

Efeito do fator de crescimento de fibroblasto 4 (FGF4) na diferenciação do endoderma primitivo em embriões bovinos

Matheus Pasini Martins, Felipe Eduardo Luedke, Caroline Pereira da Costa, Marcelo Demarchi Goissis

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo (USP)- São Paulo - SP

E-mail de contato: matheus.pasini.martins@usp.br

Objetivos

As falhas no desenvolvimento do embriões in vitro podem estar relacionadas às alterações na fase inicial do desenvolvimento, incluindo a especificação dos tipos celulares. A segunda diferenciação celular que ocorre no embrião é a separação do epiblasto (EPI) e endoderma primitivo (PE). O objetivo específico é suplementar FGF em diferentes janelas no cultivo embrionário, avaliando a formação do PE e EPI pela avaliação da expressão de marcadores moleculares específicos para EPI, como NANOG, e para PE como GATA6 e SOX17 e desta forma, determinar o requerimento temporal de FGF4 para diferenciação do PE.

Métodos e Procedimentos

Foram coletados oócitos provenientes de abatedouro comercial e em sequência submetidos à maturação in vitro, fecundação e cultivo in vitro. Em um primeiro momento foi realizado teste dose-resposta para o FGF4, contendo respectivamente 0,5 µg/ml, 1 µg/ml e 2 µg/ml e um grupo controle, e todos grupos foram suplementados com 1 µg/ml heparina. Posteriormente, nos dias 5-7, 5-9 e 7-9 do CIV, os embriões serão tratados com a dose determinada de FGF4 e heparina. No dia 9 os embriões serão fixados em formaldeído 3,8%. Os mesmos serão analisados perante a presença dos marcadores de EPI ou PE, utilizando anticorpos primários referentes a marcação por NANOG, GATA6 e SOX17 e as células positivas para os marcadores serão contadas. Assim, deseja-se obter informações sobre a ação do tratamento na diferenciação do

PE em bovinos por meio da avaliação em microscopia de epifluorescência. Os dados foram analisados por regressão linear e ANOVA.

Resultados

Os resultados parciais das taxas encontram-se na tabela em sequência. O grupo tratado com 1µg/ml FGF foi o mais próximo ao controle ($p=0,99$), entretanto não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$) entre os grupos.

Figura 1. Tabela contendo as taxas de blastocistos e desenvolvimento embrionário referente aos testes dose resposta.

Grupo	Taxa Blastocisto	Taxa Desenvolvimento
C	30,00 ± 7,36 (24/80)	40,48 ± 9,61 (24/59)
0,5 ug/mL	21,25 ± 6,29 (17/80)	26,06 ± 6,44 (17/62)
1 ug/mL	28,75 ± 6,25 (23/80)	39,87 ± 6,02 (23/56)
2 ug/mL	16,25 ± 5,20 (13/80)	20,20 ± 8,62 (13/63)

Conclusões

A partir dos testes iniciais de taxa/dose resposta podemos concluir que as doses utilizadas não interferiram estatisticamente nas taxas de blastocisto e desenvolvimento.

Referências Bibliográficas

Canizo, J. R. et. al. (2019). A dose-dependent response to MEK inhibition determines hypoblast fate in bovine embryos. BMC Developmental Biology, 19:13.

Effect of fibroblast growth factor (FGF4) in the differentiation of primitive endoderm in bovine embryos

Matheus Pasini Martins, Felipe Eduardo Luedke, Caroline Pereira da Costa, Marcelo Demarchi Goissis

School of Veterinary Medicine and Animal Science – University of Sao Paulo (USP) - São Paulo - SP

Correspondence: matheus.pasini.martins@usp.br

Objective

Failures in embryo development in vitro may be related to changes in the early stage of development, including cell type specification. The second cell differentiation that occurs in the embryo is the separation of the epiblast (EPI) and the primitive endoderm (PE). The specific objective is to add FGF in different times of in vitro embryo culture and assess the formation of PE and EPI through evaluation the expression of specific molecular markers such as NANOG for EPI, and GATA6 and SOX17 for PE and thus, determine the time requirement of FGF4 for differentiation of PE.

Methods and Procedures

Oocytes from ovaries obtained at commercial slaughterhouses were collected and subsequently subjected to in vitro maturation, passing through the stages of fertilization and in vitro culture (IVC). At first, a dose-response test was performed for FGF4, containing 0.5 µg/ml, 1 µg/ml and 2 µg/ml, respectively, and a control group, and all groups were supplemented with 1 µg/ml heparin. Subsequently, on days 5-7, 5-9 and 7-9 of IVC, embryos will be treated with the determined dose of FGF4 and heparin. On the 9th day of IVC embryos will be fixed in 3.8% formaldehyde. They will be analyzed for the presence of the EPI or PE markers, using primary antibodies for markers NANOG, GATA6 and SOX17 and the positive cells will be counted. Thus, it is desired to obtain information about the treatment effect on the differentiation of PE in cattle through evaluation in epifluorescence microscopy. Data were analyzed by linear regression and ANOVA.

Results

The partial results are shown in the table below. The group treated with 1µg/ml FGF4 was the closest to the control ($p = 0.99$), however there was no statistically significant difference ($p > 0.05$) between the groups.

Figure 1. Table including the blastocyst and embryo development rates relative dose response tests.

Group	Blastocyst rate	Development rate
C	30,00 ± 7,36 (24/80)	40,48 ± 9,61 (24/59)
0,5 ug/mL	21,25 ± 6,29 (17/80)	26,06 ± 6,44 (17/62)
1 ug/mL	28,75 ± 6,25 (23/80)	39,87 ± 6,02 (23/56)
2 ug/mL	16,25 ± 5,20 (13/80)	20,20 ± 8,62 (13/63)

Conclusions

From the initial dose response tests, we observed that the doses used did not statistically interfere in blastocyst and development rates.

Reference

Canizo, J. R. et al. (2019). A dose-dependent response to MEK inhibition determines hypoblast fate in bovine embryos. BMC Developmental Biology, 19:13.