



Biobancos para a conservação da vida silvestre: desafios e perspectivas

Biobanks for wildlife conservation: challenges and prospects

Romário Parente dos Santos¹, Alexandre Rodrigues Silva^{1*}

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFRSA, Mossoró, RN, Brasil

Resumo

Um repositório de amostras biológicas, ou biobanco, pode ser definido como uma coleção-base de amostras orgânicas de origem humana, animal, vegetal ou microbiana, destinados para a conservação da ampla variabilidade dos recursos genéticos, apresentando-se como uma alternativa para a manutenção da biodiversidade. Esses repositórios são instrumentos indispensáveis no propósito de salvaguardar e coordenar um conjunto de informações da fauna silvestre, dando origem a uma rede de dados para o desenvolvimento de estratégias para a conservação de espécimes com genótipos raros ou ameaçados. Portanto, esta revisão tem como objetivo ressaltar a importância e aplicabilidade dos biobancos para a conservação da vida silvestre, destacando o estado da arte, e enfatizando os aspectos técnicos, procedimentos necessários para sua implementação e quais os principais desafios e perspectivas para o aprimoramento e utilização desse recurso na biotecnologia reprodutiva.

Palavras-chave: criopreservação, tecido gonadal, animais silvestres, biomateriais.

Abstract

A repository of biological samples or biobanks can be defined as a base collection of organic samples of human, animal, plant or microbial origin, intended for the conservation of the wide variability of genetic resources, presenting itself as an alternative for the maintenance of the biodiversity. These repositories are indispensable instruments for the purpose of safeguarding and coordinating a set of information on wildlife, giving rise to a data network for the development of strategies for the conservation of specimens with rare or endangered genotypes. Therefore, this review aims to highlight the importance and applicability of biobanks for the conservation of wildlife, highlighting the state of the art, and emphasizing the technical aspects, as well as the necessary procedures for its implementation and what are the main challenges and perspectives for the improvement and use of this resource in reproductive biotechnology.

Keywords: cryopreservation, gonadal tissue, wild animals, biomaterials.

Introdução

Há aproximadamente três décadas, a coleta sistemática e o acondicionamento criogênico de biomateriais de diferentes espécies silvestres estão em desenvolvimento com a intenção de salvaguardar a diversidade dos recursos genéticos, além de melhorar as técnicas de manejo em animais de vida livre (in situ) ou em cativeiro (ex situ) (Comizzoli e Wildt, 2017). Um biobanco pode ser definido como um repositório de biomateriais biológicos, em outras palavras, uma coleção organizada de amostras biológicas com dados associados predominantemente para pesquisa ou manutenção, por exemplo, para utilização dos recursos genéticos oriundos de animais de cativeiro ou de vida livre (Evangelista et al., 2022). Essas amostras são vitais para melhorar a compreensão da biologia fundamental de espécies raras e ameaçadas, auxiliando no desenvolvimento e implementação das biotecnologias reprodutivas (Comizzoli e Wildt 2017).

Os progressos recentes nas áreas da Biotecnologia e Medicina Veterinária auxiliaram na criação dos biobancos como ferramentas para a aquisição de informações com nível mais elevado de detalhamento dos biomateriais, melhorando a compreensão nas áreas da ciência animal, como por exemplo, na segurança alimentar, saúde animal, conservação genética e biotecnologia reprodutiva (Lombardo et al, 2015). Outro fator que vem tomando destaque dentro dessa temática é a flexibilização e compartilhamento de dados, por meio da informatização dos biobancos (biorepositórios virtuais), isso garante a obtenção de dados sem a necessidade de usar materialmente as amostras biológicas, garantindo o avanço de uma rede de informações para melhorar a logística de colaboração com outros biobancos nacionais ou internacionais (Van Draanen, 2016). Para garantir a sua utilização de forma mais efetiva, os zoológicos, parques de conservação, laboratórios de pesquisa animal, e até mesmo em outros biobancos, é necessário trabalhar de forma coesa

e ter acesso livre aos recursos e informações de cada um desses mencionados (Brahmasani et al., 2021).

Milhões de amostras em todo o mundo são armazenadas para realização de pesquisas e diagnósticos de patologias durante o decorrer dos anos, contudo, para algumas áreas com pesquisas em andamento, a falta de materiais e modelos de biobancos adequados são os grandes obstáculos para frear o aprimoramento dessa tecnologia (Lombardo et al., 2015). De fato, como mencionado por Comizzoli e Wildt (2017), os criobancos podem ser considerados uma “lacuna crucial não preenchida” que oferece um armazenamento na forma de cópias de segurança do material genético de espécimes vivos que já estão sob forte ameaça ou em um futuro próximo.

Diante de tudo que foi apresentado, o presente trabalho tem por objetivo enfatizar a importância dos biobancos para a conservação da vida silvestre, assim como o estado da arte acerca dos aspectos técnicos, bem como os procedimentos necessários para sua implementação e quais os principais desafios e perspectivas para o aprimoramento e utilização desse recurso na biotecnologia reprodutiva.

Aspectos técnicos para a formação dos biorepositórios

A criopreservação é um componente crítico para a formação de biobancos de amostras biológicas. Primeiramente, é necessário que nesse processo haja a redução da atividade metabólica das células, parcial ou completamente, pela refrigeração gradual das células/tecidos a temperaturas abaixo de zero, que serão acondicionados em botijões criogênicos, no nitrogênio líquido a -196°C , ou em sua fase de vapor a -150°C (Domingues et al., 2011; Brahmasani et al., 2021). Na tentativa de minimizar os efeitos deletérios da redução acentuada da temperatura, as soluções de criopreservação são acrescidas com agentes crioprotetores com o intuito de proteger as células de possíveis danos devido à formação de cristais de gelo intracelulares (Palomar e Molina, 2017). Depois de armazenadas em criobanco, essas amostras biológicas viáveis e criopreservadas, poderão garantir a manutenção ou regeneração de um espécime para fins de conservação. É importante ressaltar que essas amostras são altamente especializadas na medida em que requerem a aplicabilidade de várias biotecnologias bastante complexas, além da implementação de outras tecnologias emergentes (Rhiannon et al., 2022). A aplicação dessas técnicas deve acontecer de forma harmônica para ser verdadeiramente eficaz. Os processos que estão interligados ao biobanco são: coleta, preservação e acessibilidade das amostras para serem destinados para os mais diversos fins futuros, além de permitir a aplicação de outras biotecnologias para utilização das amostras (Fig. 1).

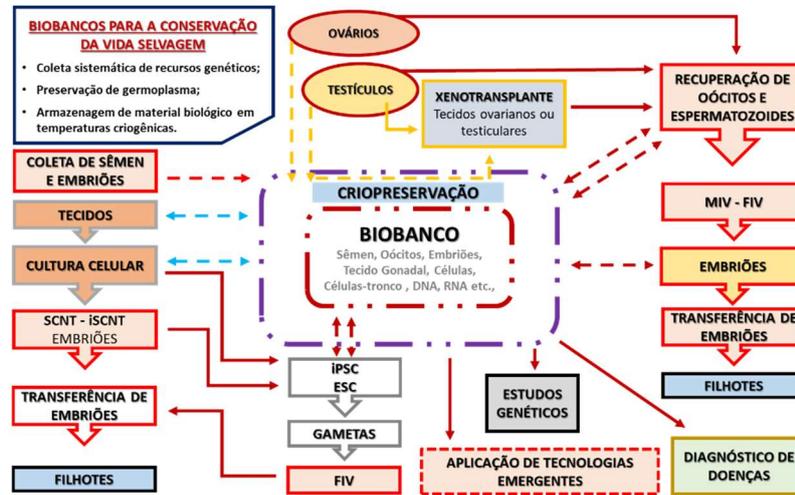


Figura 1. Esquema de funcionamento e atribuições dos biobancos para a conservação da vida silvestre. As amostras podem ser coletadas em animais vivos ou mortos. Logo após a coleta, os materiais biológicos são submetidos ao processo lento e gradual de refrigeração antes de serem acondicionados no repositório do biobanco em temperaturas criogênicas (-196°C). Nessas condições e com protocolos adequados, é possível preservar tecidos gonadais, ovócitos, espermatozoides, entre outros. Posteriormente, esse material biológico pode ser utilizado para a produção de descendentes por meio da maturação e fertilização *in vitro* (MIV - FIV), como também essas células preservadas podem ser aplicadas em outras biotecnologias reprodutivas, como exemplo, através da transferência nuclear de células somáticas (SCNT e iSCNT - interespecíficas), na busca de garantir a perpetuação de espécimes ameaçados de extinção. Em outro cenário, essas células podem ser destinadas para a geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) e no isolamento de células-tronco embrionárias (ESC), que poderão futuramente serem aplicadas para a produção de gametas. Por fim, por ser um repositório permanente de material biológico, essa característica permite a implementação de novas tecnologias emergentes, que no futuro próximo permitiram a extrapolação em larga escala na conservação da vida selvagens (Adaptado de Brahmasani et al., 2021).

O desenvolvimento dos biobancos compreende diferentes protocolos de coleta, manipulação, acondicionamento e informatização de dados referentes aos biomateriais, que são etapas fundamentais para diversas áreas de pesquisa (Vaught e Lockhart, 2012). Esses vários eventos podem influir na qualidade final das amostras biológicas e no sucesso durante a utilização (Strand et al., 2020). Quando observado o desenho, fluxograma e utilização dos biobancos é possível verificar uma característica heterogênea, que permite a obtenção de dados para diferentes interesses e tipos de estudos científicos, é importante salientar que os dados e as amostras inevitavelmente acabam sendo obtidos sob condições distintas e com regulamentação ainda em processo de padronização (Coppola et al., 2019). Haja vista que o presente texto tem foco na implementação dos biorepositórios, serão aqui abordados apenas os aspectos técnicos relacionados as biotecnologias aplicadas na reprodução assistida em animais silvestres.

Conservação de gametas masculinos e tecidos gonadais

Pela grande diversidade de espécies silvestres, cada uma com suas peculiaridades, foram desenvolvidos diversos métodos para a obtenção de sêmen, e dentre eles, pode-se destacar o uso da manipulação digital do pênis, vagina artificial, eletroejaculação, coleta farmacológica de sêmen (Rola et al., 2012; Ribeiro et al., 2019). Contudo, o método de eleição para a obtenção de sêmen nesses animais é por meio da eletroejaculação sob anestesia, uma vez que, a manipulação dos mesmos envolve diversos entraves e riscos relacionados ao seu temperamento agressivo. Baseada na estimulação do reflexo ejaculatório por meio de pulsos elétricos a técnica de eletroejaculação, consiste na introdução de um transdutor linear transretal com eletrodos posicionados ventralmente, acoplado a um aparelho portátil produtor de voltagem específica e acompanhada da administração de estímulos elétricos de maneira progressiva e em séries até a ejaculação ou não (Silva et al., 2004).

Em relação aos diferentes métodos de obtenção de gametas masculinos e protocolos de armazenamento, a manutenção temperatura de refrigeração é uma etapa crucial para assegurar a viabilidade das amostras durante o transporte, principalmente para aquelas coletas realizadas a campo e de posterior processamento (Zimkus et al., 2018). No decorrer das coletas, as normas de biosseguranças são preconizadas, pois é indispensável considerar todas as amostras de animais silvestres como eventualmente contaminadas, assim todos os procedimentos de coleta, transferência e acondicionamento devem ser realizados com extrema cautela (Santos e Cubas, 2014). Por fim, uma vez coletados, esses gametas podem ser direcionados para à criopreservação cuja eficácia é dependente da composição do diluente em associação com os crioprotetores (interno e externo) e uma curva de congelamento ideal (Hussain et al., 2011). Apesar da criopreservação de sêmen ser uma técnica já consolidada, diferenças na sua eficácia podem ser atribuídas a particularidades de cada espécie.

Uma alternativa bastante interessante para a conservação espermática é a criopreservação de células epididimárias, sendo uma técnica de preservação importantíssima para aqueles casos em que os animais passaram por procedimentos de esterilização cirúrgica ou que vieram a óbito. Nesses casos, por meio dessa metodologia, existe a possibilidade de transporte e armazenamento por tempo indeterminado, além de permitir o transporte de material genético entre localidades distantes (Varesi, 2012). O processo de coleta e criopreservação de células espermáticas post-mortem é frequentemente referido como “resgate de gametas” e é aplicado pelos pesquisadores para impedir o desaparecimento dos recursos genéticos masculinos de uma população (Rhiannon et al., 2022). Para facilitar a obtenção de espermatozoides epididimários, diversas técnicas foram desenvolvidas, sendo preferivelmente empregadas as técnicas de flutuação e a de fluxo retrógrado (Lopes et al., 2020). A primeira compreende em realizar o fatiamento da região da cauda do epidídimo e acondiciona-lo em meio diluidor para permitir a migração dos espermatozoides para o meio (Bergo, 2018); o outro método busca promover um fluxo retrógrado na cauda do epidídimo, por meio da aplicação de pressão aos vasos deferentes até que o conteúdo seminal da região da cauda saia através de uma pequena incisão na junção com o corpo do epidídimo (Bustamante, 2019).

Contudo, se está técnica falhar, ou o indivíduo for pré-pubere, as gônadas continuam sendo uma fonte viável para obtenção de espermatozoides (Fayomi et al., 2019). A criopreservação de tecido testicular é outra técnica interessante para amplificar o potencial em resguardar exemplares genéticos de animais raros e ameaçados de extinção que morreram inesperadamente. Além disso, existem algumas técnicas que podem ser usadas na preservação de tecido testicular (Rhiannon et al., 2022). De modo geral, dois métodos são reportados para a conservação de tecido testicular em espécimes silvestres: a criopreservação lenta (redução gradual de temperatura, associada a baixas concentrações de agentes crioprotetores) e a vitrificação (rápidas taxas de congelamento, associadas a altas concentrações de crioprotetores) (Silva et al., 2019), cuja eficiência depende de diferentes fatores relacionados ao aumento das exigências de permeação

do crioprotetor e ao aumento da heterogeneidade do tecido (Pothana et al., 2017). Em animais silvestre, estas técnicas mencionadas já foram aplicadas com sucesso na conservação de gametas masculinos, esses resultados estão descritos com detalhes nesta revisão (Tab. 1).

Tabela 1. Exemplo de espécies silvestres para as quais a criopreservação de gametas e de tecido testicular foram alcançadas.

Espécie	Técnicas de obtenção	Extensores	Motilidade / Pós-descongelamento (%)	Autores
Gato-do-mato (<i>Leopardus tigrinus</i>)		Test Yolk Buffer® + 12% glicerol e 20% gema de ovo	30,6 ± 6,5	(Erdmann, 2005)
		Test Yolk Buffer® + 6% de glicerol	55,2 ± 2,4	(Erdmann et al., 2014)
Gato-maracajá (<i>Leopardus wiedii</i>)		Test Yolk Buffer® + 12% glicerol e 20% gema	25,0 ± 3,6	(Erdmann et al., 2019)
Onça pintada (<i>Panthera onca</i>)		Diluyente A (20% gema, 11% lactose, 1000 UI/ml penicilina, 1000 mg/ml de estreptomicina) +	26,7 ± 3,4	(Paz et al., 2007)
		Diluyente B (20 % gema, 11% lactose, 1000 UI/ml de penicilina, 1000 mg/ml de estreptomicina e 8% de glicerol)		
Jaguaririca (<i>Leopardus pardalis</i>)	Eletroejaculação	Convencional: Tris, 20% de gema e 7% glicerol	73,1 ± 3,4	(Tebet et al., 2022)
		Comercial: BotuCRIO® contendo 7% de glicerol.	61,0 ± 9,2	
Suçarana (<i>Puma concolor</i>)		Tris-Citrato + 5% de glicerol	42,5 ± 6,4	(Deco-Souza et al., 2013)
Mico-leão-da-cara-dourada (<i>Leontopithecus chrysomelas</i>)		BotuBOV®	60,0 ± 14,5	(Arakaki et al., 2019)
Cateto (<i>Pecari tajacu</i>)		ACP-16c + 20% gema e 3% glicerol	48,3 ± 6,1	(Silva et al., 2012)
		Extrato Aloe Vera 20% e glicerol 3%.	46,4 ± 3,9	(Souza et al., 2016)
Tamanduá-bandeira (<i>Myrmecophaga tridactyla</i>)		OptiXcell®	30,0	(Silva et al., 2019)
Cutia	Recuperação epididimária	ACP-108® + gema e 12% de glicerol	26,5 ± 2,6	(Silva et al., 2011)

<i>(Dasyprocta agut)</i>	(lavagem retrógrada)	ACP-108® + 20% de gema e 3% de glicerol	47,5 ± 8,4	(Castelo et al., 2015)
Cutia <i>(Dasyprocta leporina)</i>		Tris - gema + 12% de glicerol	49,8 ± 5,2	(Bezerra et al., 2018)
Cateto <i>(Pecari tajacu)</i>		Tris + 20% de gema e 6% de glicerol	60,9 ± 4,4	(Silva et al., 2018)
Preá-de-dentes-amarelados <i>(Galea spixii spixii)</i>		Tris + 12% gema + 12% de glicerol	48,2 ± 7,4	(Moreira et al., 2021)
Preá-de-dentes-amarelos-do-Spix <i>(Galea spixii Wagler, 1831)</i>				

Espécie	Criopreservação de tecido testicular	Meio de criopreservação	Resultados	Referências
Preá <i>(Galea spixii)</i>	Vitrificação de superfície sólida	MEM com 10% de soro fetal bovino mais 0,25 M de sacarose por 5 min antes da exposição a 3 M etilenoglicol por 5 min.	Os resultados foram semelhantes ao controle para inchaço das células, perda de células e ruptura da membrana.	(Silva et al., 2016)
Cateto <i>(Pecari tajacu)</i>	vitrificação de superfície sólida	Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com sacarose 0,25 M e soro fetal bovino (FBS) 10% (v/v) e a combinação (DMSO/EG) contendo uma concentração de 1,5 M de cada crioprotetor.	Viabilidade das células germinativas foi de cerca de 80% para tecido fresco e 30-40% em tecidos vitrificados.	(Silva et al., 2019)
Cateto <i>(Pecari tajacu Linnaeus, 1758)</i>	Congelação lenta	MEM suplementado com 0,25 M de sacarose, 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1,5 M de crioprotetor intracelular (0,75 M de DMSO + 0,75 M de EG)	Viabilidade das células germinativas foi de cerca de 84 ± 2,1% para tecido fresco e 67,0 ± 8,4 - 52,8 ± 10,3% em tecidos sob congelação lenta e vitrificação convencional.	(Silva et al., 2021)
	Vitrificação	MEM suplementado com 0,25 M de sacarose, 10% de FBS e 3,0 M de crioprotetor intracelular (1,5 M de DMSO + 1,5 M de EG)		
Cutia <i>(Dasyprocta leporina Linnaeus, 1758)</i>	Vitrificação de superfície sólida	MEM suplementado com 0,25 M de sacarose e 10% de soro fetal bovino (FBS) e concentrações de 1,5 M DMSO + 1,5 M EG.	Viabilidade das células germinativas foi de cerca de 80,6 ± 0,5% para tecido fresco e 31,6 ± 1,2% a 45,6 ± 2,9% entre os tratamentos.	(Silva et al., 2022)

Conservação de gametas femininos, tecido ovariano e embriões

Os protocolos de criopreservação de gametas femininos em animais silvestres ainda não foram completamente padronizados. Isso pode ser reflexo das grandes limitações em relação ao número de animais disponíveis e os desafios associados ao congelamento dos oócitos, pois os mesmos possuem tamanho e propriedades bem peculiares (Comizzoli, 2017). Contudo sua relevância é indiscutível para a interface entre os programas de conservação de recursos genéticos *in situ* e *ex situ* (Andrabi e Maxwell, 2007). Os processos de estocagem do tecido ovariano, dos folículos isolados ou dos oócitos maduros ou imaturos, são biotecnologias que representam alternativas bem interessantes na conservação de gametas femininos e um complemento para a criopreservação de sêmen (Lermen et al., 2009). As formas de obtenção desses biomateriais podem ser realizadas por meio de punções foliculares, biópsias do tecido ovariano, ovariectomia uni ou bilateral ou colheita do ovário obtido de imediato logo após a morte do animal, independentemente da idade (Domingues et al., 2007).

A recuperação e criopreservação de oócitos e embriões de animais silvestres mortos/ameaçados de extinção podem ser alcançados pela extrapolação e adaptação de dois métodos para este fim, a congelamento lenta e a vitrificação (Xu et al., 2012; Bhat e Sofi, 2021). Em ambas as técnicas as células são tratadas com agentes crioprotetores para prevenir danos/criolesões; em seguida, as células são refrigeradas de maneira controlada em temperaturas abaixo de zero, além disso, é importante salientar que para esses dois sistemas de criopreservação exigem diferentes concentrações de crioprotetores e aplicam diferentes taxas de congelamento (Aljaser, 2022). Por motivos relacionados com a área de superfície e o volume do oócito, essas características podem desencadear um aumento dos níveis de formação de gelo intracelular durante o processo de criopreservação, tornando a técnica mais desafiadora, entretanto, é possível encontrar tentativas do seu uso em várias espécies, inclusive em espécimes silvestres (Tab. 2) (Borini e Bianchi, 2012).

Dependendo do estado de desenvolvimento do oócito, essas lesões que ocorrem no decorrer do processo de criopreservação acabam sendo exacerbadas pela baixa e variável permeabilidade da membrana aos crioprotetores (García-Martínez et al., 2021), nessa situação, essas variações podem acarretar aumento no número de rupturas e morte celular, gerando taxas de fertilização baixas de oócitos pós-descongelamento (Tharasanit e Thuwanut 2021). Como alternativa, o congelamento rápido ou vitrificação é uma técnica de congelamento ultrarrápido e com altas concentrações de crioprotetores, que resulta na solidificação sem formação de cristais de gelo, permitindo colocar células em temperaturas criogênicas (Aljaser, 2022). A vitrificação tem sido adotada com sucesso na criopreservação de oócitos, contudo, devido a sua estrutura complexa e sensibilidade ao frio, ainda é desafiadora a sua aplicabilidade (Prentice e Anzar 2010). As evidências sugerem que ambas as técnicas podem ser selecionadas para a conservação de oócitos, pelo menos para alguns espécimes de vida livre (Bhat e Sofi, 2021).

Uma abordagem alternativa para armazenar oócitos é a criopreservação de tecido ovariano contendo oócitos imaturos, que se tornou uma opção promissora para preservar células germinativas e gametas de vertebrados ameaçados de extinção, sendo essa já aplicada em algumas espécies silvestres (Tabe 2) (Comizzoli e Wildt, 2014; Comizzoli, 2015). Após a morte, eutanásia ou esterilização cirúrgica, uma porção do ovário (córtex contendo folículos imaturos) pode ser submetido a criopreservação. Nesse procedimento, essa região é dissecada e fragmentada em pequenas tiras sob meios estéreis antes do congelamento (Hinkle et al., 2021). Existe um potencial enorme em produzir um grande número de oócitos a partir do tecido ovariano processado em laboratório, no qual os oócitos recuperados podem ser levados para maturação *in vitro* e fertilização *in vitro* para a produção de embriões (Rhiannon et al., 2022). Os principais entraves no estabelecimento dos protocolos de criopreservação de tecido ovariano em diferentes espécimes silvestres envolvem a alta complexidade da arquitetura estrutural do tecido gonadal e a heterogeneidade celular (Jewgenow e Songsasen, 2014). Para solucionar essas limitações, é importante compreender os efeitos da criopreservação na proliferação e apoptose das células submetidas aos protocolos de congelamentos em cada espécie, no intuito de aprimorar o sucesso no desenvolvimento folicular e produção de gametas, para no futuro serem submetidos a cultura *in vitro* e/ou transplante de tecido gonadal (Gastal et al., 2018).

Por fim, a criopreservação de embriões é uma ferramenta interessante para manutenção de recursos genéticos de animais domésticos e silvestres, permitindo o melhor uso futuro dos recursos genéticos (Saragusty e Arav, 2011). Do ponto de vista conservacionista, a criopreservação de embriões tem como vantagem permitir a preservação de todo complemento genético de ambos os progenitores, além disso, garante a eficiente utilização do material genético de uma fêmea valiosa que é fisicamente incapaz de se reproduzir (Saragusty e Arav, 2011; Bhat e Sofi, 2021). Embora não seja uma problemática para espécies domesticadas, reunir machos e fêmeas para gerar embriões é um processo bem rápido e fácil, porém, em

muitas outras espécies isso pode ser um problema bem difícil de ser resolvido e quando finalmente esses embriões são gerados, na maioria das vezes é mais interessante o prosseguimento da gestação ao invés da realização da coleta e armazenamento desse material (Saragusty e Arav, 2011). Porém, para ter êxito na criopreservação de embriões, é necessário testar e ajustar os protocolos utilizando embriões da espécie alvo, o que geralmente é quase impossível em espécies ameaçadas de extinção, onde a possibilidade de obtenção de embriões é muito rara. Na tentativa de superar essa limitação, é interessante a utilização de animais de laboratório, fazenda ou de companhia como modelos (Saragusty e Arav, 2011). Os biobancos de embriões podem, assim, auxiliar no desenvolvimento de populações fundadoras objetivando eventualmente a reintrodução na natureza (Silva et al., 2012). Futuramente, para que gestações bem sucedidas sejam uma rotina nos criatórios ou zoológicos, são essenciais mais estudos abrangentes acerca da criopreservação e dos agentes crioprotetores, maturação e fertilização de embriões (Bhat e Sofi, 2021).

O estabelecimento da criopreservação de embriões em espécies domésticas já está em um estágio bastante avançado, contudo, ainda é necessário o aperfeiçoamento dos procedimentos dentro da técnica, para garantir melhores taxas de sobrevivência embrionária e, posteriormente, a sua extrapolação em animais silvestres ameaçados (Silva et al., 2012). Há pouco tempo, importantes passos foram dados para a biotecnologia de embriões em animais silvestres, como por exemplo, a produção in vitro de embriões de um primata neotropical (*Cebus apella* – Lima et al., 2012), produção de embriões partenogênicos de cateto (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758 – Borges et al., 2018), e a fertilização in vitro heteróloga e produção de embriões para avaliação de sêmen de onça-pintada (*Panthera onca* Linnaeus, 1758 – Santos et al., 2022). A criopreservação de oócitos, tecidos gonadais e embriões podem ser aditivos importantes na luta pela preservação de espécies, garantindo a estocagem a longo prazo e a proteção da diversidade genética existente, sendo um seguro contra a perda de populações silvestres devido a caça, tráfico, alterações no seu habitat, escassez de alimento, epidemias e desastres naturais (Bhat e Sofi, 2021).

Tabela 2. Conservação de gametas femininos e embriões em animais silvestres: métodos e resultados.

Espécies	Método	Material	Condições de criopreservação	Resultado	Autores
Cutia (<i>Dasyprocta aguti</i>)	Criopreservação lenta	Tecido ovariano	Meio contendo 1,8 mL de HMEM+ (HMEM + 10% de soro fetal bovino) e adicionado propanodiol (PROH) 1,5 M.	Morfologia e ultraestrutura do folículo satisfatória. Apenas os folículos congelados com PROH apresentaram ultraestrutura normal. PROH: 62.00±6.91%	(Wanderley et al., 2012)
Preá (<i>Galea spixii</i> Wagler, 1831)	Vitrificação de superfície sólida	Tecido ovariano	3 M de DMSO em meio mínimo essencial (MEM), suplementado com 0,25 M de sacarose (SUC) e 10% de soro fetal de vitela (FCS).	Redução na proporção de folículos pré-antrais morfolologicamente normais em relação ao grupo não vitrificado (69,5% vs 91,2%, respectivamente).	(Praxedes et al., 2017)
Cutia (<i>Dasyprocta leporina</i> , Lichtenstein, 1823)	Vitrificação - Xenotransplante	Tecido ovariano	MEM suplementado com 10 mg mL ⁻¹ de soro fetal bovino (FCS) e 0,25 M de sacarose, com a adição de 3,0 M de dimetilsulfóxido (DMSO) e 3,0 M de etilenoglicol (EG) como agentes crioprotetores (CPAs).	Controle fresco Primordiais: 61,1%, Transição: 14,4%, Primário: 15,6% Controle-vitrificado Primordial: 41,7%, Primário: 26,7% Xeno-fresco Primordiais: 63,6%, Transição: 9,1%, Primário: 9,1% Xenovitrificado Primordiais: 40%, Transição: 7,5%, Primário: 12,5%	(Praxedes et al., 2018)
Catetos (<i>Pecari tajacu</i>)	Ovarian Tissue Cryosystem (OTC)	Tecido ovariano	MEM suplementado com sacarose (0,25 M), 10% de	OTC proporcionou folículos pré-antrais morfolologicamente normais	(Campos et al., 2019)

			soro fetal bovino (FBS) e 3 M EG.	semelhante ao grupo controle fresco (75,6 ± 8,6%). Análise de apoptose (46,7%).	
Catetos (<i>Pecari tajacu</i>)	vitrificação de superfície sólida	Tecido ovariano	MEM suplementado com sacarose (0,25 M) e 10% de soro fetal de vitela (FCS), acrescido etilenoglicol – EG em concentrações finais de 3 ou 6 M na solução.	Folículos pré-antrais morfológicamente normais. Em folículos primordiais, a preservação mais efetiva foi alcançada com o uso de EG a 3 M (74,2±7,3%). A viabilidade foi preservada com o uso de EG a 3 (97%) ou 6 (97%) M.	(Lima et al., 2019)
Cutia (<i>Dasyprocta leporina</i> Linnaeus, 1758)	Ovarian Tissue Cryosystem (OTC)	Tecido ovariano	MEM mais 10 mg mL - 1 de soro fetal de bezerro e 0,25 M de sacarose, com 3,0 M de etilenoglicol	Carga bacteriana total 3120 UFC/mL; Preservaram da integridade do DNA 41,67%; Folículos primários 86,5 ± 5,5%.	(Praxedes et al., 2021)

Conservação de tecidos somáticos

A criopreservação de tecido somático pode ser estabelecida para a conservação da biodiversidade, principalmente para espécimes silvestres, com o intuito de apoiar a conservação (Borges et al., 2017). A formação de biobancos de tecidos somáticos para obtenção de células da pele tem sido aconselhado como uma técnica viável e prática para a preservação de espécies (Praxedes et al., 2018). Diferentes técnicas são aplicadas para a preservação tecidual, essas consistem no congelamento rápido ou lento e a vitrificação. Em ambas as metodologias, alguns aspectos podem atuar na variação dos resultados, como o método a ser aplicado, os tipos e concentração dos crioprotetores e oscilações de temperatura (Carvalho et al., 2011; Borges et al., 2017).

Pensando na possibilidade de realizar a coleta em um grande número de indivíduos, a criopreservação de tecidos somáticos se apresenta como uma técnica vantajosa e muito importante, que proporciona o acondicionamento de muitos fragmentos e otimizando a preservação de um determinado recurso genético valioso (León-Quinto et al., 2014). As amostras biológicas criopreservadas podem facilmente ser aplicadas para pesquisas biológicas, genéticas, toxicológicas, epidemiológicas e a nível de biotecnologias aplicadas a reprodução assistida, bem como na clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) para resguardar o material genético (Mogollón-Waltero et al., 2014). A TNCS se destaca pela possibilidade de viabilizar a manutenção de espécimes ameaçados de extinção (Folch et al., 2009). Além do mais, com grande capacidade de utilização os tecidos somáticos armazenados em biobancos, poderia permitir a restauração ou expansão de populações raras, por meio da clonagem por TCNS interespecies (Loi et al., 2011).

A padronização e aplicabilidade dos biobancos em espécies de vida livre tem sido centralizado para o progresso da pesquisa de cunho científico básico e para o aprimoramento dos protocolos de estocagem a longo prazo de células somáticas (Comizzoli, 2017). Como apresentado por Praxedes et al. (2018), é possível encontrar relatos de muitos estudos que objetivaram a conservação dos tecidos somáticos para espécimes selvagens. Quando associado com a TNCS interespecies é possível encontrar resultados muito promissores, como os apresentados por Gómez et al. (2004), que relataram o primeiro nascimento de um gato selvagem por meio da utilização de embriões clonados obtidos pela fusão de núcleos de fibroblastos e citoplastos de gato selvagem africano (*Felis silvestres libica*) e gato domesticado, respectivamente. Em um momento posterior, o mesmo grupo de pesquisa demonstrou o nascimento de uma prole entre espécimes distintas, gato da areia (*Felis Margarita*) sendo o doador de núcleos e o gato doméstico doador de citoplasto (Gómez et al., 2008). Na Tabela 3, estão apresentados a situação atual da utilização e desenvolvimento de estudos realizados em nosso continente no intuito de preservar células somáticas de espécimes silvestres ameaçadas de extinção (Tab. 3).

Tabela 3. Cenário atual do uso das células somáticas e fibroblastos na conservação de animais silvestres

Espécies	Fonte da amostra	Condições de cultura <i>in vitro</i>	Condições de criopreservação	Resultados	Autores
Veado-catingueiro (<i>Mazama gouazoubira</i> Fischer, 1814)	Tecido auricular- Fibroblastos	DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10% e solução antibiótica/antimicótica a 2% (v/v) a 38,5 C em 5% de CO ² .	Meio de congelamento consistiu em DMEM+ suplementado com dimetilsulfóxido (DMSO, D5879; Sigma) a 10% (v/v).	Sobrevida celular superiores a 80% independente do grupo testado, com exceção da passagem 10 no grupo congelado/aquecido.	(Magalhães et al., 2017)
Cachorro-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>)	Fibroblastos	αMEM (Minimum Essential Medium) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de estreptomomicina/penicilina e 1 μl por ml de βFGF (PeproTech Inc., EUA) a 5% CO ₂ e 38,5°C.	Congelamento lento: αMEM suplementado com 10% de FBS, 1% de antibióticos e 1 μl por ml de Bfgf, e centrifugadas. Ressuspensas em meio com 45% αMEM, suplementado com 50% de FBS, 1% de antibióticos e 1 μl por ml e 10% de DMSO.	Tanto as células pré-congeladas como as células pós-congeladas mostraram um declínio na proliferação celular a partir da passagem de P4 seguido principalmente de apoptose celular.	(Machado et al., 2017)
Catetos (<i>Pecari tajacu</i> Linnaeus, 1758)	Tecido auricular	DMEM suplementado com solução de bicarbonato de sódio a 2,2 g/L (p/v), solução antibiótica-antimicótica a 2% (v/v) e FBS a 10% (v/v) a 38,5 °C, 5 % CO ₂ no ar e 95% de umidade relativa.	Vitrificação de superfície sólida (VSS): DMEM suplementado com 20% (v/v, 3,58 M) de etilenoglicol (EG), 20% (v/v, 2,82 M) dimetilsulfóxido (DMSO), 0,25 M (p/v) sacarose e soro fetal bovino (FBS) a 10% (v/v).	VSS é um método mais eficiente para vitrificação do tecido cutâneo de catetos quando comparado ao	(Borges et al., 2017)
Catetos (<i>Pecari tajacu</i> Linnaeus, 1758)	Tecido auricular	Solução de prata preparada em 1 parte de gelatina a 2% em ácido fórmico aquoso a 1% e 2 partes de solução aquosa de nitrato de prata a 50% e as lâminas foram expostas em uma sala escura por 30 min. Lâminas foram lavadas em solução de tiosulfato a 5% por 10 min.	Vitrificação de superfície sólida (VSS): DMEM composto de 2,2 g/L de bicarbonato de sódio e 10% de FBS (DMEM ⁺), suplementado com sacarose, EG-SUC (DMEM ⁺ +3,0 M EG +0,25 M sacarose +10% FBS).	3,0 M de EG com sacarose foi capaz de manter as características normais do tecido, especialmente para a proporção volumétrica da epiderme (61,2%) e derme (34,5%), número de fibroblastos (90,3), razão da região argirófila organizadora de nucléolo (AgNOR) (0,09%) e área do núcleo (15,4 μm ²).	(Borges et al., 2018)
Onça-pintada (<i>Panthera onca</i> Linnaeus, 1758)	Tecido auricular	DMEM constituído com 10% de FBS e 2% de solução antibiótico-antimicótico a 38,5°C e 5% de CO ₂ .	Vitrificação de superfície sólida (VSS): DMEM suplementada com 1,5 M de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,25 M de sacarose (SUC) e 10% de FBS.	SSV eficientes para a maioria dos parâmetros avaliados, principalmente no que diz respeito à duração da cultura e atividade metabólica celular.	(Praxedes et al., 2019)
Cutia (<i>Dasyprocta leporina</i> Linnaeus, 1758)	Pele	DMEM suplementado com solução de bicarbonato de sódio a 2,2 g/L (p/v), solução antibiótica-antimicótica a 2% (v/v) e FBS a 10% (v/v) a 38,5 °C, 5 % CO ₂ no ar e 95% de umidade relativa.	Vitrificação de superfície sólida (VSS): Composta de DMEM suplementada com 20% de etilenoglicol (EG), 20% de DMSO, sacarose 0,25 M (SUC) e 10% soro bovino (FBS).	VSS apresentou maior número de condrócitos normais e menor número de condrócitos degenerados. Lacunas vazias em fragmentos derivados de SSV permaneceu semelhante aos controles.	(Costa et al., 2020)

<p>Catetos (<i>Pecari tajacu</i> Linnaeus, 1758)</p>	<p>Tecido auricular – Fibroblastos</p>	<p>DMEM mais FBS a 10% e solução antibiótico-antimicótico a 2%. A pele foi cultivada a 38,5°C em ambiente controlado com 5% de CO₂ e 95% de ar, conforme método descrito.</p>	<p>Congelamento lento: DMEM suplementado com 10% de DMSO como permeante crioprotetor e 10% de FBS e 0,2 M de sacarose como crioprotetores não permeáveis. Primeiramente expostas à solução de DMSO-FBS por 15 min a 4°C, então a solução de sacarose foi adicionada seguida por uma incubação adicional por 15 min a 4°C.</p>	<p>Sem diferença significativa na viabilidade celular (74,5-84,4%), após as passagens. No entanto, a atividade metabólica foi reduzida na décima. Qualidade de linhas de fibroblastos apresentou viabilidade de (87,4 ± 0,3% vs. 74,0 ± 5,9%). As células criopreservadas apresentaram maiores níveis de ROS intracelular.</p>	<p>(Borges et al., 2020)</p>
<p>Cutia (<i>Dasyprocta leporina</i> Linnaeus, 1758)</p>	<p>Tecido auricular</p>	<p>----</p>	<p>1,5 M etilenoglicol (EG), 1,5 M DMSO e 0,25 M de Sacarose (SUC).</p>	<p>EG-DMSO-SUC mostrou-se a solução crioprotetora ideal em termos dos parâmetros avaliados, como espessura da derme e da pele, número de halos perinucleares, potencial proliferativo, número de lacunas vazias e condrócitos degenerados.</p>	<p>(Rodrigues et al., 2021)</p>
<p>Onça-pintada (<i>Panthera onca</i>)</p>	<p>Tecido auricular</p>	<p>DMEM com 10% de FBS, solução a 2% de 10.000 unidades/ mL de penicilina, 10.000 µg/mL de estreptomomicina e 25 µg/mL de anfotericina a 38,5°C, 5% de CO₂ e 95% de ar.</p>	<p>Congelamento lento: Inicialmente, as células foram suspensas em 350 µL de DMEM contendo apenas 10% de FBS. Em seguida, 350 µL de DMEM contendo DMSO adicionados à célula inicial em suspensão. Para os grupos contendo SUC 300 µL e sem SUC, 300 µL de DMEM foram adicionados para atingir o volume de 1,0 mL.</p>	<p>Apenas células criopreservadas em DMSO com SUC (76,0%±2,7) ou ausência de SUC (77,0%±3,7) mantiveram sua atividade metabólica após o descongelamento</p>	<p>(Oliveira et al., 2021)</p>
<p>Onça-parda (<i>Puma concolor</i> Linnaeus, 1771)</p>	<p>Tecido auricular</p>	<p>Vitrificação de superfície sólida: DMEM com 3,0 M de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,25 M de sacarose (SUC) e 10% de FBS.</p>	<p>Vitrificação de superfície sólida: DMEM com 3,0 M de dimetilsulfóxido (DMSO), 0,25 M de sacarose (SUC) e 10% de FBS.</p>	<p>Primeiro estudo a descrever a criopreservação de tecidos somáticos de onça-parda, demonstrando que as amostras submetidas à criopreservação eram viáveis e mantinham a integridade do tecido, apresentando alterações mínimas após o aquecimento.</p>	<p>(Lira et al., 2021)</p>

Células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC)

As células-tronco possuem a capacidade de se diferenciar em células germinativas, que poderiam facilmente fornecer outra maneira de melhorar a diversidade genética, em especial, naquelas populações com um número significativamente reduzido de indivíduos (Rhiannon et al., 2022). As células-tronco pluripotentes induzidas (IPSCs) podem ser obtidas pela reprogramação genética de células somáticas adultas por meio da superexpressão de genes pluripotentes específicos. O resultado dessa reprogramação são células que possuem as mesmas propriedades de diferenciação que as células-tronco embrionárias, fornecendo uma fonte celular pluripotente para o uso na conservação da vida selvagem por complementação embrionária, transferência nuclear usando células doadoras reprogramadas, clonagem, fertilização in vitro, diferenciação direcionada de gametas (masculino e feminino) e criopreservação de recursos genéticos (Gavin-Plagne et al., 2020). Neste sentido, as iPSCs são ferramentas valiosas para a preservação de

espécimes raros e ameaçados de extinção e, em associação com a tecnologia de desenvolvimento das células somáticas, podem ampliar o pool de amostras biológicas para os biobancos (Gavin-Plagne et al., 2020). As iPSCs estão sendo usadas em várias tentativas para regenerar espécies ameaçadas, principalmente espécimes selvagens, no entanto, alguns clones de células iPS apresentam grandes diferenças em relação as células-tronco embrionárias em vários aspectos, que incluem a expressão gênica, metilação do DNA e diferenciação celular (Yamanaka, 2012), o resultado dessa implicação resulta em vários problemas potencialmente graves, incluindo o aumento da imunogenicidade (Okita et al., 2011). Tais eventos necessitam serem levados em consideração no momento de implementação e utilização das células iPS. Preliminarmente, a utilização das células iPS ou até mesmo as técnicas de transferência nuclear de células somáticas, para que elas sejam utilizadas para produzir descendentes viáveis, uma abordagem aprofundada sobre a elucidação da biologia reprodutiva tanto do embrião, quanto da fêmea receptora devem ser necessários e vitais para garantir a manutenção e sucesso da aplicação dessas duas técnicas (Lindau et al., 2021; Rhiannon et al., 2022).

No contexto dos biobancos para a conservação de animais selvagens, as células iPS foram inicialmente produzidas a partir de fibroblastos criopreservados de um primata ameaçado de extinção (*Mandrillus leucophaeus*) e do quase extinto rinoceronte branco do Norte (*Ceratotherium simum cottoni*), utilizando vetores virais que transferem os fatores de sequenciamento humano para a reprogramação Oct4, Sox2, cMyc e KLF4 (Ben-Nun et al., 2011). Surpreendentemente, para o rinoceronte as respostas significativas em relação com as sequências de fatores de reprogramação, sugerem que os princípios do mecanismo de reprogramação são demasiadamente conservados entre espécies distintas, o que é um presságio interessante para a aplicabilidade dessa inovação tecnológica a uma diversidade de espécimes (Rhiannon et al., 2022).

Desafios e Perspectivas

Os biobancos contribuem para várias aplicações dentro da conservação em animais silvestres, contudo, há grandes obstáculos e incertezas em relação a alguns procedimentos (coleta, manuseio, transporte, acondicionamento e custos elevados (Strand et al., 2020). Seguindo esse raciocínio, a coleta de gametas, tecidos e gônadas de animais silvestres nem sempre são possíveis. Em populações de vida livre, é muito difícil coletar e processar as amostras biológicas imediatamente após a morte dos animais em virtude da indisponibilidade de recursos ou falta de meios adequados para transporte e protocolos adequados para armazenamento (Brahmasani et al., 2021). Tanto a integridade, viabilidade e arquitetura dos tecidos ou órgãos coletados post-mortem são afetados pelo atraso no intervalo de tempo entre a morte do animal e a coleta do material biológico de escolha, onde as alterações celulares e bioquímicas são favorecidas por meio das condições ambientais, como por exemplo, a temperatura que ocasiona danos irreversíveis a qualidade das células, tecidos ou gametas coletados de animais post-mortem ou até mesmo em exemplares vivos (Brahmasani et al., 2021).

Em um cenário geral, os protocolos ainda necessitam ser aperfeiçoados para uma grande diversidade de biomateriais oriundos de animais silvestres, como oócitos, espermatozoides, tecidos gonadais, embriões, células somáticas e células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC), por exemplo, dada as suas vulnerabilidades à exposição as técnicas de coleta e processamento, aos crioprotetores, temperaturas de refrigeração, congelamento e pós-descongelamento que podem provocar alterações no DNA e danos nas células/tecidos (Baker, 2012). Com base nos aspectos reprodutivos e a grande escassez de informações acerca dessa temática, principalmente em animais silvestres, o sucesso da implementação da biotecnologia aplicada a reprodução ainda se apresentam de forma bastante limitada, porém, a utilização da criotecnologia já possibilitou grandes avanços para a biologia reprodutiva em diversas espécies silvestres, é importante salientar que mesmo com esses passos promissores até então existem muitas limitações distintas que precisam ser elucidadas (Silva et al., 2012). Nesse contexto, a carência de informações detalhadas sobre a fisiologia da maioria dos espécimes silvestres acarreta no comprometimento da implementação de tecnologias reprodutivas e essas seguem uma trajetória de desenvolvimento e execução bastante lenta (Silva et al., 2018). Além do mais, em paralelo com o desenvolvimento de estratégias de conservação do germoplasma, seria interessante e necessário o progresso das biotecnologias, como a inseminação artificial, monitoramento e controle de ovulações e a própria tecnologia de embriões, que possibilitariam a aplicação dos biomateriais na manutenção da conservação de espécimes ou até mesmo produzir uma descendência saudável (Comizzoli e Wildt, 2013; Silva et al., 2018).

Diante de toda essas problemáticas, o aprimoramento e adaptações dos protocolos empregados nos procedimentos para o armazenamento das amostras biológicas vem sendo essenciais para aumentar a eficiência dos programas de enriquecimento dos bancos de germoplasma, entretanto, mesmo apresentando

resultados satisfatórios, tanto no Brasil como no mundo, os baixos índices de repetitividade e de aplicação efetiva ainda mostram o quanto é necessário aperfeiçoar e padronizar os protocolos existentes (Silva et al., 2012).

Quando analisados outros fatores importantes para o estabelecimento dos biobancos, é possível verificar uma série de desafios, em especial, a própria dependência quase em sua totalidade em relação a técnica da criopreservação utilizando crioprotetores que auxiliam no acondicionamento em temperaturas a baixo de zero em sistema automatizados dependentes de eletricidade ou sistemas convencionais a base de nitrogênio líquido (Comizzoli e Wildt, 2017; Cruz et al., 2022). Ambos os sistemas mencionados são caros e exigem monitoramento intensivo, equipamentos de segurança, ventilação e cópias de segurança em caso de mal funcionamento dos dispositivos, apresentando-se significativamente como obstáculos que precisam ser analisados, principalmente em países em desenvolvimento ou emergentes, que retêm grande parte da biodiversidade rara e onde o nitrogênio é um produto escasso ou até mesmo indisponível (Comizzoli e Wildt, 2017). Em países com essas características, os desafios vão além desses já supra citados, é possível incluir nessa lista diversos outros fatores, como por exemplo, a escassez de apoio financeiro e iniciativas políticas, assim como a implementação de políticas públicas, indisponibilidade de mão de obra especializada e falta de gestão de dados de forma eficiente (Angeles e Catap, 2022).

Os biobancos são apenas um elo incorporado em uma cadeia cheia de complexidade que envolve a conservação das espécies, relacionando várias áreas do conhecimento, e não se direcionando apenas as comunidades de pesquisas, mas também a política pública, redes de financiamento, os estudantes, dentre outros (Silva et al., 2012). Afinal de contas, sem a existência de um ambiente propício para comportar os animais e permitir a sua manutenção e multiplicação, não faria sentindo tantos esforços para multiplicar e conservar todos esses biomateriais em laboratório.

Apesar dos desafios, os biobancos modernos garantem a formação integrada e mais acessível da biodiversidade, fornecendo possibilidades mais amplas para a implementação de tecnologias emergentes e estudos exploratórios dos recursos silvestres, no intuito de garantir a manutenção e sobrevivência desses recursos genéticos (Cruz et al., 2022). O gerenciamento e compartilhamento de dados entre os biobancos, poderia ser o pontapé inicial para o aprimoramento e manutenção dessas instalações. Nesse caso, a informatização dos biobancos seria necessário para revolucionar a forma de gestão e permitir o desenvolvimento de unidades mais complexas (Coppola et al, 2019). Os bancos de dados são definidos como sendo uma coleção de informações organizadas de forma coerente e lógica, com significância própria, que simboliza especulativamente algo da realidade, sendo fundamentais para salvaguardar e compartilhar informações. Esse compartilhamento pode ser realizado por meio de programas específicos de gerenciamento de dados, que promovem a administração colaborativa de informações entre os biobancos (Tedeschi e Tsunoda, 2020). A informatização dos dados para a implementação de biobancos compreendem diversos fatores significativos para o seu funcionamento apropriado, como a segurança e inviolabilidade, gerenciamento dos dados dos biomateriais e tipo de sistema virtual implementado (Cruz et al., 2022).

Além do gerenciamento e utilização, as tecnologias emergentes poderiam atuar como ferramentas importantes no aperfeiçoamento do acondicionamento de amostras biológicas provenientes de animais de vida livre. A otimização dos protocolos e utilização de outros métodos de criopreservação facilitariam significativamente o aprimoramento entre as fronteiras relacionadas com o congelamento de amostras biológicas e a sua utilização futura (Aljaser, 2022). Aljaser (2022) cita algumas técnicas emergentes de criopreservação, como por exemplo: (1) vitrificação controlada por rastreamento líquido, que é um protocolo lento, controlado e com aumento gradativo nas concentrações dos crioprotetores de forma simultânea com a redução da temperatura, de modo que, a composição da solução “rastree” a linha líquida (ponto de fusão) para esse sistema (Pegg, 1986). Se o rastreamento for eficiente, a formação de gelo não acontece e o tecido não é exposto a altas concentrações de crioprotetores (Kay et al., 2015). Resultados promissores já foram relatados com sucesso na restauração da função ovariana em ovelhas adultas (Campbell et al., 2014). (2) Vitrificação por pulso a laser, como o próprio nome sugere, é uma técnica proposta por meio da aplicabilidade da luz a laser no processo de criopreservação, como princípio básico, o laser atinge apenas o gelo intracelular, fazendo com que ele derreta e resolidifique em estado vítreo (Aljaser, 2022). A aplicação dessa técnica já foi relatada para garantir a sobrevivência completa de oócitos em camundongos após serem submetidos a vitrificação e aquecimento ultrarrápido em associação com pulsos a laser (Jin et al., 2014). (3) Criopreservação isocórica e hiperbárica, nessa abordagem o procedimento de criopreservação é o congelamento sob pressão, as metodologias supracitadas anteriormente empregavam condições de pressão padrão ininterruptos (isobárica, com pressão de 1 atm), já a refrigeração isocórica (volume constante) proporciona meios para diminuir de forma significativa as temperaturas de acondicionamento não criopreservadas sem qualquer ou simplesmente com quantidades mínimas de crioprotetores, desta forma, é possível alcançar maior redução metabólica sem lesões

associadas ao congelamento, toxicidade reduzida e menores quantidades de solutos osmóticos (Aljaser, 2022). Na criopreservação isocórica, basicamente é um procedimento de equilíbrio de duas fases, onde o gelo e o líquido encontram-se paralelamente em estabilidade sob temperatura e volume constante, enquanto na congelação hiperbárica o meio é estabilizado em uma única fase (líquida) (Taylor et al., 2019). Nesse método, ainda não foi possível criopreservar e restaurar as funções normais de amostras biológicas complexas, como tecido e órgão em mamíferos (Aljaser, 2022).

Além disso, novas perspectivas estão sendo encontrada a partir da adoção de outras tecnologias emergentes para o armazenamento do material genético, como por exemplo a liofilização. A liofilização é o método definitivo para acondicionar o material biológico (Kaneko et al., 2014a). Aplicando essa metodologia, as amostras podem ser facilmente acondicionadas por um longo intervalo de tempo e mantidas em refrigeração (4 °C) ou até mesmo em temperatura ambiente (Kaneko e Serikawa, 2012a; Kaneko e Serikawa, 2012b). Seguindo essas premissas, os espermatozoides liofilizados de camundongos e ratos podem ser preservados por 3 a 5 anos em temperatura de armazenamento a 4 °C em solução contendo Tris 10 mM e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 1 mM (tampão TE) (Kaneko e Serikawa, 2012a; Kaneko e Serikawa, 2012b). Somado a isso, as células espermáticas liofilizadas são transportadas facilmente e com segurança para qualquer localidade em temperatura ambiente, sem a necessidade de utilização do nitrogênio líquido ou gelo seco (Kaneko e Nakagata, 2005; Kaneko, 2014a).

É possível encontrar na literatura resultados bem promissores sobre a liofilização, em alguns estudos com espécies domésticas os espermatozoides liofilizados permaneceram viáveis após o procedimento, permitindo tanto a fertilização *in vitro* de oócitos bovinos, como a possibilidade de apoiar a produção de potros viáveis (Keskintepe et al., 2001; Choi et al., 2011). Em 2014, resultados preliminares mencionados por Kaneko et al. demonstraram que o ejaculado de alguns espécimes de vida livre, incluindo chimpanzés, girafas, onças, doninhas e ratos de pêlo comprido, podem resistir ao procedimento de liofilização e permanecerem viáveis. Foi verificado para todas as espécies, a formação de pró-núcleos após a injeção de espermatozoides liofilizados em oócitos de camundongos. Embora ainda em validação, a técnica tem um grande potencial, tanto no desenvolvimento das técnicas de micro-inseminação, como no estabelecimento de um “zoológico de liofilização” para conservar e repovoar os animais de vida livre que estão ameaçados de extinção em momentos com baixa disponibilidade de sêmen (Kaneko et al., 2014b).

Considerações finais

Graças aos grandes avanços nas últimas décadas, as diferentes abordagens da biotecnologia aplicadas a reprodução assistida em âmbito conservacionista, apresentaram-se como técnicas promissoras para garantir a manutenção de espécimes raros e ameaçados de extinção. Contudo, para que essas tecnologias sejam estabelecidas e aplicadas em animais silvestres, é necessária imediatamente uma cooperação global. Para alcançar essa premissa, a distribuição de conhecimento e de dados, além do inventário de amostras biológicas e a criação de uma rede informatizada entre os biobancos são primordiais. De fato, é imprescindível que os protocolos de todas essas biotecnologias sejam completamente padronizados e garantam a manutenção e viabilidade das amostras biológicas, isso é particularmente importante, pois, quando é levado em consideração que a disponibilidade do material biológico para os grupos de pesquisa/biobancos é bastante limitada para o desenvolvimento de protocolos e pesquisas mais amplas e aprofundadas. Além disso, é necessário o conhecimento de toda a biologia reprodutiva dos espécimes para o qual se deseja armazenar nos biorepositórios, uma vez que, através desses conhecimentos fica mais fácil a aplicabilidade e validação de uma técnica reprodutiva e que a mesma seja capaz de auxiliar na sobrevivência e combate a crise de extinção de espécimes em risco ou ameaçados.

Os biobancos em associação com as biotecnologias reprodutivas abrem novos caminhos estratégicos para a conservação de animais silvestres, por meio da integralização de metodologias inovadoras e métodos mais tradicionais para a elaboração de uma rede segurança de base biológica para espécimes em perigo. É necessário começar a armazenagem de amostras biológicas o quanto antes, para garantir o aproveitamento ao máximo da diversidade genética, pois não é possível prever o que será necessário no futuro.

Referências

- Aljaser FS.** Cryopreservation Methods and Frontiers in the Art of Freezing Life in Animal Models. In Y. Bozkurt, & M. N. Bucak (Eds.), *Anim Reprod*. IntechOpen, 2022.
- Andrabi SMH, Maxwell WMC.** A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim Reprod Sci*, v.99, p.223-243, 2007.

- Angeles NAC, Catap ES.** Challenges on the Development of Biodiversity Biobanks: The Living Archives of Biodiversity. *Biop Biobank*. 2022.
- Arakaki PR, Salgado PAB, Losano JDA, Gonçalves DR, Valle RR Pereira RJG, Nichi M.** Semen cryopreservation in golden-headed lion tamarin, *Leontopithecus chrysomelas*. *Am J Primatol*, 2019.
- Baker M.** Building better biobanks. *Nature*, v.486, n.7401, p.141-146, 2012.
- Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo TR, Wang YC, Charter SJ, Laurent LC, Ryder OA.** Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nature Met*, v.8, p.829–831, 2011.
- Bergo LCF.** *Comparação de técnicas de recuperação de espermatozoides epididimários em cães*. 2018. 36f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2018.
- Bezerra J, Silva A, Sousa P, Campos L, Praxedes E, Bezerra L, Silva AR.** Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu* L., 1758) epididymal sperm using extenders based on Tris and powdered coconut water (ACP®-116c). *Zygote*, v.26, n.4, p.301-307, 2018.
- Bhat GR, Sofi KA.** Oocyte and embryo preservation in wild animals: an update. *Cryo Let*, v.42, n.5, p.251-260, 2021
- Borges AA, Lima GL, Queiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Conservation of somatic tissue derived from collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) using direct or solid-surface vitrification techniques. *Cytotechnology*, v.69, n.4, p.643-654, 2017.
- Borges AA, Lira GPO, Nascimento LE, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Isolation, characterization, and cryopreservation of collared peccary skin-derived fibroblast cell lines. *PeerJ*, v.8, e9136, 2020.
- Borges AA, Quiroz Neta LB, Santos MVO, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Combination of ethylene glycol with sucrose increases survival rate after vitrification of somatic tissue of collared peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Pes Vet Bras*, v.38, n.02, 2018.
- Borges AA, Santos MVO, Nascimento LE, Lira GPO, Praxedes ÉA, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Production of collared peccary (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758) parthenogenic embryos following different oocyte chemical activation and in vitro maturation conditions. *Theriogenology*, v.142, p.320-327, 2020.
- Borini A, Bianchi V.** E Seli and A Agarwal (Eds.) Oocyte cryopreservation. In Fertility Preservation. 2012.
- Brahmasani SR, Sontakke S, Ghosh S, Mallapur G, Yadav S, Vasudevan K.** An Introduction to Genetic Resource Banks for Wildlife Conservation. GRB Manual, 2021.
- Bustamante LRC.** *Seleção espermática em amostras ejaculadas e epididimárias de cães domésticos e efeito da adição de fluido prostático*. 2019. 73f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.
- Campbell BK, Hernandez-Medrano J, Onions V, Pincott-Allen C, Aljaser F, Fisher J, McNeilly AS, Webb R, Picton HM.** Restoration of ovarian function and natural fertility following the cryopreservation and autotransplantation of whole adult sheep ovaries. *Hum Reprod*, v.29, n.8, p.1749-1763, 2014.
- Campos LB, Silva AM, Praxedes ECG, Bezerra LGP, Gama Lins TLB, Menezes VG, de Matos MHT, Lima GL, Rodrigues APR, Silva AR.** Vitrification of collared peccary ovarian tissue using open or closed systems and different intracellular cryoprotectants. *Cryobiology*, v.91, p.77-83, 2019.
- Carvalho AA, Faustino LR, Silva CMG, Castro SV, Lopes CAP, Santos RR, Bão SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR.** Novel wide-capacity method for vitrification of caprine ovaries: ovarian tissue cryosystem (OTC). *Anim Reprod Sci*. v.138, p.220–227, 2013.
- Carvalho AA, Faustino LR, Silva CMG, Castro SV, Luz HKM, Rossetto R, Lopes CAP, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Costa APR.** Influence of vitrification techniques and solutions on themorphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology*, v.76, p.933–941, 2011.
- Castelo TS, Silva AM, Bezerra LGP, Costa CYM, Lago AEA, Bezerra JAB, Campos LB, Praxedes ECG, Silva AR.** Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). *Cryobiology*, v.71, n.3, p.442-447, 2015.
- Choi YH, Varner DD, Love CC, Hartman DL, Hinrichs K.** Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction*, v.142, p.529-538, 2011.
- Comizzoli P, e Wildt D.** Cryobanking Biomaterials from Wild Animal Species to Conserve Genes and Biodiversity: Relevance to Human. *Biobank Biom Res*, 2017.
- Comizzoli P, Wildt DE.** Mammalian fertility preservation through cryobiology: value of classical comparative studies and the need for new preservation options. *Reprod Fertil Dev*, v.26, p.91-98, 2014.
- Comizzoli P.** Biobanking and fertility preservation for rare and endangered species. *Anim Reprod*, vol.14, n1, p.30-33, 2017.

- Comizzoli P.** Biotechnologies for wildlife fertility preservation. *Anim Front*, v.5, p.73-78, 2015.
- Coppola L, Cianflone A, Grimaldi AM, Incoronato M, Bevilacqua P, Messina F, Salvatore M.** Biobanking in health care: evolution and future directions. *J Transl Med*, v.17, n.1, p.1-18, 2019.
- Costa CAS, Borges AA, Nascimento MB, Aquino LVC, Silva AR, Oliveira MF, Pereira AF.** Effects of Vitrification Techniques on the Somatic Tissue Preservation of Agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). *Bio Biobank*, v.18, n.3, p.165-170, 2020.
- Cruz RE, Oliveira HGS, Salvarani FM.** Wild animals biobanks: literature review. *Res Soc Dev*, v.11, n.8, 2022.
- Deco-Souza T, Paula TAR, Costa DS, Costa EP, Barros JBG, Araujo GR, Carreta-Jr M.** Comparação entre duas concentrações de glicerol para a criopreservação de sêmen de suçuarana (*Puma concolor*). *Pes Vet Bras*, v.33, n.4, p.512-516, 2013.
- Domingues SFS, Caldas-Bussiere MC, Martins N, Carvalho RA.** Ultrasonographic imaging of the reproductive tract and surgical recovery of oocytes in *Cebus apella* (Capuchin monkeys). *Theriogenology*, v.68, p.1251-1259, 2007.
- Domingues SFS.** Semen coagulum liquefaction; sperm activation and cryopreservation of capuchin monkey (*Cebus apella*) semen in coconut water solution (CWS) and TES-TRIS. *Anim Reprod Sci*, v.123, p.75-80, 2011.
- Erdmann RH, Blank MH, Ribeiro RN, Oliveira MJD, Cubas ZS, Pradie J, Goularte KL, Moreira N.** Cryopreservation of margay (*Leopardus wiedii*) spermatozoa: effects of different extenders and frozen protocols. *Theriogenology*, v.143 n.1, p.27-34, 2020.
- Erdmann RH.** *Protocolos de criopreservação de sêmen em felídeos do gênero Leopardus e quantificação de metabólitos fecais de andrógenos e glicocorticoides.* 2014. 142. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.
- Erdmann, R. H.** *Exame reprodutivo, contenção farmacológica e Criopreservação de sêmen em gato-domato-pequeno (Leopardus tigrinus Schreber, 1775).* 2005. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, 2005.
- Evangelista CR, Oliveira H, Salvarani F.** Biobancos de animais selvagens: revisão de literatura. *Res Soc Dev*, v.11, n.8, 2022.
- Fayomi AP, Peters K, Sukhwani M, Valli-Pulaski H, Shetty G, Meistrich ML, Houser L, Robertson N, Roberts V, Ramsey C, Hanna C, Hennebold JD, Dobrinski I, Orwig KE.** Autologous grafting of cryopreserved prepubertal rhesus testis produces sperm and offspring. *Science*. v.363, p.1314-1319, 2019.
- Folch J, Cocero MJ, Chesné P, Alabart JL, Domínguez V, Cognié Y, Vignon X.** First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. *Theriogenology*, v.71, p.1026-1034, 2009.
- García-Martínez T, Mogas T, Mullen SF, Martínez-Rodero I, Gulieva RE, Higgins AZ.** Effect of cryoprotectant concentration on bovine oocyte permeability and comparison of two membrane permeability modelling approaches. *Sci Report*, v.11, 2021.
- Gastal GDA, Aguiar FLN, Rodrigues APR, Scimeca JM, Apgar GA, Banz WJ, Feugang JM, Gastal EL.** Cryopreservation and in vitro culture of white-tailed deer ovarian tissue. *Theriogenology*, v.113, p.253-260, 2018.
- Gavin-Plagne L, Perold F, Osteil P.** Insights into Species Preservation: Cryobanking of Rabbit Somatic and Pluripotent Stem Cells. *Int J Mol Sci*, v.21, n.19, p.7285, 2020.
- Gómez MC, Pope CE, Giraldo A, Lyons LA, Harris RF, King AL, Dresser BL.** Birth of African wildcat cloned kittens born from domestic cats. *Clon Stem Cells*, v.6, p.247-258, 2004.
- Gómez MC, Pope CE, Kutner RH, Ricks DM, Lyons LA, Ruhe M, Reiser J.** Nuclear transfer of sand cat cells into enucleated domestic cat oocytes is affected by cryopreservation of donor cells. *Clon Stem Cells*, v.10 p.469-484, 2008.
- Hinkle K, Orwig KE, Valli-Pulaski H, Taylor S, Van Leeuwen K, Carpentieri D, Walsh A.** Cryopreservation of ovarian tissue for pediatric fertility. *Bio Biobank*, v.19, p.30-135, 2021.
- Hussain SA, Lessard C.; Anzar M.** Quantification of damage at different stages of cryopreservation of endangered North American bison (*Bison bison*) semen and the effects of extender and freeze rate on post-thaw sperm quality. *Anim Reprod Sci*, v.129, p. 171-179, 2011.
- Jewgenow K, Songsasen N.** Reproduction and advances in reproductive studies in carnivores. In: Holt WV, Brown JL, Comizzoli P, editors. *Reproductive sciences in animal conservation.* first ed. New York: Springer; 2014. p.205-39.
- Jin B, Kleinhans FW, Mazur P.** Survivals of mouse oocytes approach 100% after vitrification in 3-fold diluted media and ultra-rapid warming by an IR laser pulse. *Cryobiology*, v.68, n.3, p.419-430, 2014.
- Kaneko T, Nakagata N.** Relation between storage temperature and fertilizing ability of freeze-dried mouse

- spermatozoa. *Comp Med*, v.55, n.2, p.140-44, 2005.
- Kaneko T, Serikawa T.** Long-term preservation of freeze-dried mouse spermatozoa. *Cryobiology*, v.64, n.3, p.211-14, 2012b.
- Kaneko T, Serikawa T.** Successful long-term preservation of rat sperm by freeze-drying. *PLoS One*, v.7, n.4, e35043, 2012a.
- Kaneko T.** The latest improvements in the mouse sperm preservation. *Methods Mol Biol*, a, 1092, p.357-65. 2014a.
- Kay AG, Hoyland JA, Rooney P, Kearney JN, Pegg DE.** A liquidus tracking approach to the cryopreservation of human cartilage allografts, *Cryobiology*, v.71, n.1, p.77-84, 2015.
- Keskintepe L, Hasan A, Khan I, Stice L.** Bovine embryo development after lyophilized sperm injection. *Theriogenology*, v.55, p.505, 2001.
- León-Quinto T, Simón MA, Cadenas R, Martínez A, Sern A.** Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Cryobiology*, v.68, p.227-233, 2014.
- Lermen D, Blömeke B, Browne R, Clarke A, Dyce PW, Fixemer T, Fuhr GR, Holt WV, Jewgenow K, Lloyd RE, Lötters S, Paulus M, Mcgregor RG, Rapoport DH, Rawson D, Ringleb J, Ryder OA, Spörl G, Schmitt T, Veith M, Müller P.** Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes. *Mol Eco*, v.18, p.1030-1033, 2009.
- Lima GL, Luz VB, Lunardi FO, Souza ALP, Peixoto GCX, Rodrigues APR, Oliveira MF, Santos RR, Silva AR.** Effect of cryoprotectant type and concentration on the vitrification of collared peccary (*Pecari tajacu*) ovarian tissue. *Anim Reprod Sci*, v.205, p.126-133, 2019.
- Lima J, Leão D, Sampaio R, Brito A, Santos R, Miranda M, Domingues S.** Embryo production by parthenogenetic activation and fertilization of in vitro matured oocytes from *Cebus apella*. *Zygote*, v.21, n.2, p.162-166, 2013.
- Lindau R, Vondra S, Spreckels J, Solders M, Svensson-Arvelund J, Berg G, Pollheimer J, Kaipe H, Jenmalm MC, Ernerudh J.** Decidual stromal cells support tolerance at the human foetal-maternal interface by inducing regulatory M2 macrophages and regulatory T-cells. *J Reprod Immun*, v.146, 2021.
- Lira GPO, Borges AA, Nascimento MB, Aquino LVC, Moura LFMP, Silva HVR, Ribeiro, LR, Oliveira MF, Pereira AF.** Effects of somatic tissue cryopreservation on puma (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) tissue integrity and cell preservation after in vitro culture. *Cryobiology*, v.101, p.52-60, 2021.
- Loi P, Modlinski JA, Ptak G.** Interspecies somatic cell nuclear transfer: A salvage tool seeking first aid. *Theriogenology*, v.76, p.217-228, 2011.
- Lombardo T, Dotti S, Villa R, Cinotti S, Ferrari M.** Veterinary biobank facility: development and management for diagnostic and research purposes. In *Veterinary Infection Biology: Molecular Diagnostics and High-Throughput Strategies*. Hum Press, p. 43-60, 2015.
- Lopes STP, Sousa Filho MAC, Silva JHL, Barros FN, Castelo Branco MA, Melo LSE, Souza JAT.** Eficiência de duas técnicas de recuperação de espermatozoides epididimários de cães e avaliação seminal pós-criopreservação. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.72, n.5, p.1758-1766, 2020.
- Machado, LC, Roballo, KCS, Cury, FS, Ambrósio, CE.** Female reproductive system morphology of crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and cryopreservation of genetic material for animal germplasm bank enrichment. *Anat Histol Embryol*, v.46, p.539-546, 2017.
- Magalhães LC, Bhat MH, Freitas JLS, Melo LM, Teixeira DIA, Pinto LCA, Câmara LMC, Duarte JMB, Freitas VJF.** The Effects of Cryopreservation on Different Passages of Fibroblast Cell Culture in Brown Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*). *Bio Biobank*, v.15, n.5, p.463-468, 2017.
- Mogollón-Waltero EM, Mello MRB, Burla-Días AJ.** Cloning bovine embryos from somatic cells. *Orinoquia*, v.18, p.95-104, 2014.
- Moreira SSJ, Silva AM, Souza ALP, Praxedes ECG, Souza Junior JBF, Pereira AF, Silva AR.** Cryopreservation of Spix's yellow-toothed cavy epididymal sperm using Tris- and coconut water-based extenders supplemented with egg yolk or Aloe vera. *Cryobiology*, v.99, p.40-45, 2021.
- Okita K, Nagata N, Yamanaka S.** Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Circulation Research*, v.109 p.720-721, 2011.
- Oliveira LRM, Praxedes ÉA, Silva MB, Ribeiro LR, Silva HVR, Pereira AF.** Comparative effect of cryoprotectant combinations on the conservation of somatic cells derived from jaguar, *Panthera onca*, towards the formation of biologic banks. *A Acad Bras Ciênc*, v.93, n.4, 2021.
- Palomar RA, Molina BI.** Sperm parameters that play a major role in the assessment of semen quality after cryopreservation, *J assist reprod genet*, v.34, n.10, p.1271-1276, 2017.
- Paz RCR, Zuge RM, Barnabe VH.** Frozen Jaguar (*Panthera onca*) sperm capacitation and ability to penetrate zona free hamster oocytes. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v. 44, n. 5, p. 337-344, 2007.

- Pegg DE.** Equations for obtaining melting points and eutectic temperatures for the ternary system dimethylsulphoxide/sodium chloride/water. *CryoLetters*, v.7, p.387-394, 1986.
- Pothana L, Devi L, Goel S.** Cryopreservation of adult cervid testes. *Cryobiology*, v.74 p.103–109, 2017.
- Praxedes ÉA, Borges AA, Santos MV, Pereira AF.** Use of somatic cell banks in the conservation of wild felids. *Zoo Biol*, v.37, p.258-263, 2018.
- Praxedes ÉC, Lima GL, Bezerra LGP, Santos FA, Bezerra MB, Guerreiro DD, Rodrigues AP, Domingues SFS, Silva AR.** Development of fresh and vitrified agouti ovarian tissue after xenografting to ovariectomised severe combined immunodeficiency (SCID) mice. *Reprod Fertil Dev*; v.30, p.459–468, 2018.
- Praxedes ÉCG, Bezerra LGP, Moreira SSJ, Santos CS, Brasil AV, Silva AM, Guerreiro DD, Pereira AF, Rodrigues APR, Silva AR.** Microbiological load and preantral follicle preservation using different systems for ovarian tissue vitrification in the red-rumped agouti. *Cryobiology*, v.103, p.123-128, 2021.
- Praxedes ÉCG, Lima GL, Silva AM, Apolinário CAC, Bezerra JAB, Souza ALP, Oliveira MF, Rodrigues APR., Silva AR.** Characterisation and cryopreservation of the ovarian preantral follicle population from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Reprod Fert Dev*, v.29, p.594-602, 2015.
- Praxedes, ÉA, Oliveira LRM, Silva MB, Borges AA, Santos MVO, Silva HVR, Oliveira MF, Silva AR, Pereira AF.** Effects of cryopreservation techniques on the preservation of ear skin – An alternative approach to conservation of jaguar, *Panthera onca* (Linnaeus, 1758). *Cryobiology*, v.88, p.15-22, 2019.
- Prentice JR, Anzar M.** Cryopreservation of Mammalian oocyte for conservation of animal genetics. *Vet Med Inter*, 2010.
- Rhiannon BL, Mooney A, Pettit MT, AE, Morgan L, Drake GJ, Appeltant R, Walker SL, Gillis JD, Hvilsom C.** Resurrecting biodiversity: advanced assisted reproductive technologies and biobanking. *Reprod Fert*, v.3, n.3, p.121–146, 2022.
- Ribeiro RN, Almeida ARG, Martinez AC.** Métodos de coleta de sêmen em felídeos. *Enc Bio*, v.16 n.29, p.1, 2019.
- Rodrigues LLV, do Nascimento MB, Costa de Aquino LV, Caritas BSMD, Silva AR, Oliveira MF, Pereira AF.** Evaluation of different cryoprotectant solutions for the cryopreservation of somatic tissues of *Dasyprocta leporina* (Linnaeus, 1758). *Cryo Letters*, v.42, n.4, p.210-219, 2021.
- Rola, LD, Zanetti, Eveline S, Duarte JMB.** Avaliação de dois métodos para condicionamento e coleta de sêmen em quatro espécies do gênero *Mazama*. *Pesq Vet Bras*, v.32 n.7, p.658-662, 2012.
- Santos LC, Cubas PH.** Colheita e conservação de Amostras biológicas. In: Tratado de Animais Selvagens. *Roca*, p.1690 – 1702, (2014).
- Santos MVO, Silva HVR, Bezerra LGP, Oliveira LRM, Oliveira MF, Alves ND, Silva LDM, Silva AR, Pereira AF.** Heterologous in vitro fertilization and embryo production for assessment of jaguar (*Panthera onca* Linnaeus, 1758) frozen-thawed semen in different extenders. *Anim Reprod*, v.19, n.1, 2022.
- Saragusty J, Arav A.** Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification, *Reproduction*, v.141, n.1, p.1-19, 2011.
- Silva A, Bezerra J, Campos L, Praxedes É, Lima G, Silva A.** Characterization of epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831) recovered by different methods. *Acta Zoo*, v.98, 2016.
- Silva AM, Bezerra LGP, Praxedes ECG, Moreira SSJ, Souza CMP, Oliveira MF, Pereira AF, Comizzoli P, Silva AR.** Combination of intracellular cryoprotectants preserves the structure and the cells proliferative capacity potential of adult collared peccary testicular tissue subjected to solid surface vitrification, *Cryobiology*, v.91, p.53-60, 2019.
- Silva AM, Pereira AF, Silva, AR.** Criopreservação e cultivo de tecido testicular como ferramenta na conservação de mamíferos silvestres. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 43, p. 229-234, 2019.
- Silva AM, Pereira AG, Bezerra LGP, Moreira SSJ, Pereira AF, Oliveira MF, Comizzoli P, Silva AR.** Cryopreservation of Testicular Tissue from Adult Red-Rumped Agoutis (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). *Animals*, v.12, n.6, p.738, 2022.
- Silva AM, Pereira AG, Bezerra LGP, Moreira, SSJ, Pereira AF, Oliveira MF, Comizzoli P, Silva AR.** Cryopreservation of Testicular Tissue from Adult Red-Rumped Agoutis (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758). *Animals*, v.12, p.738, 2022.
- Silva AM, Pereira AG, Brasil AV, Macedo LB, Souza-Junior J, Moura CEB, Pereira AF, Oliveira MF, Comizzoli P, Silva AR.** Influence of freezing techniques and glycerol-based cryoprotectant combinations on the survival of testicular tissues from adult collared peccaries. *Theriogenology*, v.167, p.111-119, 2021.

- Silva AM, Praxedes ECG, Campos LB, Bezerra LGP, Moreira SSJ, Maia KM, Souza ALP, Silva AR.** Epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies sperm successfully cryopreserved in Tris extender with 6% glycerol and 20% egg yolk. *Anim Reprod Sci*, v.191, p.64-69, 2018.
- Silva AR, Morato RG, Silva LDM.** The potential of gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim Reprod Sci*, v.81, p.159-175, 2004.
- Silva AR, Silva AM, Pereira AF.** Conservação de germoplasma de mamíferos silvestres da fauna brasileira visando a implantação de biobancos. In: IX Congresso Norte e Nordeste de Reprodução Animal (CONERA 2018), 10 a 12, 2018, Belém. *Anais...* Belém, PA: Rev Bras Reprod Anim, v.42, n.3-4, p.120-124, 2018.
- Silva AR, SOUZA ALP, Santos EAA, Lima GL, Peixoto GCX, Souza PCS, Castelo TS.** Formação de bancos de germoplasma e sua contribuição para a conservação de espécies silvestres no Brasil. *Ciênc Anim*, v.22, n.1, 2012.
- Silva MA, Peixoto GCX, Lima GL, Bezerra JAB, Campos LB, Paiva ALC, Paula VV, Silva A.R.** Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various concentrations of egg yolk and glycerol. *Theriogenology*, v.78, n.3, p.605-611, 2012.
- Silva MA, Peixoto GCX, Santos EAA, Castelo TS, Oliveira MF, Silva AR.** 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 MCC, Araujo GR, Kersul MG, Neto PNJ, Deco-Souza T, Miranda FR.** Pharmacological semen collection and cryopreservation of the Giant Anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) in the wild. *Rev Bras Reprod Anim*, v.43, n.2, p.705, 2019.
- Souza ALP, Lima GL, Peixoto GCX, Silva AM, Oliveira MF, Silva AR.** Use of Aloe vera-based extender for chilling and freezing collared peccary (*Pecari tajacu*) semen. *Theriogenology*, v.85, n.8, p.1432-1438, 2016.
- Strand J, Thomsen H, Jensen JB, Marcussen C, Nicolajsen TB, Skriver MB, Pertoldi C.** Biobanking in amphibian and reptilian conservation and management: opportunities and challenges. *Con Genet Res*, v.12, n.4, p.709-725, 2020.
- Strand J, Thomsen H, Jensen JB, Marcussen C, Nicolajsen TB, Skriver MB, Pertoldi C.** Biobanking in amphibian and reptilian conservation and management: opportunities and challenges. *Con Genet Res*, v.12, n.4, p.709-725, 2020.
- Taylor MJ, Weegman BP, Baicu SC, Giwa SE.** New approaches to cryopreservation of cells, tissues, and organs. *Transf Med Hemot*, v.46, p.97-215 2019.
- Tebet JM, Souza FF, Martins MIM, Chirinéa VH, Carvalho JC, Papa FO, Lopes MD.** Assessment of thawed sperm quality from feline species: Ocelot (*Leopardus pardalis*) and oncilla (*Leopardus guttulus*). *Theriogenology*, v.177, p. 56-62, 2022.
- Tedeschi VHP, Tsunoda DF.** Banco de dados sobre biodiversidade: Uma análise temporal da produção científica. *Rev Cien Mul Núcl do Conhec*, v.6, n.9, p.68-81, 2020.
- Tharasanit T, Thuwanut P.** Oocyte cryopreservation in domestic animals and humans: principles, techniques and updated outcomes. *Animals*, v.11, 2021.
- Van DJ, Davidson P, Bour-Jordan H, Bowman-Carpio L, Boyle D, Dubinett S, Dry S.** Assessing researcher needs for a virtual biobank. *Bio Biobank*, v.15, n.3, p.203-210, 2016).
- Varesi S.** *Canine epididymal spermatozoa: characteristics, collection and cryopreservation.* 2012. 115f. Tese (Doctoral Program in Veterinary Clinical Sciences) - Università degli Studi di Milano, Milano, 2012.
- Vaught J, Lockhart NC.** The evolution of biobanking best practices. *Clin chim act*, v.413, n.19-20, p.1569-1575, 2012.
- Wanderley LS, Luz HKM, Faustino LR, Lima IMT, Lopes CAP, Silva AR, Bão SN, Campello CC, Rodrigues APR, José Ricardo de Figueiredo.** Ultrastructural features of agouti (*Dasyprocta aguti*) preantral follicles cryopreserved using dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propanediol. *Theriogenology*, v.77, n.2, p.260-267, 2012.
- Xu Z, Wanga X, Wua Y, Menga Y, Wua F, Zhoua N, Chenb W, Yea B, Liuc J, Zhoua Y.** Slow-controlled freezing versus speed-cooling for cryopreservation of whole guinea pig ovaries. *Theriogenology*, v.77, p.483-491, 2012.
- Yamanaka S.** Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*, v.10, p.678-684, 2012.
- Zimkus BM, Hassapakis CL, Houck ML.** Integrating current methods for the preservation of amphibian genetic resources and viable tissues to achieve best practices for species conservation. *Amp Rep Con*. v.12, n.2, p.1-27, (2018).