



Biología reproductiva de hembras: Sincronización del ciclo y reproducción asistida










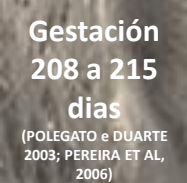
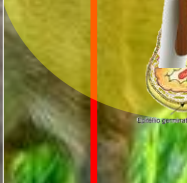






Luciana Diniz Rola

Curso Biología de la conservación de cérvidos
neotropicales

Junho de 2024



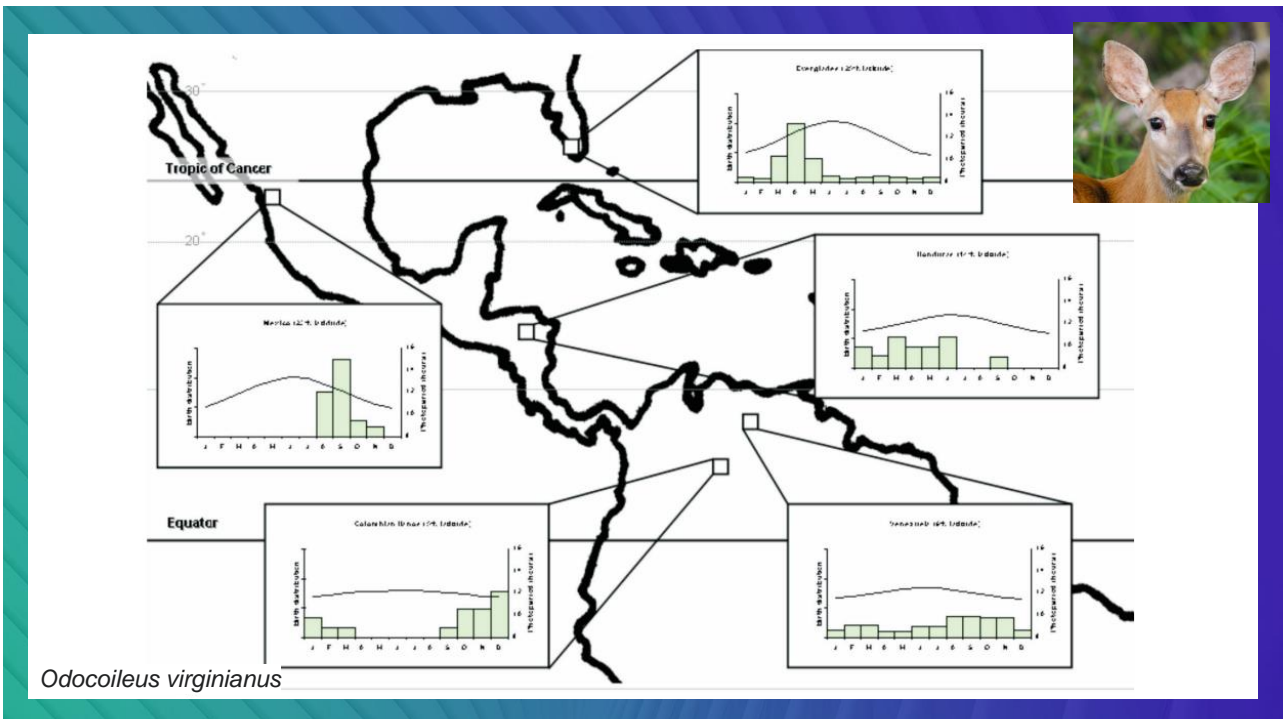
?					0,50 m de altura (PINDER e LEEUWENBERG, 1997)	?
?	Uníparas (PINDER e LEEUWENBERG, 1997)					?
?		Gestación 208 a 215 días (POLEGATO e DUARTE 2003; PEREIRA ET AL, 2006)			Asazonais (PINDER e LEEUWENBERG, 1997) Ciclo de 21 a 37 días PEREIRA ET AL, 2006	?
?	Peso de 13Kg e 20,5 Kg (PINDER e LEEUWENBERG, 1997)					?

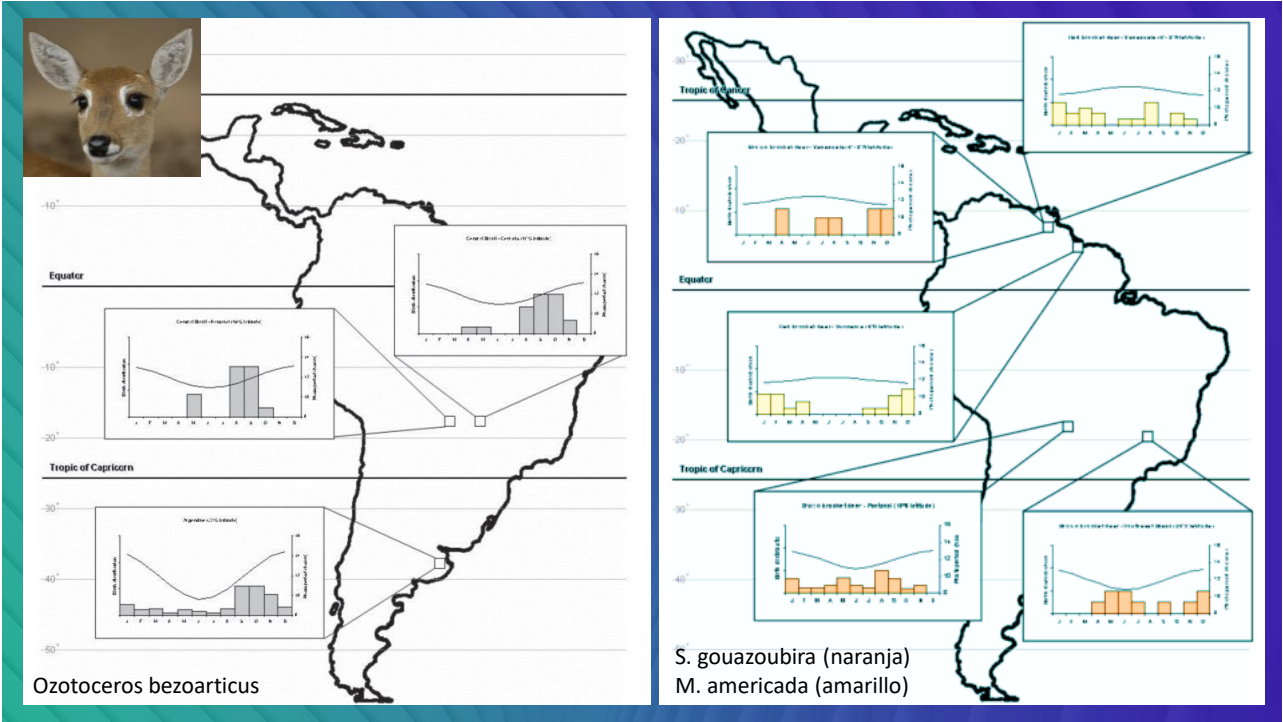
Características generales


- Hembras sexualmente maduras alrededor de los 18 meses;
- Concepción en cualquier época del año;
- Es probable que hembras de diferentes géneros, como *Blastocerus*, *Ozotoceros*, *Subulo*, *Passalites* y *Mazama*, puedan tener ciclos estrales continuos durante todo el año;
- El ciclo estral dura un promedio de 21 días (14 a 24 días);
- Duración del estro 18-48h;
- Placenta cotiledonaria y sinepiteliocorial (se produce pérdida del epitelio uterino materno);




Species	Gestation length	Interlitter interval	Postpartum estrus	Neonatal weight	Litter size	Reference
Marsh deer (<i>Blastoceros dichotomus</i>)	~270 days ¹	353 days ²	Observed ¹	5.2kg (n=8) ³	1 ^{3,4}	¹ Frädrieh 1987 ² Frädrieh 1995 ³ Duarte in litt. ⁴ Hayssen and Tienhoven 1993 ²⁰ Schwarzenberger and Dreßßen 1998
White-tailed deer (<i>Odocoileus virginianus</i>)	~200 days* ^{5,6}	~300 days ⁷	Observed ⁷	m: 2.6-4.1kg ⁴ f: 2.5-3.9kg ⁴	1-2** ^{4,5,6,8}	⁴ Hayssen and Tienhoven 1993 ⁵ Gallindo-Leal and Weber 1998 ⁶ Blouch 1987 ⁷ Brokx 1972 ⁸ Frädrieh 1987
Pampas deer (<i>Ozotoceros bezoarticus</i>)	~210 days ⁹	252-408 days ¹⁰	Observed ⁹	1.4-2.5kg ^{10,11}	1 (rarely twins) ¹²	⁹ Sierra 1985 ¹⁰ Frädrieh 1981 ¹¹ Merino et al. 1997 ¹² Redford 1987
North Andean deer (<i>Hippocamelus antisensis</i>)	~240 days ¹³	—	—	—	1 (rarely twins) ¹⁴	¹³ Merkt 1987 ¹⁴ Whitehead 1993
South Andean deer (<i>Hippocamelus bisulcus</i>)	220-240 days ¹⁴	—	—	—	1 (rarely twins) ¹⁴	¹⁴ Whitehead 1993
Red brocket deer (<i>Mazama americana</i>)	~240 days ¹⁵	225 days	Observed ¹	1.8kg (n=1) ¹⁶	1 (rarely twins) ^{14,16}	¹ Frädrieh 1987 ¹⁴ Whitehead 1993 ¹⁵ Tomas 1975 ¹⁶ Duarte in litt.
Brown brocket deer (<i>Mazama gouazoubira</i>)	208-215 days ¹⁷	—	Observed ^{17,18}	0.5-1.3kg ¹⁶	1 (rarely twins) ^{4,16,14}	⁴ Hayssen and Tienhoven 1993 ¹⁴ Whitehead 1993 ¹⁶ Duarte in litt. ¹⁷ Pereira et al. 2005 ¹⁸ Polegato and Duarte 2003
Brazilian dwarf brocket deer (<i>Mazama nana</i>)	—	—	Observed ¹⁹	1.3kg (n=1) ¹⁶	1 ¹⁶	¹⁶ Duarte in litt. ¹⁹ Gardner 1971









Vulnerável




Vulnerável



Vulnerável




Quase ameaçada




Dados deficientes


Cervídeos neotropicais:
53% estão sob algum grau de ameaça, enquanto 17,6% apresentam deficiência de dados



Pouco preocupante



Pouco preocupante



Pouco preocupante

IUCN Red List, 2019

Biotechnologías reproductivas + bancos de germoplasma

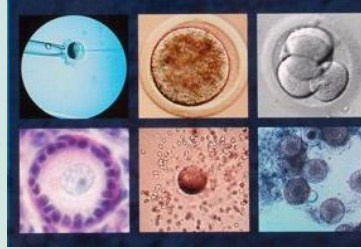


Transferencia de embrión

Inseminación artificial

clonación

ICSI



Fertilización in-vitro

Células-tronco

Salvajes ≠ Domésticos

Reproducción asistida



Genética no muere con el animal



Variabilidad en cautiverio y vida libre



Transporte y problemas de salud

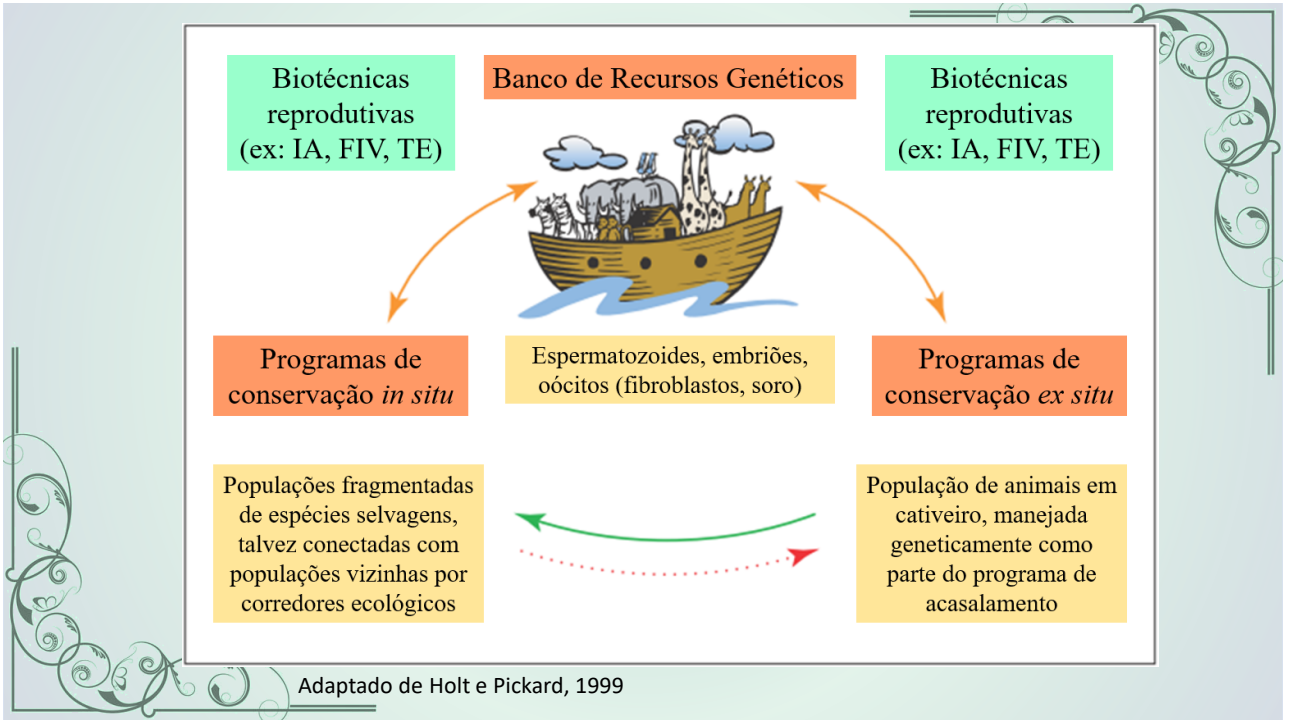


Problemas de espacio



Problemas de comportamiento





animals



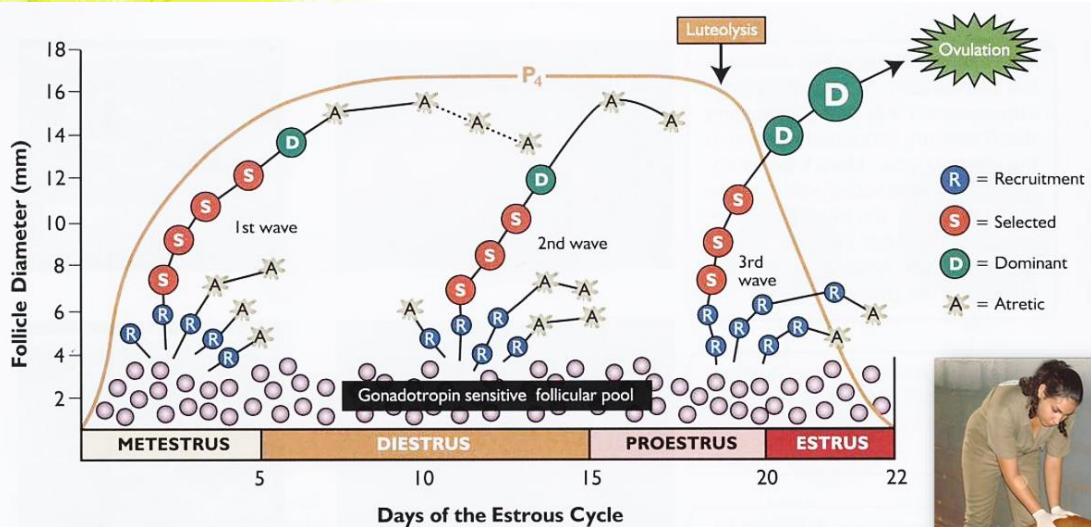
Review

Assisted Reproductive Technology in Neotropical Deer: A Model Approach to Preserving Genetic Diversity

Luciana Diniz Rola ¹, Marcos Eli Buzanskas ¹, Luciana Magalhães Melo ², Maiana Silva Chaves ³, Vicente José Figueirêdo Freitas ^{3,*} and José Maurício Barbanti Duarte ^{4,*}

Manipulación del ciclo estral

- ¿Cuándo usar?
- Base para recogida de ovocitos, inseminación artificial y recogida y transferencia de embriones
- Más eficaz que la detección natural del estro
- Progestágenos, prostaglandinas, GnRH, etc.



Sincronización estral

Animal Reproduction Science 117 (2010) 266–274

Comparison of two methods of synchronization of estrus in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*)

Eveline dos Santos Zanetti^{a,b,*}, Bruna Furlan Polegato^a, José Maurício Barbanti Duarte^a



- T1 - CIDR[®], durante 8 días, con una aplicación de 265µg de cloprostenol al momento del retiro.
- T2 - Dos aplicaciones de 265 µg de cloprostenol con 11 días de diferencia
- Ambos tratamientos lograron sincronizar el estro en la especie *S. gouazoubira*, con la formación del cuerpo lúteo funcional.



Sincronização estral

Monitoring ovarian cycles, pregnancy and post-partum in captive marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) by measuring fecal steroids

Bruna Furlan Polegato¹, Eveline dos Santos Zanetti^{1*} and José Maurício Barbanti Duarte

- Cloprostenol ya ha sido reportado en dosis de 530 ug (IM)
- El intervalo sugerido entre aplicaciones para esta especie es de 15 días
- Exhiben estro conductual en promedio 58 horas después del final del tratamiento (rango: 40–64 h).



Mazama (Yuki Tanaka)

- Acetato de melengestrol - 1.0 mg/animal/day, se recomienda dividirlo en dos periodos del día (mañana y tarde).

¿¿¿Por que usar???

Utilizar material criopreservado de bancos genómicos



Solucionar problemas de cautiverio



Inseminación artificial

- *Mazama sp*
 - ▣ Vagina larga que dificulta la exposición del cuello uterino;
 - ▣ Anillos cervicales que son difíciles de transponer;
 - ▣ Oclusión observada en algunos animales;



Inseminación artificial



Videolaparoscopia

- ✓ Técnica de elección para la mayoría de las especies no domésticas, incluidos los pequeños cérvidos (Leibo e Songsasen 2002)
- ✓ Dosis más bajas – $10\text{-}50 \times 10^6$ spz
- ✓ Limitaciones: necesidad de anestesia, formación en técnica de laparoscopia y costes del equipo (Willard et al. 1998)

Inseminación artificial



Evaluación de una técnica de IA en corzuela parda con semen congelado

- ✓ La tasa de concepción fue 50% (4/8)

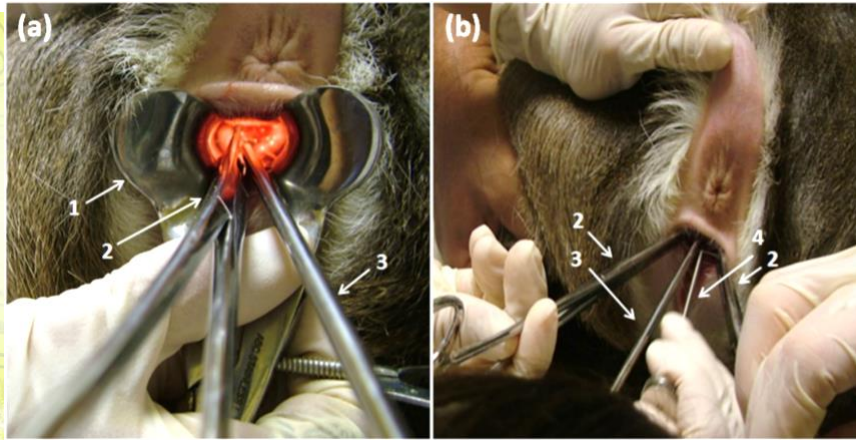
(Peroni, 2011)



First live offspring of Amazonian brown brocket deer (*Mazama nemorivaga*) born by artificial insemination

Maria Emilia Franco Oliveira¹ · Eveline dos Santos Zanetti² · Marina Suzuki Cursino² · Ellen de Fátima Carvalho Peroni² · Luciana Diniz Rola² · Marcus Antonio Rossi Feliciano¹ · Júlio Carlos Canola³ · José Maurício Barbanti Duarte²

Eur J Wildl Res
DOI 10.1007/s10344-016-1040-y



Superovulação: ¿Por qué usarlo???



Criopreservação



Aumento de crias



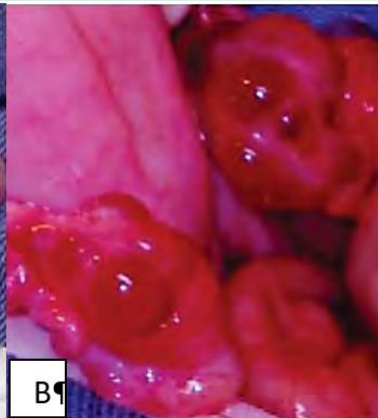
Fêmea substituta



Poupar o animal de intervenções frequentes



A



B



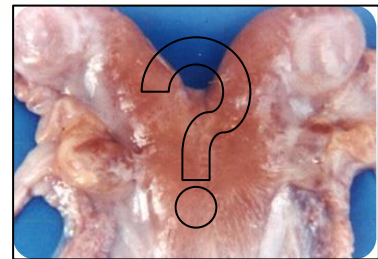
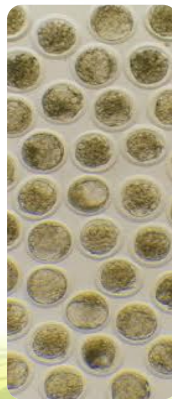
C

Colheita de embriões

- Embriões: alta variabilidade na resposta e resultados muitas vezes desanimadores (Fennessy et al., 1989; Zanetti, 2009; Zanetti e Duarte, 2012; Zanetti et al., 2014).
- *B. dichotomus* 6 protocolos testados, 17 animais superovulados - 2 embriões viáveis (projeto FUNBIO)



FIV: ¿Por qué usarlo???



(Loskutoff et al., 1995; Gonçalves et al., 2002; Cornizzoli et al., 2002)

Producción de embriones *in vitro*



Collection and *in vitro* maturation of *Mazama gouazoubira* (brown brocket deer) oocytes obtained after ovarian stimulation

Luciana D. Rola¹, Eveline S. Zanetti², Maite del Collado³, Ellen F.C. Peroni⁴, José Maurício B. Duarte⁴ (2020) - ZYGOTE

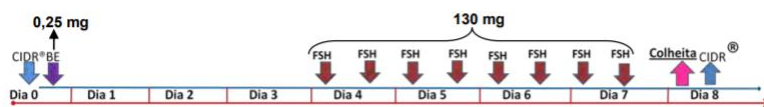
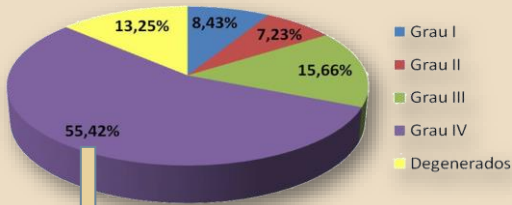
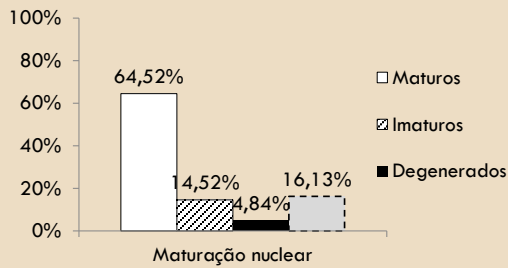


Figura 2 — Esquema do protocolo hormonal utilizado para estimulação ovariana das fêmeas de *M. gouazoubira*.

Producción de embriones *in vitro*



Possibilidade de inadequações da técnica



Taxa de aspiração animal/cirurgia \approx 7 óocitos

Rola (2013)

Soltura

- Problemas taxonômicos
- Problemas de comportamento
- Problemas de salud

- Protocolos de rehabilitación
- ¡¡¡Monitoreo!!!



¿¿¿No hay solución???

Y si...



En lugar de devolver los animales a la naturaleza...

... ¿Devolví material genético???



Reintroducción de material genético



- Baja posibilidad de transmisión de enfermedades.
- Un animal nace en estado salvaje, y pasa por todos los cuidados y aprendizajes maternos: sabe quiénes son los depredadores, cuál es la comida, quiénes son sus parejas sexuales y puede conquistar territorios.



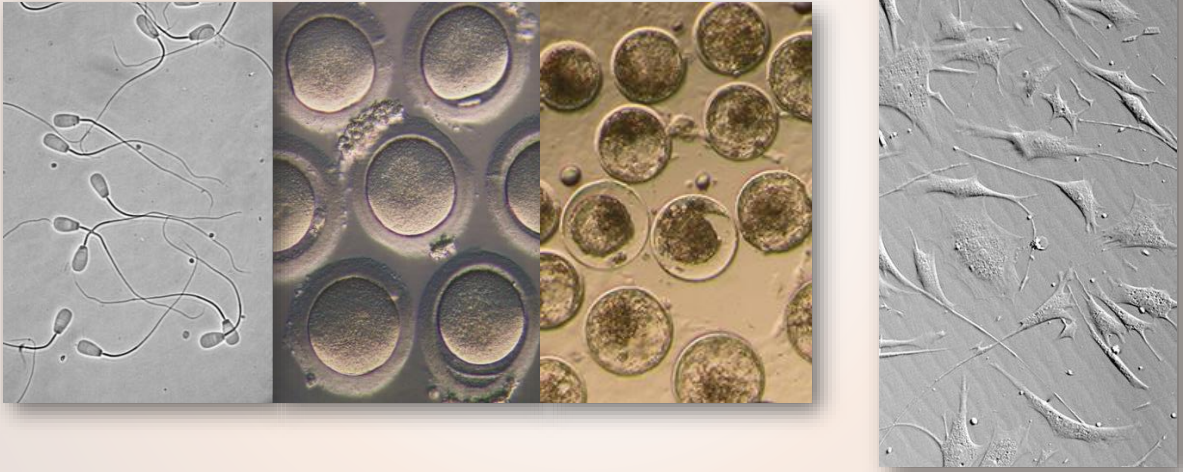
- *B. dichotomus*
- 6 protocolos probados
- 17 animales
- SOV 2 embriones viables



• II Prêmio Nacional da Biodiversidade

Principales fuentes de germoplasma

Obtención x Criopreservación



Ejemplo de banco de germoplasma

T. Leon-Quinto et al. / Animal Reproduction Science 112 (2009) 347–361

355

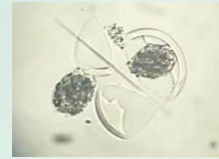
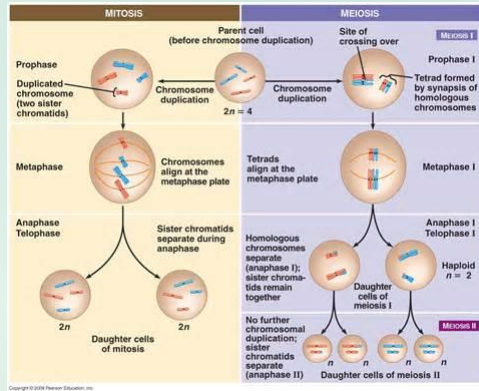
Table 4
The Iberian lynx Biological Resource Bank at the end of 2006

Preserved samples	Males (N)	Females (N)	Total individuals (N)
Gonads	7	6	13
Gametes	2	5	7
Somatic tissues	35	34	69
Somatic cells	31	32	63
Cells with SCLP	11	7	18
Blood and derivatives	28	30	58
Hairs	20	25	45
Urine	19	15	34
Feces	25	14	39

The abbreviation SCLP means stem-cell-like properties.

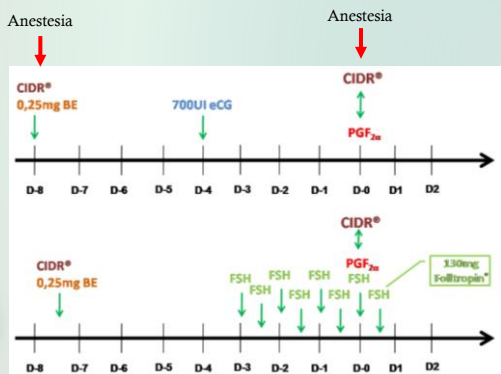
Uso de células: perspectivas

- Fuente inagotable de células, incluso después de la muerte del animal.



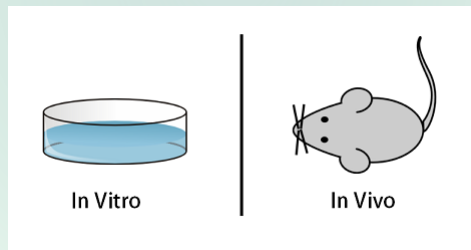
Uso de células: perspectivas

- No es necesaria la sujeción química/física de los animales en repetidas ocasiones.



Uso de células: perspectivas

- Posibilidad de repetir experimentos con mayor frecuencia y muchas más veces.

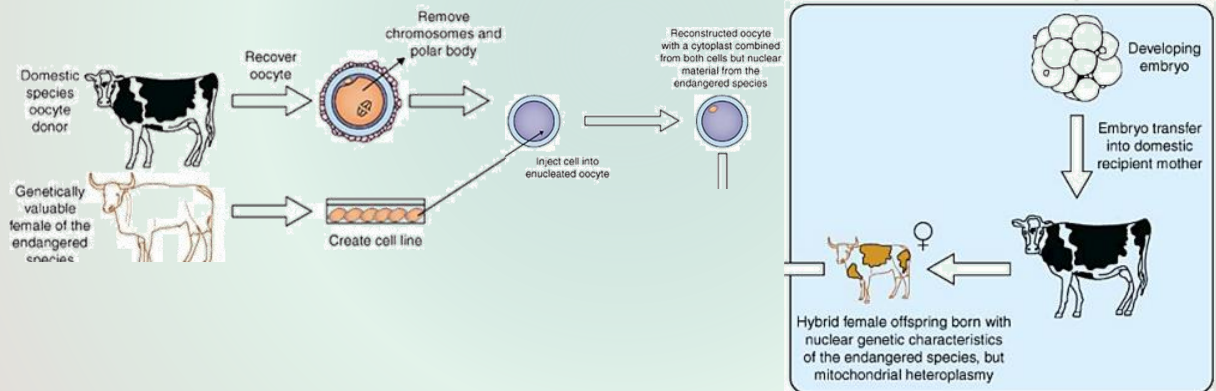


Uso de células: perspectivas

- Posibilidad de obtener material de animales en libertad;
- Utilizar animales poco después del nacimiento o seniles;
- Criopreservación mucho más eficiente en relación a gametos y embriones;
- Desarrollo y aplicación de biotecnias reproductivas.

Clonación

- Baja eficiencia
- Problemas de desarrollo



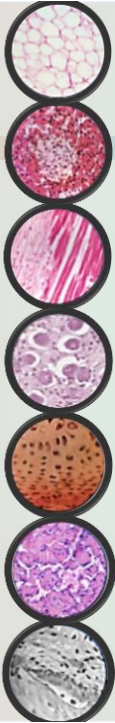
CELLULAR REPROGRAMMING
 Volume 22, Number 4, 2020
 © Mary Ann Liebert, Inc.
 DOI: 10.1089/cell.2019.0069

Research Article

In Vitro Development and Mitochondrial Gene Expression in Brown Brocket Deer (*Mazama gouazoubira*) Embryos Obtained by Interspecific Somatic Cell Nuclear Transfer

Livia C. Magalhães,¹ Jenin V. Cortez,² Maajid H. Bhat,³ Ana Clara N.P.C. Sampaio,¹ Jeferson L.S. Freitas,¹ José M.B. Duarte,⁴ Luciana M. Melo,^{1,5} and Vicente J.F. Freitas¹

¿Qué tipos de células existen???

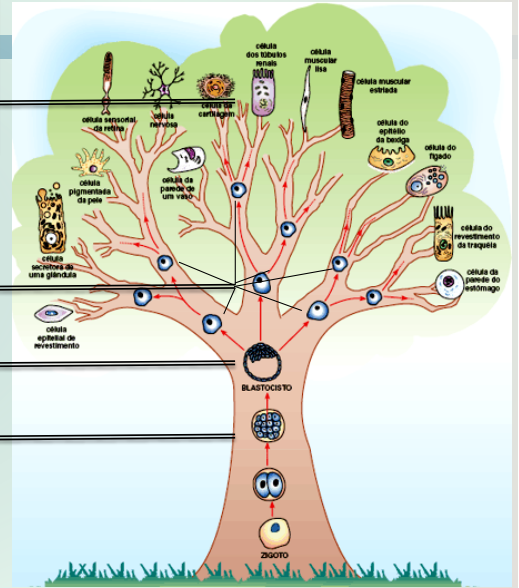


Céls. Unipotentes

Céls. Multipotentes

Céls. Pluripotentes

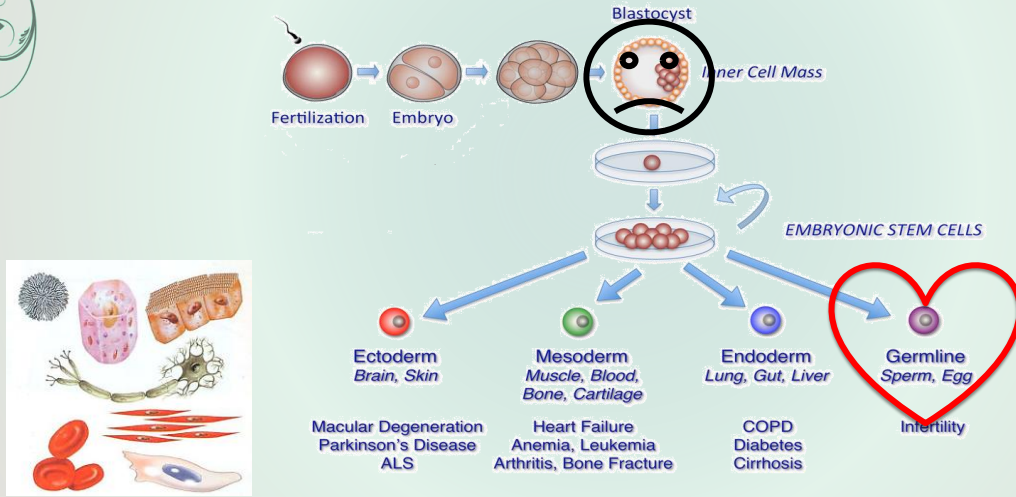
Céls. Totipotentes



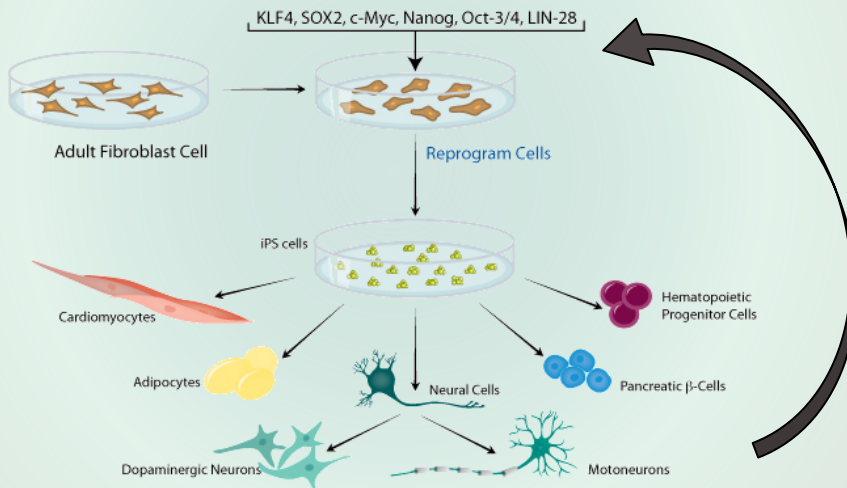
Células Pluripotentes



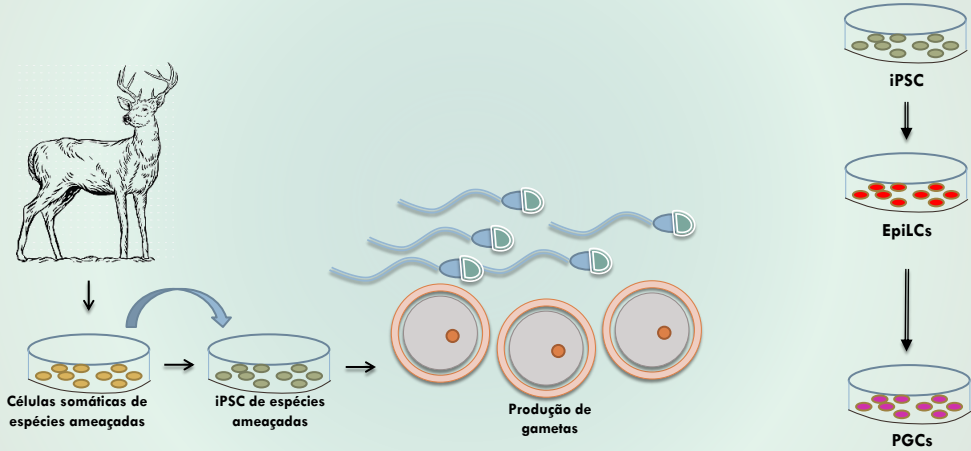
Células madre embrionarias pluripotentes



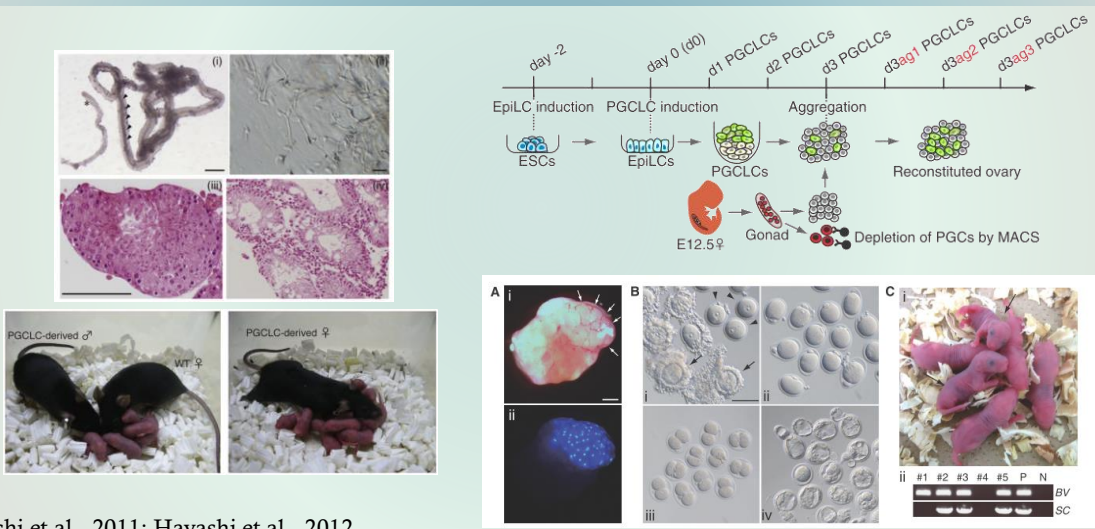
Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)



Producción de gametos

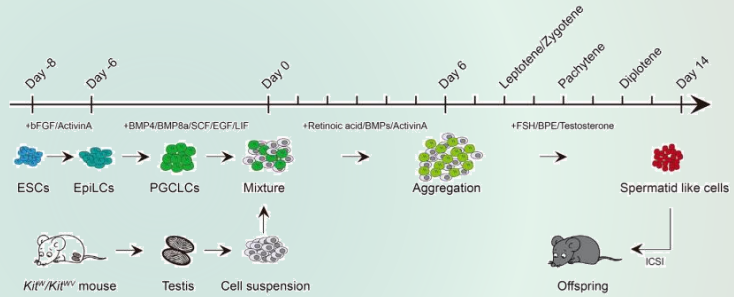
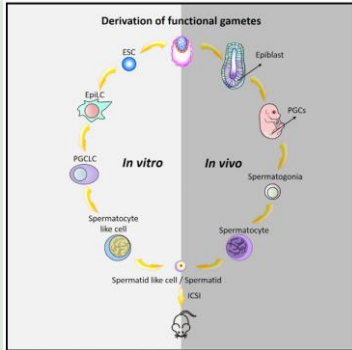


Producción de gametos: etapa *in vivo*



Hayashi et al., 2011; Hayashi et al., 2012

Producción de gametos: etapa *in vitro*

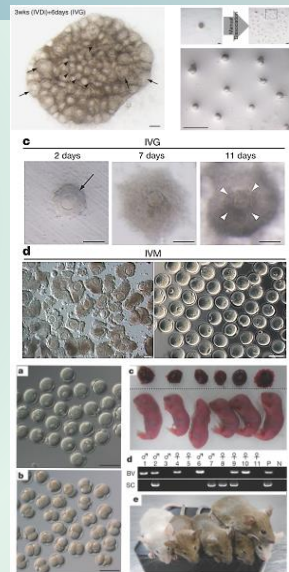
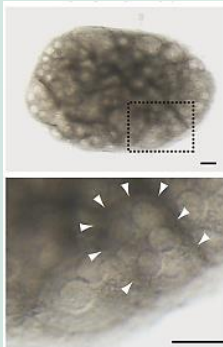
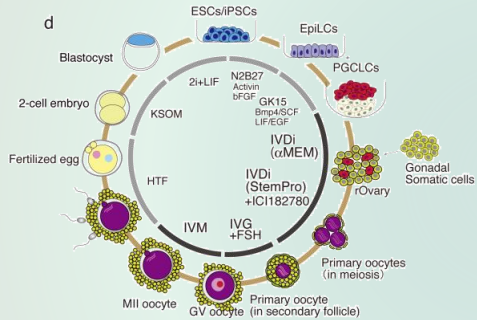


Cell Stem Cell Article

Complete Meiosis from Embryonic Stem Cell-Derived Germ Cells In Vitro

Quan Zhou,^{1,2,8} Mei Wang,^{2,3,8} Yan Yuan,^{1,2,8} Xuepeng Wang,^{2,4} Rui Fu,² Haifeng Wan,² Mingming Xie,^{2,5} Mingxi Liu,¹ Xuejiang Guo,¹ Ying Zheng,⁶ Guihai Feng,² Qinghua Shi,⁷ Xiao-Yang Zhao,^{2,3,6} Jiahao Sha,^{1,7} and Qi Zhou^{2,*}

Producción de gametos: etapa *in vitro*



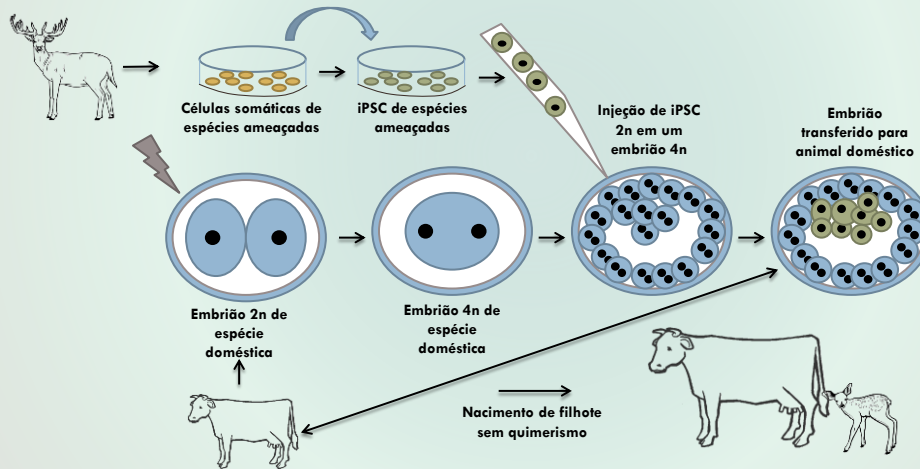
LETTER

doi:10.1038/nature20104

Reconstitution *in vitro* of the entire cycle of the mouse female germ line

Orle Hikabe^{1*}, Nobuhiko Hamazaki¹, Go Nagamatsu¹, Yayoi Obata¹, Yuji Hirao¹, Norio Hamada^{1,4}, So Shimamoto¹, Takuya Imamura¹, Kinichi Nakashima¹, Mitsuori Saitou^{2,3,5,6} & Katsuhiko Hayashi^{1,2*}

¿Nuevo enfoque para la clonación?



Células multipotentes

Astas



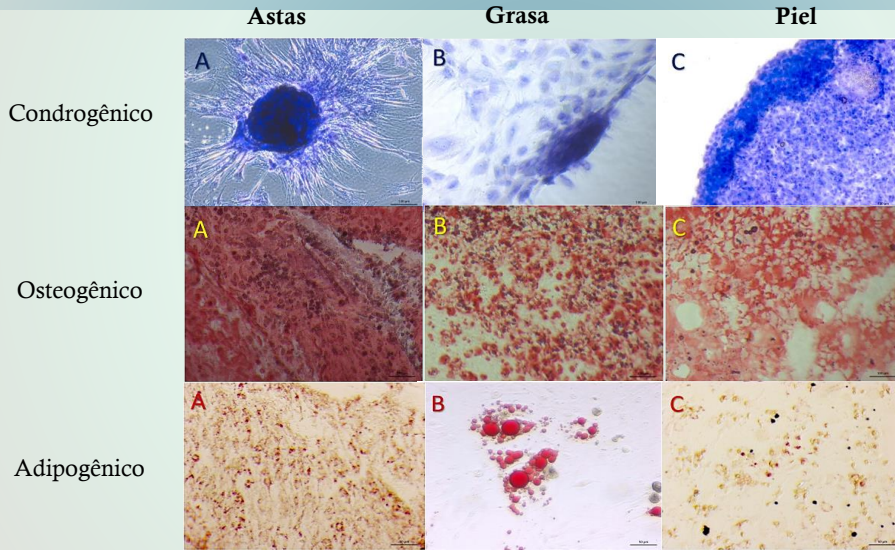
Grasa



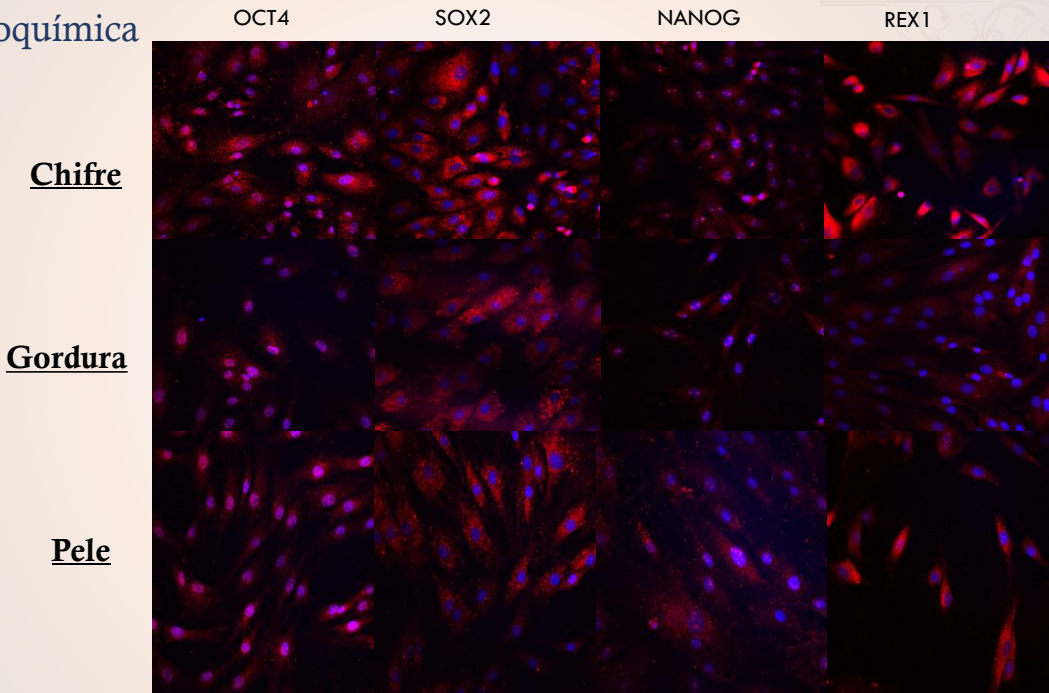
Piel



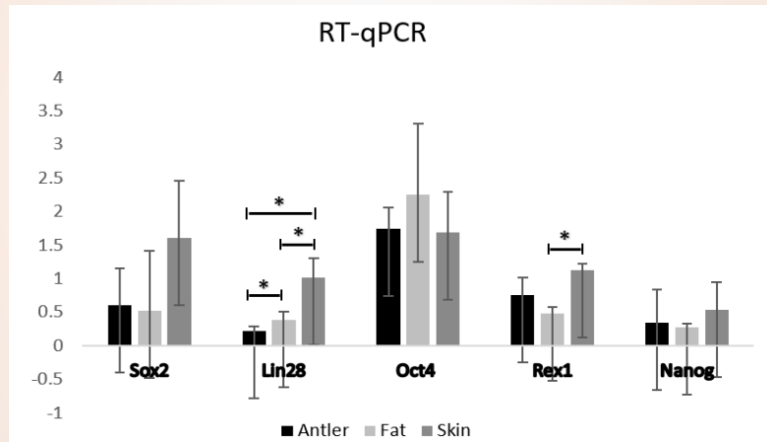
Células multipotentes



Imunocitoquímica

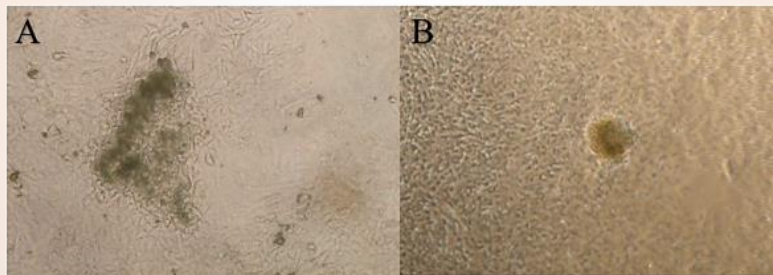


RT-qPCR para genes marcadores de pluripotencia



Producción de iPSC

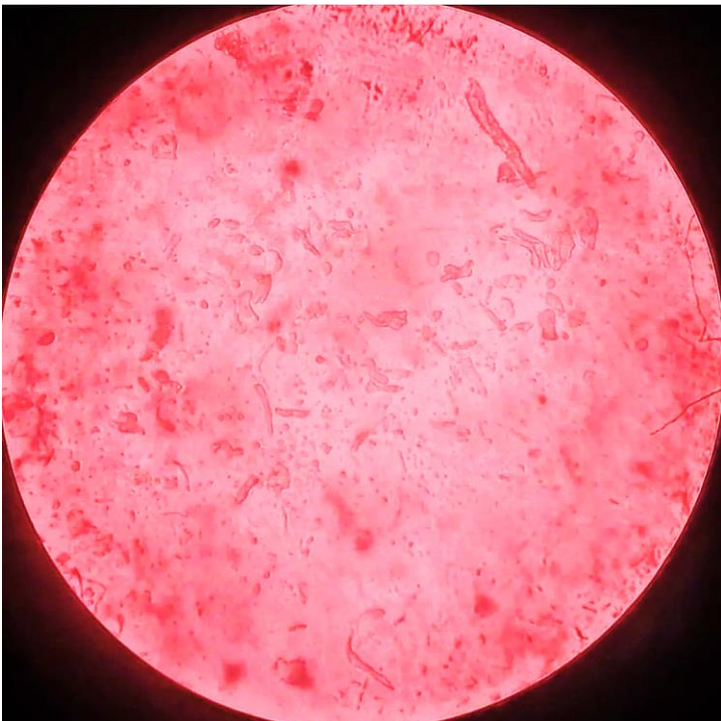
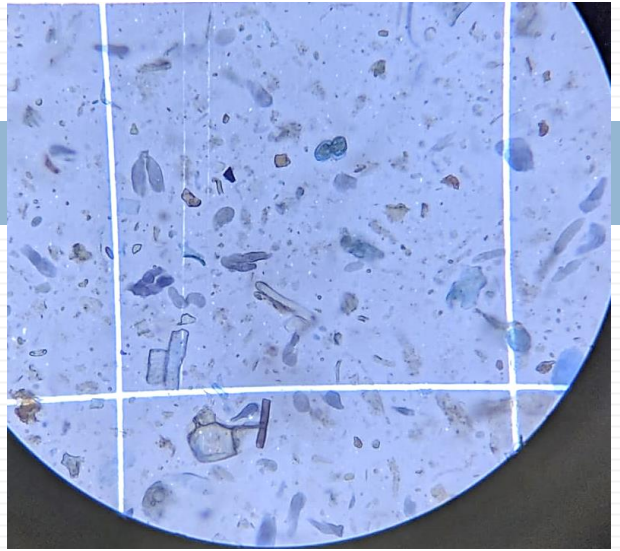
- No fue posible obtener cepas independientemente de la fuente del material utilizado (astas, grasa, piel), componente utilizado en el medio (SFB o KOSR), vectores (PiggyBac o STEMCCA) o el método de entrega del material (electroporación, lipofección o lentiviral)
- Resistencia para lograr la entrada del vector en las células, observada mediante la expresión del gen informador GFP



Células Multipotentes

- ❖ Eficiência mais rápida e maior na produção de iPSC (interesse na produção de gametas) (Hayashi, K. et al., 2012; Hayashi, Y. et al., 2012; Easley et al., 2012)
- ❖ Capacidade de diferenciação direta em células germinativas (Nayernia et al., 2006; Hua, Jinlian et al., 2009; Hua, J. et al., 2009; Huang et al., 2010; Hua, 2011; Makoolati et al., 2011; Mazaheri et al., 2011; Jouni et al., 2014; Li et al., 2014)
- ❖ Capacidade de diferenciação em células semelhantes a oócitos (Danner et al., 2006; Song et al., 2011; Qiu et al., 2013; Yu et al., 2014)
- ❖ Transplante de células para restaurar a produção de gametas e espermatozoides em animais estéreis (Johnson et al., 2005; Wang et al., 2013)
- ❖ Melhorar as taxas da clonagem por transferência nuclear (Liu, 2001; Hochedlinger e Jaenisch, 2002; Oback e Wells, 2002; Faast et al., 2006; Colleoni et al., 2005; Lee et al., 2010)

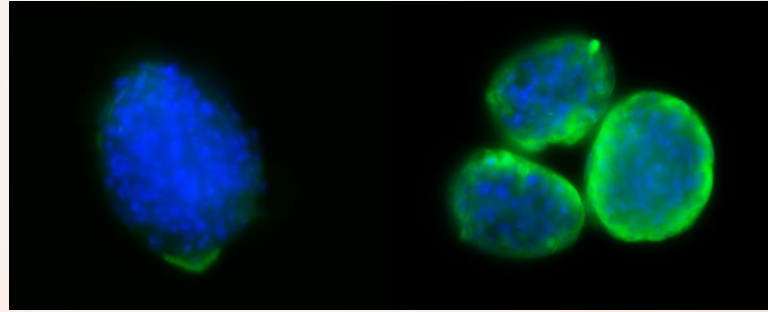
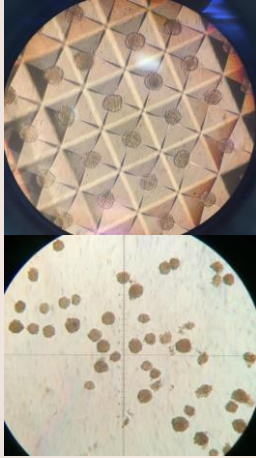




Cultivo celular

Como utilizar células somáticas para salvar espécies????

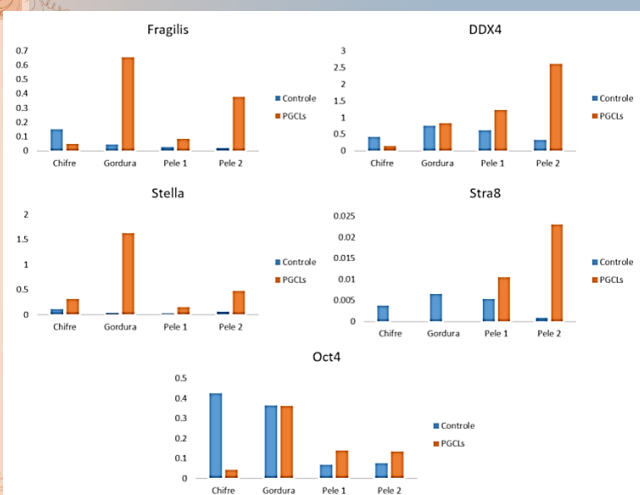
PGCLs em *Blastocerus dichotomus*



+ Vasa

+ Dazl

Expresion genica – RT-qPCR



✓ Después de la diferenciación en PGCL, la mayoría de los linajes obtuvieron un aumento en la expresión genética

✓ Astas: peor desempeño, aumenta solo para Stella y baja para los demás

✓ Grasa: altos niveles de transcripción para Fragilis y Stella

✓ Piel: mostró mejores niveles de expresión para Ddx4 y Stra8



!!!Gracias!!!



lucianadinizr@gmail.com



@lucianadinizr