

Adição de fator estimulador de colônias 2 (CSF2) ao meio de cultivo embrionário na presença ou ausência de soro e efeitos sobre o desenvolvimento embrionário e características neonatais da progênie

André Lopes Cirino⁽¹⁾⁽⁴⁾, João Gabriel Viana de Grazia⁽²⁾, Luany Alves Galvão Martinhão⁽²⁾, Luiz Sérgio Almeida Camargo⁽³⁾, Luiz Gustavo Bruno Siqueira⁽³⁾

⁽¹⁾Bolsista (Pibic/CNPq.), Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽²⁾Técnico, Apoyar Biotech Ltda, Alta Floresta, MT. ⁽³⁾Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. ⁽⁴⁾E-mail: andre.lopes@estudante.ufjf.br.

Resumo — O estabelecimento e a manutenção da gestação em bovinos de leite e corte tem grande impacto sobre a eficiência reprodutiva dos rebanhos e sustentabilidade produtiva e econômica. A ocorrência de perdas gestacionais, por sua vez, representa altos custos e prejuízo financeiro, além de comprometer a produtividade das fazendas. Neste contexto, as causas multifatoriais que levam a perdas embrionárias e fetais devem ser foco de atenção e, assim, estudos têm demonstrado quais os principais fatores de risco envolvidos, incluindo o uso de tecnologia de reprodução assistida (ART). No caso da produção in vitro de embriões, melhorias nos sistemas de cultivo podem ser promissoras para que sejam produzidos embriões de melhor qualidade, que não apenas produzam uma prenhez, mas que sejam capazes de levar a gestação a termo, com o nascimento de bezerros saudáveis. O fator estimulador de colônias 2 (CSF2) é uma citocina secretada pelo endométrio alguns dias após a ovulação em bovinos. Esta citocina pode ter papel importante na programação do desenvolvimento embrionário inicial, com reflexos na vida pós-natal da prole. O objetivo deste estudo foi investigar se a suplementação com CSF2 do quinto dia ao sétimo dia de cultivo embrionário, em meio com ou sem soro, afeta o desenvolvimento embrionário inicial, a duração da gestação, e características dos neonatos.

Termos para indexação: programação fetal, embrião in vitro, gestação.

Addition of colony-stimulating factor 2 (CSF2) to embryo culture medium with or without serum and the effects on embryonic development and neonatal features of the progenie)

Abstract — Pregnancy establishment and maintenance in dairy and beef cattle have a great impact on herd reproductive efficiency and sustainability of livestock systems. The occurrence of pregnancy losses represents a high financial cost for farms. In this context, multifactorial causes of pregnancy and fetal losses have been a reason for concern, particularly if assisted reproductive technologies (ART) are used. In the case of in vitro embryo production, improvements in culture conditions may be important to produce embryos of better quality that will not only result in a pregnancy, but also in the birth of a viable calf. Colony-stimulating factor 2 (CSF) is a maternally-derived cytokine produced by the endometrium a few days after ovulation in cattle and is likely to play a role in programming early embryo development and cause effects on fetal development with reflects on postnatal features of the resultant calf. The objective of this study was to investigate whether supplementation with CSF2 during embryo culture, with or without serum, affect early embryonic development, gestation length, and neonatal features of calves.

Index terms: fetal programming, in vitro embryo, pregnancy.

Introdução

O embrião pré-implantação é sensível à estímulos vindos do microambiente no qual se encontra e pode modificar a sua função em resposta ao ambiente artificial de cultivo *in vitro*. Eventos celulares e moleculares importantes para o desenvolvimento subsequente acontecem neste período, entres eles a reprogramação epigenética (desmetilação e metilação de novo; Santos; Dean, 2004), diferenciação da massa celular interna que dará origem aos folhetos embrionários e diferenciação dos tecidos extra-embrionários (placentação). Esse conjunto de eventos, incluindo possíveis alterações, adaptações ao microambiente, e modificações celulares e moleculares é chamado de programação do desenvolvimento embrionário e/ou fetal.

O uso da PIVE (Produção *in vitro* de embriões) tem grande importância para o Brasil, país que se destaca como o segundo maior produtor global de embriões *in vitro* (Viana, 2023), para o melhoramento genético e para a multiplicação de animais superiores. Contudo, há relatos recorrentes de elevadas taxas de perdas embrionárias, desenvolvimento fetal anormal, e alterações da placenta e anexos em humanos e animais (Wagtendonk-de Leeuw et al., 1998; Wang et al., 2004; Farin et al., 2006). No caso específico da PIVE, a maior incidência de perdas embrionárias está associada à ocorrência de aneuploidia/mixoploidia (Viuff et al., 1999), reprogramação epigenética anormal (Chen et al., 2015), erros na diferenciação celular, alongamento do conceito, implantação e placentação (Speckhart et al., 2023), função placentária anormal (Grazul-Bilska et al., 2010) e desenvolvimento fetal alterado (Bertolini et al., 2002; Bloise et al., 2014).

Evidências indicam ainda que as consequências podem persistir até a vida adulta, o que impacta também os programas de melhoramento genético, em função das possíveis alterações fenotípicas. Assim, o desenvolvimento de estratégias de mitigação dos efeitos adversos da PIVE sobre o desenvolvimento fetal e perdas gestacionais, como avanços nas técnicas de cultivo *in vitro*, podem contribuir para a maior eficiência da técnica. Neste contexto, a adição de moléculas de origem materna aos meios de cultivo tem potencial de mitigar anormalidades embrionárias e fetais (Denicol; Siqueira, 2023). O fator estimulador de colônias 2 (CSF2) é uma citocina secretada pelo endométrio alguns dias após a ovulação em bovinos (Hansen et al., 2014). Esta citocina pode ter papel importante na programação do desenvolvimento embrionário inicial (Siqueira et al., 2017), com reflexos na vida pós-natal da prole (Amaral et al., 2022). Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da adição de CSF2 ao meio de cultivo embrionário sobre o desenvolvimento inicial e as características pós-natais dos bezerros nascidos após a transferência de embriões PIVE.

O conteúdo desse documento vai ao encontro dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) contidos na Agenda 2030, proposta pela Organização das Nações Unidas, da qual o Brasil é signatário, contribuindo para o alcance do ODS 8 – “Empregos dignos e crescimento econômico: Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos”.

Material e métodos

Embriões foram produzidos *in vitro* utilizando os procedimentos de rotina de um laboratório comercial (Apoyar Biotech Ltda., Alta Floresta, MT). Complexos cumulus-oócitos (CCO) coletados de ovários de matadouro foram maturados *in vitro* por 22 horas a 24 horas e fertilizados com sêmen sexado de macho de um único touro da raça Nelore de fertilidade comprovada. O cultivo embrionário foi realizado em meio com ou sem soro fetal bovino

(SFB), em atmosfera de 5% CO₂ e 5,5% O₂. No quinto dia de cultivo, os zigotos foram alocados aleatoriamente para serem tratados com veículo (Controle) ou 10 ng/mL de CSF2 bovino recombinante (Kingfisher Biotech, Inc., Saint Paul, MN, USA), formando um arranjo de tratamentos fatorial 2 x 2: Controle (0% SFB, veículo); Controle-CSF2 (0% SFB, 10 ng/mL CSF2); SFB (3% SFB, veículo); e SFB-CSF2 (3% SFB, 10 ng/mL CSF2). Receptoras (n= 132) foram sincronizadas utilizando protocolo de Transferência de embrião em tempo fixo (TETF) baseado em progesterona e estradiol e, no sétimo dia do ciclo, as receptoras aptas (presença de CL > 2 cm²) receberam um embrião de um dos quatro tratamentos, que foram distribuídos aleatoriamente entre as receptoras aptas no dia da transferência. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 26 dias após a transferência do embrião (dia 33 da gestação) com base na presença de um embrião com batimento cardíaco. O comprimento do embrião (CRL) foi mensurado durante este exame. Ao nascimento, os bezerros machos (n= 31) foram pesados e o diâmetro do cordão umbilical foi medido, além do cálculo da duração da gestação. A análise estatística foi realizada utilizando o Proc GLM do software SAS para avaliar os efeitos de tratamento sobre CRL, duração da gestação, peso ao nascimento e diâmetro do cordão umbilical.

Resultados e discussão

As taxas de gestação aos 33 dias de prenhez não diferiram entre tratamentos (37,0%; 30,8%; 44,9%; e 33,3% para Controle, Controle-CSF2, SFB, e SFB-CSF2, respectivamente; P= 0,23). Não foi observado efeito de tratamento sobre o CRL no dia 33 da gestação (1,09 ± 0,06; 1,08 ± 0,06; 1,04 ± 0,05; 1,08 ± 0,06; para Controle, Controle-CSF2, SFB, e SFB-CSF2, respectivamente; P=0,92), nem sobre duração da gestação (298,2 ± 2,7; 300,0 ± 2,3; 297,4 ± 1,8; 302,0 ± 2,2; para Controle, Controle-CSF2, SFB, e SFB-CSF2, respectivamente; P= 0,43), peso ao nascer (45,5 ± 2,9; 41,1 ± 2,4; 40,7 ± 1,9; 45,9 ± 2,3; para Controle, Controle-CSF2, SFB, e SFB-CSF2, respectivamente; P= 0,25) ou diâmetro do cordão umbilical (1,36 ± 0,2; 1,66 ± 0,2; 1,61 ± 0,1; 1,77 ± 0,2; para Controle, Controle-CSF2, SFB, e SFB-CSF2, respectivamente; P= 0,54). Contrastes ortogonais entre os tratamentos com SFB ou sem (SFB e SFB-CSF2 vs Controle e Controle-CSF2) e CSF2 ou não (Controle-CSF2 e SFB-CSF2 vs Controle e SFB) não detectaram efeito sobre as variáveis estudadas. Foi observada uma tendência (P= 0,09) para maior peso ao nascer no grupo SFB-CSF2 comparado ao SFB (45,8 ± 2,3 vs 40,7 ± 1,9; respectivamente).

Os resultados corroboram parcialmente com aqueles obtidos em estudo anterior no qual se demonstrou que os efeitos do CSF2 sobre bezerros nascidos dependem da presença de soro no meio de cultivo (Amaral et al., 2022). Contudo, não foram observadas evidências de que o CSF2 exerça efeitos importantes sobre a prenhez, como detalhado em meta-análise recente (Hansen et al., 2024). Estudos futuros podem investigar a ocorrência de perdas embrionárias em prenhez de embriões tratados com CSF2 cultivados em meio com ou sem a presença de soro.

Conclusões

Conclui-se que a adição de CSF2 do dia 5 ao 7 do cultivo in vitro de embriões não afeta aspectos relacionados à prenhez e às características neonatais de bezerros machos da raça Nelore, exceto na presença de soro no meio que leva a uma tendência de maior peso ao nascimento em embriões tratados com CSF2.

Agradecimentos

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - Brasil, Fapemig (Projeto APQ-02126-21), Embrapa (Projeto SEG 10.22.00.159.00.00) e INCT Reprodução Animal (Processo CNPq 406866/2022-8). À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade da bolsa recebida do Programa PIBIC, o que nos proporcionou obter experiência e aprendizado; ao pesquisador Luiz Gustavo Bruno Siqueira pelo acompanhamento, orientação e apoio durante o período de estudos e treinamento.

Referências

- AMARAL, T. F.; GRAZIA, J. G. V. de; MARTINHAO, L. A. G.; DE COL, F.; SIQUEIRA, L. G. B.; VIANA, J. H. M.; HANSEN, P. J. Actions of CSF2 and DKK1 on bovine embryo development and pregnancy outcomes are affected by composition of embryo culture medium. **Scientific Reports**, v. 12, 7503, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11447-7>.
- BERTOLINI, M.; MASON, J. B.; BEAM, S. W.; CARNEIRO, G. F.; SWEEN, M. L.; KOMINEK, D. J.; MOYER, A. L.; FAMULA, T. R.; SAINZ, R. D.; ANDERSON, G. B. Morphology and morphometry of in vivo-and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. **Theriogenology**, v. 58, n. 5, p. 973-994, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00935-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00935-4).
- BLOISE, E.; FEUER, S. K.; RINAUDO, P. F. Comparative intrauterine development and placental function of ART concepti: implications for human reproductive medicine and animal breeding. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 6, p. 822-839, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu032>.
- CHEN, Z.; HAGEN, D. E.; ELSIK, C. G.; JI, T.; MORRIS, C. J.; MOON, L. E.; RIVERA, R. M. Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 15, p. 4618-4623, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1422088112>.
- DENICOL, A. C.; SIQUEIRA, L. G. B. Maternal contributions to pregnancy success: from gamete quality to uterine environment. **Animal Reproduction**, v. 20, n. 2, e20230085, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2023-0085>.
- FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 178-191, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.022>.
- GRAZUL-BILSKA, A. T.; BOROWICZ, P. P.; JOHNSON, M. L.; MINTEN, M. A.; BILSKI, J. J.; WROBLEWSKI, R.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Placental development during early pregnancy in sheep: vascular growth and expression of angiogenic factors in maternal placenta. **Reproduction**, v. 140, n. 1, p. 165-174, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1530/rep-09-0548>.
- HANSEN, P. J.; DOBBS, K. B.; DENICOL, A. C. Programming of the preimplantation embryo by the embryokine colony stimulating factor 2. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 1/2, p. 59-66, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.05.017>.
- HANSEN, P. J.; ESTRADA-CORTÉS, E.; AMARAL, T. F.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, R. Meta-analysis to determine efficacy of colony-stimulating factor 2 for improving pregnancy success after embryo transfer in cattle. **Theriogenology**, v. 219, p. 126-131, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.02.025>.
- SANTOS, F.; DEAN, W. Epigenetic reprogramming during early development in mammals. **Reproduction**, v. 127, n. 6, p. 643-651, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1530/rep.1.00221>.

SIQUEIRA, L. G. B.; TRIBULO, P.; CHEN, Z.; DENICOL, A. C.; ORTEGA, M. S.; NEGRON-PEREZ, V. M.; KANNAMPUZHA-FRANCIS, J. P.; POHLER, K. G.; RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Colony-stimulating factor 2 acts from days 5 to 7 of development to modify programming of the bovine conceptus at day 86 of gestation. **Biology of Reproduction**, v. 96, n. 4, p. 743-757, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolre/iox018>.

SPECKHART, S. L.; OLIVER, M. A.; EALY, A. D. Developmental hurdles that can compromise pregnancy during the first month of gestation in cattle. **Animals**, v. 13, n. 11, 1760, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13111760>.

VIANA, J. H. M. 2022 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: the main trends for the world embryo industry still stand. **Embryo Technology Newsletter**, v. 41, p. 20-38, 2023.

VIUFF, D.; RICKORDS, L.; OFFENBERG, H.; HYTTTEL, P.; AVERY, B.; GREVE, T.; OLSAKER, I.; WILLIAMS, J. L.; CALLESEN, H.; THOMSEN, P. D. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 6, p. 1273-1278, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.6.1273>.

WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. van; AERTS, B. J.; DAAS, J. H. den. Abnormal offspring following in vitro production of bovine preimplantation embryos: a field study. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 883-894, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00038-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00038-7).

WANG, J. X.; NORMAN, R. J.; WILCOX, A. J. Incidence of spontaneous abortion among pregnancies produced by assisted reproductive technology. **Human Reproduction**, v. 19, n. 2, p. 272-277, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/humrep/deh078>.