

*Ana Paula Azambuja*

**UM MODELO DE CULTURA PARA  
PRECURSORES CORONÁRIOS**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Biologia  
Celular da Universidade  
Federal do Paraná, para  
obtenção do título de Mestre  
em Biologia Celular e  
Molecular.

Curitiba

2006

*Ana Paula Azambuja*

**UM MODELO DE CULTURA PARA  
PRECURSORES CORONÁRIOS**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Biologia Celular  
da Universidade Federal do  
Paraná, para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Celular e  
Molecular.

Área de Concentração:  
Biologia Celular e Molecular

Orientador:  
Dr. José Xavier Neto

Curitiba

2006

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Azambuja, Ana Paula  
Um modelo de cultura para precursores coronários. / Ana Paula  
Azambuja. – Curitiba, 2006.

77f. : il. ; 30cm.

Orientador: José Xavier Neto

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Molecular.

1. Terapia celular 2. Ácido retinóico 3. Precursores coronários 4.  
Embrião I. Título II. Xavier Neto, José III. Universidade Federal do  
Paraná. Setor de Ciências Biológicas.

CDD(20.ed.) 611.018

*Ana Paula Azambuja*

**UM MODELO DE CULTURA PARA  
PRECURSORES CORONÁRIOS**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Biologia Celular da  
Universidade Federal do Paraná, para  
obtenção do título de Mestre em  
Biologia Celular e Molecular.

**Banca Examinadora:**

Orientador:

Dr. José Xavier Neto  
Universidade Federal do Paraná/  
Universidade de São Paulo

Membro:

Dr. Silvio Marques Zanata  
Universidade Federal do Paraná

Membro:

Dra. Lúcia Elvira Álvares  
Universidade Estadual de Campinas

Curitiba  
2006

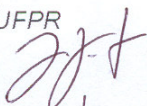
# PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná  
Instituto de Biologia Molecular do Paraná

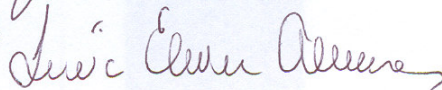
## PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:

Dr. José Xavier Neto  
Orientador da USP-UFPR



Dr<sup>a</sup>. Lúcia Elvira Álvares  
UNICAMP



Dr. Sílvio Marques Zanata  
UFPR



após argüir o(a) mestrando(a) **Ana Paula Azambuja** em relação ao seu trabalho de dissertação intitulada: "Um modelo de cultura para precursores coronários", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de **Mestre** em Biologia Celular e Molecular, área de concentração em **BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**.

A obtenção do título de Mestre está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas nas Normas Internas deste curso de pós-graduação.

Curitiba, 27 de março de 2006



Dr<sup>a</sup>. Célia Regina Cavichiolo Franco  
Coordenadora do Curso  
Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata  
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular e Molecular  
Matr UFPR 167649

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor-HCFMUSP), pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, com o auxílio financeiro (bolsa de Mestrado) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

*Aos meus pais,  
a quem dedico todos os meus passos.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. José Xavier Neto. Obrigada por ter compartilhado suas idéias e sua experiência, por ter confiado a mim o desenvolvimento do seu trabalho, e por ter proporcionado momentos únicos para a minha formação pessoal e profissional.

Ao diretor do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor, Dr. José Eduardo Krieger, pelo apoio e entusiasmo.

Ao Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná.

À CAPES, cujo apoio financeiro possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

À toda a equipe do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor pela ajuda durante o desenvolvimento de todo este trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Vascular do InCor, onde foram capturadas as imagens de fluorescência deste trabalho, por toda a ajuda.

Aos meus professores, cuja importância na minha vida é indiscutível. Devo a vocês todas as minhas conquistas. Em especial, agradeço à professora Dra. Cloris Faraco, cuja sabedoria e amor à Ciência e à Biologia do Desenvolvimento sempre serão exemplo. À professora Dra. Carla Wanderer por todo o carinho, dedicação, amizade e pela orientação dos meus “primeiros passos”. Ao professor Dra. Silvio Zanata pelo apoio, colaboração, entusiasmo e sugestões. Obrigada!

Ao Grupo de Biologia do Desenvolvimento: Tatiana, Michelle, Allysson, Marilene, Camila, Rollssman, Rodrigo, Marcos, Priscila, Roberta e Hozana, pela ajuda, amizade surpreendente, companheirismo único e alegria constante. Vocês tornaram estes anos inesquecíveis!

Agradeço especialmente: à Tatiana, pelo apoio, exemplo e amizade; à Michelle, pela ajuda e pela força; à Marilene, minha parceira de bancada, pelo companheirismo e pelas deliciosas conversas; ao Allysson por todo o seu conhecimento indiscutível e bom humor indispensável; à Roberta pela calorosa recepção, alegria, amizade e força.

Ao meu grande amigo Marcos por tantos momentos incríveis. Obrigada pelo apoio sempre presente, pelos comentários sempre instigantes, pelos conselhos sempre inteligentes e pelas risadas sempre contagiantes.

Aos outros amigos do laboratório. Obrigada pela amizade e pelo período de convivência e aprendizado que compartilhamos.

Aos meus velhos e bons amigos: Sibelle, Adolfo, Márcio e Isis (“*Fernandinha*”). Levo vocês sempre comigo!

Aos meus irmãos, porque “sem vocês meu mundo não seria completo”. *Pat*, minha eterna amiga, parceira, companheira e fonte de inspiração. *Fê*, a quem devo muito do que sou, gosto, ouço e penso. *Keké*, por toda a luz que trouxe a minha vida.

Aos meus pais. Nunca me cansarei de agradecer por toda a força, apoio, exemplo, incentivo, compreensão, amizade e amor. Obrigada! É por vocês que guio o meu caminho.

Às minhas avós, cuja experiência e vida sempre serão inspiração.

A Deus.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

*Obrigada!*

## **SUMÁRIO**

<b>RESUMO .....</b>	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 A Origem da Circulação Coronária.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2 Bases moleculares da vasculogênese coronária.....</b>	<b>25</b>
2.2.1 O estado indiferenciado das células derivadas do epicárdio .....	27
2.2.2 As células derivadas do epicárdio e a proliferação do miocárdio .....	28
2.2.3 A diferenciação dos precursores coronários.....	29
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
<b>3.1 Objetivos Gerais.....</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>33</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Obtenção de Embriões.....</b>	<b>35</b>
4.1.1 Embriões de codorna.....	35
4.1.2 Embriões de camundongo .....	35
<b>4.2 Coleta do OPE.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Cultura Celular do OPE.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4 Tratamentos .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5 Moléculas de Adesão.....</b>	<b>38</b>
<b>4.6 Caracterização da cultura .....</b>	<b>38</b>
<b>4.7 Imunohistoquímica Indireta.....</b>	<b>39</b>
<b>4.8 Captura e análise de imagens .....</b>	<b>40</b>
<b>4.9 Contagem de células.....</b>	<b>40</b>
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
<b>5.1 Padronização das condições de coleta e de cultura do OPE.....</b>	<b>42</b>
<b>5.2 Efeito do SFB .....</b>	<b>46</b>
<b>5.3 Moléculas de Adesão .....</b>	<b>49</b>
<b>5.4 O efeito do ácido retinóico .....</b>	<b>50</b>
5.4.1 Diferenciação de CML.....	50
5.4.2 Manutenção do estado indiferenciado dos precursores coronários .....	51
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>

<b>6.1 Padronização das condições de cultura do OPE.....</b>	<b>59</b>
<b>6.2 O SFB induz a diferenciação a CML .....</b>	<b>60</b>
<b>6.3 O papel do AR na diferenciação dos precursores coronários .....</b>	<b>62</b>
6.3.1 AR inibe a diferenciação a CML.....	62
6.3.2. O AR mantém as células derivadas do OPE em um estado indiferenciado.....	63
<b>6.4 Modelo do controle da diferenciação dos precursores coronários .....</b>	<b>65</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: O eixo OPE/E. O OPE (órgão proepicárdico) é a fonte inicial de precursores da circulação coronária. ....	24
Figura 2: Controles exercidos sobre os precursores coronários. ....	27
Figura 3: Modelos experimentais.. ....	36
Figura 4: Esquema dos tratamentos aplicados nas culturas de OPE. ....	38
Figura 5: Cultura do OPE.....	44
Figura 6: Manutenção de características autóctones das células do OPE em cultura .....	45
Figura 7: Controles dos anticorpos utilizados. ....	47
Figura 8: O efeito do SFB na cultura de OPE. ....	48
Figura 9: O Ácido retinóico inibe a diferenciação precoce de células proepicárdicas em células musculares lisas de camundongos.....	52
Figura 10: O Ácido retinóico inibe a diferenciação precoce de células proepicárdicas em células musculares lisas de codornas. ....	53
Figura 11: O AR aumenta a expressão de WT1. ....	54
Figura 12: O AR aumenta a expressão de RALDH2.....	55
Figura 13: Esquema representativo da participação do AR e do SFB na diferenciação dos precursores coronários a CML. ....	67

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Modelos animais para alterações no eixo OPE/E .....	22
Quadro 2: Relação dos anticorpos utilizados .....	39
Quadro 3: Moléculas de adesão.....	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

AR	ácido retinóico
BSA	albumina sérica bovina, do inglês <i>bovine serum albumine</i>
CML	célula muscular lisa
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
Epo	eritropoetina
EpoR	receptor de eritropoetina
HH	estágios de Hamburger e Hamilton (1951) para embriões de aves
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
OPE	órgão proepicárdico
OPE/E	Eixo órgão proepicárdico/epicárdio
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PFA	paraformaldeído
RALDH2	retinoaldeído desidrogenase
SFB	soro fetal bovino
SRE	elemento de resposta ao soro, do inglês <i>serum response element</i>
SRF	fator responsivo ao soro, do inglês <i>serum response factor</i>

## RESUMO

As doenças cardiovasculares apresentam-se como alvos atraentes para a Terapia Celular (TC) e atualmente diversos tipos de células-tronco, embrionárias e adultas, têm sido cogitados como fonte para TC cardíaca. Para que o potencial da TC possa ser explorado eficazmente é necessário um maior conhecimento da diferenciação dos diversos tipos de células pluripotentes disponíveis, assim como acesso a sistemas de referência adequados. No embrião, a circulação coronária deriva do órgão proepicárdico (OPE), que é constituído por células multipotentes, precursoras do endotélio, das células musculares lisas (CML), dos fibroblastos dos vasos coronários e também do epicárdio. Acreditamos que o estudo do desenvolvimento das coronárias possa levar ao aperfeiçoamento da TC cardíaca através do desenvolvimento de modelos eficientes de angiogênese. Assim, buscamos estabelecer um sistema de cultura para o OPE, caracterizando o estado de diferenciação dos precursores coronários em cultura, e ainda, elucidar fatores envolvidos na manutenção do estado indiferenciado destas células. Com isso, demonstramos a viabilidade da cultura do OPE, assegurando a manutenção de características endógenas destas células em cultura. Demonstramos ainda, que o soro fetal bovino (SFB), indispensável à adesão celular, apresenta um forte efeito indutor da diferenciação de CMLs em cultura. Refreando esta indução, o ácido retinóico (AR) se apresentou como um forte candidato a mantenedor do estado indiferenciado das células do OPE, sendo capaz não só de diminuir significativamente o número de CMLs em cultura, como também de aumentar a expressão de WT1 e RALDH2, reconhecidos como marcadores do estado indiferenciado desta linhagem celular.

Palavras chave: 1. Precursores coronários. 2. Terapia Celular. 3. Ácido Retinóico. 4. Órgão proepicárdico. 5. Embrião.

## **1. INTRODUÇÃO**

As doenças cardiovasculares apresentam características que as tornam alvos atraentes para a terapia celular. Em resposta a agressões variadas, o coração apresenta reações estereotipadas destinadas a preservar sua função. O exemplo clássico é a hipertrofia cardíaca ativada em patologias hipertensivas, valvulares, isquêmicas e genéticas (ORLIC *et al.*, 2001; ABBOTT & GIORDANO, 2003; CIULLA *et al.*, 2004). Embora eficientes a curto prazo, essas reações regulatórias estereotipadas se tornarão os principais agentes de destruição do órgão a longo prazo. Portanto, a existência de danos semelhantes em agressões muito heterogêneas fornece uma base racional para o uso de estratégias comuns de preservação da função cardíaca sendo que, em muitos dos casos de doença cardíaca, como em cardiopatias isquêmicas, o objetivo terapêutico é a restauração da contratilidade do órgão através da recuperação da malha circulatória.

Nos últimos anos abriram-se perspectivas para um uso amplo das células pluripotentes em medicina. Diversos modelos foram testados em animais de experimentação e em ensaios clínicos e os resultados iniciais têm oferecido esperança. Hoje, diversos tipos de células-tronco, como as embrionárias, germinativas, do cordão umbilical e da medula óssea adulta têm sido cogitadas como fonte para terapia celular cardíaca (ORLIC *et al.*, 2001; ABBOTT & GIORDANO, 2003; CIULLA *et al.*, 2004). Problemas práticos e éticos têm consolidado uma preferência pelas células pluripotentes da medula óssea adulta, sendo que graus variados de sucesso têm sido registrados tanto em protocolos clínicos quanto experimentais (ORLIC *et al.*, 2001; ABBOTT & GIORDANO, 2003; CIULLA *et al.*, 2004). Contudo, a terapia celular cardíaca ainda é um procedimento pouco sofisticado, tanto do ponto de vista teórico quanto do operacional, e hoje a intervenção médica se limita a semi-purificações e à administração direta ou indireta de células-tronco da medula óssea adulta.

Para que o potencial da terapia celular cardíaca possa ser explorado eficazmente, é necessário um maior conhecimento da biologia da diferenciação dos diversos tipos de células pluripotentes disponíveis. Quatro objetivos fundamentais precisam ser atingidos: 1- estabelecer quantitativamente os potenciais angiogênicos dos vários tipos de células-tronco; 2- desenvolver a capacidade de programar a sua diferenciação; 3- desenvolver testes para a determinação das capacidades individuais de diferenciação vascular e, com isso, estabelecer tanto o número quanto a composição de tipos celulares administrados; 4- expandir o potencial de diferenciação vascular das células-tronco. A realização desses quatro objetivos só será possível se dispusermos de sistemas de referência adequados. Portanto, acreditamos que o

estudo do desenvolvimento embrionário da circulação coronária pode fornecer elementos para o incremento da capacidade restauradora das células-tronco, levando a um desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas de revascularização de corações afetados pela insuficiência coronária.

Embora relativamente desconhecido, o eixo órgão proepicárdio/epicárdio (OPE/E) é responsável pela origem da circulação coronária durante o desenvolvimento (PEREZ-POMARES *et al.*, 1997; DETTMAN *et al.*, 1998; GITTENBERGER-DE GROOT *et al.*, 1998; MANNER, 1999; PEREZ-POMARES *et al.*, 2002b). Assim, enquanto outras células-tronco podem ser consideradas “amadoras” para a formação de vasos coronários, as células do eixo OPE/E são, verdadeiramente, as “profissionais” nesta função. Portanto, acreditamos que as diversas transformações sofridas pelas células que compõem o eixo OPE/E podem fornecer valiosas indicações sobre os processos-chave envolvidos na angiogênese coronária fisiológica.

Tendo em vista o futuro desenvolvimento de um modelo eficiente de angiogênese coronária baseado na biologia do desenvolvimento desta malha vascular, o presente trabalho busca compreender vias envolvidas na manutenção do estado indiferenciado das células derivadas do OPE e na diferenciação dos precursores coronários. Para tanto, este trabalho foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira etapa buscamos a padronização da cultura do OPE. Ainda nesta primeira etapa as células derivadas do OPE em cultura foram caracterizadas através de imunohistoquímica, quanto aos principais fenótipos vasculares. Na segunda etapa do trabalho procuramos descobrir um método para manter as células do OPE em um estado indiferenciado, caracterizado pela manutenção de marcadores típicos do fenótipo indiferenciado como WT1 e RALDH2.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2.1 A Origem da Circulação Coronária

O sistema circulatório de amniotas é formado em estágios muito precoces do desenvolvimento embrionário, satisfazendo assim a crescente demanda metabólica do embrião em rápido desenvolvimento. Assim, o coração é o primeiro órgão funcional, apresentando o seu primeiro batimento por volta de 8.25 dias de desenvolvimento em embriões de camundongo (estágio HH10 em embriões de galinhas). Neste momento, o coração embrionário é uma estrutura tubular, constituída por uma fina camada de tecido muscular (miocárdio), revestido internamente pelo endocárdio (DE LA CRUZ & MARKWALD, 1998; XAVIER-NETO *et al.*, 2005). Esta organização simples do coração precoce permite que as necessidades metabólicas básicas do miocárdio, ainda de pequena espessura, sejam obtidas por processos de difusão a partir do sangue circulante. Porém, à medida que ocorre o espessamento da parede do miocárdio, a difusão de oxigênio e metabólitos se torna insuficiente para a demanda dos cardiomiócitos em proliferação, fazendo-se necessário o desenvolvimento de uma malha circulatória para a perfusão da parede cardíaca – a circulação coronária.

O grupo de precursores da circulação coronária está concentrado no OPE, um órgão mesodérmico transitório encontrado em vertebrados de peixes a aves e mamíferos (MANNER *et al.*, 2001). O OPE surge no septo transverso, entre o broto hepático e o coração abaixo do canal atrioventricular (MANNER, 1993). Este órgão mantém a estrutura mesotelial da parede do celoma, organizando-se, porém, em uma série de vilosidades epiteliais, constituídas por células multipotentes precursoras de quatro tipos celulares: endotélio, células musculares lisas (CML), fibroblastos coronários e epicárdio (PEREZ-POMARES *et al.*, 1997; DETTMAN *et al.*, 1998; GITTENBERGER-DE GROOT *et al.*, 1998; MANNER, 1999; PEREZ-POMARES *et al.*, 2002b).

A partir do OPE, as células precursoras migram para o coração suprajacente onde formam o epicárdio (XAVIER-NETO *et al.*, 2000; MANNER *et al.*, 2001; NAHIRNEY *et al.*, 2003). Uma série de estudos tem demonstrado a existência de dois diferentes mecanismos de transferência das células do OPE até o miocárdio através da cavidade pericárdica. No primeiro mecanismo, predominante em peixes e alguns mamíferos, agregados celulares formados pelas vilosidades do OPE atravessam passivamente o fluido da cavidade pericárdica alcançando a superfície nua do miocárdio em diferentes pontos, de onde se inicia a migração

sobre a parede do miocárdio (PEREZ-POMARES *et al.*, 1997; MANNER *et al.*, 2001). Estudos com embriões de anfíbios e aves demonstraram a predominância de um segundo mecanismo de transferência de células. Nestes organismos uma ponte de matriz extracelular se forma entre o OPE e o coração, o que permite a ligação direta de vilosidades deste órgão com o miocárdio (MANNER *et al.*, 2001; NAHIRNEY *et al.*, 2003). Segundo NAHIRNEY e colaboradores (2003) esta ponte de matriz extracelular é rica em proteoglicanos de heparan sulfato. Com isso, os autores sugerem que esta ponte poderia atuar não somente como uma ligação física entre as duas estruturas, mas também como um centro de sinalização e regulação da transferência de células do OPE. Isso porque matrizes ricas em proteoglicanos de heparan sulfato podem atuar também como estoques de fatores de crescimento com papel em sinalização parácrina (NAHIRNEY *et al.*, 2003).

Através de interações adesivas com o miocárdio as células provenientes do OPE iniciam migração e proliferação sobre este órgão. Este processo culmina com a criação do epicárdio, a membrana que recobre externamente o coração. Durante a última década a geração de animais *knockout* foi um passo importante para a elucidação da formação do epicárdio, bem como das moléculas envolvidas neste processo. Desta forma, destacou-se a importância das moléculas de adesão celular VCAM-1 (expressa no miocárdio, KWEE *et al.*, 1995) e a subunidade  $\alpha$ -4 da integrina (expressa nas células derivadas do OPE, YANG *et al.*, 1995), no reconhecimento e migração das células do OPE sobre o miocárdio e na formação e manutenção do epicárdio. Animais deficientes para estas moléculas de adesão perecem por volta de 10.5 dias de desenvolvimento com características comuns como ausência de epicárdio, má formação coronária e hipoplasia ventricular. Outro elemento comum nestes modelos é a hemorragia intrapericárdica caracterizada pela falta de conexão entre a malha coronária (neste caso deficiente) e o tronco da aorta, que acaba assim por derramar sangue dentro da cavidade pericárdica. A convergência deste fenótipo demonstra a complexidade das vias genéticas que envolvem a morfogênese coronária, sendo comum a sua manifestação em animais deficientes na expressão de moléculas como GATA4 e o seu ligante FOG2, também relacionadas ao processo de formação/manutenção do epicárdio (TEVOSIAN *et al.*, 2000; CRISPINO *et al.*, 2001; KATZ *et al.*, 2003; WATT *et al.*, 2004). O Quadro 1 mostra a convergência de fenótipos entre animais deficientes em genes envolvidos com a morfogênese do eixo OPE/E.

Gene/ Alteração	Fenótipo cardíaco	Referência
$\alpha$ -4 Integrina	Hemorragia intrapericárdica, miocárdio ventricular hipoplásico, descolamento do epicárdio e subdesenvolvimento coronário.	(YANG <i>et al.</i> , 1995)
Epo/EpoR	Miocárdio ventricular hipoplásico, descolamento do epicárdio, subdesenvolvimento do espaço subepicárdico e ausência de estruturas capilares (coronárias)	(WU <i>et al.</i> , 1999)
ETS1,2 (antisense)	Alterações no desenvolvimento do miocárdio, hemorragia subepicárdica e má formação (subdesenvolvimento) e distribuição da circulação coronária.	(MACIAS <i>et al.</i> , 1998)
FOG1	Hemorragia intrapericárdica, hipoplasia ventricular, defeitos de septação ventricular.	(KATZ <i>et al.</i> , 2003)
FOG2	Hemorragia intrapericárdica, miocárdio ventricular hipoplásico e anormalidades (subdesenvolvimento) coronárias.	(TEVOSIAN <i>et al.</i> , 2000)
GATA4	Ausência de OPE, hipoplasia ventricular, defeitos de septação ventricular.	(CRISPINO <i>et al.</i> , 2001; WATT <i>et al.</i> , 2004)
RXR $\alpha$	Apoptose do OPE, miocárdio ventricular hipoplásico, má formação do epicárdio, diminuição no número de ilhotas sangüíneas no espaço subepicárdico,	(GRUBER <i>et al.</i> , 1996; CHEN <i>et al.</i> , 2002; JENKINS <i>et al.</i> , 2005)
VCAM	Miocárdio ventricular hipoplásico, defeitos no septo interventricular, ausência do epicárdio, hemorragia intrapericárdica.	(KWEE <i>et al.</i> , 1995)
WT1	Miocárdio ventricular hipoplásico, hemorragia intrapericárdica, má formação do epicárdio (epicárdio descontínuo), pequeno número de células derivadas do epicárdio e ausência de coronárias.	(MOORE <i>et al.</i> , 1999)
Ablação manual do OPE	Miocárdio ventricular hipoplásico, atraso na formação do epicárdio, pequeno número de células derivadas do epicárdio e deficiência (subdesenvolvimento) coronária.	(MANNER, 1993)

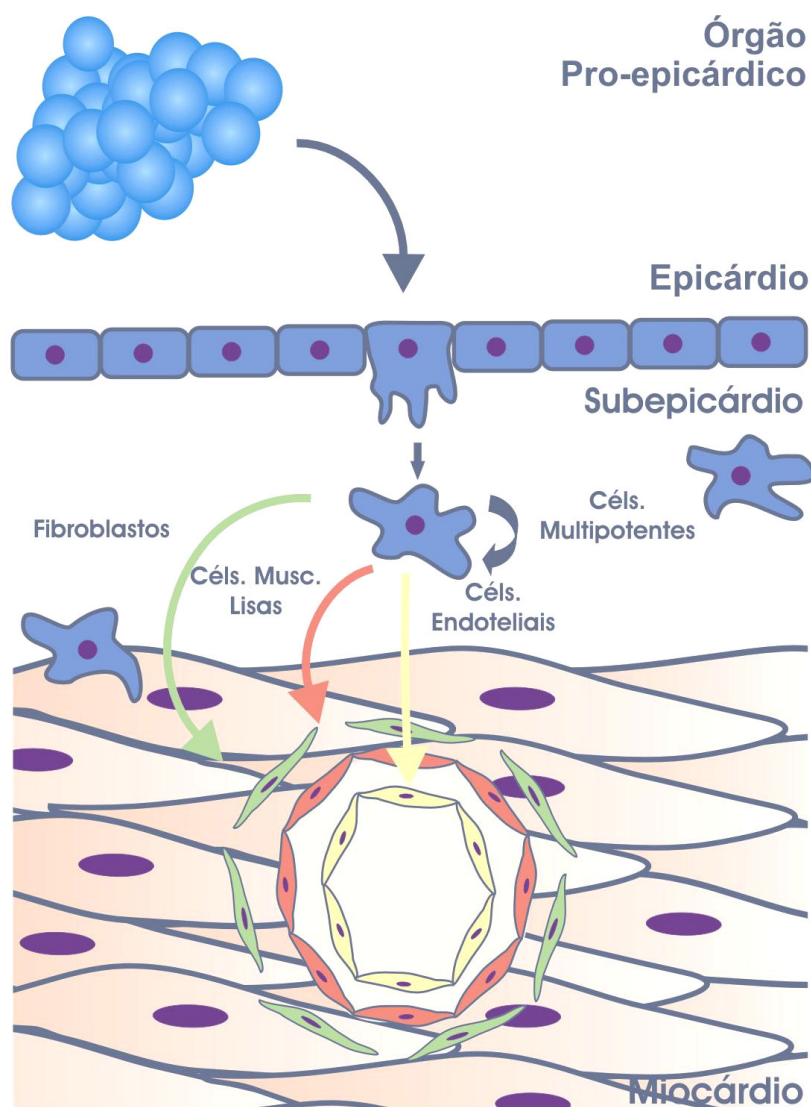
**Quadro 1:** Modelos animais para alterações no eixo OPE/E

Durante a fase inicial de formação do epicárdio, as células desta monocamada apresentam-se diretamente aderidas à superfície do miocárdio. Subseqüentemente, entretanto, um espaço preenchido por matriz extracelular surge entre estas duas camadas celulares (WESSELS & PEREZ-POMARES, 2004). Inicialmente, este espaço subepicárdico se forma nas junções atrioventricular, conoventricular e interventricular, surgindo posteriormente ao longo dos ventrículos e na porção ventral dos átrios (PEREZ-POMARES *et al.*, 1997). O espaço subepicárdico é rico em elementos de matriz extracelular como colágeno tipo IV, fibronectina e laminina (KALMAN *et al.*, 1995). Atualmente acredita-se que a fibronectina produzida pelo miocárdio precede a chegada de células epicárdicas, podendo assim atuar no

direcionamento da migração destas células. Contudo, a organização desta matriz é descontínua, observando-se nichos de maior acúmulo nas regiões do canal atrioventricular e do septo interventricular, formando microambientes propícios à hematopoiese e vasculogênese (KALMAN *et al.*, 1995). Isso se dá, provavelmente, devido ao acúmulo de fatores de crescimento produzidos pelo miocárdio como FGFs, VEGFs, TGF $\beta$ s e BMPs (WESSELS & PEREZ-POMARES, 2004).

Em todos os vertebrados estudados, o recém formado espaço subepicárdico é prontamente povoado por células mesenquimais que, sofrendo drásticas mudanças em seu citoesqueleto, se destacam do epicárdio, em um processo conhecido como transformação epitélio-mesenquimal (DETTMAN *et al.*, 1998; MANNER *et al.*, 2001; WESSELS & PEREZ-POMARES, 2004). A transformação epitélio-mesenquimal do epicárdio é semelhante à que ocorre durante a formação dos coxins endocárdicos que, posteriormente, darão origem às válvulas do canal atrioventricular. É destacada a participação de fatores de crescimento, produzidos pelo miocárdio, como bFGF, TGF $\beta$ , BMP2 e BMP4, na indução desse processo (WESSELS & PEREZ-POMARES, 2004). Uma vez no espaço subepicárdico, subgrupos destas células oriundas do epicárdio invadem o miocárdio e entram em processo de diferenciação, sofrendo a influência de vários fatores de crescimento/citocinas como VEGF, PDGF, BMPs e FGFs. A partir de então, estas células se diferenciam em endotélio, musculatura lisa e fibroblastos coronários, os tipos vasculares principais (WESSELS & PEREZ-POMARES, 2004) (Figura 1). Destaca-se também um papel importante das células derivadas do OPE na regulação da proliferação do miocárdio, na diferenciação das fibras de Purkinje e, ainda, na septação do coração (MANNER, 1993; KWEE *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 1995; MANNER, 1999; MOORE *et al.*, 1999; GITTENBERGER-DE GROOT *et al.*, 2000).

Em resumo, o eixo OPE/E fornece a possibilidade de identificação dos mecanismos genéticos que dirigem uma célula precursora ao destino coronário. Portanto, acreditamos que o estudo da biologia das células que compõem o eixo OPE/E, particularmente dos processos de geração do OPE, a mobilização dos precursores coronários a partir do epicárdio e a diferenciação dos precursores intramiocárdicos, contribuirá, a longo prazo, significativamente para o aprimoramento das técnicas de revascularização do coração.



**Figura 1: O eixo OPE/E.** O OPE (órgão proepicárdico) é a fonte inicial de precursores da circulação coronária. A partir do OPE as células migram sobre o miocárdio e formam o epicárdio. A transformação epitélio-mesenquimal de uma subpopulação das células epicárdicas gera células multipotentes e migratórias que invadem o miocárdio. A diferenciação destas células derivadas do epicárdio ocorre dentro do miocárdio em resposta à sinalização por fatores de crescimento/citocinas como VEGF, PDGF, BMPs e FGFs.

## 2.2 Bases moleculares da vasculogênese coronária

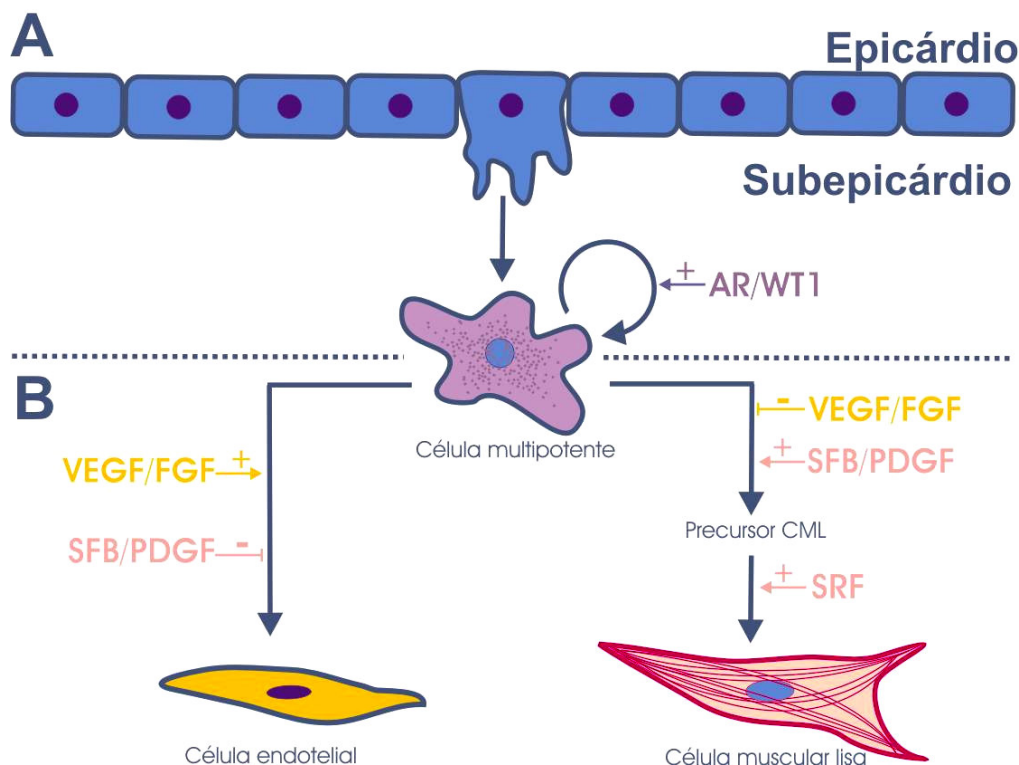
Nos últimos anos tem se acumulado informação considerável sobre a biologia celular e molecular das células do eixo OPE/E. Vários mecanismos de diferenciação têm sido sugeridos, assim como tem sido descrita uma série de marcadores moleculares dos vários fenótipos vasculares, intermediários e definitivos (WESSELS & PEREZ-POMARES, 2004). De maneira simplificada, todos os processos de diferenciação ocorrem a partir de um cenário onde os precursores coronários se encontram em estágio indiferenciado no OPE e no epicárdio. O processo de diferenciação tem início após a transformação epitélio mesenquimal e formação das células derivadas do epicárdio. Nesses estágios parcialmente indiferenciados, as células derivadas do epicárdio expressam uma série de marcadores característicos como os fatores de transcrição Slug (CARMONA *et al.*, 2000) e Ets (MACIAS *et al.*, 1998; LIEVENEMA *et al.*, 2003) envolvidos no processo de transformação epitélio mesenquimal; o receptor de eritropoetina (EpoR), provavelmente relacionado a resposta de vias angiogênicas; o fator de transcrição tipo zing finger WT1 (*Wilms' tumor transcription factor*) (MOORE *et al.*, 1999; CARMONA *et al.*, 2001; PEREZ-POMARES *et al.*, 2002b), e a enzima chave na síntese de ácido retinóico (AR), a RALDH2 (MOSS *et al.*, 1998; XAVIER-NETO *et al.*, 2000); além de uma série de moléculas de adesão como Bves (REESE *et al.*, 1999), e a subunidade  $\alpha$ -4 de integrina (YANG *et al.*, 1995). Embora alguns destes genes sejam apenas marcadores do fenótipo indiferenciado ou efetores da interação adesiva entre epicárdio e miocárdio, é possível que RALDH2 e WT1 estejam envolvidos na manutenção do estágio indiferenciado ou na regulação da diferenciação das células derivadas do OPE, o que é sugerido pelo fato de que a sua expressão é diminuída durante o processo de diferenciação (PEREZ-POMARES *et al.*, 2002a; GUADIX *et al.*, 2006)

Diferentemente do proposto previamente, as coronárias se formam a partir de um processo denominado vasculogênese (MUNOZ-CHAPULI *et al.*, 2002). A vasculogênese se caracteriza pela diferenciação *in situ* de precursores vasculares, formando ilhotas sanguíneas que acabam por se interconectar, formando uma malha vascular. Guadix e colaboradores (2006) recentemente demonstraram, *in vivo*, um alto poder vasculogênico do OPE, sendo este potencializado pelos fatores de crescimento VEGF e FGF.

Os precursores coronários só adquirem a expressão de marcadores fenotípicos após a transformação epitelial-mesenquimal. Mais freqüentemente, a expressão é iniciada quando

eles ainda estão no espaço subepicárdico e/ou durante a sua migração através do miocárdio (PEREZ-POMARES *et al.*, 2002b). Inicialmente, parece haver uma clara separação temporal entre a diferenciação endotelial (HH21 em embriões de galinha) e a muscular lisa (HH32 em embriões de galinha), sugerindo que esta última é suprimida até que haja suficiente geração de tipos endoteliais sob a influência de VEGF produzido pelo miocárdio hipóxico (TOMANEK *et al.*, 2001b; TOMANEK *et al.*, 2002). Mesmo após o encaminhamento dos precursores à diferenciação muscular, parece haver ainda um estágio proliferativo, pré-muscular, caracterizado pela expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso (LANDERHOLM *et al.*, 1999). A passagem para este estágio parece ser regulada pelo PDGF produzido pelas células endoteliais (LANDERHOLM *et al.*, 1999; LU *et al.*, 2001; TOMANEK *et al.*, 2001b). Uma elevada proporção destas células progride rumo à diferenciação CML definitiva sob o controle de SRF (*Serum Response Factor*), enquanto que o balanço pode constituir um compartimento proliferativo, ou mesmo assumir outros destinos vasculares (DU *et al.*, 2003). Pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que controlam a diferenciação dos precursores coronários em fibroblastos/pericitos.

Em nossa interpretação, a geração dos tipos coronários principais (o endotélio e as CML) reflete a atuação de diferentes fatores destinados, primeiramente, a reprimir a diferenciação dos precursores coronários, e posteriormente, a induzir fenótipos vasculares específico. Assim, dois tipos de controle seriam impostos aos precursores coronários: um controle geral, exercido durante a fase de OPE e epicárdio, e destinado a manter o fenótipo precursor indiferenciado, e um controle específico da diferenciação ao fenótipo vascular, endotélio ou CML (Figura 2).



**Figura 2: Controles exercidos sobre os precursores coronários.** A) Controle geral, exercido durante a fase de OPE, epicárdio e célula multipotente, e destinado a manter o fenótipo precursor indiferenciado. Entre as moléculas que podem estar participando desta via estão o WT1 e o AR. B) Controle específico da diferenciação. Na presença de fatores como soro/PDGF, a célula multipotente assume um fenótipo de CML. Por outro lado, na presença de fatores como VEGF e FGF, há a indução do fenótipo endotelial.

### 2.2.1 O estado indiferenciado das células derivadas do epicárdio

Entre os possíveis candidatos ao papel de mantenedores do fenótipo indiferenciado no OPE e no epicárdio estão o fator de transcrição WT1 e a sinalização via AR. O WT1 é um fator de transcrição do tipo *zinc finger*, identificado como fator candidato no desenvolvimento de um tumor pediátrico renal de alta frequência (LITTLE *et al.*, 1999; LEE & HABER, 2001; ROBERTS, 2005; SCHOLZ & KIRSCHNER, 2005). Durante o desenvolvimento embrionário, o WT1 apresenta uma ampla expressão gênica, estando envolvido na formação dos rins, de neurônios, da glândula adrenal e do epicárdio (MOORE *et al.*, 1999; ROBERTS, 2005). Em animais *knockout* para WT1, além da má formação de outros órgãos, há diferenciação prematura para músculo liso e crescimento insuficiente da circulação coronária (MOORE *et al.*, 1999). Embora animais *knockout* para RALDH2 pereçam antes do estágio de desenvolvimento das coronárias, há evidências múltiplas na literatura de que o AR é

necessário para o desenvolvimento coronário. Animais deficientes em RALDH2 apresentam um defeito endotelial intrínseco e animais *knockout* para RXR $\alpha$ , um receptor de AR, apresentam um menor número de ilhotas endoteliais no coração (CHEN *et al.*, 2002). Evidências circunstanciais para esta hipótese também são encontradas nos padrões de expressão destes genes durante o desenvolvimento coronário. Assim, observa-se uma forte expressão de WT1 no OPE, no epicárdio, nas células subepicárdicas, e nas células que invadem o miocárdio. É observado um gradiente decrescente de expressão da face epicárdica do coração (zona compacta) até a face endocárdica do coração (zona trabeculada), onde poucas células WT1-positivas são encontradas. Isso indica que à medida que as células derivadas do epicárdio entram em processo de diferenciação, a expressão de WT1 é perdida (PEREZ-POMARES *et al.*, 2002b). Paralelamente, a expressão de RALDH2 foi demonstrada no OPE, no epicárdio e nas células derivadas em um padrão muito semelhante ao de WT1, criando assim, no espaço subepicárdico, um ambiente rico em AR. A exemplo do que ocorre com WT1, a expressão de RALDH2 também se reduz à medida em que os precursores epicárdicos penetram no coração e ativam a expressão de marcadores de diferenciação (PEREZ-POMARES *et al.*, 2002b).

### 2.2.2 As células derivadas do epicárdio e a proliferação do miocárdio

A criação deste ambiente rico em AR no espaço subepicárdico, associada a sinalização por eritropoetina, tem sido relacionada à manutenção de um estado proliferativo da face epicárdica (zona compacta) do coração, culminando com o espessamento da parede do coração. Neste processo, AR e eritropoetina atuam no epicárdio, e nas células derivadas do epicárdio, que passam a produzir morfógenos atuantes nos cardiomiócitos da zona compacta do coração (GRUBER *et al.*, 1996; KASTNER *et al.*, 1997; OGILVIE *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2002; STUCKMANN *et al.*, 2003). Recentemente foi demonstrado que moléculas da família dos FGFs, particularmente o FGF9, podem estar envolvidos nesta via, atuando como mitógenos sobre o miocárdio. Esta hipótese tem como base o fato de o FGF9 ser induzido por AR e expresso no epicárdio, e ainda, que animais *knockout* para este fator de crescimento apresentam diferenciação precoce dos cardiomiócitos resultando em hipoplasia ventricular (LAVINE *et al.*, 2005). Esta via de sinalização reforça a hipótese de que o AR e a Epo podem estar atuando também na manutenção de um estado indiferenciado e proliferativo dos precursores coronários.

### 2.2.3 A diferenciação dos precursores coronários

Os mecanismos moleculares de diferenciação endotelial e muscular lisa também estão sendo elucidados. Atualmente, existem elementos suficientes para se acreditar que os precursores coronários atuam de maneira semelhante a progenitores vasculares bipotenciais (endoteliais/musculares lisos). Neste modelo os fatores de crescimento VEGF e PDGF seriam cruciais na decisão do destino a ser tomado por estas células (MUNOZ-CHAPULI *et al.*, 2002; GUADIX *et al.*, 2006). Esta visão é baseada em um modelo desenvolvido recentemente para progenitores derivados de células-tronco responsivos a VEGF e PDGF. Neste modelo, quando cultivados na presença de VEGF, os progenitores se diferenciam em células endoteliais, enquanto que, quando cultivados na presença de PDGF ou soro, as células sofrem diferenciação a células musculares lisas (YAMASHITA *et al.*, 2000). Consistente com esta hipótese, recentemente foi demonstrada a co-expressão de receptores de VEGF e PDGF nas células proepicárdicas e epicárdicas (GUADIX *et al.*, 2006).

A participação de VEGF na diferenciação de fenótipos coronários endoteliais vem sendo estudada há alguns anos, sendo esta via de sinalização relacionada ao processo de hipóxia do miocárdio (TOMANEK *et al.*, 2001b; TOMANEK *et al.*, 2002). Assim a proliferação dos cardiomiócitos e o aumento da espessura do miocárdio, estimulada indiretamente pela sinalização por AR e EpoR via próprio epicárdio, torna insuficiente a difusão de oxigênio a partir do endocárdio. O desencadeamento da hipóxia do tecido em proliferação leva a expressão de HIF (*Hipoxia Inducible Factor*) um fator de transcrição que tem como alvo, entre outros genes, o VEGF e a eritropoetina (Epo) (TOMANEK *et al.*, 2002). Com isso, as células derivadas do epicárdio, Flk-1-positivas (VEGFR2), entram em processo de diferenciação, formando ilhotas sangüíneas no espaço subepicárdico. Neste ambiente hipóxico do coração em desenvolvimento a diferenciação das células derivadas do epicárdio a CML é tardia e acredita-se que esteja relacionada ao aumento de pressão sofrido pelas células endoteliais coronárias quando há a ligação da malha coronária recém formada à aorta (VRANCKEN PEETERS *et al.*, 1997). Em resposta ao estiramento do vaso, as células endoteliais expressam PDGF promovendo o recrutamento de precursores de CML entre as células derivadas do epicárdio e, conseqüentemente, a arterialização do vaso (FOLKMAN & D'AMORE, 1996; TOMANEK *et al.*, 2001b; VAN DEN AKKER *et al.*, 2005). O processo de diferenciação (determinação) das CML não está completamente elucidado, porém, sabe-se que este é um processo que envolve a expressão do fator de transcrição SRF que se liga a

SREs (*Serum Response Element*) presentes em uma série de genes marcadores de CML como  $\alpha$ -actina de músculo liso, SM22 $\alpha$ , calponina, caldesmon (LANDERHOLM *et al.*, 1999) e também em genes envolvidos com a proliferação celular (DU *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004). É descrito que a alternância entre o fenótipo proliferativo e diferenciado das CML é dependente da formação de complexos protéicos, SFR/Elk1 ou SRF/miocardina, nos SREs, respectivamente. Assim, a ligação de SRF ao coativador miocardina é necessária e suficiente para a ativação da transcrição de marcadores de diferenciação (proteínas contráteis) (DU *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004). Por outro lado, quando há a sinalização por PDGF ou soro, a fosforilação do fator de transcrição Elk1 desloca a miocardina do complexo, bloqueando a transcrição de genes de diferenciação e permitindo a proliferação deste tipo celular (DU *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004).

Uma via de sinalização adicional parece estar envolvida na especificação/determinação das CML coronárias. Landerholm e colaboradores (1999) demonstraram, em cultura, que a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso não é afetada pela deficiência em SRF. Foi demonstrado ainda, que a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso é precoce, precedendo a transformação epitélio mesenquimal. Com isso, concluiu-se que a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso parece identificar células com o potencial de diferenciação a CML (pré-CML), uma vez que, em cultura, nem todas as células que expressam  $\alpha$ -actina de músculo assumem marcadores terminais de diferenciação para este fenótipo (calponina,  $\gamma$ -actina de músculo liso, e miosina de músculo liso) (LANDERHOLM *et al.*, 1999).

Em resumo, há um considerável corpo de evidências indicando que a geração das coronárias pode ser entendida como uma competição entre processos de diferenciação de precursores bi- ou multi-potenciais, com os processos que mantêm o fenótipo indiferenciado. Faz-se necessário assim, a elucidação dos vários agentes envolvidos tanto na manutenção do estado indiferenciado, quanto na diferenciação destes precursores, permitindo com isso a elucidação das vias de sinalização envolvidas no desenvolvimento coronário. A compilação destas informações, associadas a ensaios *in vivo* da potencialidade das células do OPE pode levar então ao desenvolvimento de modelos eficientes de angiogênese cardíaca e, finalmente, pode abrir perspectivas na utilização deste conhecimento para programar a diferenciação de outros tipos de células-tronco e levando a um incremento de eficiência na revascularização em terapia celular cardíaca.

### **3. OBJETIVOS**

Tendo em vista a potencialidade descrita para as células derivadas do OPE e a possibilidade de identificação dos mecanismos que dirigem uma célula precursora ao destino coronário, este trabalho tem como objetivos gerais e específicos:

### **3.1 Objetivos Gerais**

1. Estabelecer um sistema de cultura para o OPE, caracterizando o estado de diferenciação dos precursores coronários em cultura.
2. Estabelecer um método de cultura capaz de manter os precursores coronários em um estado indiferenciado.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- A) Estabelecer condições de coleta e cultura do OPE de embriões de codorna e de camundongo.
- B) Avaliar o estado de diferenciação das células do OPE em cultura.
- C) Definir condições de cultura que propiciam a manutenção do estado indiferenciado das células do OPE.
- D) Avaliar, em cultura, o desempenho do AR como agente inibidor da diferenciação das células derivadas do OPE a CML coronárias, através de imunohistoquímica para o marcador  $\alpha$ -actina de músculo liso.
- E) Elucidar os mecanismos de ação do AR na manutenção estado indiferenciado das células do OPE.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

## 4.1 Obtenção de Embriões

### 4.1.1 Embriões de codorna

Embriões de codorna (*Coturnix coturnix*) foram obtidos a partir de ovos fertilizados, incubados em ambiente úmido a 38,5°C, por aproximadamente 56 horas permitindo o desenvolvimento embrionário até os estágios utilizados para a coleta do OPE, HH16-18 (HAMBURGUER & HAMILTON, 1951) (Figura 3A).

Após a incubação, o conteúdo do ovo era depositado em uma placa de Petri com o cuidado de manter o embrião voltado para a superfície. Afastando-se cuidadosamente com lenços de papel o albúmen que recobre o embrião o blastoderma era exposto, sobre este era então posicionada uma moldura de papel de filtro estéril. O embrião era então removido aderido à moldura de papel filtro, recortando-se as membranas ao seu redor (CHAPMAN *et al.*, 2001).

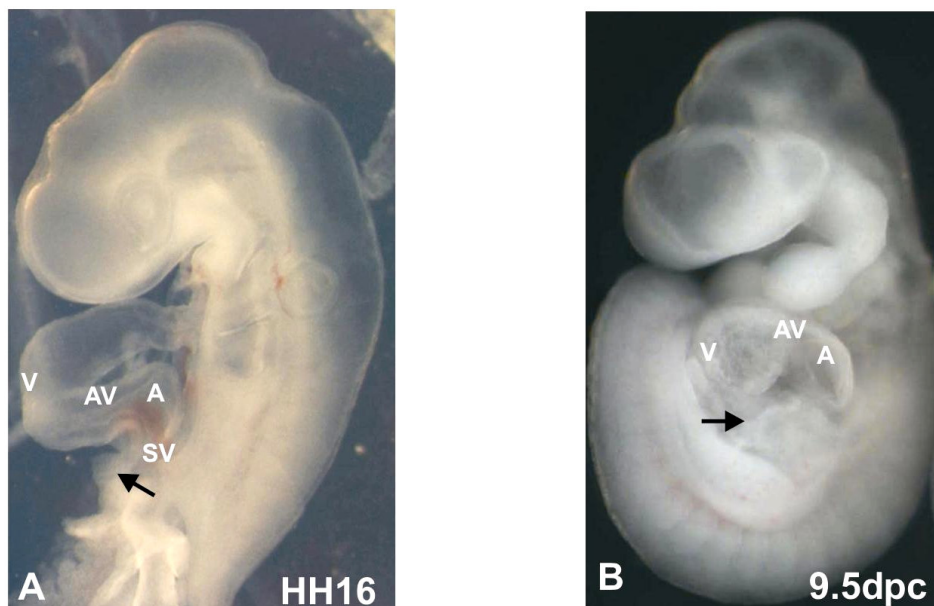
Os embriões aderidos à moldura de papel filtro foram lavados em solução de PBS estéril contendo Penicilina e Estreptomicina (12 U/ml) a fim de remover o excesso de gema. Os embriões foram mantidos em cultura, até o momento da dissecação do OPE, com o lado ventral voltado para cima sobre uma matriz semi-sólida composta de Albúmen/Ágar (50% de Albúmen fino de ovos, 123 mM NaCl, 0.3% Ágar bacteriológico, 10 U/ml Penicilina, 10 U/ml Estreptomicina) em placas de Petri que funcionam como câmaras úmidas mantidas em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

### 4.1.2 Embriões de camundongo

Para a obtenção dos embriões de camundongo (*Mus musculus*, linhagem FVB) a gestação das fêmeas foi estagiada através da observação da presença da rolha vaginal (*plug vaginal*) na manhã seguinte ao acasalamento, passando este a ser considerado o dia 0,5 de desenvolvimento embrionário. Este acompanhamento é possível pois assume-se que o acasalamento entre um casal de camundongos ocorre à meia-noite.

Nos experimentos realizados neste trabalho, os embriões de camundongo foram coletados após 9,5 dias de desenvolvimento (dias pós-coito – d.p.c.). Este é o estágio em que as células do OPE ainda não migraram para o miocárdio (Figura 3B). Após o sacrifício da fêmea por deslocamento cervical, a extração dos embriões foi feita, por meio de uma incisão na região abdominal da fêmea e retirada do útero. Os cornos uterinos foram então lavados em

uma placa de Petri contendo PBS + penicilina/streptomicina (12 U/ml). Com o auxílio de pinças finas, em estereomicroscópio, os embriões foram individualizados e dissecados de seus anexos embrionários em uma segunda placa contendo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) + 15% de soro fetal bovino (SFB).



**Figura 3: Modelos experimentais.** A) Embrião de codorna no estágio HH16 (aproximadamente 56 horas de incubação). B) Embrião de camundongo com 9.5 dpc. As setas indicam a posição do órgão proepicárdico. A – átrio comum, AV – canal atrioventricular, SV – seio venoso, V – ventrículo.

#### 4.2 Coleta do OPE

A coleta do OPE, tanto de embriões de codorna quanto de embriões de camundongo, foi realizada, em estereomicroscópio, com o auxílio de pinças finas e agulhas de tungstênio. Para tanto, o pericárdio foi cuidadosamente removido e o OPE dissecado do septo transverso evitando a contaminação com células do seio venoso. Após a dissecação os OPEs foram retirados do meio com o auxílio de capilares de vidro e prontamente posicionados e mantidos em placas de cultura com DMEM+15%SFB em estufa a 37°C.

### 4.3 Cultura Celular do OPE

Após a coleta ter sido realizada, os OPEs foram posicionados, com o auxílio de pinças finas, sobre lamínulas previamente limpas e esterilizadas, em placas de 24 poços, sendo um órgão posicionado por lamínula. Para a limpeza das lamínulas (13mm de diâmetro) estas foram mantidas sob agitação por 30 minutos em solução de SDS a 0,5%, posteriormente lavadas com água destilada e autoclavadas.

Os OPEs foram mantidos em DMEM + 15% SFB por aproximadamente 30 horas, em estufa a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, permitindo a adesão celular. Passado este período inicial de adesão celular, o meio de cultura era trocado por DMEM + 0,5% SFB, por um período de 48 horas, o que impede o contato excessivo das células com o soro. Este período é necessário à formação de uma monocamada de células sobre a lamínula. No quarto dia de cultura os tratamentos foram iniciados (Figura 4).

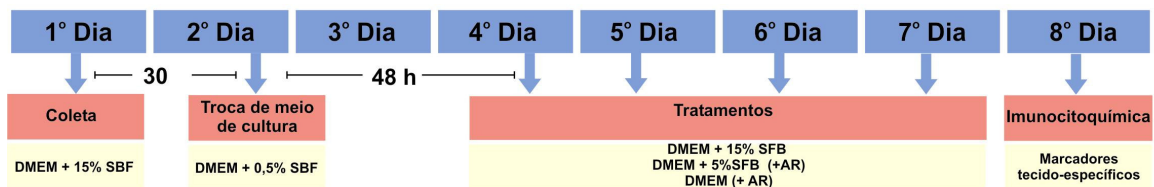
### 4.4 Tratamentos

Buscando avaliar o efeito do soro fetal bovino e do ácido retinóico sobre a diferenciação das células derivadas do OPE, diferentes tratamentos foram realizados a partir do quarto dia de cultura.

- 1- DMEM + 15% SFB;
- 2- DMEM + 5% SFB
- 3- DMEM + 5% SFB + AR
- 4- DMEM (remoção total do SFB);
- 5- DMEM + AR

Para avaliar o efeito do ácido retinóico, as células foram tratadas com *all-trans* ácido retinóico a uma concentração de 10<sup>-6</sup>M diluído no próprio meio de cultura a partir de uma solução estoque a 10<sup>-3</sup>M em DMSO (dimetil sulfóxido). Nas culturas controle o veículo (DMSO) foi adicionado em igual quantidade.

Os tratamentos foram realizados por quatro dias, sendo o meio de cultura trocado diariamente. No oitavo dia de cultura as lamínulas contendo as células derivadas do OPE foram submetidas ao protocolo de imunohistoquímica indireta como descrito posteriormente.



**Figura 4: Esquema dos tratamentos aplicados nas culturas de OPE.** Após a coleta, os órgãos são posicionados sobre lamínula e mantidos em DMEM + 15% SFB para promover a adesão celular. Aproximadamente 30 horas após o início da cultura o meio de cultura é substituído por DMEM + 0,5% SFB. No quarto dia de cultura têm início os tratamentos. No oitavo dia de cultura é feita a caracterização das células através de imunohistoquímica.

#### 4.5 Moléculas de Adesão

Como descrito posteriormente, a utilização do soro fetal bovino direciona a diferenciação das células derivadas do epicárdio a CML. Como este trabalho objetiva alcançar a manutenção do estado indiferenciado destas células em cultura, foram realizados testes com diferentes moléculas, para avaliar o seu papel na adesão do OPE à lamínula, possibilitando assim, a substituição, ou a diminuição do uso de SFB. Para tanto, foi realizada a cobertura das lamínulas utilizadas como substrato da cultura com soluções de Poly-L-Lysine (0,1µg/ml), gelatina (30mg/ml), Matrigel a 30µg/ml, Vitronectina a 10µg/ml, Fibronectina a 20µg/ml ou Colágeno tipo I a 0,2g/L.

Após a cobertura com as soluções acima descritas, as lamínulas eram posicionadas nas placas de cultura (24 poços) e mantidas em fluxo laminar por 1-2 horas para secagem. Após este período os poços eram lavados duas vezes com PBS para a remoção do excesso de moléculas não diretamente aderidas à lamínula.

A cultura do OPE sobre estas diferentes moléculas foi realizada em DMEM + 0,5% SFB.

#### 4.6 Caracterização da cultura

Para a caracterização das células derivadas do OPE, *in vitro*, as culturas foram avaliadas, através de imunohistoquímica de fluorescência quanto a expressão de: 1 – marcadores típicos do fenótipo epicárdico indiferenciado, utilizando anticorpos primários para WT1 e RALDH2; 2 – marcador endotelial, utilizando o anticorpo primário para Fator von

Willebrand, 3 – marcador de CML, utilizando o anticorpo primário para  $\alpha$ -actina de músculo liso; e ainda, 4 – marcador de fibroblastos utilizando o anticorpo primário para vimentina (Quadro 2).

Como anticorpos secundários foram utilizados anti-IgG de camundongo e de coelho conjugados com Cy3 ou FITC (Quadro 2).

Para a detecção e contagem do número total de células na cultura, à imunofluorescência foi associada a marcação de núcleos por *Hoechst* 33258 (LIU & FUNG, 1998).

Anticorpo	Titulação	Empresa
<i>Anti-mouse IgG Cy3 Conjugate</i>	1:700	Sigma
<i>Anti-mouse IgG Fluorescein Conjugate</i>	1:100	Calbiochem
<i>Anti-rabbit IgG Cy3 Labelled</i>	1:700	Amersham
<i>Monoclonal Mouse IgG anti Smooth Muscle <math>\alpha</math>-Actin (clone 1A4)</i>	1:500	Sigma
<i>Monoclonal Mouse IgG anti Vimentin</i>	1:75	Sigma
<i>Rabbit IgG anti RALDH2</i>	1:400	Doação
<i>Rabbit IgG anti Von Willebrand Factor</i>	1:150	Sigma
<i>Rabbit IgG anti WT1</i>	1:50	Santa Cruz

**Quadro 2:** Relação dos anticorpos utilizados

#### 4.7 Imunohistoquímica Indireta

As células provenientes da cultura celular (lamínulas) foram fixadas e imunomarcadas segundo o seguinte protocolo:

1. Lavagem em PBS; 3 vezes, 5 minutos cada;
2. Fixação com PFA 4% por 10 minutos a 4°C;
3. Lavagem com PBS; 3 vezes 10 minutos cada;
4. Permeabilização em solução de PBS+nonidet P40 0,1% por 30 minutos a 37°C;
5. Lavagem com PBS; 3 vezes 10 minutos cada;
6. Bloqueio com solução de PBS+albumina 1% a 37°C por 30 minutos;
7. Lavagem com PBS; 2 vezes, 5 minutos cada;
8. Incubação com anticorpo primário diluído em solução PBS+albumina 1% a 37° por 60 minutos;
9. Lavagem com PBS; 4 vezes, 10 minutos cada;

10. Incubação com anticorpo secundário diluído em PBS por 90 minutos a 4°C, em câmara escura;
11. Lavagem em PBS, 5 minutos;
12. Incubação com *Hoechst* 33258 (20µg/ml diluído em tampão de citoesqueleto) por 30 minutos;
13. Lavagem em PBS; 3 vezes 10 minutos cada;
14. Montagem em lâmina.

#### **4.8 Captura e análise de imagens**

As imagens em campo claro foram capturadas em microscópio invertido, processadas e avaliadas com auxílio do programa *Image-Pro Plus*.

As lâminas resultantes de imunohistoquímica foram avaliadas em microscópio de fluorescência. As imagens foram capturadas e processadas com auxílio do programa *Axio Vision*.

#### **4.9 Contagem de células**

Visando estabelecer o efeito dos diferentes tratamentos realizados neste trabalho sobre a diferenciação a células musculares lisas, foram realizadas contagens do número de células diferenciadas, *in vitro*, em relação ao número total de células da cultura. Para tanto, cinco campos foram escolhidos aleatoriamente por cultura (lamínula), sendo estabelecida a relação entre o número de células musculares lisas (células marcadas por Cy3)/número total de células (núcleos marcados por *Hoechst* 33258) para cada campo, e posteriormente, definida uma média para a cultura. Estes valores foram então submetidos a análise comparativa par-a-par entre todos os grupos experimentais (*Bonferroni's Multiple Comparison Test*) e a análise estatística (Teste T) utilizando o programa *GraphPad Prism*.

## **5. RESULTADOS**

### 5.1 Padronização das condições de coleta e de cultura do OPE

Para os experimentos realizados neste trabalho explantes de OPE foram obtidos de embriões de codornas e de camundongos. Uma vez que o OPE é uma estrutura transitória, os estágios de coleta são bem definidos, sendo utilizados os estágios HH16-18 para embriões de codorna e estágio 9,5 d.p.c. para embriões de camundongo.

Buscando estabelecer o melhor protocolo de obtenção das células derivadas do OPE, tanto de camundongos, quanto de codornas, foram utilizadas, inicialmente, duas estratégias: 1 – digestão prévia do OPE por tripsina e, 2 – cultura direta do explante. No primeiro protocolo, as estruturas dissecadas eram reunidas em agregados, seguido de digestão por tripsina. Para a digestão dos OPEs, os explantes foram mantidos em solução de tripsina 0,2% por 4 minutos, em estufa a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período a reação era bloqueada pela adição de DMEM+15%SFB. As células então eram centrifugadas, ressuspensas em DMEM+15%SFB, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 24 poços cobertas com lamínulas de vidro em uma concentração de 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. No segundo protocolo, após a dissecação dos OPEs, estes eram individualmente posicionados sobre lamínulas de vidro recobertas com DMEM+15%SFB, sem nenhuma forma de digestão prévia do tecido.

O protocolo que inclui a digestão prévia do OPE permitiu uma maior homogeneização entre o número de células por cultura, o que facilitou a análise dos resultados. Porém, esta estratégia se mostrou pouco eficiente, uma vez que muitas células se tornavam inviáveis após o processo de digestão da matriz do OPE. Com isso, optamos por adotar neste trabalho a estratégia de cultura direta do explante do OPE, como descrito em ensaios de invasão de matriz tridimensional (DETTMAN *et al.*, 1998; TOMANEK *et al.*, 2001a; TOMANEK *et al.*, 2001b; TOMANEK & ZHENG, 2002) e sobre substrato sólido (plástico) (LANDERHOLM *et al.*, 1999; HATCHER *et al.*, 2004).

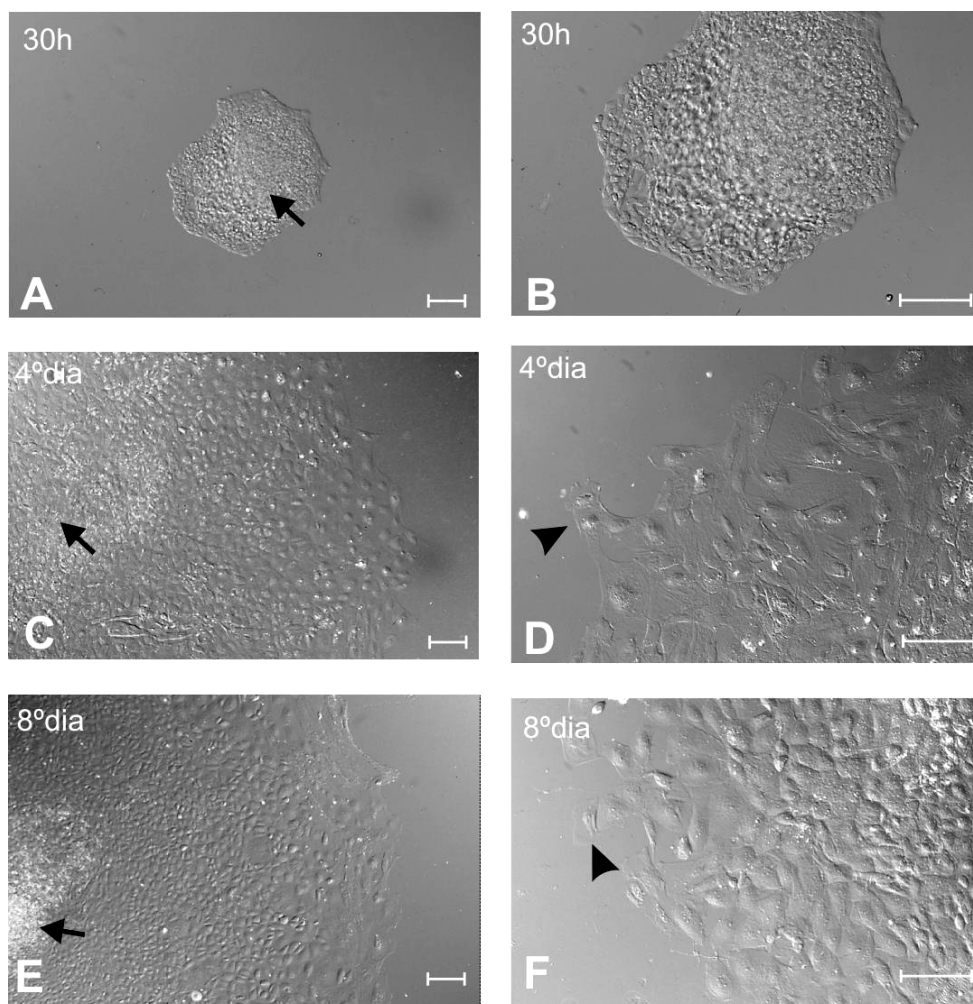
Após ser posicionado sobre lamínula de vidro em DMEM+15%SFB o OPE tanto de embriões de codorna, quanto de camundongo, adere ao substrato e, em um período de 30 horas de cultura, as células deste órgão iniciam um processo de migração que culmina com a formação de um halo de células em torno do ponto central da cultura (Figura 5). Este halo apresenta uma formação contínua, caracterizando-se como uma monocamada de células epiteliais. Neste momento, observa-se na porção mais periférica da cultura a presença de

algumas células com filopodia e pseudopodia, não sendo observadas, porém, células migratórias isoladas da monocamada.

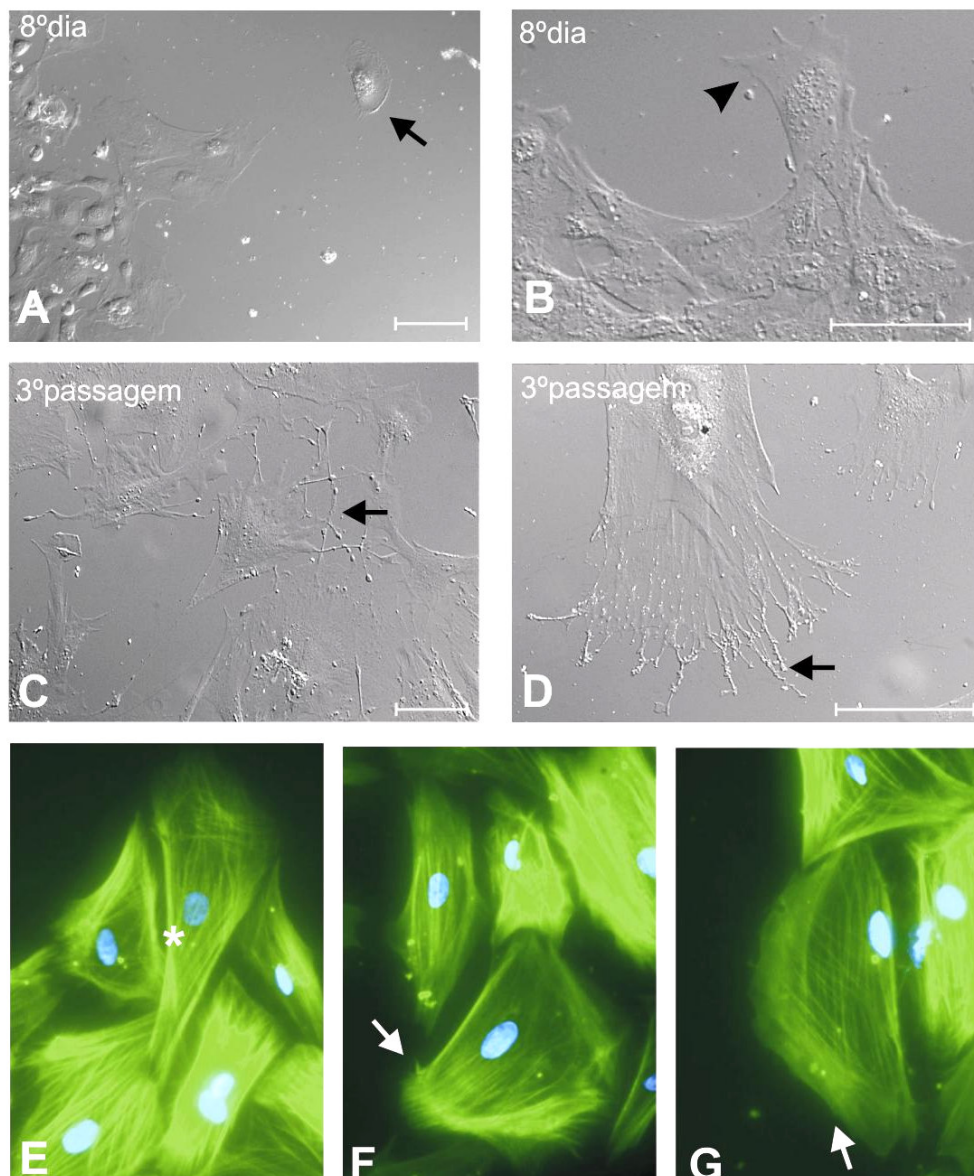
Completado este período inicial de adesão celular, o meio de cultura era substituído por um meio com baixa concentração de SFB (DMEM+0,5%SFB), visando minimizar o contato das células com o soro. Durante este período (48 horas) pôde se observar um expressivo aumento da área do halo de células em torno do ponto central da cultura (Figura 5), tornando-se mais evidente a presença de estruturas de migração celular como pseudopodia e filopodia. Ainda, durante este período, observamos que as primeiras células isoladas, destacadas do conjunto epitelial que forma a cultura. Estas células apresentam uma forma irregular, com aspecto migratório, características mantidas até o último dia de cultura (8º dia – Figura 6).

No quarto dia de cultura têm início os diferentes tratamentos realizados neste trabalho. De uma maneira geral, as culturas evoluíram de maneira semelhante nos diferentes tratamentos, sendo característico o aumento no número de células isoladas do restante da cultura. A principal diferença que pôde se observar durante o período de quatro dias que compõem os tratamentos foi a expansão mais acentuada da cultura nos tratamentos onde o SFB foi mantido na cultura (DMEM+15%SFB, DMEM+5%SFB, DMEM+5%SFB+AR), devido, provavelmente à proliferação celular induzida por fatores de crescimento presentes no soro. Nestas culturas as células se mostraram menores, o que é consistente com a idéia de um ciclo celular mais curto.

Visando uma maior caracterização das células derivadas do OPE, algumas culturas de células foram mantidas além dos oito dias do protocolo padrão adotado no trabalho. Estas culturas foram expandidas e se mostraram viáveis por até quatro passagens, mantendo características autóctones como a capacidade proliferativa e a presença de estruturas como lamelipodia e filopodia (Figura 6).



**Figura 5: Cultura do OPE.** A figura (contraste de fase) mostra a evolução da cultura do OPE. A-B) Explante de OPE 30 horas após o início da cultura (DMEM+15%SFB). Observa-se o início da formação de um halo de células em torno do ponto central da cultura (seta). C-D) Quarto dia de cultura do OPE (DMEM+0,5%SFB). Neste momento é característica a expansão do halo de células em torno do ponto central da cultura (seta) e a observação das primeiras células isoladas do restante da cultura (cabeça de seta). E-F) Oitavo dia de cultura. A seta indica o ponto central da cultura, e a cabeça de seta aponta para uma célula isolada da monocamada. Barra = 50 $\mu$ m.



**Figura 6: Manutenção de características autóctones das células do OPE em cultura.** A) Imagem mostrando uma célula isolada do restante da cultura (seta) com características migratórias (DMEM+5%SFB). B) Fotomicrografia demonstrando uma célula da periferia da cultura apresentando pseudopodia (cabeça de seta) (DMEM+15%SFB). C-D) Imagem da cultura de OPE em terceira passagem. Pode-se observar a presença de múltiplos filopodia (setas) na frente de migração da célula. E-G) Imuno marcação do citoesqueleto de actina. As setas indicam a presença de lamelipodia. O asterisco indica a formação de fibras tensionais. Barra = 50 $\mu$ m.

## 5.2 Efeito do SFB

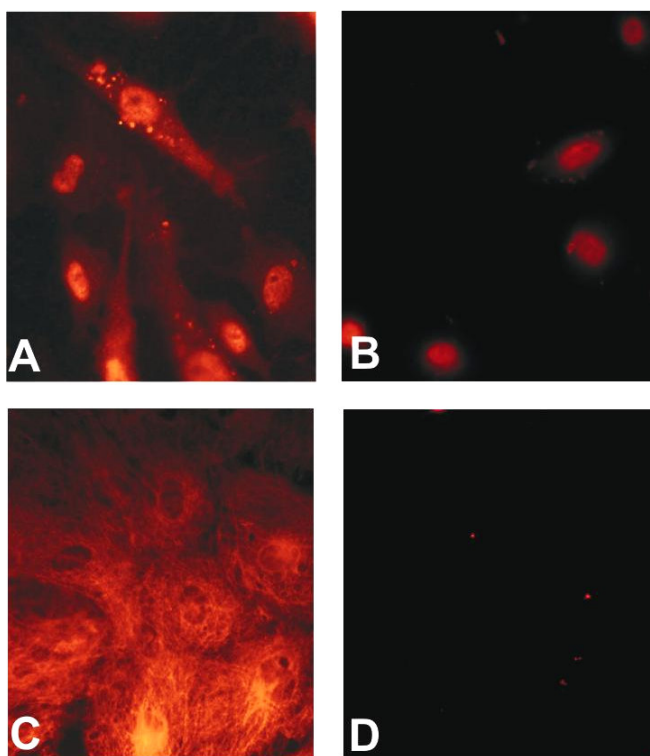
Visando determinar o efeito do SFB sobre as células do OPE em cultura os órgãos foram submetidos a reações de imunohistoquímica com anticorpos contra antígenos específicos dos principais tipos celulares derivados do OPE (endotélio, CML e fibroblastos). Para esta fase inicial do trabalho foram utilizados os tratamentos DMEM+15%SFB e DMEM, a partir do quarto dia de cultura.

Quando suplementadas com SFB, tanto culturas provenientes de embriões de camundongos, quanto provenientes de embriões de codorna apresentaram intensa marcação para o marcador de CML ( $\alpha$ -actina de músculo liso – Figura 8). Esta forte indução da diferenciação dos precursores coronários a CML chega a 80% das células, sendo que os maiores índices de diferenciação celular foram encontrados na periferia da cultura. As células reconhecidas pelo anticorpo anti- $\alpha$ -actina de músculo liso foram observadas tanto na monocamada epitelial, onde apresentavam feixes subcorticais de actina; quanto isoladas da cultura, exibindo os filamentos de actina organizados em fibras tensionais. É interessante notar que apesar dos altos níveis de diferenciação na cultura suplementada com SFB, esta nunca se dá na totalidade da cultura, permanecendo um grupo de células que não se diferencia a CML. Neste tratamento não foram observadas células marcadas para o fenótipo endotelial (fator Von Willebrand) ou para o fenótipo de fibroblasto (vimentina).

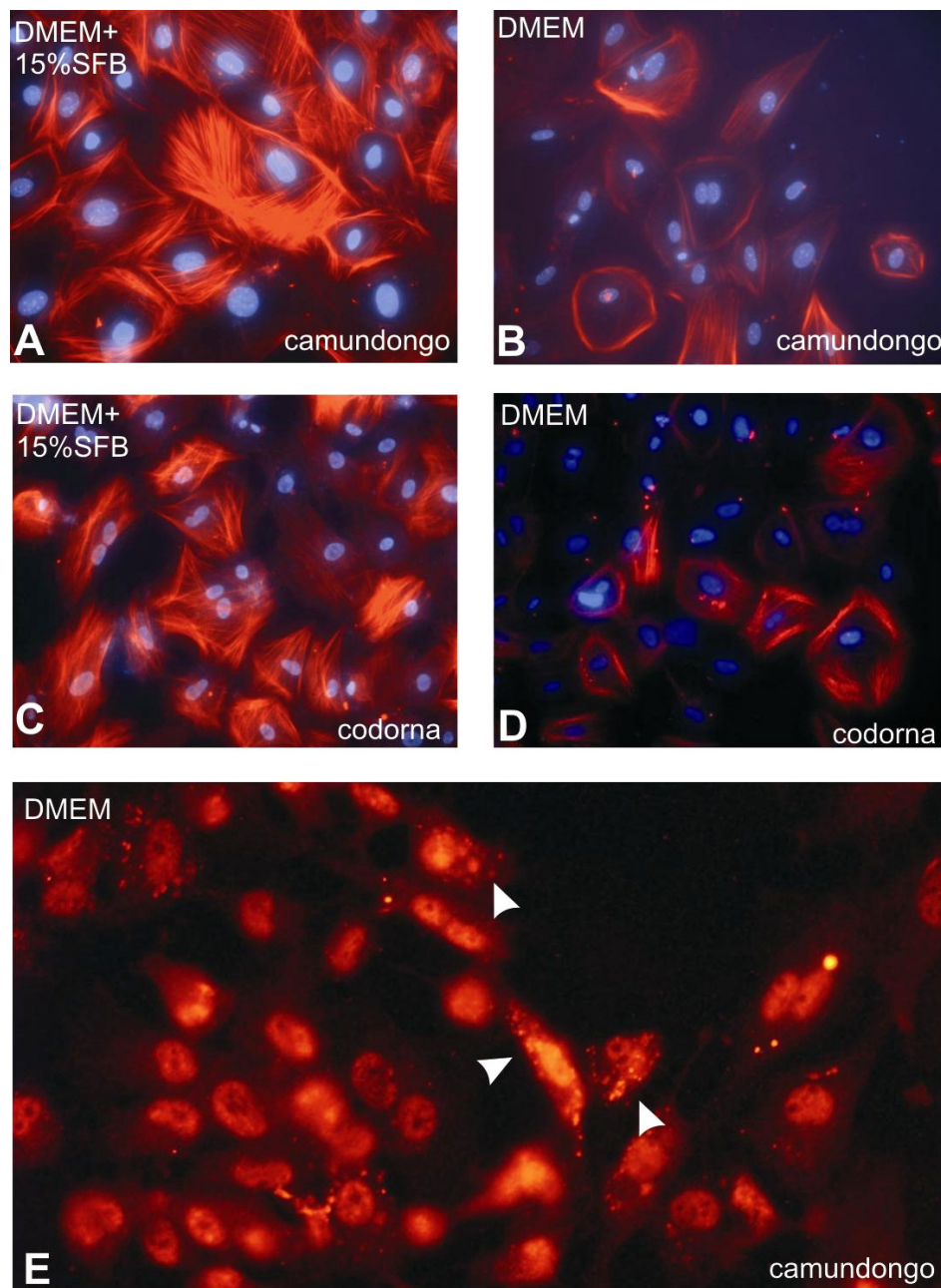
O efeito do SFB pode ainda ser avaliado através de resultados de imunohistoquímicas realizadas em culturas do OPE que sofreram a retirada total do SFB após o período inicial de adesão. Nestas culturas é marcante a redução do número de CML observadas, não ultrapassando o índice de 60% das células da cultura. É interessante observar que, na ausência de SFB, além de uma robusta redução no número de CML na cultura, há uma importante redução do número de feixes de filamentos de actina presentes nas células (Figura 8). Esta redução do número de CML e da quantidade de feixes de filamentos de actina se mostrou conservada em culturas provenientes de embriões de camundongo e de codorna.

Outro dado interessante referente a retirada do soro da cultura é o aparecimento de algumas células que expressam o marcador endotelial Fator Von Willebrand (Figura 8), indicando que as células derivadas do OPE mantêm a potencialidade de formar tipos vasculares em cultura. Novamente não foram observadas células reconhecidas pelo marcador de fibroblastos. A Figura 7 mostra os controles positivos destes anticorpos.

Dados referentes a imunohistoquímicas realizadas após 1 a 4 passagens demonstram que estas células apresentam capacidade proliferativa em cultura. Novamente foi possível observar a manutenção de um grupo de células não marcadas para o fenótipo de CML, ainda que na presença de SFB. Nestes experimentos, mesmo após várias passagens, o número de células musculares lisas não passa de 80% do total de células da cultura.



**Figura 7: Controles dos anticorpos utilizados.** A-B) Célula REC (*Rabbit Endothelial Cell*) A) Controle positivo de endotélio. Imunomarcção com o anticorpo para Fator Von Willebrand + Cy3. B) Controle negativo de A. C-D) Fibroblastos cardíacos. C) Controle positivo. Imunomarcção com o anticorpo para Vimentina + Cy3. D) Controle negativo de C. Aumento = 200x.



**Figura 8: O efeito do SFB na cultura de OPE.** Caracterização por imunohistoquímica das culturas de OPE na presença e ausência de SFB. A-D) Imunohistoquímica de OPE de embriões de camundongo (A-B) e de codorna (C-D) em cultura, utilizando como anticorpos  $\alpha$ -actina de músculo liso + Anti-IgG-Cy3 e contra-marcação de núcleos por Hoechst 33258. A e C) Imagens mostrando a robusta diferenciação a CML (vermelho) na presença de SFB. B e D) Imagens mostrando a redução a forte redução tanto no número de células marcadas, quanto no número de feixes de filamentos de actina presentes em cada célula, na ausência de SFB. E) Imunohistoquímica de OPE de embriões de camundongo, utilizando como anticorpos Fator von Willebrand + Anti-IgG-Cy3. As cabeças de seta indicam a diferenciação a células endoteliais nas culturas de OPE na ausência de SFB. Aumento = 200x.

### 5.3 Moléculas de Adesão

A importância de moléculas de matriz extracelular e de membrana (adesão) tem sido recentemente destacada no processo de formação do epicárdio e seus derivados (KWEE *et al.*, 1995; YANG *et al.*, 1995; NAHIRNEY *et al.*, 2003). Assim, na intenção de avaliar o efeito de diferentes moléculas de matriz e de adesão celular sobre a biologia do OPE em cultura, e ainda, buscando alternativas ao SFB para a adesão celular à superfície de cultura, testamos diferentes substratos (gelatina, poly-L-Lysine, colágeno tipo I, vitronectina, matrigel e fibronectina).

Dentre as moléculas testadas pôde-se observar que apenas nas lamínulas recobertas com matrigel (3 aderidos em 10 testados) e nas lamínulas recobertas com fibronectina (2 aderidos em 10 testados) houve a adesão do OPE na presença de meio com baixas concentrações de SFB (DMEM+0,5%SFB – Quadro 3). Ainda, estas culturas apresentaram crescimento menor em relação ao protocolo padrão (adesão na presença de SFB), dificultando a caracterização de suas células. Nenhuma das outras moléculas testadas (gelatina, poly-L-Lysine, colágeno tipo I, vitronectina) se mostrou eficiente na adesão do OPE em cultura na presença de meio com baixas concentrações de SFB (Quadro 3).

Considerando estes resultados optamos pela adição de SFB nas trinta primeiras horas de cultura para promover a adesão celular como protocolo padrão em todos os experimentos.

Molécula	Concentração	OPEs aderidos/ OPEs testados	Observações
Colágeno tipo I	0,2g/L	0/9	-
Gelatina	30mg/ml	0/12	-
Fibronectina	20µg/ml	2/10	Halo pequeno, fácil descolamento das células.
Matrigel	30µg/ml	3/10	
Poly-L-Lysine	0,1µg/ml	0/12	-
Vitronectina	10µg/ml	0/8	-
SFB	15% (em DMEM)	10/10	-

**Quadro 3:** Moléculas de adesão

## 5.4 O efeito do ácido retinóico

Tendo em vista que o SFB se mostrou necessário à adesão celular, e que este induz uma robusta diferenciação dos precursores coronários à CML, este trabalho visou definir métodos para refrear a diferenciação a CML e preservar as células derivadas do OPE em um estado indiferenciado e proliferativo. Para tanto, o ácido retinóico foi escolhido como um candidato, tendo como base duas observações: 1 – o papel do AR na manutenção do estado indiferenciado e proliferativo da zona compacta do miocárdio (STUCKMANN *et al.*, 2003), e 2 – o padrão de expressão da enzima chave na síntese de AR (RALDH2), que diminui a medida que os precursores coronários entram em processo de diferenciação (PEREZ-POMARES *et al.*, 2002b). Com isso, as culturas de OPE foram submetidas a tratamentos continuados (período de quatro dias) com *all-trans* ácido retinóico a  $10^{-6}$ M, tanto na presença, quanto na ausência de SFB sendo, ao final deste período, submetidas a caracterização por imunohistoquímica.

### 5.4.1 Diferenciação de CML

O efeito do tratamento com AR sobre a diferenciação dos precursores de CML foi avaliado através de imunofluorescência com anticorpo primário para a  $\alpha$ -actina de músculo liso, reconhecido como o primeiro marcador expresso durante o processo de diferenciação deste tipo vascular (LANDERHOLM *et al.*, 1999).

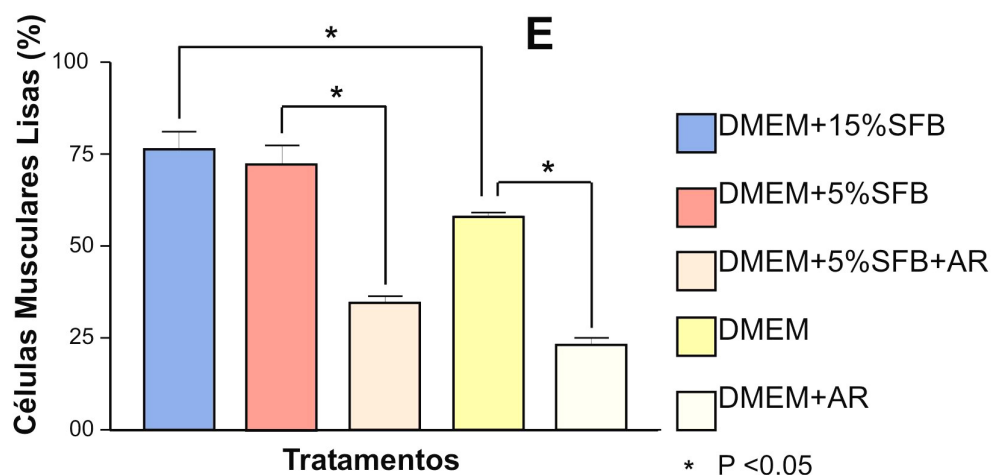
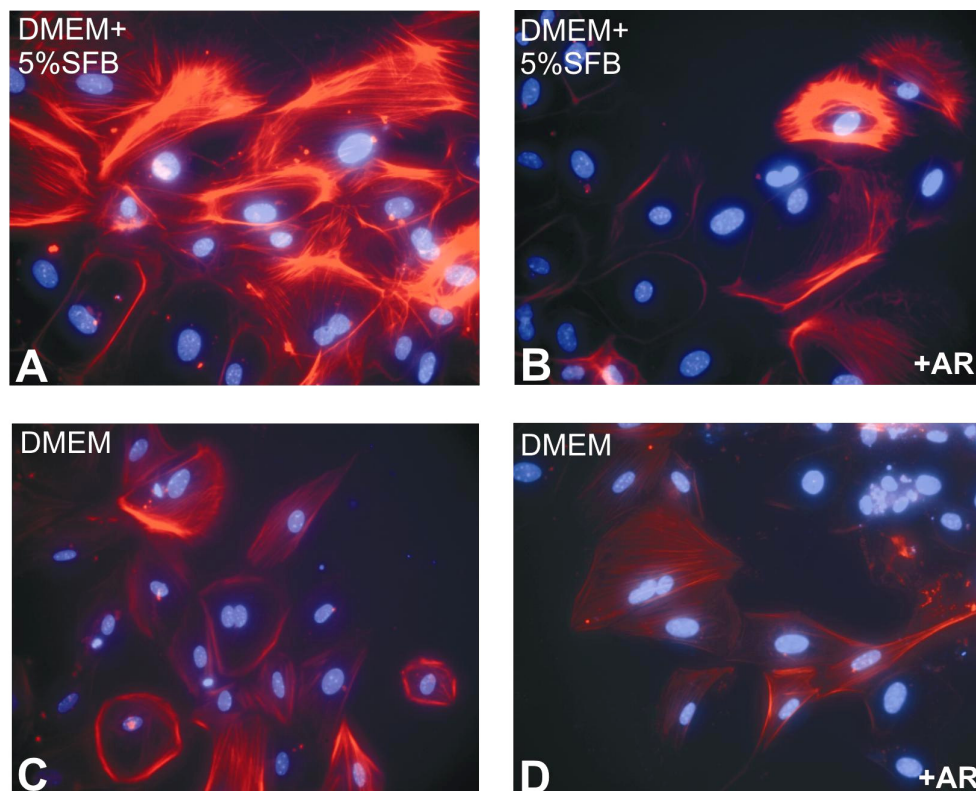
A adição de AR à cultura do OPE levou, tanto nas cultura de OPE de camundongo, quanto nas culturas de OPE de codorna, a uma redução significativa do número de CML, mostrando-se assim um efeito conservado entre aves e mamíferos. Como pode ser observado na Figura 9 e na Figura 10, este bloqueio na diferenciação precoce dos precursores coronários em CML ocorre não só no tratamento DMEM+AR, como também quando a adição de AR é feita ao meio suplementado com soro (DMEM+5%SFB) que se mostrou um forte indutor deste fenótipo vascular como descrito anteriormente. Assim, o AR, na ausência de soro reduziu, significativamente, o número de CML a aproximadamente 25% (60% no controle) do número total de células da cultura de OPEs provenientes de embriões tanto de codorna, quanto de camundongo. Na presença de soro, o AR reduziu o número de CML a 35% (75% no controle) do total de células da cultura de OPEs provenientes de embriões de camundongos (Figura 9), sendo ainda mais marcante nas culturas provenientes de embriões de codorna, onde

o tratamento com AR reduziu o número de CML a aproximadamente 20% (80% no controle) do número total de células da cultura (Figura 10).

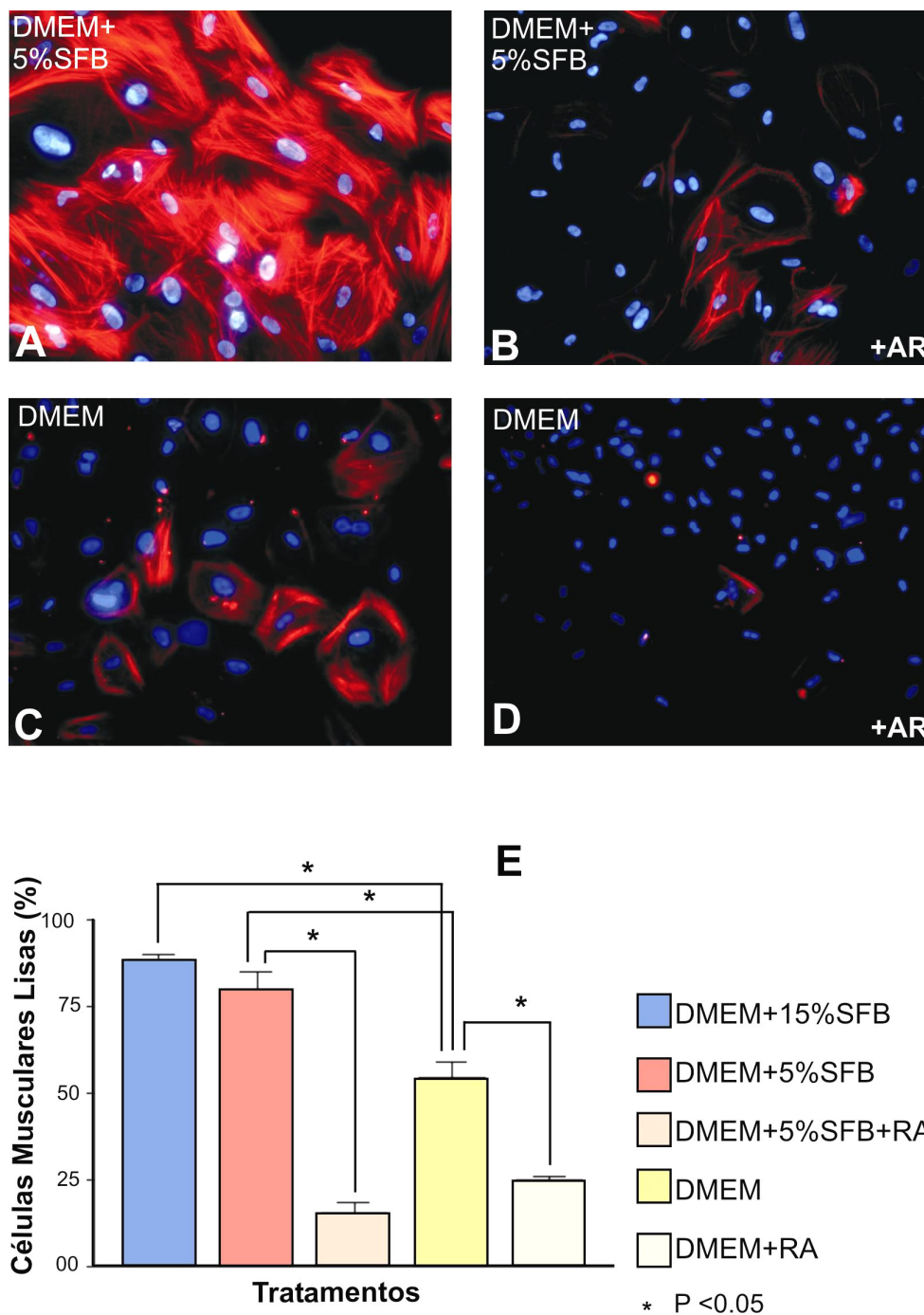
Além da redução do número de CML na cultura, o tratamento continuado com AR levou ainda a uma redução do número de feixes de filamentos de actina presentes no citoplasma das células, indicando um retardo no processo de diferenciação destas células.

#### 5.4.2 Manutenção do estado indiferenciado dos precursores coronários

Considerando que o protocolo de adição de AR à cultura se mostrou efetivo na redução da diferenciação a CML em OPEs de camundongos e de codornas, a próxima etapa foi avaliar se o tratamento com AR representava não só uma diminuição na diferenciação dos precursores coronários a CML, como também um aumento no número de células indiferenciadas em cultura, caracterizado através de um aumento na expressão dos marcadores WT1 e RALDH2, reconhecidos com marcadores do estado indiferenciado das células derivadas do epicárdio. Para tanto, as células foram submetidas ao protocolo padrão, com adição de AR a partir do quarto dia de cultura e caracterização por imunohistoquímica (anticorpos primários anti-WT1 ou anti-RALDH2) no oitavo dia de cultura.



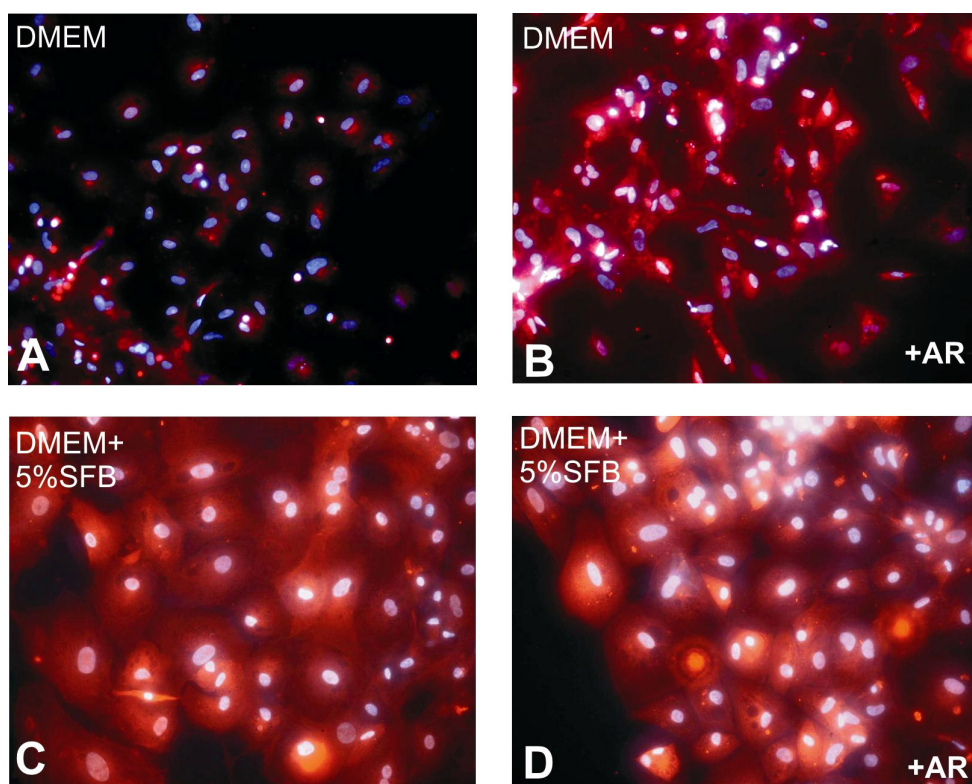
**Figura 9: O Ácido retinóico inibe a diferenciação precoce de células proepicárdicas em células musculares lisas de camundongos.** A-D) Imunomarcagem por anti- $\alpha$ -actina de músculo liso + Anti-IgG-Cy3 e contra-marcagem de núcleos por Hoechst 33258 de culturas do OPE de embriões de camundongo submetidas a diferentes concentrações de SFB e AR  $10^{-6}$  M. Aumento = 200x. E) Número de células musculares lisas nos vários tratamentos. A utilização de SFB 5% ou 15% induz uma diferenciação robusta (75-80%) das células do OPE a CML. Esta diferenciação prematura é significativamente reduzida pela administração contínua de AR, o que reduz a porcentagem de CML na cultura para 25-30%.



**Figura 10: O Ácido retinóico inibe a diferenciação precoce de células proepicárdicas em células musculares lisas de codornas.** A-D) Imunomarcagem por anti- $\alpha$ -actina de músculo liso + Anti-IgG-Cy3 e contra-marcagem de núcleos por Hoechst 33258 de culturas do OPE de embriões de codorna submetidas a diferentes concentrações de SFB e AR  $10^{-6}$  M. Aumento = 20x. E) Número de células musculares lisas nos vários tratamentos. A utilização de SFB 5% ou 15% induz uma diferenciação robusta (80-85%) das células do OPE a CML. Esta diferenciação prematura é significativamente reduzida pela administração contínua de AR, o que reduz a porcentagem de CML na cultura para 20-25%.

## WT1

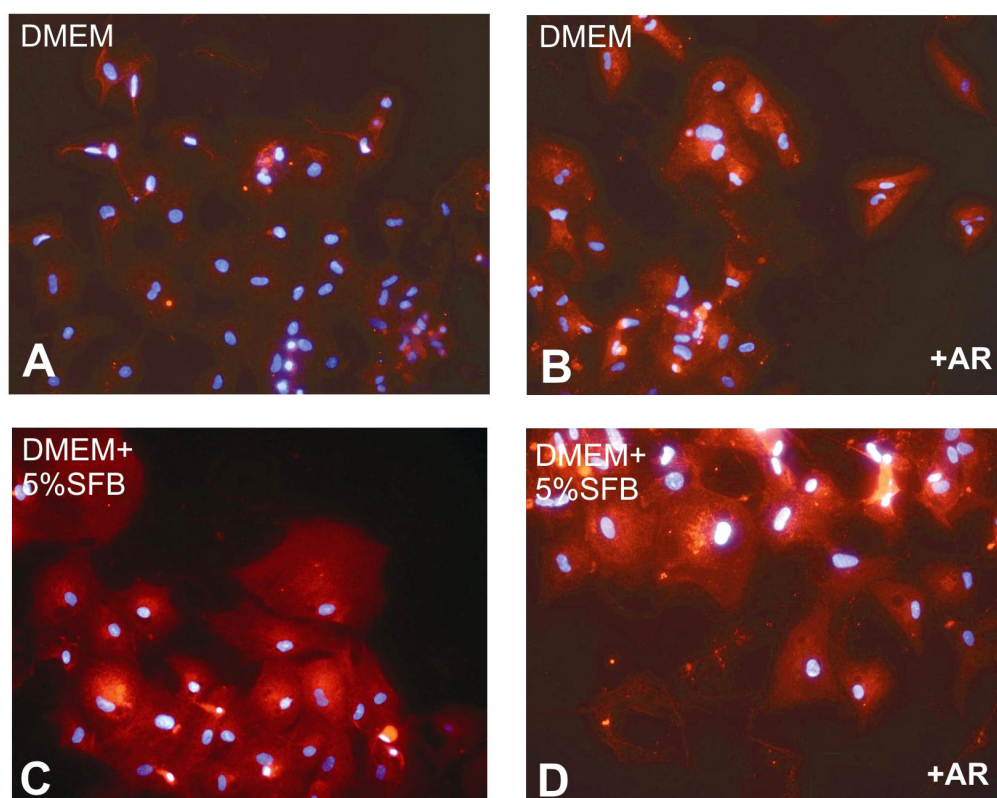
Imunohistoquímicas realizadas em culturas provenientes de embriões de camundongos e de codornas mostraram que o tratamento continuado com AR em concentrações capazes de inibir a diferenciação em CML aumenta a expressão do fator de transcrição WT1 na ausência de SFB (DMEM+AR, Figura 11). Entretanto, nos tratamentos realizados na presença de SFB (DMEM+5%SFB+AR) não se observou efeito da adição de AR, uma vez que não houve diferença na intensidade de marcação em relação as culturas controle (DMEM+5%SFB). Ao comparar a expressão de WT1 entre os tratamentos sem e com SFB o que se observou foi uma maior intensidade de marcação no tratamento com soro, sugerindo que este também é capaz de ativar a expressão de WT1.



**Figura 11: O AR aumenta a expressão de WT1.** A-D) Imunomarcção por anti-WT1 + Anti-IgG-Cy3 e contra-marcção de núcleos por Hoechst 33258 de culturas do OPE de embriões de codorna. A) DMEM B) Cultura submetida ao tratamento com AR  $10^{-6}$  M (DMEM+AR). Observar o aumento no número de células e na intensidade da marcação quanto o AR é adicionado à cultura. C) DMEM+5% D) DMEM+5%+AR. Aumento = 200x.

## RALDH2

De maneira semelhante ao encontrado para a expressão de WT1, o tratamento continuado com AR, em culturas de OPE provenientes de embriões de codorna, levou a um aumento na expressão da enzima RALDH2 na ausência de SFB (DMEM+AR, Figura 12). Nos tratamentos realizados na presença de soro (DMEM+5%SFB+AR) não foi observada diferença na expressão de RALDH2. Sendo que entre os tratamentos DMEM e DMEM+5%SFB a marcação foi mais intensa na presença de soro (Figura 12), indicando que o SFB induz a expressão de RALDH2.



**Figura 12: O AR aumenta a expressão de RALDH2** A-D) Imunomarcção por anti-RALDH2 + Anti-IgG-Cy3 e contra-marcção de núcleos por Hoechst 33258 de culturas do OPE de embriões de codorna. A) DMEM. B) DMEM+AR. C) DMEM+5%SFB. D) DMEM+SFB+AR. Observar o aumento no número de células e na intensidade da marcação quando o AR é adicionado à cultura na ausência de SFB. Aumento = 200x.

Em resumo, demonstramos que é possível cultivar as células do OPE de embriões de codorna e de camundongo. O protocolo mais eficiente envolve o uso de SFB, que se mostrou indispensável à adesão celular à superfície de cultura. Esta dependência do SFB produziu uma diferenciação maciça das células do OPE em CML. Demonstramos que esta diferenciação pode ser bloqueada pela administração contínua de AR. O AR se apresentou como um eficiente mantenedor do estado indiferenciado das células do OPE, uma vez que demonstramos, que o tratamento continuado com AR, foi capaz de aumentar a expressão de WT1 e RALDH2, moléculas reconhecidas como marcadores do estado indiferenciado das células derivadas do OPE.

## **6. DISCUSSÃO**

O coração de amniotas é um órgão de origem complexa que envolve múltiplos tipos celulares de origem mesodérmica e também de origem ectodérmica. Inicialmente o primórdio cardíaco é formado apenas por precursores derivados da mesoderme lateral, que rapidamente se organizam compondo um coração tubular primitivo (BUCKINGHAM *et al.*, 2005). Assim, os tipos celulares de origem extracardiaca que contribuem para a formação do coração, são: 1) as células da crista neural que participam da septação dos grandes vasos (STOLLER & EPSTEIN, 2005); 2) as células do mesocárdio dorsal que atuam na septação atrial (WESSELS *et al.*, 2000) e, por fim, 3) as células do OPE, fundamentais na formação da circulação coronária e na regulação da proliferação do miocárdio (WESSELS & PEREZ-POMARES, 2004). O fato de que vários tecidos precursores podem dar origem ao tecido cardíaco leva diretamente às perspectivas de aproveitamento deste potencial em intervenções como a terapia celular.

Neste âmbito, a formação da circulação coronária têm sido uns dos principais objetos de estudo de diferentes grupos. Entretanto, mesmo com o crescente número de estudos envolvendo o eixo OPE/E e a diferenciação coronária, pouco ainda se sabe sobre os genes e processos envolvidos na regulação da plasticidade destes precursores multipotentes. Os resultados *in vitro* aqui descritos, somados a resultados recentes do nosso laboratório e de outros grupos de pesquisa, sugerem a existência de diversas vias endógenas de controle do destino celular (estado indiferenciado/diferenciado) dos precursores coronários, envolvendo sinalização autócrina (AR); parácrina, proveniente do miocárdio (VEGF, FGF); ou até mesmo endócrina (Epo).

A recente classificação das células derivadas do OPE como células-tronco cardíacas baseada em características como potencialidade, capacidade proliferativa e expressão gênica (WESSELS & PEREZ-POMARES, 2004), abriu a perspectiva da sua utilização em terapia celular para a revascularização de corações afetados por cardiopatias isquêmicas. Portanto, a compreensão e caracterização das suas vias de diferenciação são de extrema importância para o desenvolvimento de futuros modelos de terapia celular para revascularização cardíaca. Em resumo, este trabalho teve o duplo objetivo de implantar metodologias para o aprimoramento das técnicas de terapia celular e de compreender a biologia do desenvolvimento das coronárias. Nestas etapas iniciais estabelecemos protocolos para o cultivo de células multipotentes do OPE e investigamos mecanismos que regulam as transições entre os fenótipos diferenciados e indiferenciados.

## 6.1 Padronização das condições de cultura do OPE

Adotamos neste trabalho um sistema de cultura onde o OPE cuidadosamente dissecado é posicionado diretamente sobre lamínula de vidro na presença de DMEM+15%SFB. Este tipo de cultura do OPE, sem digestão prévia, tem sido adotada por vários grupos de pesquisa em ensaios que visam a quantificação do processo de transformação epitélio-mesenquimal e de formação de tubos endoteliais em matrizes tridimensionais (DETTMAN *et al.*, 1998; TOMANEK *et al.*, 2001a; TOMANEK *et al.*, 2001b; TOMANEK & ZHENG, 2002; GUADIX *et al.*, 2006), ou ainda a caracterização celular e molecular do OPE em diferentes condições de cultura (LANDERHOLM *et al.*, 1999; HATCHER *et al.*, 2004). A principal vantagem deste método reside na semelhança do processo de adesão celular em cultura com o processo de adesão das células derivadas do OPE sobre o miocárdio *in vivo*. Assim, demonstramos que na cultura do OPE de embriões de camundongo e de codorna, as células espriam sobre o substrato, formando um halo em torno do ponto central da cultura, em um processo semelhante à formação do epicárdio. Observamos ainda que estas células podem ser cultivadas por até quatro passagens, mantendo sua capacidade proliferativa e características autóctones de migração celular, como a presença de pseudopodia, lamelipodia e filopodia. Destaca-se também a passagem de um estado epitelial a um estado mesenquimal de células na periferia da cultura, com a formação de fibras tensionais no citoplasma que indicam a manutenção de características migratórias das células derivadas do OPE em cultura. Este processo de transformação epitélio mesenquimal que ocorre com o OPE em cultura foi descrito por Landerholm e colaboradores (1999) onde, através da imunomarcagem de vinculina e do citoesqueleto de actina, os autores demonstraram a formação de contatos de adesão focal e a reorganização das fibras de actina das células na periferia da cultura (LANDERHOLM *et al.*, 1999).

Portanto, estes dados indicam que nosso método de cultura do OPE, tanto de embriões de camundongo, quanto de embriões de codorna, é viável e assegura a manutenção de características endógenas de suas células. Este método possibilita assim o desenvolvimento de ensaios *in vitro* que, dentro das limitações técnicas usuais do sistema de cultura, permitam o estudo dos processos que ocorrem durante o desenvolvimento coronário normal do embrião.

## 6.2 O SFB induz a diferenciação a CML

A caracterização inicial das células em cultura demonstrou que o SFB (cultura em DMEM+15%SFB) é capaz de induzir uma robusta diferenciação dos precursores coronários a um fenótipo de pré-CML (75-80% da cultura) representado pela marcação de  $\alpha$ -actina de músculo liso, um marcador inicial no processo de diferenciação deste tipo celular (FOLKMAN & D'AMORE, 1996; LANDERHOLM *et al.*, 1999). Somado a isso, a retirada total do SFB da cultura leva a uma redução da diferenciação a CML (aproximadamente 60% da cultura). Esta robusta diferenciação na presença de SFB pode estar sendo mediada por fatores de crescimento como o PDGF. O PDGF é reconhecido pelo envolvimento na especificação e determinação deste tipo celular como descrito anteriormente (FOLKMAN & D'AMORE, 1996).

A sinalização por PDGF atua em dois momentos diferentes da modulação da diferenciação de CML. Um deles, melhor caracterizado na literatura, se refere a ação deste fator de crescimento sobre a retomada de um estado proliferativo pelas células já diferenciadas. Assim, a sinalização via PDGF/PDGFR atuaria no desligamento de genes diferenciação ( $\alpha$ -actina de músculo liso, SM22, calponina e caldesmon), ativando o ciclo celular e retomando a proliferação das CML, via sinalização por Elk1/SRF (DU *et al.*, 2003; MIANO, 2003; MIANO *et al.*, 2004; WANG & OLSON, 2004; WANG *et al.*, 2004). A outra atuação da sinalização por PDGF diz respeito ao recrutamento inicial de precursores de CMLs e ao início da especificação deste tipo celular. Esta resposta se dá, provavelmente, por vias paralelas à sinalização por SRF, uma vez que Landerholm e colaboradores (1999) demonstraram que a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso, em células provenientes de OPE de embriões de galinhas, não é afetada pela ausência de SRF. Estes autores demonstraram ainda que a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso em células derivadas do OPE não representa, necessariamente, o comprometimento final com este fenótipo vascular, que é representado pela expressão de outros marcadores como calponina e SM22 $\alpha$  (LANDERHOLM *et al.*, 1999).

É interessante notar que, quando houve a retirada do SFB após a adesão celular, foram observadas células endoteliais na cultura (reconhecidas pelo anticorpo contra o Fator von Willebrand) indicando que as células do OPE, em cultura, podem manter a sua potencialidade de geração de diferentes fenótipos vasculares. Outro ponto interessante, é que mesmo sob

altas concentrações de soro, ou após quatro passagens, as células derivadas do OPE não perdem a sua capacidade proliferativa, permanecendo ainda um grupo de células que não se diferenciam a CML. Este fato indica que mesmo sob forte pressão de diferenciação, exercida pela presença de SFB, um subgrupo de células derivadas do OPE é capaz de se manter um estado indiferenciado e proliferativo.

Esta forte reação das células derivadas do OPE ao soro reforça a idéia de existência de controles endógenos, no modelo *in vivo*, destinados a refrear esta robusta especificação de fenótipos pré-CML. Entre os candidatos estão tanto moléculas que podem estar atuando na manutenção do estado indiferenciado destes precursores, como o AR e o WT1 (PEREZ-POMARES *et al.*, 2002b; GUADIX *et al.*, 2006; PEREZ-POMARES *et al.*, 2006), quanto indutores do fenótipo endotelial, como o VEGF (induzido pela hipóxia/HIF) e o FGF, por exemplo (TOMANEK *et al.*, 1999; TOMANEK *et al.*, 2001a; TOMANEK *et al.*, 2001b; TOMANEK *et al.*, 2002; TOMANEK & ZHENG, 2002; GUADIX *et al.*, 2006).

### 6.3 O papel do AR na diferenciação dos precursores coronários

#### 6.3.1 AR inibe a diferenciação a CML

Tendo em vista a hipótese da existência de diferentes controles endógenos, responsáveis por neutralizar a forte tendência a diferenciação a CML dos precursores coronários buscamos explorar a possibilidade de o AR atuar como um mantenedor do estado indiferenciado das células derivadas do OPE, em modelos *in vitro*.

A hipótese de o AR ser um morfógeno atuante no processo de manutenção dos precursores coronários em estado indiferenciado tem como base: 1) o fato de que o AR produzido pelas células derivadas do epicárdio atue na manutenção do miocárdio em estado proliferativo (STUCKMANN *et al.*, 2003) e 2) a descrição de que a expressão da enzima sintetizadora do AR (RALDH2) é perdida a medida que as células derivadas do epicárdio entram em diferenciação (PEREZ-POMARES *et al.*, 2002b). Com isso, foi desenvolvido um protocolo de tratamento das células derivadas do OPE em cultura com AR tanto na presença, quanto na ausência de SFB, seguido da caracterização do destino celular assumido. Para tanto, realizamos imunohistoquímicas após a administração continuada de AR  $10^{-6}$ M. Demonstramos aqui que este protocolo é efetivo na redução da diferenciação a CML, uma vez que a adição de AR reduziu o número de CML a 20-30% do número total de células da cultura, mesmo na presença de SFB. Esta atuação do AR na modulação da diferenciação dos precursores coronários se mostrou um efeito conservado entre aves e mamíferos.

Estes resultados sugerem que tanto em aves, quanto em mamíferos, um microambiente rico em AR sintetizado pela RALDH2 atuaria no retardo da diferenciação de um grupo de precursores coronários. A observação de que a adição de AR na cultura em DMEM+5%SFB reduz o número de CML em níveis semelhantes aos encontrados no tratamento DMEM+AR indica que a atuação do AR supera a forte indução do fenótipo de CML pelo soro (PDGF).

Em um trabalho recente Guadix e colaboradores (2006) demonstraram a co-expressão de RALDH2/VEGFR2, e de RXR $\alpha$  (receptor de AR)/QH1 (marcador endotelial de codornas) em precursores imaturos de células vasculares coronárias. Foi demonstrado ainda que a expressão, tanto de RALDH2, quanto de RXR $\alpha$ , é perdida conforme a morfogênese vascular ocorre com a diferenciação terminal das células endoteliais e a invasão de camadas mais profundas do miocárdio (GUADIX *et al.*, 2006). Com isso, mais uma vez o papel do AR é destacado na manutenção de um subgrupo de precursores coronários bipotenciais livres e

aptos a receberem informações do microambiente onde se encontram, respondendo com a diferenciação de células endoteliais (através da sinalização por VEGF proveniente do miocárdio) ou CML (através da sinalização por PDGF proveniente das células endoteliais), em diferentes momentos do desenvolvimento coronário.

Com relação a este controle exercido pelo AR sobre os precursores de CML, uma questão que surge referente ao sistema *in vitro* é: se as células do OPE expressam RALDH2, ou seja, são capazes de sintetizar o próprio AR, por que se observam níveis tão altos de diferenciação a CML? Uma resposta a esta questão é a provável deficiência de retinol<sup>1</sup> disponível na cultura. Assim, mesmo havendo expressão de RALDH2, a síntese de AR estaria prejudicada. Portanto a suplementação com AR pode estar representando uma recuperação do estado fisiológico em que o OPE e derivados se encontram na cavidade pericárdica e subepicárdica onde, naturalmente se observa um atraso na diferenciação a CML, até que tenham sido geradas células endoteliais suficientes a formação da malha coronária básica.

### 6.3.2. O AR mantém as células derivadas do OPE em um estado indiferenciado

Buscando a caracterização do destino celular assumido pelas células tratadas com AR, foram realizadas imunohistoquímicas para a detecção do fator de transcrição WT1 e da enzima RALDH2, moléculas reconhecidas como marcadores do estado indiferenciado das células derivadas do epicárdio. Na ausência de soro, o que observamos um significativo incremento no número de células e na intensidade de expressão destes marcadores. Isso indica que a presença de AR, não só é capaz de bloquear a via que leva a diferenciação dos precursores coronários a CML, como também é capaz de, provavelmente, induzir a

Com esta inter-relação entre WT1 e RALDH2, cria-se um panorama onde o AR produzido pelo epicárdio e pelas células derivadas do epicárdio atua, de maneira autócrina, no aumento da expressão de WT1, o que contribuiria para a manutenção do estado indiferenciado e proliferativo dos precursores coronários.

Nos tratamentos realizados na presença de soro (DMEM+5%SFB+AR) a adição de AR não foi capaz de alterar os níveis de expressão dos marcadores WT1 e RALDH2. É

<sup>1</sup> O retinol (vitamina A) é o precursor de AR, obtido, *in vivo*, através da dieta alimentar. A síntese de AR se dá através de duas oxidações sucessivas do retinol, sendo a primeira catalisada pelas álcool desidrogenases (ADHs), e a segunda, catalisada pelas retinoaldeído desidrogenases (RALDHs).

interessante notar que, ao mesmo tempo em que a presença de soro representou um aumento na expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso, a expressão de WT1 e de RALDH2 também foi aumentada (DMEM x DMEM+5%SFB). Isso indica que fatores presentes no soro podem estar estimulando simultaneamente a expressão de WT1 e RALDH2 e induzindo a diferenciação a CML; estando, porém, o equilíbrio final claramente voltado à diferenciação de CML. Este fato, também pode estar relacionado à carência de precursores de AR na cultura, o que impossibilitaria a sua síntese pela RALDH2 uma vez que a adição de AR neutraliza a ação do soro e refreia a diferenciação a CML.

A análise de sítios putativos a fatores de transcrição em seqüências regulatórias representa uma abordagem preliminar, porém, é capaz de fornecer indícios de vias de regulação gênicas. Com isso, a hipótese de regulação da RALDH2 pelo soro é apoiada pela presença de sítios putativos de ligação a SRF em seqüências conservadas entre aves e mamíferos da RALDH2 (CRAVO, *et al*, resultados não publicados). Ainda, uma análise preliminar da região do promotor do WT1 de camundongos<sup>2</sup>, demonstrou a presença dos mesmos sítios de ligação a SRF.

---

<sup>2</sup> Para esta análise foi utilizado o programa Genomatix ([www.genomatix.de](http://www.genomatix.de)). Para tanto, uma seqüência de 2500pb da região 5' do gene do WT1 de camundongos foi comparada a uma matriz de seqüências de sítios putativos de ligação a fatores de transcrição.

#### 6.4 Modelo do controle da diferenciação dos precursores coronários

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho e dados de literatura, podemos propor algumas das possíveis vias, conservadas entre aves e mamíferos, que estão envolvidas no complexo processo de modulação da diferenciação das células derivadas do OPE durante o desenvolvimento coronário. Assim, nos deparamos com uma intrincada rede de fatores atuando, por um lado, na manutenção de um fenótipo indiferenciado, multipotente e proliferativo das células derivadas do epicárdio, e por outro, no direcionamento da diferenciação aos dois fenótipos vasculares principais (endotélio e célula muscular lisa).

Este modelo é dividido em dois estados diferentes: na ausência e na presença de SFB, que contém uma complexa mistura de fatores de crescimento e morfógenos.

Em uma primeira análise (Figura 13A), na ausência de SBF, o AR é capaz de reduzir fortemente a diferenciação a CML. Neste cenário, o AR atuaria na manutenção de um estado indiferenciado das células do OPE, através da ativação do fator de transcrição WT1 e da enzima chave na síntese do AR, a RALDH2, marcadores reconhecidos como característicos do estado multipotente destas células (PEREZ-POMARES *et al.*, 2002b; GUADIX *et al.*, 2006). Esta ativação da RALDH2 pelo AR representa a constituição de uma via de auto-regulação (AR/RALDH2) atuante na criação de um microambiente rico em AR capaz de manter as células derivadas do OPE em um estado indiferenciado.

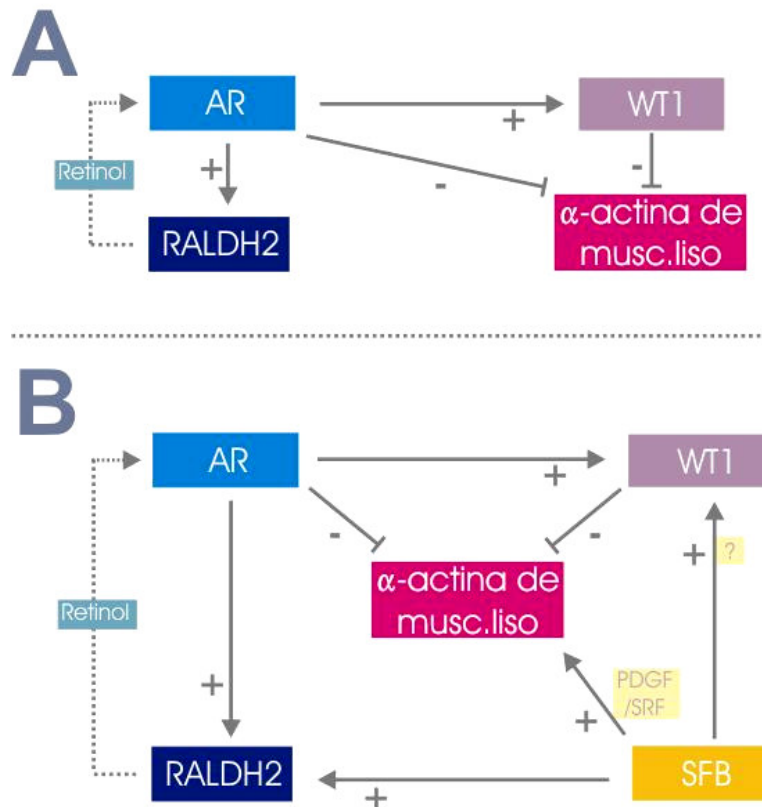
A existência desta auto-regulação na via de sinalização do AR é apoiada por dados recentes que mostram a co-localização de RALDH2 e RXR nas células derivadas do OPE de maneira restrita a estágios precoces da diferenciação endotelial (GUADIX *et al.*, 2006), o que sugere uma participação na modulação da proliferação ou sobrevivência destas células. A participação do AR na modulação da proliferação endotelial tem sido proposta, ainda, para outros modelos vasculares (LAI *et al.*, 2003; BOHNSACK *et al.*, 2004).

Há alguns anos já foi demonstrado que a deficiência em WT1 leva a uma diferenciação precoce dos precursores coronários, o que diminui o número de células sintetizadoras de AR levando a um quadro de hipoplasia ventricular, defeitos de septação e má formação coronária (MOORE *et al.*, 1999). Com isso a relação entre WT1 e RALDH2 tem sido apontada como crucial na manutenção do estado indiferenciado das células derivadas do OPE (PEREZ-POMARES *et al.*, 2002b; GUADIX *et al.*, 2006). Portanto, a demonstração de que há uma regulação positiva de WT1 frente ao tratamento com AR é um ponto chave na

estruturação de um modelo onde a atuação conjunta destes fatores na face epicárdica do coração é responsável pela modulação da proliferação do miocárdio e dos próprios precursores coronários.

Um quadro diferente é composto pela presença de SFB na cultura das células do OPE (Figura 13B). Fatores presentes no SFB (provavelmente o PDGF) induzem a uma robusta diferenciação dos precursores coronários a pré-CML. Paradoxalmente, neste mesmo panorama de intensa diferenciação celular, ocorre um aumento na expressão de WT1 e RALDH2. Até o momento, não foi possível sugerir algum fator candidato a atuar nesta ativação. Este cenário onde, mesmo sob a ativação de WT1 e RALDH2, as células do OPE entram em processo de diferenciação a CML indica que a presença de SFB pode estar levando a um desequilíbrio na relação entre diferenciação/proliferação dos precursores coronários, orientando-os na direção da diferenciação a CML. Nestas condições, a adição de AR exógeno recapitula as condições fisiológicas encontradas na cavidade pericárdica e no espaço subepicárdico, bloqueando a diferenciação a CML, em uma ação que sobrepuja a forte indução deste tipo celular pelo sistema PDGF/SRF. A demonstração de que a ativação de WT1 e RALDH2, na presença de SFB, não é suficiente para o bloqueio da diferenciação a CML indica a existência de um segundo mecanismo de ação do AR. Neste mecanismo o AR pode estar atuando diretamente sobre a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso, evitando a especificação precoce de precursores de CML. Provavelmente esta atuação direta do AR sobre a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso é responsável pelo bloqueio da diferenciação deste fenótipo celular mesmo na ausência de SFB.

Assim, fazendo um paralelo com a situação encontrada *in vivo*, enquanto no espaço subepicárdico, os precursores coronários se encontram em um microambiente rico em AR que ativa a expressão da própria RALDH2 e de WT1, o que as mantém indiferenciadas e, paralelamente, induz o espessamento do miocárdio. À medida que estas células se afastam deste espaço, ou seja, invadem o miocárdio, elas perdem o contato com esta alta concentração de AR e passam a receber a influência de fatores como o VEGF e o FGF, produzidos pelo miocárdio hipóxico, ou mais tarde, o PDGF, produzido pelas células endoteliais entrando em processo de diferenciação celular.



**Figura 13: Esquema representativo da participação do AR e do SFB na diferenciação dos precursores coronários a CML.** A) Na ausência de SFB o AR bloqueia diferenciação a CML tanto indiretamente via ativação de WT1, quanto diretamente sobre a expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso. Ainda, o AR ativa a expressão de RALDH2 que através da oxidação do retinol, produz mais AR. B) A presença de SFB leva a uma robusta diferenciação de CML, mesmo havendo um aumento da expressão de WT1 e RALDH2, indicando um provável aumento na relação diferenciação/proliferação dos precursores coronários. A adição de AR recapitula o cenário encontrado no espaço subepicárdico, bloqueando a diferenciação a CML dos precursores coronários.

## **7. CONCLUSÕES**

Em resumo nosso trabalho demonstrou a viabilidade da cultura celular do OPE de embriões de aves (codornas) e de mamíferos (camundongos), assegurando a manutenção de características autóctones das células derivadas do OPE, como por exemplo a presença de filopodia e lamelipodia utilizados na migração celular. Neste modelo *in vitro* podemos observar a ineficiência da utilização de moléculas de adesão celular e de matriz extracelular na adesão do OPE ao substrato de vidro ou plástico, adotando assim a utilização de SFB para a promoção da adesão celular em ambos os modelos animais utilizados.

Demonstramos ainda que o fenótipo de pré-CML é fortemente induzido pelo soro, havendo porém, a manutenção de um grupo de células indiferenciadas mesmo sob altas concentrações de soro ou após passagens. Através da adição de AR à cultura, mostramos ainda que o AR é capaz de neutralizar o efeito do SFB, não só reduzindo significativamente o número de CML na cultura, como também aumentando a expressão de marcadores característicos do fenótipo indiferenciado. Esta observação se mostrou condizente com dados recentes de literatura e nos levou a formulação de um modelo de algumas das vias atuantes no desenvolvimento coronário, conservado entre aves e mamíferos, onde a relação entre WT1 e RALDH2/AR é responsável pela manutenção de um estado indiferenciado e proliferativo, restando a ação de fatores envolvidos na diferenciação celular vascular como o PDGF, por exemplo.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram a elaboração de um modelo onde propomos algumas das vias, conservadas entre aves e mamíferos, envolvidas no complexo processo de modulação da diferenciação das células do OPE durante o desenvolvimento embrionário. Com isso, acreditamos estar colaborando para a compreensão da biologia do desenvolvimento das coronárias e contribuindo, a longo prazo, para o aprimoramento das técnicas de terapia celular em revascularização cardíaca.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABBOTT, J.D.; GIORDANO, F.J. Stem cells and cardiovascular disease. **J Nucl Cardiol**, v. 10, n. 4, p. 403-412. 2003.
- BOHNSACK, B.L.; LAI, L.; DOLLE, P.; HIRSCHI, K.K. Signaling hierarchy downstream of retinoic acid that independently regulates vascular remodeling and endothelial cell proliferation. **Genes Dev**, v. 18, n. 11, p. 1345-1358. 2004.
- BUCKINGHAM, M.; MEILHAC, S.; ZAFFRAN, S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. **Nat Rev Genet**, v. 6, n. 11, p. 826-835. 2005.
- CARMONA, R.; GONZALEZ-IRIARTE, M.; MACIAS, D.; PEREZ-POMARES, J.M.; GARCIA-GARRIDO, L.; MUNOZ-CHAPULI, R. Immunolocalization of the transcription factor Slug in the developing avian heart. **Anat Embryol (Berl)**, v. 201, n. 2, p. 103-109. 2000.
- CARMONA, R.; GONZALEZ-IRIARTE, M.; PEREZ-POMARES, J.M.; MUNOZ-CHAPULI, R. Localization of the Wilm's tumour protein WT1 in avian embryos. **Cell Tissue Res**, v. 303, n. 2, p. 173-186. 2001.
- CHAPMAN, S.C.; COLLIGNON, J.; SCHOENWOLF, G.C.; LUMSDEN, A. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. **Dev Dyn**, v. 220, n. 3, p. 284-289. 2001.
- CHEN, T.H.; CHANG, T.C.; KANG, J.O.; CHOUDHARY, B.; MAKITA, T.; TRAN, C.M.; BURCH, J.B.; EID, H.; SUCOV, H.M. Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor. **Dev Biol**, v. 250, n. 1, p. 198-207. 2002.
- CIULLA, M.M.; FERRERO, S.; LAZZARI, L.; PACCHIANA, R.; PALIOTTI, R.; GIANELLI, U.; BUSCA, G.; ESPOSITO, A.; BOSARI, S.; MAGRINI, F.; REBULLA, P. The translocation of marrow MNCs after experimental myocardial cryoinjury is proportional to the infarcted area. **Transfusion**, v. 44, n. 2, p. 239-244. 2004.
- CRISPINO, J.D.; LODISH, M.B.; THURBERG, B.L.; LITOVSKY, S.H.; COLLINS, T.; MOKKENTIN, J.D.; ORKIN, S.H. Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. **Genes Dev**, v. 15, n. 7, p. 839-844. 2001.
- DE LA CRUZ, M.V.; MARKWALD, R.R. **Living morphogenesis of the heart**. Cambridge, EUA: Birkhäuser. 1998
- DETTMAN, R.W.; DENETCLAW, W., JR.; ORDAHL, C.P.; BRISTOW, J. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. **Dev Biol**, v. 193, n. 2, p. 169-181. 1998.
- DU, K.L.; IP, H.S.; LI, J.; CHEN, M.; DANDRE, F.; YU, W.; LU, M.M.; OWENS, G.K.; PARMACEK, M.S. Myocardin is a critical serum response factor cofactor in the

transcriptional program regulating smooth muscle cell differentiation. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 7, p. 2425-2437. 2003.

FOLKMAN, J.; D'AMORE, P.A. Blood vessel formation: what is its molecular basis? **Cell**, v. 87, n. 7, p. 1153-1155. 1996.

GITTENBERGER-DE GROOT, A.C.; VRANCKEN PEETERS, M.P.; BERGWERFF, M.; MENTINK, M.M.; POELMANN, R.E. Epicardial outgrowth inhibition leads to compensatory mesothelial outflow tract collar and abnormal cardiac septation and coronary formation. **Circ Res**, v. 87, n. 11, p. 969-971. 2000.

GITTENBERGER-DE GROOT, A.C.; VRANCKEN PEETERS, M.P.; MENTINK, M.M.; GOURDIE, R.G.; POELMANN, R.E. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. **Circ Res**, v. 82, n. 10, p. 1043-1052. 1998.

GRUBER, P.J.; KUBALAK, S.W.; PEXIEDER, T.; SUCOV, H.M.; EVANS, R.M.; CHIEN, K.R. RXR alpha deficiency confers genetic susceptibility for aortic sac, conotruncal, atrioventricular cushion, and ventricular muscle defects in mice. **J Clin Invest**, v. 98, n. 6, p. 1332-1343. 1996.

GUADIX, J.A.; CARMONA, R.; MUNOZ-CHAPULI, R.; PEREZ-POMARES, J.M. In vivo and in vitro analysis of the vasculogenic potential of avian proepicardial and epicardial cells. **Dev Dyn**, v. n., p. 2006.

HAMBURGUER, V.; HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **J. Morphol.**, v. 88, n., p. 49-92. 1951.

HATCHER, C.J.; DIMAN, N.Y.; KIM, M.S.; PENNISI, D.; SONG, Y.; GOLDSTEIN, M.M.; MIKAWA, T.; BASSON, C.T. A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis. **Physiol Genomics**, v. 18, n. 2, p. 129-140. 2004.

JENKINS, S.J.; HUTSON, D.R.; KUBALAK, S.W. Analysis of the proepicardium-epicardium transition during the malformation of the RXRalpha<sup>-/-</sup> epicardium. **Dev Dyn**, v. 233, n. 3, p. 1091-1101. 2005.

KALMAN, F.; VIRAGH, S.; MODIS, L. Cell surface glycoconjugates and the extracellular matrix of the developing mouse embryo epicardium. **Anat Embryol (Berl)**, v. 191, n. 5, p. 451-464. 1995.

KASTNER, P.; MESSADDEQ, N.; MARK, M.; WENDLING, O.; GRONDONA, J.M.; WARD, S.; GHYSELINCK, N.; CHAMBON, P. Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. **Development**, v. 124, n. 23, p. 4749-4758. 1997.

KATZ, S.G.; WILLIAMS, A.; YANG, J.; FUJIWARA, Y.; TSANG, A.P.; EPSTEIN, J.A.; ORKIN, S.H. Endothelial lineage-mediated loss of the GATA cofactor Friend of GATA 1 impairs cardiac development. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 24, p. 14030-14035. 2003.

KWEE, L.; BALDWIN, H.S.; SHEN, H.M.; STEWART, C.L.; BUCK, C.; BUCK, C.A.; LABOW, M.A. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. **Development**, v. 121, n. 2, p. 489-503. 1995.

LAI, L.; BOHNSACK, B.L.; NIEDERREITHER, K.; HIRSCHI, K.K. Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis. **Development**, v. 130, n. 26, p. 6465-6474. 2003.

LANDERHOLM, T.E.; DONG, X.R.; LU, J.; BELAGULI, N.S.; SCHWARTZ, R.J.; MAJESKY, M.W. A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells. **Development**, v. 126, n. 10, p. 2053-2062. 1999.

LAVINE, K.J.; YU, K.; WHITE, A.C.; ZHANG, X.; SMITH, C.; PARTANEN, J.; ORNITZ, D.M. Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. **Dev Cell**, v. 8, n. 1, p. 85-95. 2005.

LEE, S.B.; HABER, D.A. Wilms tumor and the WT1 gene. **Exp Cell Res**, v. 264, n. 1, p. 74-99. 2001.

LIE-VENEMA, H.; GITTENBERGER-DE GROOT, A.C.; VAN EMPEL, L.J.; BOOT, M.J.; KERKDIJK, H.; DE KANT, E.; DERUITER, M.C. Ets-1 and Ets-2 transcription factors are essential for normal coronary and myocardial development in chicken embryos. **Circ Res**, v. 92, n. 7, p. 749-756. 2003.

LITTLE, M.; HOLMES, G.; WALSH, P. WT1: what has the last decade told us? **Bioessays**, v. 21, n. 3, p. 191-202. 1999.

LIU, S.Q.; FUNG, Y.C. Changes in the organization of the smooth muscle cells in rat vein grafts. **Ann Biomed Eng**, v. 26, n. 1, p. 86-95. 1998.

LU, J.; LANDERHOLM, T.E.; WEI, J.S.; DONG, X.R.; WU, S.P.; LIU, X.; NAGATA, K.; INAGAKI, M.; MAJESKY, M.W. Coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells requires rhoA-mediated actin reorganization and p160 rho-kinase activity. **Dev Biol**, v. 240, n. 2, p. 404-418. 2001.

MACIAS, D.; PEREZ-POMARES, J.M.; GARCIA-GARRIDO, L.; CARMONA, R.; MUNOZ-CHAPULI, R. Immunoreactivity of the ets-1 transcription factor correlates with areas of epithelial-mesenchymal transition in the developing avian heart. **Anat Embryol (Berl)**, v. 198, n. 4, p. 307-315. 1998.

MANNER, J. Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos. **Anat Embryol (Berl)**, v. 187, n. 3, p. 281-289. 1993.

MANNER, J. Does the subepicardial mesenchyme contribute myocardioblasts to the myocardium of the chick embryo heart? A quail-chick chimera study tracing the fate of the epicardial primordium. **Anat Rec**, v. 255, n. 2, p. 212-226. 1999.

MANNER, J.; PEREZ-POMARES, J.M.; MACIAS, D.; MUNOZ-CHAPULI, R. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. **Cells Tissues Organs**, v. 169, n. 2, p. 89-103. 2001.

MIANO, J.M. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. **J Mol Cell Cardiol**, v. 35, n. 6, p. 577-593. 2003.

MIANO, J.M.; RAMANAN, N.; GEORGER, M.A.; DE MESY BENTLEY, K.L.; EMERSON, R.L.; BALZA, R.O., JR.; XIAO, Q.; WEILER, H.; GINTY, D.D.; MISRA, R.P. Restricted inactivation of serum response factor to the cardiovascular system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 49, p. 17132-17137. 2004.

MOORE, A.W.; MCINNES, L.; KREIDBERG, J.; HASTIE, N.D.; SCHEDL, A. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. **Development**, v. 126, n. 9, p. 1845-1857. 1999.

MOSS, J.B.; XAVIER-NETO, J.; SHAPIRO, M.D.; NAYEEM, S.M.; MCCAFFERY, P.; DRAGER, U.C.; ROSENTHAL, N. Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. **Dev Biol**, v. 199, n. 1, p. 55-71. 1998.

MUNOZ-CHAPULI, R.; GONZALEZ-IRIARTE, M.; CARMONA, R.; ATENCIA, G.; MACIAS, D.; PEREZ-POMARES, J.M. Cellular precursors of the coronary arteries. **Tex Heart Inst J**, v. 29, n. 4, p. 243-249. 2002.

NAHIRNEY, P.C.; MIKAWA, T.; FISCHMAN, D.A. Evidence for an extracellular matrix bridge guiding proepicardial cell migration to the myocardium of chick embryos. **Dev Dyn**, v. 227, n. 4, p. 511-523. 2003.

OGILVIE, M.; YU, X.; NICOLAS-METRAL, V.; PULIDO, S.M.; LIU, C.; RUEGG, U.T.; NOGUCHI, C.T. Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. **J Biol Chem**, v. 275, n. 50, p. 39754-39761. 2000.

ORLIC, D.; KAJSTURA, J.; CHIMENTI, S.; JAKONIUK, I.; ANDERSON, S.M.; LI, B.; PICKEL, J.; MCKAY, R.; NADAL-GINARD, B.; BODINE, D.M.; LERI, A.; ANVERSA, P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. **Nature**, v. 410, n. 6829, p. 701-705. 2001.

PEREZ-POMARES, J.M.; CARMONA, R.; GONZALEZ-IRIARTE, M.; ATENCIA, G.; WESSELS, A.; MUNOZ-CHAPULI, R. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. **Int J Dev Biol**, v. 46, n. 8, p. 1005-1013. 2002a.

PEREZ-POMARES, J.M.; MACIAS, D.; GARCIA-GARRIDO, L.; MUNOZ-CHAPULI, R. Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. **Dev Dyn**, v. 210, n. 2, p. 96-105. 1997.

PEREZ-POMARES, J.M.; PHELPS, A.; SEDMEROVA, M.; CARMONA, R.; GONZALEZ-IRIARTE, M.; MUNOZ-CHAPULI, R.; WESSELS, A. Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). **Dev Biol**, v. 247, n. 2, p. 307-326. 2002b.

PEREZ-POMARES, J.M.; XAVIER-NETO, J.; GUADIX, J.A.; PORTILLO, V.; AZAMBUJA, A.P.; CARMONA, R.; MUNOZ-CHAPULI, R. Differential promotion of the differentiation of coronary cell progenitors and coronary vasculogenesis in three in vitro proepicardial/epicardial culture assays: a comparison with in vivo conditions. **Weinstein**, no prelo, n., p. 2006.

REESE, D.E.; ZAVALJEVSKI, M.; STREIFF, N.L.; BADER, D. bves: A novel gene expressed during coronary blood vessel development. **Dev Biol**, v. 209, n. 1, p. 159-171. 1999.

ROBERTS, S.G. Transcriptional regulation by WT1 in development. **Curr Opin Genet Dev**, v. 15, n. 5, p. 542-547. 2005.

SCHOLZ, H.; KIRSCHNER, K.M. A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. **Physiology (Bethesda)**, v. 20, n., p. 54-59. 2005.

STOLLER, J.Z.; EPSTEIN, J.A. Cardiac neural crest. **Semin Cell Dev Biol**, v. 16, n. 6, p. 704-715. 2005.

STUCKMANN, I.; EVANS, S.; LASSAR, A.B. Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. **Dev Biol**, v. 255, n. 2, p. 334-349. 2003.

TEVOSIAN, S.G.; DECONINCK, A.E.; TANAKA, M.; SCHINKE, M.; LITOVSKY, S.H.; IZUMO, S.; FUJIWARA, Y.; ORKIN, S.H. FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. **Cell**, v. 101, n. 7, p. 729-739. 2000.

TOMANEK, R.J.; HOLIFIELD, J.S.; REITER, R.S.; SANDRA, A.; LIN, J.J. Role of VEGF family members and receptors in coronary vessel formation. **Dev Dyn**, v. 225, n. 3, p. 233-240. 2002.

TOMANEK, R.J.; RATAJSKA, A.; KITTEN, G.T.; YUE, X.; SANDRA, A. Vascular endothelial growth factor expression coincides with coronary vasculogenesis and angiogenesis. **Dev Dyn**, v. 215, n. 1, p. 54-61. 1999.

TOMANEK, R.J.; SANDRA, A.; ZHENG, W.; BROCK, T.; BJERCKE, R.J.; HOLIFIELD, J.S. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor differentially modulate early postnatal coronary angiogenesis. **Circ Res**, v. 88, n. 11, p. 1135-1141. 2001a.

TOMANEK, R.J.; ZHENG, W. Role of growth factors in coronary morphogenesis. **Tex Heart Inst J**, v. 29, n. 4, p. 250-254. 2002.

TOMANEK, R.J.; ZHENG, W.; PETERS, K.G.; LIN, P.; HOLIFIELD, J.S.; SUVARNA, P.R. Multiple growth factors regulate coronary embryonic vasculogenesis. **Dev Dyn**, v. 221, n. 3, p. 265-273. 2001b.

VAN DEN AKKER, N.M.; LIE-VENEMA, H.; MAAS, S.; ERALP, I.; DERUITER, M.C.; POELMANN, R.E.; GITTENBERGER-DE GROOT, A.C. Platelet-derived growth factors in the developing avian heart and maturing coronary vasculature. **Dev Dyn**, v. 233, n. 4, p. 1579-1588. 2005.

VRANCKEN PEETERS, M.P.; GITTENBERGER-DE GROOT, A.C.; MENTINK, M.M.; HUNGERFORD, J.E.; LITTLE, C.D.; POELMANN, R.E. The development of the coronary vessels and their differentiation into arteries and veins in the embryonic quail heart. **Dev Dyn**, v. 208, n. 3, p. 338-348. 1997.

WANG, D.Z.; OLSON, E.N. Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators. **Curr Opin Genet Dev**, v. 14, n. 5, p. 558-566. 2004.

WANG, Z.; WANG, D.Z.; HOCKEMEYER, D.; MCANALLY, J.; NORDHEIM, A.; OLSON, E.N. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. **Nature**, v. 428, n. 6979, p. 185-189. 2004.

WATT, A.J.; BATTLE, M.A.; LI, J.; DUNCAN, S.A. GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 34, p. 12573-12578. 2004.

WESSELS, A.; ANDERSON, R.H.; MARKWALD, R.R.; WEBB, S.; BROWN, N.A.; VIRAGH, S.; MOORMAN, A.F.; LAMERS, W.H. Atrial development in the human heart: an immunohistochemical study with emphasis on the role of mesenchymal tissues. **Anat Rec**, v. 259, n. 3, p. 288-300. 2000.

WESSELS, A.; PEREZ-POMARES, J.M. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v. 276, n. 1, p. 43-57. 2004.

WU, H.; LEE, S.H.; GAO, J.; LIU, X.; IRUELA-ARISPE, M.L. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. **Development**, v. 126, n. 16, p. 3597-3605. 1999.

XAVIER-NETO, J.; PEREIRA, A.C.; SAMPAIO, A.C.; AZAMBUJA, A.P. Bases Embriológicas e Genéticas das Doenças Cardíacas Congênitas. In: **Tratado de Cardiologia**. Barueri: Ed. Manole, 2005. p.1850.

XAVIER-NETO, J.; SHAPIRO, M.D.; HOUGHTON, L.; ROSENTHAL, N. Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart. **Dev Biol**, v. 219, n. 1, p. 129-141. 2000.

YAMASHITA, J.; ITOH, H.; HIRASHIMA, M.; OGAWA, M.; NISHIKAWA, S.; YURUGI, T.; NAITO, M.; NAKAO, K. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. **Nature**, v. 408, n. 6808, p. 92-96. 2000.

YANG, J.T.; RAYBURN, H.; HYNES, R.O. Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. **Development**, v. 121, n. 2, p. 549-560. 1995.