

A contribuição das biotecnologias reprodutivas na conservação de espécies selvagens

The contribution of reproductive biotechnologies to the conservation of wild species

Ricardo José Garcia Pereira^{1*}, Marcel Henrique Blank¹, Julia Roismann¹

¹Grupo de Estudos para Multiplicação de Aves (GEMA), Departamento de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (FMVZ – USP), São Paulo, SP, Brazil

Resumo

Há um consenso entre pesquisadores de todo mundo de que as atividades humanas têm provocado um declínio sem precedentes na biodiversidade global, com a perda de espécies ocorrendo a um ritmo de 1.000 a 10.000 vezes superior à taxa natural de extinção. Este panorama alarmante faz com que programas de conservação *in situ* e *ex situ* recorram a criação de criobancos e ao desenvolvimento de tecnologias de reprodução assistida (TRA) para assegurar a diversidade genética de muitas espécies. Todavia, a aplicação bem-sucedida dessas ferramentas depende do aprimoramento de protocolos espécie-específicos e do conhecimento aprofundado da fisiologia reprodutiva dos táxons de interesse. Infelizmente, os maiores avanços em ambas as áreas ocorrem em mamíferos sendo que outros grupos como anfíbios e peixes cartilagosos correm maiores riscos de extinção. Desse modo, este texto tem por objetivo discutir as biotecnologias mais empregadas nas cinco classes de vertebrados para propagação e conservação de espécies ameaçadas, ressaltando suas benesses e limitações.

Palavras-chave: biodiversidade; conservação; criobancos; reprodução assistida; reprodução em cativeiro

Abstract

*There is a consensus among researchers around the world that human activities have caused an unprecedented decline in global biodiversity, with the loss of species occurring at a rate 1,000 to 10,000 times higher than the natural rate of extinction. This alarming scenario has led to *in situ* and *ex situ* conservation programs resorting to the creation of biobanks and the development of assisted reproduction technologies (ART) to ensure the genetic diversity of many species. However, the successful application of these tools depends on the improvement of species-specific protocols and in-depth knowledge of the reproductive physiology of the taxa of interest. Unfortunately, the greatest advances in both areas have been made in mammals, while other groups such as amphibians and cartilaginous fish are at greater risk of extinction. The aim of this article is therefore to discuss the biotechnologies most commonly used in the five vertebrate classes for the propagation and conservation of threatened species, highlighting their benefits and limitations.*

Keywords: biodiversity; conservation; cryobanks; assisted reproduction; captive breeding

Introdução

Nos últimos 500 anos, os seres humanos desencadearam alterações no meio ambiente que têm ocasionado uma onda de extinção, ameaça e declínio de espécies selvagens comparável, tanto em taxa como em magnitude, às cinco extinções em massa anteriores da história da Terra (Barnosky et al., 2011). Semelhantemente aos eventos anteriores, os efeitos desta “sexta onda de extinção” estendem-se a todos os grupos taxonômicos, mas este também pode ser considerado muito mais impactante a alguns grupos táxons (i.e., anfíbios e peixes cartilagosos), visto que eles podem apresentar maior susceptibilidade às alterações ambientais ou receber maior pressão da caça e exploração (IUCN, 2024). Conseqüentemente, o número de extinções e possíveis extinções (i.e., espécies ainda categorizadas como criticamente ameaçadas, mas que possivelmente já estejam extintas) tem aumentado drasticamente nas últimas décadas. Recentemente, o Brasil presenciou a extinção de quatro espécies de aves endêmicas, enquanto outras apresentam número de animais remanescentes tão reduzido que é improvável que elas sobrevivam sem estratégias para aumentar suas populações (Butchart et al., 2018). Não obstante, estudos tem demonstrado que 33% das espécies listadas como “não ameaçadas” estão em declínio, no qual excede amplamente o número de espécies que

*Correspondência: ricpereira@usp.br

Recebido: 29 de abril de 2023

Aceito: 25 de maio de 2023

exibem aumento populacional (Finn et al., 2023).

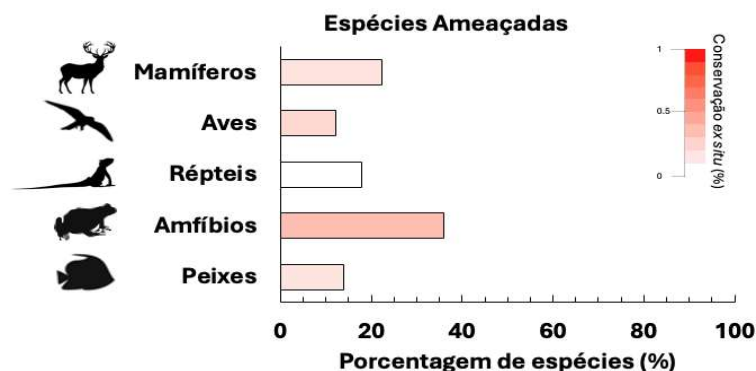


Figura 1. Porcentagem de espécies categorizadas como ameaçadas de extinção (ou seja, número de espécies listadas como vulnerável, ameaçada e criticamente ameaçada dividido pelo número total de espécies) para cada grupo taxonômico. O gradiente de cores do gráfico de barras indica a representatividade de cada grupo em programas de conservação ex situ (0-100%), considerando o número total de espécies em programas de conservação dividido pelo número total de espécies ameaçadas. A base de dados utilizada foi fornecida pela lista vermelha de espécies ameaçadas da IUCN <http://www.iucnredlist.org>. O número total de espécies e espécies ameaçadas para cada classe taxonômica foi a seguinte: Mamíferos (5980 espécies e 1339 espécies ameaçadas), Aves (11197 espécies e 1354 espécies ameaçadas), Répteis (10254 espécies e 1834 espécies ameaçadas), anfíbios (8020 espécies e 2876 espécies ameaçadas) e Peixes (27042 espécies e 3778 espécies ameaçadas).

Tomado em conjunto, tais dados enfatizam a importância da elaboração de programas de conservação que objetivam manter populações suficientemente grandes, e com diversidade genética suficiente, para serem sustentáveis. Neste sentido, a reprodução ex situ tem um papel fundamental na conservação, sendo uma apólice de seguro vital para a preservação de espécies ameaçadas, promovendo a educação ambiental e investigação espécie-específica da biologia animal (Bolton et al. 2022). Como resultado, espécies anteriormente extintas na natureza como a ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*), cavalo-de-przewalski (*Equus ferus przewalski*), e furão-de-patas-negras (*Mustela nigripes*), vem sendo reintroduzidas em seu habitat natural por meio da reprodução em cativeiro (Wolf et al., 2000; Turghan et al., 2022; Purchase et al., 2024). Além disso, a utilização de técnicas de reprodução assistida (TRAs) como; coleta e criopreservação de espermatozoides, inseminação artificial (IA), produção in vitro de embriões (PIVE), e transferência de embriões (TE), são algumas das técnicas empregadas na conservação de espécies ameaçadas de extinção. A utilização dessas técnicas tem garantido o incremento das taxas reprodutivas, além de permitir o intercâmbio do material genético entre diferentes instituições, garantindo que indivíduos geneticamente valiosos que naturalmente não são capazes de reproduzir naturalmente possam reproduzir. Contudo, para alguns grupos taxonômicos como; peixes, aves, répteis e anfíbios, o estado da arte das TRAs precisa ser aprimorado para, de fato, poder ser empregado com sucesso em programas de reprodução assistida. A grande quantidade de gema depositada no ovócito e zigoto torna o congelamento impraticável em espécies ovíparas e ovovivíparas como peixes, anfíbios, répteis e aves (Clulow e Clulow, 2016; Rivers et al., 2020; Blank et al., 2024). Não obstante, os espermatozoides de espécies pertencentes a algumas dessas classes (p.e., anfíbios, aves e répteis) são altamente susceptíveis à criopreservação devido a particularidades da membrana celular dos espermatozoides (Clulow e Clulow, 2016; Blank et al., 2020; Blank et al., 2022).

Como apoio a estes procedimentos, a geração de culturas e linhas celulares utilizando células somáticas e germinativas têm fornecido outra fonte de criobanco, no qual podem ser utilizadas na geração de células tronco induzidas (iPSc), na transferência nuclear com células somáticas (TNCS) e no transplante celular para a geração de animais quiméricos. Apesar do crescente avanço das TRAs em alguns grupos prioritários como anfíbios, é evidente a necessidade de maiores esforços de conservação ex situ para todos os vertebrados (Figura 1), no qual o número de espécies avaliadas em programas de conservação representa menos de 16% do número de espécies consideradas ameaçadas de extinção. Diante do apresentado, a presente revisão visa apresentar as biotecnologias mais empregadas nas cinco classes de vertebrados para propagação e conservação de espécies ameaçadas, ressaltando suas vantagens e limitações. Além disso, discutiremos brevemente algumas técnicas que já foram utilizadas, mas com cunho exploratório, para que o leitor possa vislumbrar as reais aplicações para cada grupo taxonômico.

Biotechnologias reprodutivas em Peixes

Conforme mencionado anteriormente, o grave declínio global tanto da abundância quanto da biodiversidade de peixes levou a criação de estratégias englobando não só medidas de conservação *in situ* (p.e., estabelecimento de áreas de proteção marinha e a implementação de programas de reforço populacional), como também ações *ex situ* com a manutenção de pequenas populações viáveis de peixes em aquários acreditados, reprodução sob cuidados humanos, e a preservação de germoplasma em criobancos (Mayer & Psenicka, 2024). Neste sentido, a criopreservação de sêmen tem sido realizada com sucesso em mais de 200 espécies, porém em sua grande maioria peixes de importância comercial (Mayer & Psenicka, 2024). Porém, à grande diversidade morfológica e funcional dos espermatozoides em peixes e os curtos períodos de reprodução nas espécies sazonais retardam a adequação das técnicas de congelamento ou até mesmo inviabilizam a transferência desses processos entre espécies, gêneros ou famílias (Rivers et al., 2020). Concomitantemente, a criopreservação de oócitos, zigotos ou embriões é complicada devido ao tamanho e complexidade dessas estruturas, a baixa relação superfície/volume, e o elevado teor de lipídeos, fatores que juntos dificultam a penetração dos crioprotetores e levam a formação de cristais de gelo durante o congelamento (Mayer & Psenicka, 2024; Rivers et al., 2020). Perante tais desafios na formação de biobancos para peixes ameaçados, pesquisadores se voltaram ao desenvolvimento de técnicas utilizando células germinativas (p.e., células primordiais germinativas – PGCs, spermatogonias e oogonias), dada a possibilidade de congelamento, cultivo e transplantes intra- e interespecíficos empregando essas células (Mayer & Psenicka, 2024; Rivers et al., 2020). Essa ferramenta permite que testículos e ovários das espécies de interesse possam ser coletados e congelados, para que posteriormente suas células sejam transplantadas em receptores estéreis. A produção de peixes receptores estéreis pode ser alcançada usando métodos como poliploidia induzida, hibridização interespecífica, knockdown de genes da linhagem germinativa, hipertermia, e tratamento químico (Mayer & Psenicka, 2024).

Outro recurso muito empregado na aquicultura comercial é a manipulação hormonal de peixes para indução reprodutiva, visto que em muitas espécies as condições ambientais estimulatórias (p.e., fotoperíodo, temperatura, substrato, etc.) são desconhecidas, impraticáveis ou até mesmo impossíveis de mimetizar artificialmente (Mylonas et al., 2010). Desse modo, hormônios exógenos são empregados na aquicultura como ferramentas de manejo para incrementar a eficiência na produção de ovos, aumentar a espermição, induzir maturação dos gametas, realizar fertilização artificial, facilitar a operação das incubadoras, etc. Essa diversidade de aplicações atrelada a praticidade do método torna-o extremamente atraente na conservação de peixes ameaçados (Budi et al., 2023; Mylonas et al., 2010). Entretanto, não é objetivo deste texto discutir detalhes referentes aos hormônios, protocolos, frequência, vias de administração, e etc., tendo em vista a existência de diversos livros e artigos científicos de revisão especializados no tema.

Biotechnologias reprodutivas em Anfíbios

Os anfíbios são indiscutivelmente a classe de vertebrados com o maior número de espécies globalmente ameaçadas, e ao mesmo tempo o grupo com o menor volume de pesquisas, investimentos e avanços na conservação, inclusive no que se refere ao desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida (Bolton et al., 2022; Della Togna et al., 2020; Strand et al., 2020). O fato da maioria das espécies do grupo realizar fertilização externa (particularmente anuros), faz com que a fertilização *in vitro* (FIV) seja bem mais simples quando comparada àquela utilizada em mamíferos (Silla et al., 2021). Embora essa metodologia tenha sido descrita a mais de 60 anos, a mesma tem sido empregada predominantemente em pesquisas não relacionadas a conservação de espécies (Clulow et al., 2019). Porém, com o advento de manipulações hormonais visando a liberação de gametas a fertilização artificial em anfíbios expandiu, sendo atualmente aplicada na reprodução de diversas espécies ameaçadas de anuros (Browne et al., 2006; Byrne & Silla, 2010; Kouba et al., 2012; Waggener & Carroll, 1998).

O sêmen de anfíbios pode ser surpreendentemente mantido a 4°C por até 30 dias mantendo sua viabilidade (Browne et al., 2001), e essa capacidade fez com que a refrigeração de sêmen seguida pela fertilização artificial fosse aplicada em mais de 40 espécies de anfíbios. Protocolos de criopreservação de sêmen são também empregados com sucesso nesta classe, e ambas metodologias auxiliam na conservação de anuros por meio da estocagem de testículos inteiros, fragmentos testiculares ou urina com esperma (Poo & Hinkson, 2019). Apesar disso, semelhante aos peixes, o sucesso no congelamento de oócitos e embriões é extremamente baixo devido a quantidade de vitelo e ao grande diâmetro dessas estruturas (Bolton et al., 2022). O uso de biotecnologias que utilizem material genético de células ou tecidos somáticos para gerar

descendentes, como transferência nuclear de células somáticas e as células-tronco pluripotentes induzidas, também oferece novas possibilidades para o reestabelecimento da biodiversidade em anfíbios (Bolton et al., 2022). Todavia, um problema frequente no congelamento e cultivo de fragmentos desses animais é o alto grau de contaminação por bactérias e fungos. Em virtude dos resultados promissores em peixes, alguns pesquisadores vislumbram a futura aplicação dos transplantes de células germinativas (PGCs e SSCs) na conservação de anfíbios ameaçados (Clulow et al., 2022).

Biotecnologias reprodutivas em Répteis

Segundo Clulow et al. (2022), os répteis foram por muito tempo negligenciados, em comparação a outros vertebrados, no que diz respeito ao desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida. Além disso, divergências evolutivas ancestrais nesta classe suscitaram uma ampla diversidade e complexidade dos sistemas reprodutivos tais como: paternidade múltipla, seleção sexual pós-copulatória, grandes variações genitais, ovos amnióticos grandes e amarelados, desenvolvimento embrionário (oviparidade, ovoviviparidade e viviparidade), complexo sistemas de determinação do sexo (que variam dos sistemas XY/XX e ZZ/ZW a determinação dependente da temperatura), a inversão do sexo, o armazenamento prolongado de esperma no trato feminino, o controle do momento do nascimento, e a partenogênese (Van Dyke et al., 2021). Por conseguinte, estas peculiaridades dificultam ainda mais a adequação das diferentes biotecnologias para um vasto número de gêneros ou famílias.

De modo geral, existem dois meios de coleta de sêmen em répteis, os antemortem (massagem celomática, massagem fállica digital, vibroestimulação e a electroejaculação) e os post-mortem (maceração do epidídimo e o esvaziamento dos ductos deferentes) (Perry, 2021). Em termos de criopreservação, a pouca literatura existente em répteis lida somente com congelamento de sêmen. Um fato interessante é que entre os trabalhos relativos a protocolos de estocagem de espermatozoides em lagartos, há casos de refrigeração por até 4 dias antes da criopreservação com níveis aceitáveis motilidade e integridade de membrana (acima de 30%) (Campbell et al., 2021). Contudo, outro detalhe importante é que a grande maioria dos trabalhos envolvendo criopreservação de sêmen é com Squamata (lagartos e serpentes), circunstância que cria um dilema na conservação de répteis visto que um grande número de quelônios e crocodilianos figura nas listagens de animais ameaçados (Clulow et al., 2022). A inseminação artificial com efetiva fertilização, oviposição/parto e nascimento de filhotes só foi registrada em três espécies de serpentes e uma de crocodilo, os quais foram realizados com sêmen fresco ou refrigerado (Perry, 2021). Infelizmente, até o momento, não existem relatos em répteis de coleta e criopreservação de oócitos ou embriões (pelos mesmos motivos anteriormente descritos para peixes e anfíbios), FIV, injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), clonagem ou coleta, congelamento e transplantes de células germinativas de (PGCs, espermatogônias ou oogônias) (Perry, 2021, Clulow et al., 2022). Essa lacuna no desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas nesta classe traz sérias limitações para a criação de criobancos e para o manejo de programas de conservação de répteis *in situ* e *ex situ*, evidenciando a necessidade de pesquisadores comprometidos com o tema.

Biotecnologias reprodutivas em Aves

Apesar de várias biotecnologias já terem sido descritas e empregadas na reprodução de aves selvagens, atualmente programas de conservação *ex situ* de espécies ameaçadas ainda se baseiam sobremaneira nos métodos de incubação artificial de ovos e inseminação artificial (Pereira, 2014). O uso limitado de ferramentas como manipulações hormonais (seja na indução de comportamentos reprodutivos, maximização da produção de sêmen ou óvulos, ou até mesmo indução da oviposição) ocorre na maioria dos casos em virtude da carência de informações sobre os padrões endócrinos que regem a reprodução de muitas espécies (p.e., dinâmica folicular, oscilações circanuais, etc.) (Pereira, 2014). Por essa razão, métodos de monitoramento endócrino não-invasivo (via esteróides fecais, urinários ou de penas) se tornaram muito populares nas últimas décadas dada a possibilidade de coleta de amostras seriadas *in situ* e *ex situ* sem a perturbação dos animais. Além disso, outro obstáculo na aplicação de estimulações hormonais em aves refere-se as alterações significativas de tamanho e forma sofridas pelas gônadas em muitas espécies de reprodução sazonal, eventos que podem levar semanas ou até mesmo meses para serem concluídos, acarretando em uma duração prolongada dos protocolos quando comparados àqueles utilizados em mamíferos (Pereira, 2014). Alternativamente, a manipulação do comprimento do dia (programas de luz) empregados na indústria avícola para estimulação e manutenção da atividade reprodutiva também se traduz como uma biotecnologia reprodutiva aplicável a aves selvagens, dados os relatos do uso dessa ferramenta em diferentes espécies em pesquisas, criadores e zoológicos.

No que tange a colheita de sêmen e inseminação artificial, adaptações bem-sucedidas das técnicas oriundas de aves domésticas já foram amplamente relatadas em vários grupos taxonômicos, e alguns programas de conservação *ex situ* (p.e., grou-americano e falcão peregrino) já demonstraram a aplicabilidade desses métodos no manejo populacional de aves sob cuidados humanos (Pereira, 2014). Existem atualmente quatro alternativas para coleta de sêmen (coleta cooperativa com uso de manequins, massagem digital, cloaca artificial e eletroejaculação), e três possíveis locais no trato reprodutivo feminino para depósito do sêmen durante a inseminação (cloaca, útero e magno). Apesar de possíveis e já reportados em aves, métodos de FIV, cultivo de embriões e ICSI não se configuram atualmente como opções viáveis de biotecnologias reprodutivas para conservação de espécies ameaçadas (Pereira, 2014).

Outros processos habitualmente mencionados na conservação de mamíferos como criopreservação de oócitos e embriões são inexecutáveis em aves devido a seus ovos megalécitos. Ademais, mesmo com os recentes avanços da criopreservação de sêmen em aves domésticas, diferenças interespecíficas na qualidade do sêmen fresco e na suscetibilidade dos espermatozoides ao congelamento têm limitado a utilização desse processo na conservação de aves ameaçadas. Como resultado, da mesma forma que em peixes e anfíbios, novas abordagens de conservação *ex situ* tem sido testadas como o desenvolvimento de criobancos por meio de gônadas embrionárias, PGCs e SSCs. Tais alternativas tornam-se ainda mais palpáveis quando atreladas aos métodos de transplante de células germinativas utilizando hospedeiros geneticamente estéreis. Xenoenxertos de tecido testicular ou ovariano já foram igualmente descritos em literatura, mas não se mostram tão práticas ou eficientes como no caso do uso de células germinativas.

Biotecnologias reprodutivas em Mamíferos

Durante os últimos 100 anos, técnicas de reprodução assistida têm sido implementadas com sucesso inicialmente em mamíferos de laboratório, no qual gradativamente estão sendo repassadas às espécies selvagens com alta prioridade de conservação (Mostramonaco e Sogsasen, 2020). Consequentemente, a grande maioria das biotecnologias reprodutivas evoluíram utilizando o modelo mamífero e, portanto, este grupo tem recebido a grande maioria da atenção de pesquisa (Herrick, 2019). Assim, podemos destacar a IA, TE, FIV, micromanipulação de gametas e embriões, sexagem do sêmen e embriões e criobanco de recursos gnômicos como as principais técnicas aplicadas a mamíferos. A criopreservação de gametas (espermatozoides e oócitos) são exemplos de TRAs que podem facilitar o manejo de espécies ameaçadas, sendo um criobanco aplicado a muitas espécies mamíferas (Erdmann et al., 2020; Bolton et al., 2022; Santiago-Moreno et al., 2023). Em mamíferos, armazenar genes na forma de espermatozoides é extremamente benéfico, pois os espermatozoides são células haploides heterogaméticas reabastecidas indefinidamente e que podem ser facilmente coletadas de diferentes indivíduos geneticamente diversos de uma espécie. Não obstante, o criobanco de genes na forma de espermatozoides permite a aplicação de várias TRAs, sendo a IA a técnica mais eficiente atualmente empregada (Holt e Lloyd, 2009).

Contudo, com o incremento de conhecimento sobre a biologia básica da reprodução, técnicas envolvendo a clonagem ou transferência nuclear com células somáticas e geração de células tronco induzidas (iPSs) podem se tornar parte integrante dos programas de conservação de mamíferos selvagens (Andrabi e Maxwell, 2007). Demonstrações bem-sucedidas da arte podem ser notadas para as populações de furão-de-patas-negras (*M. nigripis*) e cavalo-de-przewalski (*E. przewalski*), cuja amostras coletadas e criopreservadas na década de 80 foram utilizadas no incremento genético da população e, mais recentemente, na geração de progênieis utilizando técnicas de clonagem (Bolton et al., 2022). A grande diversidade de espécies mamíferas torna a padronização das técnicas limitada, sendo assim extremamente necessários estudos espécie-específicos para atingir uma otimização dos protocolos para cada espécie. Além disso, a grande parte das espécies mamíferas ameaçadas ainda não possuem bancos criogênicos e, por conseguinte, tais oportunidades ainda não estão disponíveis, limitando as opções abertas aos conservacionistas e gestores populacionais.

Segundo dados da IUCN, 22,4% das espécies mamíferas encontram-se ameaçadas de extinção (ou seja, 1339 espécies das 5980 já catalogadas), este dado alarmante reitera a necessidade de maiores esforços de conservação para que não haja arrependimento futuro por não se ter coletado o material que permitiria trazer de volta táxons extintos. Por essa razão, o criobanco precisa ser visto como parte integrante do conjunto de ferramentas de conservação e, quando usado adequadamente, pode até reduzir os custos necessários para atingir as metas de retenção da diversidade genética em comparação com as estratégias tradicionais de reprodução *ex situ* (Bolton et al. 2022). No entanto, isto exigirá a combinação de prioridades de espécies e animais individuais para proporcionar a utilização mais eficaz do criobanco como ferramentas de conservação e gestão das populações de mamíferos ameaçados.

Considerações Finais

Diante do exposto, podemos notar que embora o propósito do desenvolvimento e otimização das biotecnologias reprodutivas na conservação de espécies ser o mesmo para as diferentes classes de vertebrados, seus avanços encontram-se em estágios diferentes ao compararmos peixes, anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Após décadas de pesquisas realizados por instituições em todo o mundo, o número de espécies beneficiadas não ultrapassa uma centena, e o número de indivíduos nascidos ou a aplicação rotineira desses métodos são diminutos. Esses resultados demonstram o quão experimental é o uso das TRAs na maioria das espécies selvagens, devido a inúmeros fatores como: pequeno número de indivíduos, falta de acesso aos animais, escassez de recursos financeiros e humanos, falta de padronização de protocolos, implicações logísticas da manutenção de grandes colônias com diversidade genética, entre outros. Tais dificuldades no estabelecimento de TRAs em espécies selvagens tem levado muitos programas de conservação e instituições de pesquisa a investir na criação de criobancos de células e tecidos, e no aprimoramento de biotecnologias baseadas em células somáticas e células-tronco (p.e., iPS e transplantes de células germinativas). O armazenamento de amostras viáveis de um grande número de indivíduos é a prioridade atual antes que mais espécies, populações e diversidade genética seja perdida em decorrência de atividades humanas. Outro aspecto importante é a necessidade de expandir técnicas e protocolos reprodutivos a grupos menos carismáticos como peixes, anfíbios, répteis e aves, uma vez que a atenção principal de muitos grupos de pesquisa e agências financiadoras centra-se em espécies mamíferas, circunstância que impede que diferentes abordagens reprodutivas alcancem espécies com maior risco de extinção.

Referências

- Andrabi SMH, Maxwell WMC.** A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p.23-243, 2007.
- Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, Wogan GOU, Swartz B, Quental TB, Marshall C, McGuire JL, Lindsey EL, Maguire KC, Mesey B, Ferrer EA.** Has the Earth's sixth mass extinction already arrived? *Nature*, v.471, p.51-57, 2011.
- Blank MH, Silva VC, Rui BR, Novaes GN, Castiglione VC, Pereira RJG.** Beneficial influence of fetal serum on in vitro cryosurvival of chicken spermatozoa. *Cryobiology*, v.95, p.103-109, 2020.
- Blank MH, Novaes GA, Losano JDA, Sant'Anna SS, Vieira SEM, Grego KF, Pereira RJG.** Insight on sperm assays and cryopreservation in six neotropical pit vipers. *Cryobiology*, v.106, p.55-65, 2022.
- Bolton RL, Mooney A, Pettit MT, Bolton AE, Morgan L, Drake GJ, Appeltant R, Walker SL, Gillis JD, Hvilson C.** Resurrecting biodiversity: advanced assisted reproductive technologies and biobanking. *Reproduction and Fertility*, v.3, n.3, p.R121-R146, 2022.
- Browne R, Clulow J, Mahony M.** Short-term storage of cane toad (*Bufo marinus*) gametes. *Reproduction*, v.121, n.1, p.167-173, 2001.
- Browne RK, Seratt J, Vance C, Kouba A.** Hormonal priming, induction of ovulation and in-vitro fertilization of the endangered Wyoming toad (*Bufo baxteri*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.4, n.1, p.34, 2006.
- Budi DS, Puspitasari S, Febrianti RP, Bodur T, Mukti AT.** A novel technique for mass induction of propagation in small fish species: Hormone immersion. *Animal Reproduction Science*, v.255, p.107280, 2023.
- Butchart SHM, Love S, Martin R, Symes A, Westrip JRS, Wheatley, H.** Which birds species have gone extinct? A novel quantitative classification approach. *Biological Conservation*, v.227, p.9-18, 2018.
- Byrne PG, Silla AJ.** Hormonal induction of gamete release, and in-vitro fertilisation, in the critically endangered Southern Corroboree Frog, *Pseudophryne corroboree*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.8, n.1, p.144, 2010.
- Campbell L, Clulow J, Howe B, Upton R, Doody S, Clulow S.** Efficacy of short-term cold storage prior to cryopreservation of spermatozoa in a threatened lizard. *Reproduction, Fertility and Development*, v.33, n.9, p.555-561, 2021..
- Clulow J, Clulow S.** Cryopreservation and other assisted reproductive technologies for the conservation of threatened amphibians and reptiles: bringing the ARTs up to speed. *Reproduction, Fertility and Development*, v.28, p.1116-1132, 2016.
- Clulow J, Upton R, Trudeau VL, Clulow S.** Amphibian Assisted Reproductive Technologies: Moving from Technology to Application. *In: [s.l: s.n.]p.413-463.*
- Clulow S, Clulow J, Marcec-Greaves R, Della Togna G, Calatayud NE.** Common goals, different stages: the state of the ARTs for reptile and amphibian conservation. *Reproduction, Fertility and*

Development, v.34, n.5, p.i–ix, 2022.

Della Togna G, Howell LG, Clulow J, Langhorne CJ, Marcec-Greaves R, Calatayud NE. Evaluating amphibian biobanking and reproduction for captive breeding programs according to the Amphibian Conservation Action Plan objectives. *Theriogenology*, v.150, p.412–431, 2020.

Erdmann RH, Blank MH, Ribeiro RN, Oliveira MJ, Cubas ZS, Pradice J, Goularte KL, Moreira N. Cryopreservation of margay (*Leopardus wiedii*) spermatozoa: effects of different extenders and frozen protocols. *Theriogenology*, v.143, p.27–34, 2020.

Finn C, Grattarola F, Pincheira-Donoso D. More losers than winners: investigating Anthropocene defaunation through the diversity of population trends. *Biological Reviews*, v.98, p.1732–1748, 2023.

Herrick JR. Assisted reproductive technologies for endangered species conservation: developing sophisticated protocols with limited access to animals with unique reproductive mechanisms. *Biology Reproduction*, v.100, p.1158–1170, 2019.

Holt WV, Lloyd RE. Artificial insemination for the propagation of CANDES: the reality! *Theriogenology*, v.71, p.228–235, 2009.

IUCN. The IUCN red list of threatened species. Version 2023-1 <https://www.iucnredlist.org>, 2024.

Kouba A, Willis E, Vance C, Hasentab S, Reichling S, Krebs J, Linhoff L, Snoza, M, Langhorne C, Germano J. Development of assisted reproduction technologies for the endangered mississippi gopher frog (*Rana sevosa*) and sperm transfer for in vitro fertilization. *Reproduction, Fertility and Development*, v.24, n.1, p.170, 2012.

Mayer I, Psenicka M. Conservation of teleost fishes: Application of reproductive technologies. *Theriogenology Wild*, v.4, p.100078, 2024.

Mostramonaco G, Sogsasen N. Reproductive technologies for the conservation of wildlife and endangered species in: Presicce GA. *Reproductive technologies in Animals*. Academic Press, p.99–117, 2020.

Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, v.165, n.3, p.516–534, 2010.

Pereira RJG. Reprodução de Aves. In: Zalmir, S.C., Silva, J.C.R., Dias, J.L.C. (Editores). *Tratado de Animais Selvagens - Medicina Veterinária*. 2ª Edição. São Paulo: Editora Roca, Brasil, p.2235–2269, 2014.

Perry S. Developing assisted reproduction for reptiles, what's next? *Clinical Theriogenology*, v.13, n.4, p.383–389, 2021.

Poo S, Hinkson KM. Applying cryopreservation to anuran conservation biology. *Conservation Science and Practice*, v.1, n.9, 2019.

Purchase C, Lugarini C, Purchase C, Ferreira A, Vercillo UE, Stafford ML, White Jr TH. Reintroduction of the extinct-in-the-wild spix's macaw (*Cyanopsitta spixii*) in the caatinga forest domain of Brazil. *Diversity*, v.16, 80, 2024.

Rivers N, Daly J, Temple-Smith P. New directions in assisted breeding techniques for fish conservation. *Reproduction, Fertility and Development*, v.32, n.9, p.807, 2020.

Santiago-Moreno J, Toledano-Díaz A, Castaño C, Velasquez R, Bóveda P, O'Brien E, Peris-Frau P, Pequeño B, Martínez-Madrid B, Estes MC. Review: Sperm cryopreservation in wild small ruminants: morphometric, endocrine and molecular basis of cryoresistance. *Animal*, v.17, 100741, 2023.

Silla AJ, Calatayud NE, Trudeau VL. Amphibian reproductive technologies: approaches and welfare considerations. *Conservation Physiology*, v.9, n.1, 2021.

Strand J, Thomsen H, Jensen JB, Marcussen C, Nicolajsen TB, Skriver MB, Sogaard IM, Ezaz T, Purup S, Callesen H, Pertoldi C. Biobanking in amphibian and reptilian conservation and management: opportunities and challenges. *Conservation Genetics Resources*, v.12, n.4, p.709–725, 2020.

Turghan MA, Jiang Z, Niu Z. An update on status and conservation of the przewalski's horse (*Equus ferus przewalski*): captive breeding and reintroduction projects. *Animals*, v.12, 3158, 2022.

Van Dyke JU, Thompson MB, Burrige CP, Castelli MA, Clulow S, Dissanayake DSB, Dong CM, Doody JS, Edwards DL, Ezaz T, Friesen CR, Gardner MG, Georges A, Higgie M, Hill PL, Holleley CE, Hoops D, Hoskin CJ, Merry DL, Riley JL, Wapstra E, White GM, Whiteley SL, Whiting MJ, Zozaya SM, Whittington CM. Australian lizards are outstanding models for reproductive biology research. *Australian Journal of Zoology*, v.68, n.4, p.168–199, 2021.

Waggener WL, Carroll EJA. A method for hormonal induction of sperm release in anurans (eight species) and in vitro fertilization in *Lepidobatrachus* species. *Development, Growth & Differentiation*, v.40, n.1, p.19–25, 1998.

Wolf KN, Wildt DE, Vargas A, Marinari PE, Ottinger MA, Howard JG. Reproductive inefficiency in male black-footed ferrets (*Mustela nigripes*). *Zoo Biology*, v.19, p.517–528, 2000.