

Efeito da inibição dos receptores de fator de crescimento fibroblástico na diferenciação do endoderma primitivo em embriões bovinos

Gabriel Siqueira dos Santos¹, Caroline Pereira da Costa¹, Felipe Eduardo Luedke¹, Marcelo Demarchi Goissis¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo – SP

e-mail: gabriel.siqueira.santos@usp.br

Objetivos

A correta segregação das linhagens celulares do embrião é definitiva para o sucesso da gestação. Em embriões murinos, o fator de crescimento fibroblástico (FGF), por interação com receptores de FGF (FGFR), ativa a via MEK/ERK¹. A ativação da via MEK/ERK nas células da massa interna celular leva à expressão de GATA6 e SOX17 causando a diferenciação em endoderma primitivo (PE). A supressão dessa via leva à expressão de NANOG e diferenciação em epiblasto (EPI)¹. Para a espécie bovina, os mecanismos envolvidos nessa segregação não são completamente esclarecidos. Portanto, esse estudo pretende avaliar o papel da sinalização por FGF na especificação de EPI e PE em embriões bovinos por meio da inibição farmacológica dos FGFR e consequente expressão de NANOG, SOX17 e GATA6.

Métodos e Procedimentos

Durante o cultivo de embriões produzidos *in vitro* (CIV), será adicionado o inibidor de FGFR, o fármaco AZD4547 (AZD) (Cayman Chemical), o qual será diluído em DMSO. Teste dose-resposta será realizado em triplicata com doses de 1µM, 2µM e 4µM de AZD entre os dias 5 a 9 do CIV. Posteriormente, o tratamento com dose sem efeito negativo nas taxas de blastocistos obtidas será realizado em diferentes momentos no CIV: dias 5 a 9, dias 7 a 9 e dias 5 a 7. DMSO será adicionado nos mesmos momentos no grupo veículo (Grupo DMSO) e o grupo Controle seguirá sem adições ao meio de cultivo, em triplicata. Após a fixação dos embriões no dia 9 em paraformaldeído, haverá a detecção de NANOG, GATA6 e SOX17 em conjunto por imunofluorescência e as células marcadas por essa técnica serão contadas. A análise de

dose-resposta será feita por regressão linear e os dados de número de células serão analisados por ANOVA com teste de Tukey para comparação de médias.

Resultados

Tabela 1: Taxas embrionárias resultantes após tratamento dos embriões com uso de AZD4547 em duas replicatas de teste dose-resposta

Tratamento	Taxa de blastocisto (%)	Taxa de desenvolvimento (%)
Controle	25,00 ± 14,14 (10/40)	29,41 ± 14,24 (10/34)
DMSO	19,50 ± 0,67 (8/41)	28,57 ± 2,90 (8/28)
1µM	15,00 ± 0,00 (6/40)	18,18 ± 2,36 (6/33)
AZD4547	5,00 ± 7,07 (2/40)	5,88 ± 8,32 (2/34)
2µM	2,50 ± 3,54 (1/40)	2,86 ± 4,16 (1/35)
AZD4547		

O tratamento com 2µM de AZD resultou em taxas de blastocisto e desenvolvimento médias pelo menos três vezes menores (5,00%; 5,88% - Tabela 1) do que as taxas obtidas nos tratamentos com 1µM (15,00%; 18,18% - Tabela 1). Porém é necessário realizar mais uma replicata para definir a dose de AZD a ser utilizada no tratamento de embriões em diferentes tempos do CIV.

Conclusões

No teste dose-resposta, 1µM de AZD não causou efeito negativo nas taxas embrionárias de embriões bovinos.

Referências Bibliográficas

¹Yamanaka, Y.; Lanner, F.; Rossant. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development*. 13, 715-724 (2010)

Effect of inhibition of fibroblast growth factor receptors on differentiation of primitive endoderm in bovine embryos

Gabriel Siqueira dos Santos¹, Caroline Pereira da Costa¹, Felipe Eduardo Luedke¹, Marcelo Demarchi Goissis¹

¹School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo, São Paulo – SP

e-mail: gabriel.siqueira.santos@usp.br

Objectives

The correct segregation of embryo cell line is definitive for a successful pregnancy. In murine embryos, the fibroblast growth factor (FGF) binds to FGF receptors (FGFR) and activates MEK/ERK pathway¹. The MEK/ERK pathway activation, in cells of the inner cell mass, prompts the expression of GATA6 and SOX17 resulting in its differentiation in primitive endoderm (PE). Blocking this pathway prompts the expression of NANOG and differentiation into epiblast (EPI)¹. In bovine embryos, the mechanisms involved in this segregation are not completely clarified. Therefore, this study aims to evaluate the role of signaling by FGF in EPI and PE specification in bovine embryos through pharmacological inhibition of FGFR and, consequently, expression of NANOG, SOX17 and GATA6.

Materials and Methods

FGFR inhibitor, AZD4547 (AZD, Cayman Chemical) will be added during *in vitro* embryo culture (IVC). A dose-response test will be done in triplicate using AZD at 1µM, 2µM and 4µM between the days 5 and 9 of IVC. After that, the treatment in which the dose results in no negative effects in blastocyst rates will be performed in different times in IVC: days 5 to 9, days 7 to 9 and days 5 to 7. DMSO will be added in the same experimental times as a vehicle (DMSO group) and Control group will be carried without any additions in culture medium, in triplicate. After the fixation of embryos using paraformaldehyde in the day 9, NANOG, GATA6 and SOX17 will be detected together by immunofluorescence and the cells marked by this technique will be counted. The dose-response test analysis will be done by linear regression and the cell number data will be

analyzed by ANOVA with Tukey test for comparison of means.

Results

Table 1: Embryonic rates resulting after treatment of embryos using AZD4547 in two replicates of dose-response test.

Treatment	Blastocyst rate (%)	Development rate (%)
Control	25.00 ± 14.14 (10/40)	29.41 ± 14.24 (10/34)
DMSO	19.50 ± 0.67 (8/41)	28.57 ± 2.90 (8/28)
1µM AZD4547	15.00 ± 0.00 (6/40)	18.18 ± 2.36 (6/33)
2µM AZD4547	5.00 ± 7.07 (2/40)	5.88 ± 8.32 (2/34)
4µM AZD4547	2.50 ± 3.54 (1/40)	2.86 ± 4.16 (1/35)

The treatment with 2µM AZD resulted in mean blastocyst and development rates at least three times less (5.00%; 5.88% - Table 1) than rates obtained in treatments using 1µM (15.00%; 18.18% - Table 1). However, it is necessary to accomplish one replicate more in order to determine the dose of AZD that will be used in treatment of embryos in different IVC times.

Conclusions

In dose-response test, AZD at 1µM did not induced negative effect in embryonic rates of bovine embryos.

References

¹Yamanaka, Y.; Lanner, F.; Rossant. FGF signal-dependent segregation of primitive endoderm and epiblast in the mouse blastocyst. *Development*. 13, 715-724 (2010)