprod Fertil Suppl*, v.65, n.June, p.417–32, 2007.
- Wiedemann C, Hribal R, Ringleb J, Bertelsen MF, Rasmusen K, Andersen CY, Kristensen SG, Jewgenow K.** Preservation of primordial follicles from lions by slow freezing and xenotransplantation of ovarian cortex into an immunodeficient mouse. *Reprod Domest Anim*, v.47, n.6, p.300–4, 2012; <https://doi.org/10.1111/rda.12081>
- Wiedemann C, Zahmel J, Jewgenow K.** Short-term culture of ovarian cortex pieces to assess the cryopreservation outcome in wild felids for genome conservation. *BMC Vet Res*, v.9, n.1, p.37, 2013. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-37>
- Wildt DE, Bush M, Howard JG, O'Brien SJ, Meltzer D, Van-Dyk A, Ebedes H, Brand DJ.** Unique seminal quality in the south african cheetah and a comparative evaluation in the domestic cat. *Biol Reprod*, v.29, p.1019–25, 1983.
- Wolvekamp MC, Cleary M, Cox S-L, Shaw J, Jenkin G, Trounson A.** Follicular development in cryopreserved common wombat ovarian tissue xenografted to Nude rats. *Anim Reprod Sci*, v.65, n.1–2, p.135–47, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00228-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00228-1)
-