

André Luiz Pasqua Tavares

**ESTUDO MORFOLÓGICO E FUNCIONAL DE
RHOA DURANTE A MORFOGÊNESE DAS
VÁLVULAS CARDÍACAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Gregory Thomas Kitten
Co-orientador: Dr. Raymond B. Runyan

Belo Horizonte – MG
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Aos meus pais, Luiz e Sônia, a minha irmã, Érika, e ao meu sobrinho, Lucas, pela constante presença, suporte e amor.

Ao Prof. Gregory Kitten, pela orientação singular, sempre me incentivando e ajudando no crescimento profissional.

Ao Prof. Raymond Runyan, por ter me aceitado em seu laboratório, apoiando-me na realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, pela amizade e ajuda na realização das técnicas utilizadas neste estudo.

Aos alunos, funcionários e professores dos laboratórios que ajudaram na viabilização deste estudo.

Ao curso de Pós-graduação em Biologia Celular, Profa. Ana Maria e Iraídes, pelo auxílio e possibilidade de aprimoramento profissional.

Este trabalho recebeu auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	5
LISTA DE TABELAS	6
LISTA DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMO	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
2.1. Desenvolvimento do Coração.....	11
2.2. Formação dos Coxins Endocárdicos	12
2.3. Transição epitélio-mesenquimal (EMT)	14
2.4. GTPases – A Grande Família de Proteínas Semelhante à Ras	19
2.5. A Família Rho.....	24
2.6. Rho-GTPases e Migração	29
2.7. Rho-GTPases e Morfogênese	33
3. HIPÓTESE	37
4. OBJETIVOS	38
4.1. OBJETIVO GERAL.....	38
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
5.1. Embriões	39
5.2. Microscopia de Imunofluorescência.....	39
5.2.1. Localização no tecido dos coxins endocárdicos AV.....	39
5.2.2. Localização <i>in vitro</i>	41
5.3. PCR em Tempo Real Quantitativo (qPCR): Método de Quantificação Relativa	44
5.4. Inibição de Rho pela Exoenzima C3.....	53
5.5. Inibição funcional de RhoA por Antisense DNA.....	54
5.6. Inibição de RNAm para RhoA por siRNA	55
5.6. Tratamento com Anti-TGF- β 2 e Anti-TGF- β 3	57
5.7. Detecção do Índice de Proliferação Celular In Vitro	58
5.8. Detecção do Índice de Apoptose In Vitro.....	59
6. RESULTADOS	61
6.1. Padrão temporal de expressão de RhoA em segmentos de AVC	61
6.2. Padrão temporal e espacial de localização de RhoA em segmentos de AVC ...	61

6.3. RhoA é expressa nas células derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV e colocaliza-se com ROCK-1 e ROCK-2	63
6.4. O citoesqueleto de actina sofre rearranjo estrutural durante a EMT.....	66
6.5. Inibição de Rho bloqueia invasão mesenquimal em explantes de coxins em cultura.....	70
6.6. Redução de RNAm para RhoA bloqueia a invasão mesenquimal em explantes de coxins em cultura.....	73
6.7. Redução de RNAm para RhoA afeta vários genes relacionados à EMT.....	78
6.8. Tratamento com Anti-TGF- β 2 ou Anti-TGF- β 3 diminui o nível de mensagem para RhoA.....	78
6.9. Tratamento com exoenzima C3 ou siRNA não afeta proliferação ou apoptose	83
6.10. Comparação entre os níveis de RNAm para RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1 em segmentos de AVC de embriões no estágio 17 e em células derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV	84
6.11. Cdc42 é expressa nas células derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV.....	87
6.12. Rac1 é expressa nas células derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV.....	87
7. DISCUSSÃO	90
7.1. RhoA é expressa no canal átrio-ventricular do coração de galinha	90
7.2. RhoA é necessária para EMT normal na região dos coxins endocárdicos AV ..	92
7.3. Cdc42 e Rac1 são expressas no canal átrio-ventricular do coração de galinha	96
8. CONCLUSÕES	99
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
SUMMARY	108
ANEXO.....	109

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.....	13
FIGURA 2.....	22
FIGURA 3.....	24
FIGURA 4.....	28
FIGURA 5.....	31
FIGURA 6.....	52
FIGURA 7.....	62
FIGURA 8.....	64
FIGURA 9.....	65
FIGURA 10.....	67
FIGURA 11.....	68
FIGURA 12.....	69
FIGURA 13.....	71
FIGURA 14.....	74
FIGURA 15.....	76
FIGURA 16.....	80
FIGURA 17.....	81
FIGURA 18.....	85
FIGURA 19.....	88
FIGURA 20.....	89

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.....	21
TABELA 2.....	51
TABELA 3.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADP – *adenosine diphosphate*
 APC – *adenomatous polyposis coli*
 aPKC – *atypical protein kinase C*
 Arf – *ADP ribosylation factor*
 Arp2/3 – *actin related protein 2 and 3*
 AS – *antisense*
 ATP – *adenosine triphosphate*
 AV – *átrio-ventricular(es)*
 AVC – *atrioventricular canal*
 BMP – *bone morphogenetic protein*
 BrdU – *bromodeoxyuridine*
 BSA – *bovine serum albumin*
 Cdc42 – *cell division control protein 42*
 cDNA – *DNA complementar*
 CNF – *cytotoxic necrotizing factor*
 C_T – *ponto de takeoff*
 DAPI – *4',6-diamidino-2-phenylindole*
 Dia – *diaphanous*
 DMSO – *dimetilsulfóxido*
 DNA – *deoxyribonucleic acid*
 DRF – *diaphanous-related formin homology proteins*
 dsDNA – *double strand DNA*
 dsRNA – *double strand RNA*
 DTT – *dithiothriitol*
 dUTP – *deoxyuridine triphosphate*
 ECM – *extracellular matrix*
 EGF – *epidermal growth factor*
 EMT – *epithelial-mesenchymal transition*
 EMT – *transição epitélio-mesenquimal*
 ERM – *ezzrin/radixin/moesin*
 FGF – *fibroblast growth factor*
 FIG – *figura*
 FITC – *fluorescein isothiocyanate*
 Frzb – *Frizzled b*
 GAP – *GTPase-activating protein*
 GAPDH – *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*
 GDI – *guanine nucleotide dissociation inhibitor*
 GDP – *guanosine diphosphate*
 GEF – *guanine nucleotide exchange factor*
 GFP – *green fluorescent protein*
 GSK3 – *glycogen synthase kinase 3*
 GTP – *guanosine triphosphate*
 HE – *hematoxilina e eosina*
 HH – *Hamburger e Hamilton*
 IQGAP – *IQ motif + GAP*
 JNK – *c-Jun N-terminal kinase*
 LPA – *lysophosphatidic acid*
 MAPK – *mitogen-activated protein kinase*
 MLC – *myosin light chain*
 MM1 cells – *malignant melanoma cells*
 MRCKs – *myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases*
 NADPH – *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
 ORF – *open reading frame*
 OT – *outflow tract – tronco arterioso*
 p38 – *38kDa protein*
 PAK – *p21-activated kinase*
 Par-6 – *partition defective gene - 6*
 PBS – *phosphate-buffered saline*
 PCR – *polymerase chain reaction*
 PDGF – *platelet derived growth factor*
 PFA – *paraformaldeído*
 Pi – *fosfato inorgânico*
 PKC – *protein kinase C*
 qPCR/RT-qPCR – *quantitative real-time PCR*
 Rab – *Ras in the brain*
 Rac – *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*
 Ran – *Ras-related nuclear protein*
 Ras – *Rat sarcoma*
 Rho – *Ras homologous*
 RNA – *ribonucleic acid*
 RNAm – *RNA mensageiro*
 RNAr – *RNA ribossômico*
 ROCK – *Rho-associated coiled-coil containing protein kinase*
 ROK – *Rho-associated kinase*
 rTdT – *terminal deoxynucleotidyl transferase*
 Runx2 – *Runt domain factor – 2*
 Sar1 – *secretion-associated, ras-related-1*
 SF/HGF – *scatter factor/hepatocyte growth factor*
 siRNA – *small interfering RNA*
 Smad – *SMA - C. elegans + MAD - Drosophila*
 SRF – *serum response factor*
 SSC – *sodium citrate buffer*
 TAB – *tabela*
 TGF- β – *transforming growth factor β*
 T β R – *transforming growth factor β receptor*
 TUNEL – *TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*
 UDG – *uracil-DNA-glycosylase*
 WASP – *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*
 WAVE/Scar – *WASP family Verprolin-homologous / Suppressor of cAMP Receptor*
 Wnt – *wingless type MMTV(mouse mammary tumor virus) integration site*

RESUMO

Em adição à formação da parede muscular do coração adulto, a cardiogênese envolve a morfogênese das válvulas cardíacas e septos membranosos, os quais são derivados dos coxins endocárdicos. O endocárdio nestas regiões sofre uma transição epitélio-mesenquimal (EMT), na qual células endoteliais adquirem um fenótipo mesenquimal e diferenciam-se em fibroblastos enquanto migram no interior da matriz extracelular subjacente. Rho-GTPases estão envolvidas com controle do citoesqueleto e regulação gênica durante a EMT que ocorre em outras regiões durante o desenvolvimento. O objetivo principal deste projeto foi determinar se há alguma correlação entre RhoA e a EMT que ocorre nos coxins endocárdicos átrio-ventriculares de corações de embriões de galinha. Por imunofluorescência e PCR em tempo real, RhoA foi detectada nos sítios analisados, com expressão elevada nos estágios em que a EMT estava ativamente ocorrendo. Explantes em cultura tratados com um inibidor para Rho-GTPases, a exoenzima C3, mostraram diminuição significativa no número de células mesenquimais. siRNA foi usado para bloquear especificamente a síntese de RhoA e ambos os números de células endoteliais ativadas e mesenquimais diminuíram significativamente com o tratamento. Perda de RhoA produziu redução nos níveis de RhoB, ciclina-b2 e catenina beta, mostrando que estes genes são regulados *downstream* a RhoA. Em contraste, Runx-2 não foi reduzida. Inibição das atividades de TGF- β 2 e TGF- β 3 causou redução significativa nos níveis de mensagem para RhoA. Estes dados colocam RhoA nas vias de sinalização reguladas por TGF- β e demonstram um requerimento funcional durante a EMT que ocorre durante o desenvolvimento das válvulas cardíacas.

1. INTRODUÇÃO

O interesse em se estudar o desenvolvimento dos seres vivos antes do nascimento é grande. Os homens sempre tiveram curiosidade sobre a origem da vida, sobre os mecanismos básicos pelos quais os seres vivos desenvolvem-se e sobre uma forma de melhor viver. Isto é ainda mais relevante nos dias atuais pelo uso de células tronco no tratamento de várias doenças. Além disso, muitos dos eventos que ocorrem durante a progressão de cânceres refletem mecanismos utilizados normalmente durante o desenvolvimento embrionário, como proliferação celular, migração e invasão de tecidos adjacentes. Nos últimos anos, com o desenvolvimento das novas técnicas de Biologia Celular e Molecular, foi possível ao homem progredir na jornada pelo entendimento dos eventos celulares que governam estes processos.

Dessa forma, diversos grupos de pesquisa começaram a estudar o papel de diversas proteínas durante a morfogênese. O Laboratório de Matriz Extracelular e Desenvolvimento tem realizado projetos no sentido de melhor entender o papel da matriz extracelular e sua ação nas células (receptores e vias de sinalização) durante a morfogênese. Especificamente, estuda-se essa interação na transição epitélio-mesenquimal (EMT) que ocorre durante a formação dos coxins endocárdicos. Essas estruturas originarão as válvulas e porções membranosas dos septos interatrial e interventricular do coração adulto.

Diversos experimentos foram realizados com o objetivo de descobrir qual ou quais moléculas estariam desencadeando esta EMT. Inicialmente, a atuação de componentes da camada de matriz extracelular entre o miocárdio e endocárdio primitivos foi investigada neste fenômeno (Markwald *et al.*, 1978; Krug, Runyan and

Markwald, 1985; Krug, Mjaatvedt and Markwald, 1987). Em 1989, Potts and Runyan descobriram papel importante para TGF β . Novos experimentos identificaram TGF β 3 como uma isoforma crítica na regulação desta EMT (Potts *et al.*, 1991). Em 1999, Boyer *et al.* mostraram que o bloqueio da atividade de TGF β 2 prevenia a separação celular enquanto o bloqueio de TGF β 3 permitia a separação mas bloqueava a invasão das células mesenquimais.

Wei *et al.* (2002) e Kaarbo *et al.* (2003) mostraram que membros da família Rho participam ativamente na formação do coração de camundongo e galinha, respectivamente. Com relação à valvulogênese, Zhao & Rivkes (2004) e Sakabe *et al.* (2006) demonstraram o requerimento de ROCK (*Rho-associated kinase*) para a invasão das células mesenquimais durante a EMT em coração de camundongos e galinha, respectivamente. Além disso, a presença de RhoB, Rac1 e Cdc42 foi detectada no canal átrio-ventricular (AVC) do coração embriões de galinha através de imuno-histoquímica (Tavares & Kitten, 2004).

Nesse sentido, o presente trabalho procurou detectar e relacionar o papel de RhoA com a formação do tecido dos coxins endocárdicos átrio-ventriculares (AV) do coração de embriões de galinha.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. *Desenvolvimento do Coração*

O coração de organismos vertebrados desenvolve-se a partir de complexos processos no embrião que culminarão na formação de uma bomba muscular com quatro câmaras. O coração é o primeiro órgão a funcionar nos embriões e sua viabilidade é crítica para a embriogênese e organogênese subseqüentes. Estudos de mapeamento de destino celular em embriões de galinha mostram que células do epiblasto na linha primitiva anterior no estágio 3 de Hamburger e Hamilton (HH; Hamburger & Hamilton, 1951) incluem progenitores cardíacos. O primórdio cardíaco dentro da linha primitiva involui e migra cranialmente e lateralmente formando os campos cardíacos bilaterais (crescente cardíaco) dentro do mesoderma lateral. No estágio 5 de HH, células isoladas do mesoderma pré-cardíaco podem diferenciar-se em músculo cardíaco e, dessa forma, já estão especificadas para formar cardiomiócitos. No estágio 7, progenitores cardíacos estão presentes no mesoderma esplâncnico diretamente sobre o endoderma do tubo digestivo anterior primitivo. Neste estágio, uma população de precursores endocárdicos é detectável distintamente do pré-miocárdio.

Iniciando no estágio 8 em galinha, o dobramento do embrião causa a fusão do mesoderma esplanquínico na linha média de rostral para caudal e a localização desta área na região do tórax. Fusão do coração primitivo e contrações visíveis ocorrem por volta do estágio 10. Este coração funcional consiste de uma camada de células miocárdicas externa e de uma camada de células endocárdicas interna. Entre as duas camadas há uma camada de matriz extracelular (ECM), rica em ácido hialurônico, chamada de geléia cardíaca, que se constitui como uma membrana

basal expandida. No estágio 12, o tubo cardíaco linear começa a dobrar para a direita, percebendo-se em sua superfície externa constrições menores que demarcam os segmentos cardíacos primitivos. De caudal para rostral, os segmentos cardíacos são: seio venoso, átrio, ventrículo esquerdo, ventrículo direito e tronco arterioso. Desse modo, o coração constitui-se como um tubo contínuo em expansão, recebendo drenagem venosa de seu pólo caudal e bombeando sangue para o primeiro arco aórtico. Em adição, células mesoteliais da região do seio venoso migram sobre o coração para formar o epicárdio (Sucov, 1998; Person, Klewer & Runyan, 2005).

Entretanto, a formação de um coração completo com quatro câmaras individualizadas envolve o desenvolvimento das válvulas tricúspide e mitral e septação atrial e ventricular completa. As válvulas e porções membranosas do septo cardíaco são derivadas de progenitores endocárdicos que formam mesênquima. Para isto, é crítico o processo morfogenético de invasão e transformação nos coxins endocárdicos que ocorre no canal átrio-ventricular e tronco arterioso do coração rudimentar (Markwald *et al.*, 1984).

2.2. Formação dos Coxins Endocárdicos

Os coxins endocárdicos formam-se por um processo não muito entendido, porém regulado, de secreção de ECM rica em ácido hialurônico e sulfato de condroitina pelas células do miocárdio. Este processo ocorre na região do canal átrio-ventricular e tronco arterioso logo após o início do dobramento do tubo cardíaco. Acredita-se que a regulação da produção de ECM seja feita por BMP-2 (*bone morphogenetic protein-2*) e Wnt-6 (*wingless type MMTV integration site-6*), uma vez que ambos os fatores de crescimento são expressos no miocárdio da região formadora dos coxins (Person, Klewer & Runyan, 2005).

Após a formação dos coxins, células mesenquimais são observadas no interior da geléia cardíaca nos estágios 17-18 (FIG. 1). Um trabalho pioneiro de videomicroscopia em AVC em cultura mostrou que as células mesenquimais são originadas a partir da camada de células endocárdicas por um processo conhecido como transição epitélio-mesenquimal (Kinsella & Fitzharris, 1980).

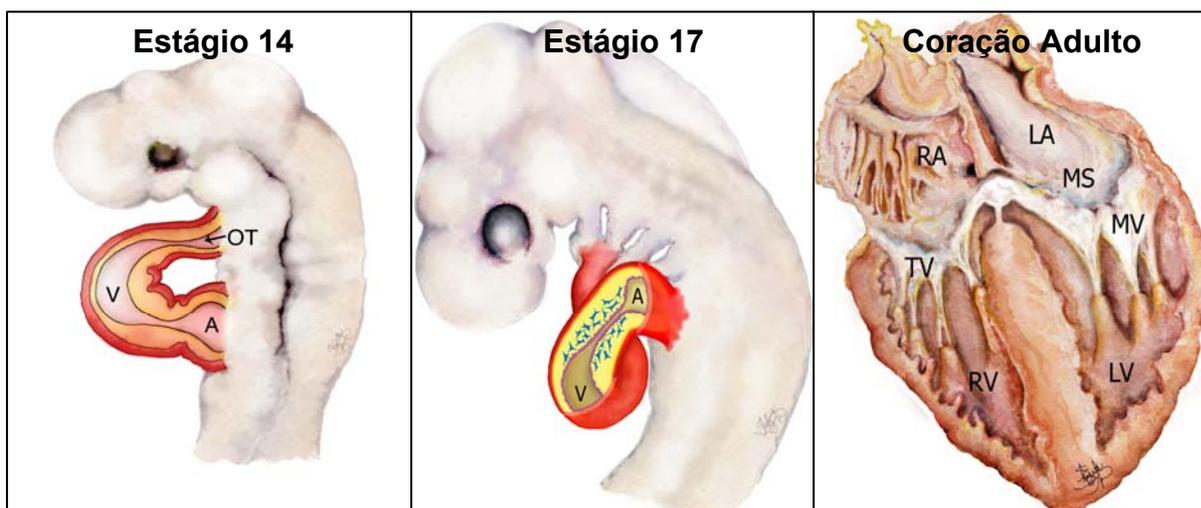


FIGURA 1 - Representação esquemática de cortes do coração de embriões de galinha nos estágios 14 e 17 de HH, bem como de um coração adulto.

Estágio 14 (52 horas): o coração tubular sofreu uma dobra, sendo possível distinguir o átrio (A) e o ventrículo (V). No canal átrio-ventricular e no tronco arterioso (OT), a quantidade de geléia cardíaca aumenta, formando os coxins endocárdicos, que servirão como valvas primitivas separando as duas cavidades. No tronco arterioso, os coxins endocárdicos expandem-se, formando a maioria do septo aórtico-pulmonar.

Estágio 17 (64 horas): a camada endotelial acima dos coxins endocárdicos torna-se “ativada”. Estas células sofrerão a transição epitélio-mesenquimal, dando origem às células do tecido dos coxins endocárdicos. Utilizando sinais diversos, tais como fatores de crescimento produzidos pelo miocárdio e componentes da matriz extracelular, as células dos coxins apresentam intensa atividade de migração na geléia cardíaca. É importante notar que o endotélio localizado em outras regiões do coração permanece como uma única camada de células que não se diferenciam.

Coração adulto: representação de um coração adulto compartimentalizado em quatro câmaras separadas pelas válvulas tricúspide (TV) e mitral (MV). Os coxins endocárdicos contribuem para a formação destas válvulas, bem como do septo interatrial e interventricular.

A- átrio; LA- átrio esquerdo; LV- ventrículo esquerdo; MS- septo membranoso; MV- válvula mitral; OT- tronco arterioso; RA- átrio direito; RV- ventrículo direito; TV- válvula tricúspide; V- ventrículo.

2.3. Transição epitélio-mesenquimal (EMT)

Historicamente, células epiteliais e mesenquimais têm sido identificadas com base no seu aspecto visual único e na morfologia das estruturas multicelulares que formam. Um epitélio típico é definido como uma camada de células justapostas em um arranjo uniforme. Junções intercelulares e de adesão entre células vizinhas mantêm as células fortemente unidas, impedindo movimentos de células individuais a partir da camada epitelial. Além disso, a camada epitelial é polarizada, apresentando uma região apical visualmente diferente da região baso-lateral. A região basal está em contato com uma camada especializada de tecido conjuntivo, a membrana basal. Embriologicamente, células epiteliais são derivadas normalmente do ectoderma e endoderma. Células mesenquimais, por sua vez, apresentam morfologia irregular e não são uniformes na composição e densidade. A adesão entre células mesenquimais é mais fraca do que a adesão entre células epiteliais, permitindo uma maior capacidade migratória. Células mesenquimais apresentam uma forma mais alongada, com polaridade anterior-posterior. Além disso, a migração mesenquimal é mecanicamente diferente do movimento epitelial. Células epiteliais movem-se como uma camada em bloco, enquanto a migração mesenquimal é considerada mais dinâmica. Células mesenquimais movem-se individualmente e podem deixar parte do seu citoplasma para trás. Elas são derivadas do mesoderma e ectoderma embrionários e durante o desenvolvimento diferenciam-se em diversos tipos celulares, como componentes do tecido conjuntivo, ósseo e cartilaginoso (Lee *et al.*, 2006).

Tornar uma célula epitelial em uma célula mesenquimal requer alterações na morfologia, arquitetura celular, citoesqueleto, adesão e capacidade de migração. Desta forma, a transição epitélio-mesenquimal (EMT) constitui-se como mudança fenotípica de células epiteliais que foram especificadas para diferenciação em células

mesenquimais. Estas células sofrem reorganização do citoesqueleto, perda de contatos celulares, hipertrofia das células epiteliais, rompimento da membrana basal e aquisição de capacidade migratória e invasiva (Shook & Keller, 2003; Person, Klewer & Runyan, 2005). Didaticamente, divide-se a EMT em duas etapas distintas: ativação (hipertrofia, perda de contatos celulares, polarização do Golgi, fluxo intracelular de cálcio, extensão de filopódios) e invasão (rompimento da membrana basal e migração no interior da ECM).

Observa-se a EMT tanto em processos fisiológicos quanto patológicos. Nos eventos fisiológicos, o processo é sutil e controlado, constituindo-se como um importante mecanismo para a reorganização das camadas celulares e dos tecidos durante o desenvolvimento embrionário. Podem-se citar, além da formação do mesênquima pré-valvular, eventos como gastrulação, formação da crista neural, diferenciação dos somitos e diferenciação do esclerótomo e regressão do tracto de Mullerian (Savagner, 2001). Por sua vez, nos eventos patológicos, como a tumorigênese, ocorre um processo agressivo e descontrolado. As células tumorais possuem características morfológicas alteradas, refletindo alterações no genoma. Essas mudanças tornam-se mais dramáticas no caso de metástase, quando as células, por exemplo, deixam uma camada epitelial organizada e adquirem um fenótipo invasivo com a capacidade de atravessar limites de tecidos (Lee et al., 2006). Um outro evento patológico atualmente relacionado com a EMT é a formação de fibroses, como a fibrose renal e pulmonar. Embora não se saiba ao certo o papel da EMT na formação dos miofibroblastos presentes nesta lesão, estas células apresentam características sugestivas de mudança fenotípica, como a expressão do marcador actina alfa de músculo liso (Masszi *et al.*, 2003).

Nos coxins endocárdicos, antes do estágio 14 de HH, o endotélio do AVC apresenta células achatadas, poligonais morfológicamente idênticas às células

endoteliais do ventrículo e átrio. Entre os estágios 13 e 16, um sinal de ativação oriundo do miocárdio é recebido por todas as células endoteliais do AVC (Boyer & Runyan, 2001; Ramsdell & Markwald, 1997; Runyan *et al.*, 1990). Este sinal produz uma população de células endoteliais que apresentam, morfológicamente, hipertrofia e perda de contatos celulares (Krug, Runyan & Markwald, 1985; Markwald, Fitzharris & Manasek, 1977), um fluxo intracelular de cálcio (Runyan *et al.*, 1990) e a produção de um número de marcadores celulares característicos. Estas células são descritas como ativadas e estão espalhadas nesta região do coração (Runyan *et al.*, 1990). Embora muitos dos marcadores conhecidos sejam produzidos nas células endoteliais ativadas, a maioria permanece na superfície da matriz como células endoteliais, enquanto um grupo de células continua a perder suas características epiteliais, estendendo filopódios e tornando-se células mesenquimais invasivas migrando no interior da geléia cardíaca (Markwald *et al.*, 1984). Contagens celulares indicam que 7 a 10% das células endoteliais ativadas tornam-se células mesenquimais (Runyan, dados não publicados). Estas células mesenquimais diferenciam-se, posteriormente, em células tipo fibroblastos e proliferam-se formando o tecido conjuntivo das válvulas e septo. No adulto, estas células diferenciar-se-ão em fibroblastos e miofibroblastos, embora a origem deste último tipo celular ainda esteja sob discussão (epicárdio, crista neural ou EMT). Em condições patológicas, estas células podem se diferenciar em condrócitos.

Tanto sinais autócrinos (da própria camada epitelial) quanto parácrinos (de tecidos adjacentes) podem desencadear a EMT. Componentes da matriz extracelular como colágeno, bem como fatores solúveis, incluindo EGF (*epidermal growth factor*), SF/HGF (*scatter factor/hepatocyte growth factor*), LPA (*lypophosphatidic acid*), membros das famílias do FGF (*fibroblast growth factor*) e TGF- β (*transforming growth factor- β*) e proteínas da família Wnt já foram diretamente relacionados com a EMT (Person *et al.*, 2005; Camenisch *et al.*, 2002, Schubert *et al.*, 2002; Savagner,

2001; Nakajima *et al.*, 2000; Yamagishi *et al.*, 1999; Song, Majka & McGuire, 1999; Potts & Runyan, 1989).

Com relação à EMT nos coxins endocárdicos AV, Potts & Runyan (1989) identificaram TGF- β como um componente essencial das vias de sinalização durante a EMT no AVC de embriões de galinha usando géis de colágeno. TGF- β s são proteínas de baixo peso molecular de aproximadamente 25 kD, compostas de duas subunidades idênticas, originalmente isoladas do meio de células transformadas. A família do TGF- β inclui cinco membros (TGF- β 1-5) compartilhando pelo menos 70% de homologia na sequência de ácidos nucléicos. Nenhuma espécie tem mais de três isoformas (Massagué, 1990). Galinha possui TGF- β 2, 3 e 4, enquanto mamíferos possuem TGF- β 1, 2 e 3. TGF- β 4 em galinha é o homólogo de TGF- β 1 em mamíferos (TGF- β 1 em galinhas foi um artefato de clonagem) (Burt, 1992). TGF- β 5 é encontrada em sapos.

Dessa forma, Potts *et al.* (1991) mostraram que TGF- β 3 era uma isoforma necessária para a regulação desta EMT em embriões de galinha. Entretanto, TGF- β 2 mostrou-se crítica para a EMT nos coxins endocárdicos AV de embriões de camundongo (Sanford *et al.*, 1997; Proetzel *et al.*, 1995). Tentando clarificar o papel das duas isoformas, Boyer *et al.* (1999) compararam a atividade das isoformas TGF- β 2 e TGF- β 3 pelo uso de anticorpos neutralizantes em embriões de galinha. Os autores mostraram que o bloqueio da atividade de TGF- β 2 prevenia a separação celular (ativação das células endoteliais). Por outro lado, anti-TGF- β 3 permitia a ativação, mas bloqueava a invasão de células endoteliais ativadas. Posteriormente, a diferença entre os dois organismos foi confirmada por Camenisch *et al.* (2002). Eles mostraram que apenas TGF- β 2 era expressa e obrigatória para a EMT em AVC de embriões de camundongo.

BMP-2, outro membro da família TGF- β , também está envolvida neste processo. Entretanto, segundo Yamagishi *et al.* (1999) e Nakajima *et al.* (2000), este

fator, produzido apenas pelas células do miocárdio, não apresenta ação isolada, atuando em conjunto com TGF- β 3 em embriões de galinha.

Por sua vez, SF/HGF possui um papel relevante neste processo. Este fator de crescimento também é produzido pelas células do miocárdio. Entretanto, seu papel parece não estar relacionado com a indução da EMT, mas com a manutenção das características mesenquimais das células em migração no interior da geléia cardíaca (Song, Majka & McGuire, 1999).

Wnt-9a e seu antagonista Frzb também foram identificados nos sítios de EMT em embriões de galinha por Person *et al.* (2005). Proteínas Wnt são moléculas de sinalização secretadas que agem como mediadores no controle de muitos aspectos do desenvolvimento em todos os animais estudados. O receptor celular para Wnt pertence à família Frizzled de proteínas transmembranas. Elas sinalizam primariamente através de uma proteína sinalizadora citoplasmática chamada Dishevelled, que por sua vez, regula a proteólise de uma proteína multifuncional chamada catenina beta. Esta última funciona tanto em adesões celulares como proteína de regulação gênica. Na ausência de sinalização por Wnt, a maior parte da catenina beta de uma célula está localizada nas zônulas de adesão associada com caderinas. Toda catenina beta não associada nas zônulas de adesão é rapidamente degradada no citoplasma. A ligação de Wnt ao receptor Frizzled causa a inibição da fosforilação e degradação da catenina beta, que se acumula no citoplasma e núcleo. Neste último local, a catenina beta causa a transcrição de vários genes regulados por Wnt, como aqueles relacionados a proliferação celular (Alberts *et al.*, 2002). Em sítios de EMT no coração de embriões de galinha, Wnt-9a e Frzb não possuem um papel regulador direto durante a ativação ou invasão da EMT. Os dados evidenciam um papel regulador destas moléculas na proliferação das células mesenquimais,

proporcionando a formação de um coxim endocárdico AV normal no coração de embriões de galinha (Person *et al.*, 2005).

A maioria dos receptores para fatores de crescimento e citocinas possui um domínio quinase intracelular ativado pela associação do ligante. Um exemplo é a ação da família TGF- β . O fator de crescimento secretado liga-se a receptores específicos na membrana da célula alvo, como o receptor do tipo II (T β RII). Por conseguinte, o receptor do tipo I (T β RI) associa-se ao complexo formado, fosforilando o receptor T β RII. Este último torna-se, assim, ativo, recrutando e fosforilando outras proteínas intracelulares, iniciando várias cascatas de sinalização. Diversas vias já foram associadas à ação destes receptores, como vias dependentes do fator de transcrição Smad (SMA - *C. elegans* + MAD - *Drosophila*) e independentes desta proteína, como o recrutamento de pequenas proteínas que se ligam a GTP (Xie *et al.*, 2003; Derynck & Zhang, 2003).

2.4. GTPases – A Grande Família de Proteínas Semelhante à Ras

Proteínas que se ligam a GTP constituem uma ampla família de proteínas na qual todas contêm variantes do mesmo domínio globular responsável pela ligação a GTP (Alberts *et al.*, 2002). Elas alternam entre um estado inativo ligado a GDP e um estado ativo ligado a GTP, devido a uma alteração conformacional no domínio de ligação. Além disso, a maioria destas proteínas possui atividade GTPásica, sendo capazes de hidrolisar o GTP ligado a elas. Por causa disso, estas proteínas também são chamadas de GTPases (Alberts *et al.*, 2002; Lodish *et al.*, 1999; Hall, 1998).

Há duas classes de proteínas que se ligam a GTP: proteínas G triméricas, que estão diretamente associadas a certos receptores; e pequenas

proteínas que se ligam a GTP ou proteínas monoméricas do tipo Ras, que estão indiretamente associadas a receptores por outras proteínas (Lodish *et al.*, 1999).

Pequenas proteínas que se ligam a GTP são proteínas monoméricas com massa molecular variando de 20 a 40 kDa. Os genes para Ha-Ras e Ki-Ras foram os primeiros descobertos por volta de 1980. Eles foram identificados com os oncogenes v-Ha-Ras e v-Ki-Ras de sarcomas virais de rato; sendo este o fato que originou o nome Ras (*rat sarcoma*). Em seguida, seus oncogenes celulares foram identificados em humanos e suas mutações foram também encontradas em alguns carcinomas humanos. Estas formas mutantes mostraram-se incapazes de hidrolisar GTP, estimulando a proliferação e transformação de células em cultura (Takai, Sasaki & Matozaki, 2001).

Atualmente, com a identificação de muitas outras proteínas relacionadas a ela, uma grande família de pequenas proteínas semelhantes à Ras foi constituída. Ela agrupa mais de 100 pequenas proteínas em eucariotas, de leveduras a humanos. Os membros são estruturalmente classificados em pelo menos cinco famílias: as famílias Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf e Ran (TAB. 1).

TABELA 1
Pequenas proteínas que se ligam a GTP em mamíferos

Rãs		Rho		Rab		Sar1/Arf	Ran	
Ha-Ras	Rheb	RhoA	Rif	Rab1A	Rab11A	Rab26	Arf1	Ran
Ki-Ras	κB-	RhoB	RhoBTB1	Rab1B	Rab11B	Rab27A	Arf2	
N-Ras	Ras1	RhoC	RhoBTB2	Rab2	Rab12	Rab27B	Arf3	
R-Ras	κB-	RhoD	Miro-1	Rab3A	Rab13	Rab28	Arf4	
M-Ras	Ras2	RhoE/Rnd3	Miro-2	Rab3B	Rab14	Rab29	Arf5	
Ra1A		RhoG	Tc10	Rab3C	Rab15	Rab30	Arf6	
Ra1B		RhoH/TTF		Rab3D	Rab16	Rab31	Sar1a	
Rap1A		Rac1		Rab4	Rab17	Rab32	Sar1b	
Rap1B		Rac2		Rab5A	Rab18	Rab33A	Ar1	
Rap2A		Rac3		Rab5B	Rab19	Rab33B	Ar2	
Rap2B		Cdc42		Rab5C	Rab20		Ar3	
Tc21		Rnd1		Rab6	Rab21		Ar4	
Rit		Rnd2		Rab7	Rab22		Ar5	
Rin		TCL		Rab8	Rab23		Ar6	
Rad		Chp		Rab9	Rab24		Ar7	
Kir/Gem		Wrch-1		Rab10	Rab25		Ard1	

Fonte – Takai, Sasaki & Matozaki, 2001; Jaffe & Hall, 2005

* Proteínas em negrito foram abordadas neste estudo.

Análises cristalográficas de várias proteínas da superfamília Ras revelaram que os domínios de ligação a GTP/GDP têm topologia conservada (FIG. 2). A região G1 apresenta estrutura tridimensional inalterável nas formas ligadas a GDP e a GTP, ligando-se aos fosfatos α e β do GDP ou do GTP, com a sequência consenso GX₄GK (onde X representa qualquer aminoácido). A região G2 apresenta um resíduo de treonina que muda a estrutura da alça orientando um íon Mg⁺² na direção dos fosfatos α e β do GTP. A região G2 é conservada dentro de cada família, mas não entre famílias diferentes. A região G3 apresenta a sequência consenso DX₂G. A região G4 apresenta quatro resíduos hidrofóbicos ou aminoácidos apolares seguidos da sequência consenso NKXD. A região G5 consiste de dois aminoácidos hidrofóbicos seguidos do consenso EXSAX (Bourne, Sanders & McCormick, 1991).

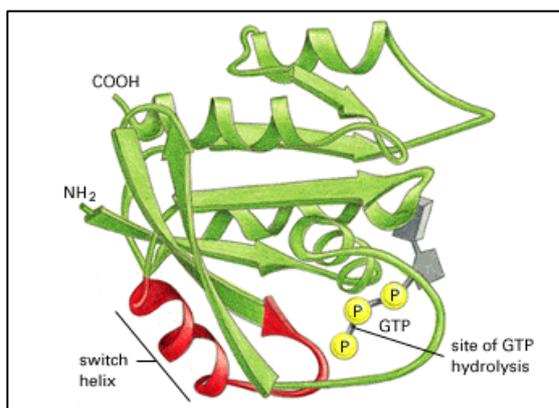


FIGURA 2 – Estrutura da proteína Ras em sua forma ligada a GTP.

Esta proteína relativamente pequena ilustra a estrutura do domínio de ligação a GTP, que está presente em outras proteínas que se ligam a GTP.

Fonte - Alberts *et al.*, 2002, p.182

Algumas das funções de muitas das pequenas GTPases têm sido ultimamente elucidadas: a subfamília Ras da família Ras está principalmente envolvida com expressão gênica; a subfamília Rho/Rac/Cdc42 da família Rho regula tanto a reorganização do citoesqueleto quanto expressão gênica; os membros da família Rab e Sar1/Arf regulam o tráfego vesicular intracelular; e os membros da família Ran estão envolvidos com o transporte nucleocitoplasmático durante as fases G₁, S e G₂ do ciclo celular e organização de microtúbulos durante a fase M. Entretanto, essa associação é muito simplista, visto que, dentro de uma mesma família, um membro pode possuir ações totalmente diferentes de outro membro.

Uma característica estrutural importante de GTPases pertencentes às famílias Ras, Rho/Rac/Cdc42 e Rab é a presença na região C terminal de seqüências para ligações de grupos lipídicos e proteólise. Um exemplo é a presença nas Rho-GTPases do motivo CAAX que, juntamente com regiões polibásicas situadas N terminalmente a este, possibilita a associação de grupos farnesila ou geranyl-geranila. Isto é muito importante para a localização intracelular destas proteínas, permitindo uma atuação espacial e temporal (Takai, Sasaki & Matozaki, 2001).

Embora a maioria dessas enzimas – GTPases – possa catalisar a hidrólise de GTP por si próprias e, portanto, tornarem-se inativas sozinhas, essa ação é lenta, havendo a necessidade de reguladores para essa ação. Isso decorre da necessidade de precisão no controle do “ligamento” e “desligamento” das GTPases, uma vez que tais proteínas estão envolvidas em processos essenciais às células. Dessa forma, existem três tipos identificados de reguladores para GTPases, embora uma família não precise necessariamente possuir os três: as proteínas ativadoras de GTPase (GAP – *GTPase-activing protein*), os inibidores de dissociação de nucleotídeos guanina (GDI – *guanine nucleotide dissociation inhibitor*) e os fatores de troca de nucleotídeo guanina (GEF – *guanine nucleotide exchange factor*) (Alberts *et al.*, 2002; Ridley, 2001; Symons & Settleman, 2000; Hall, 1998).

Resumidamente, uma GTPase é inativada por uma GAP, que se liga a ela, induzindo-a a hidrolisar seu GTP a GDP, liberando fosfato inorgânico (Pi). Esta GTPase-GDP inativa pode, agora, associar-se com um GDI, que impede que a GTPase troque seu nucleotídeo, além de solubilizar a proteína. A liberação da proteína ligada a GDP pelo GDI ainda não é completamente entendida, embora se acredite que fosforilação e/ou interação com outras moléculas celulares, como o complexo ERM (*ezrin/radixin/moesin*), possam estar envolvidas. A GTPase, então, permanece no estado inativo até encontrar um GEF, que se liga à GTPase-GDP, fazendo com que ela libere este GDP. Como o *pool* celular de GTP é maior que o de GDP, o sítio de ligação a nucleotídeo vazio é imediatamente preenchido por um GTP e a GTPase torna-se ativa (Alberts *et al.*, 2002, Ridley, 2001; Michaelson *et al.*, 2001) (FIG. 3).

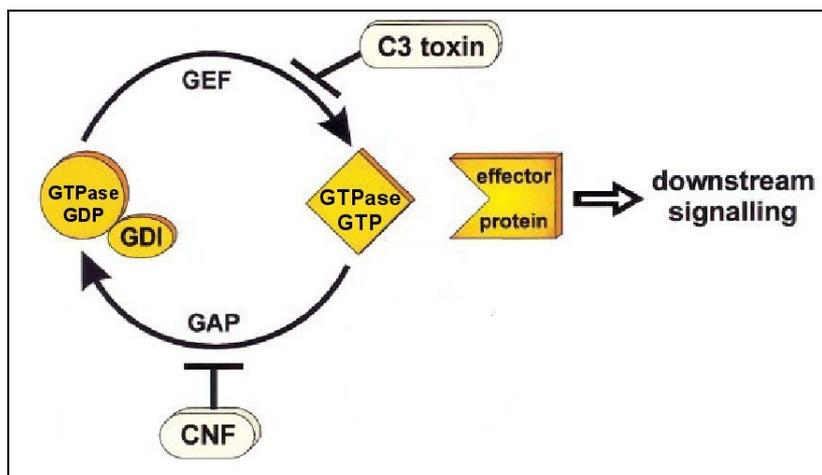


FIGURA 3 – Representação esquemática da ativação e desativação das GTPases da superfamília Rãs.

GTPases estão inativas na forma ligada a GDP. Esta forma pode ser estabilizada por um GDI. A ativação da GTPase ocorre através da liberação do GDP estimulada pelo GEF. Na forma ligada a GTP, as GTPases interagem com múltiplos efetores. O estado ativo das GTPases é interrompido pela hidrólise do GTP, evento facilitado por GAPs. A figura também indica a ação de toxinas bacterianas sobre GTPases específicas. Por exemplo, a ADP-ribosiltransferase C3 do *Clostridium botulinum* modifica Rho-GDP e, por sua vez, inibe a formação da forma ativa. Ao contrário, a toxina CNF da *E. coli* inibe a hidrólise do GTP das proteínas Rho estimulada por GAP, fazendo estas GTPases constitutivamente ativas.

Adaptado – Lerm, Schmidt & Aktories, 2000, p.3

Todas essas peculiaridades fazem com que essas pequenas GTPases funcionem como chaves moleculares. Ciclando entre a forma ativa e inativa, elas são capazes de coordenar temporal e espacialmente um grande número de eventos necessários para o normal funcionamento das células eucariotas.

2.5. A Família Rho

A família Rho de GTPases monoméricas compreende um grupo de moléculas sinalizadoras. Seus membros também funcionam como chaves moleculares, alternando entre um estado ativo ligado a GTP e um estado inativo ligado a GDP. O nome Rho deriva de *Ras-homologous*, e o primeiro gene de Rho foi acidentalmente clonado a partir do caracol marinho *Aplysia* em 1985. No mesmo ano,

três homólogos humanos foram identificados – RhoA, RhoB e RhoC. Em 1990, foram identificados outros membros da família Rho: Rac (*Ras-related C3 botulinum toxin substrate*) - Rac1 e Rac2; Cdc42 (*Cell division control protein 42*) de *Saccharomyces cerevisiae* e seu homólogo humano (Ridley, 2001).

Mas foi apenas em 1992 que Ridley & Hall e Ridley *et al.* publicaram as primeiras observações a respeito das funções celulares destas GTPases. Mutantes constitutivamente ativos de Rho e Rac induziram a formação de fibras de estresse¹ e de lamelipódios², respectivamente, quando transfectados em fibroblastos. Mais tarde, em 1995, Nobes & Hall e Kozma *et al.* demonstraram que Cdc42 estava envolvida na formação de filopódios³. A partir de então, muita atenção foi dada a estas proteínas que foram consideradas como as principais responsáveis pela ligação de sinais extracelulares com o citoesqueleto de actina. Desta forma, outras Rho-GTPases foram descobertas, sendo que, atualmente, pelo menos vinte e dois membros compõem a família em mamíferos (TAB. 1).

Baseando-se em dados de seqüência genética, bioquímicos e funcionais, pode-se subdividir a família Rho. Os subgrupos incluem proteínas que são mais semelhantes à RhoA, outras que são mais semelhantes a Rac1 e Cdc42, e aquelas que não possuem atividade GTPásica (Sahai & Marshall, 2002). Assim, três subgrupos são normalmente destacados: Rho: RhoA, RhoB e RhoC; Rac: Rac1, Rac2 e Rac3; e Cdc42.

Conseqüentemente, com a descoberta de novos membros e com o estudo apurado das Rho-GTPases descobertas, outras funções foram sendo atribuídas a elas. Elas regulam muitas outras vias de sinalização celular em adição e complementares àquelas ligadas ao citoesqueleto de actina. Assim sendo, elas

¹ Filamentos contráteis de actina e miosina-II presentes em células não musculares.

² Estruturas laminares compostas por rede de filamentos de actina em uma célula em migração.

³ Estruturas filamentosas compostas por filamentos de actina, normalmente associados aos lamelipódios.

participam da regulação da transcrição gênica (cascatas da p38, JNK e SRF), tráfego de vesículas, controle da adesão celular, ativação do complexo da NADPH oxidase, progressão no ciclo celular, envolvimento na apoptose, formação do anel contrátil durante reparação de feridas em tecidos epiteliais simples, desenvolvimento do neurito, modulação das junções aderentes (caderinas) em queratinócitos, desgarramento do uropódio de leucócitos em migração, diferenciação de células mesenquimais embrionárias pulmonárias em leiomiócitos, controle da migração celular e regulação de diversos outros eventos celulares durante a morfogênese, como por exemplo a EMT (Beqaj *et al.*, 2002; Sahai & Marshall, 2002; Rosenblatt, Raff & Cramer, 2001; Ridley, 2001; Alblas *et al.*, 2001; Michaelson *et al.*, 2001; Henderson, Ybot-Gonzalez & Copp, 2000; Grosheva *et al.*, 2000; Symons & Settleman, 2000; Braga, 2000; Small *et al.*, 1999; Hall, 1998).

É relevante notar que a função das GTPases da família Rho está intimamente relacionada com a localização intracelular destas proteínas. Dessa forma, Michaelson *et al.* (2001) investigaram a localização de Rho-GTPases em cultura de células usando híbridos com GFP (*green fluorescent protein*). De acordo com suas observações, em células quiescentes, RhoA parece ser exclusivamente citossólica; RhoB parece localizar-se na membrana plasmática, Golgi e corpos multivesiculares; Rac1 na membrana plasmática; e Rac2 e Cdc42 em endomembranas. Além disso, a localização mostrou-se dependente da associação com RhoGDI α .

Como descrito anteriormente, essa capacidade de associação a membranas decorre de uma série de modificações pós-traducionais (prenilação) do motivo CAAX no término COOH. Normalmente, essas Rho-GTPases sofrem a adição do radical geranyl-geranila, com exceção de RhoB, que pode sofrer adição tanto do radical geranyl-geranila ou farnesila.

Outro fator importante é que, ao contrário das proteínas Ras, as proteínas Rho preniladas podem ser seqüestradas no citossol pela interação com RhoGDI específico, e a capacidade de alternar entre membrana e citossol, decorrente dessa interação, faz parte da ação biológica integral⁴.

Numerosos efetores que medeiam algumas das atividades celulares descritas já foram identificados. WASP (*Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*) e MRCKs (*myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases*) servem como efetores cruciais e específicos para Cdc42 na organização da actina e formação de filopódios, ou seja, na aquisição de fenótipo migratório. Em acréscimo, membros da família PAK (*p21-activated kinase*) possuem um papel importante nas mudanças do citoesqueleto decorrentes da ativação de Rac e Cdc42. Estas mudanças afetam, por conseguinte, a mobilidade celular. As proteínas de ancoragem IQGAP (motivo IQ + GAP) e Par-6 (*partition defective gene – 6*) podem ser ativadas ou por Cdc42 ou por Rac, promovendo polarização celular e contribuindo para adesão célula-célula. A perturbação nessas duas moléculas, e dessa forma em contatos célula-célula, sugere que elas possam promover a mobilidade através da alteração da organização normal de células vizinhas (Schmitz *et al.*, 2000; Hall, 1998).

Com relação à Rho, membros de pelo menos duas famílias de proteínas parecem ser necessários para a formação de fibras de estresse e adesões focais: as quinases associadas a Rho (*Rho-associated kinases*, ROK) e os membros da família com homologia a formina (Dia -*Diaphanous* ou DRF -*Diaphanou-related formin homology proteins*). Estes incluem os efetores p164ROK α , p160ROK β (*Rho-associated coiled-coil containing protein kinase* ou ROCK), Dia1 e Dia2. Inibição de ROCK, usando o inibidor Y-27632, previne a formação de fibras de estresse. Assim, a

⁴ A atuação dos Rho-GDIs é tão importante para a ação dessas GTPases, que muitos estudos funcionais para estas proteínas usam a sobre-expressão de GDIs específicos nas células-alvo, como os trabalhos de Wei *et al.* (2002) e Michaelson *et al.* (2001).

ativação de ROCK parece ser necessária, mas não suficiente, para esse fenômeno. ROCK age inibindo a fosfatase da cadeia leve da miosina (MLC) ou fosforilando diretamente a MLC. Dia pode contribuir através de sua interação com profilina, promovendo a polimerização de actina e organização das fibras de estresse (Geiger & Bershadsky, 2001; Amano, Fukata & Kaibuchi, 2000; Schmitz *et al.*, 2000; Hall, 1998). A FIG. 4 apresenta um esquema dos principais efetores das três subfamílias Rho, relacionados com eventos da migração celular.

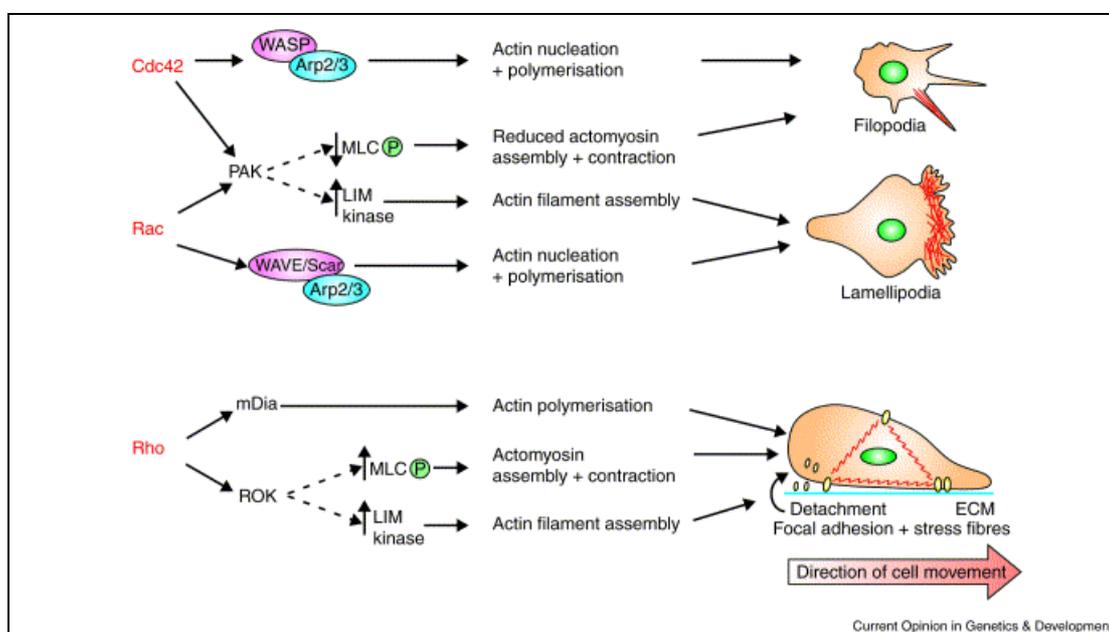


FIGURA 4 – Efetores das Rho-GTPases.

Rho-GTPases ativadas ligam-se e/ou ativam efetores downstream, como WASP, PAK, WAVE, mDia e ROCK. Estes efetores então, interagem com várias proteínas com efeitos distintos no citoesqueleto de actina e na morfologia celular. A regulação espacial e temporal de interações individuais resulta no controle da mobilidade.

Fonte – Frame & Brunton, 2002, p.37

Outro dado relevante é o fato dessas GTPases poderem ser inibidas ou ativadas por várias toxinas bacterianas⁵. A exoenzima C3 do *Clostridium botulinum* foi

⁵ O fato das Rho-GTPases serem substrato para toxinas bacterianas pode ser explicado em parte pelo papel central que estas enzimas possuem na fagocitose. Elas atuam tanto nos processos envolvidos no englobamento de partículas (Caron & Hall, 1998), como no controle do complexo da enzima NADPH oxidase (Abo *et al.*, 1991).

a primeira toxina identificada que bloqueava as funções biológicas das Rho-GTPases. Esta toxina causa a ADP-ribosilação de RhoA, B e C, mas não de outras GTPases desta família (Cdc42, Rac). Por sua vez, as toxinas A e B da *C. difficile*, toxina hemorrágica da *C. sordellii* e toxina α da *C. novyi* modificam todas as Rho-GTPases (Lerm, Schmidt & Aktories, 2000) (FIG. 3).

Muitos são os sinais extracelulares que levam à produção e à ativação de Rho-GTPases. Fatores de crescimento, citocinas e moléculas de adesão e da matriz extracelular estão associados com a indução destas proteínas (Ridley, 2001; Symons & Settleman, 2000). Com relação a fatores de crescimento, EGF e PDGF já foram relacionados com Rho-GTPases (Gampel, Parker & Mellor, 1999; Zubiaur *et al.*, 1995; Jahner & Hunter, 1991). Membros da família do TGF- β também estão envolvidos com o recrutamento de Rho-GTPases, além da via clássica de Smads. Vários trabalhos relacionam isoformas de TGF- β e o recrutamento de RhoA em diversos modelos celulares, sendo esta GTPase importante para a função biológica destes fatores de crescimento (Bhowmick *et al.*, 2001; Kaartinen *et al.*, 2002; Bhowmick *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Mercado-Pimentel, dados não publicados; Runyan, dados não publicados).

2.6. Rho-GTPases e Migração

A migração celular é um fenômeno essencial para o desenvolvimento normal dos organismos multicelulares. Células isoladas ou grupos celulares migram de um local para outro, guiados por diversos sinais do meio externo, originando novas populações celulares nos locais de destino.

Vários eventos celulares ocorrem durante a migração, como mudança do citoesqueleto, da adesão célula-substrato e alterações na matriz extracelular. Normalmente, esses processos são iniciados por sinais extracelulares, como fatores solúveis, sinais de células vizinhas e sinais oriundos da matriz extracelular. Por sua vez, esses sinais estimulam receptores transmembrana que recrutam vários sinalizadores celulares, como Rho-GTPases, proteínas reguladas por Ca^{++} , cascata da MAPK, PKC, fosfolipases C e D e tirosino-quinases.

A associação entre Rho-GTPases e migração celular decorre do fato que estas enzimas são responsáveis pela formação de típicas estruturas celulares ricas em actina. Além disso, as proteínas Rho também regulam outros processos relevantes à migração celular, como adesão célula-substrato, adesão célula-célula, secreção protéica, tráfego vesicular e transcrição. De todas as Rho-GTPases, RhoA/B, Rac1/2 e Cdc42 foram as mais estudadas com relação aos seus efeitos na migração celular. Entretanto, outros membros também afetam a organização do citoesqueleto de actina, podendo, portanto, influenciar a migração. A FIG. 4 apresenta um esquema com as três subfamílias mais relevantes da família Rho (Rho, Rac e Cdc42), em associação com seus efetores e com a ação celular decorrente de suas ações.

A migração celular pode ser dividida em quatro etapas mecanicamente separadas: extensão do lamelipódio, formação de novas adesões, contração do corpo celular e desgarramento da cauda. Em todas estas etapas é fundamental a participação das pequenas proteínas da família Rho. A FIG. 5 mostra um desenho esquemático de uma célula em migração, destacando as quatro etapas mencionadas.

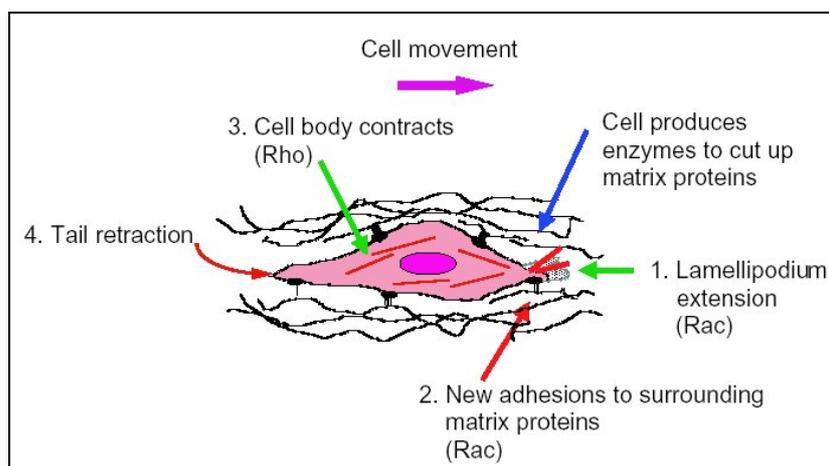


FIGURA 5 – Modelo para as etapas da migração celular.

Uma célula em migração forma na sua região anterior o lamelípódio. Esta extensão é estabilizada através da formação de novas adesões com a matriz extracelular. O corpo celular é movido para frente por contração mediada por complexo actomiosina. Finalmente, a cauda da célula solta-se do substrato e retrai. Células em migração também secretam proteases que cortam a matriz extracelular.

Fonte – Ridley, 2001b, p.2715

O lamelípódio aparece na região frontal de células em migração, como uma rede de filamentos de actina formada pela ação nucleadora do complexo Arp2/3. Este último complexo protéico pode ser ativado pela ação de Rac, através de WAVE, membro da família WASP. Esta Rho-GTPase também atua na polimerização de actina nesta região, promovendo a perda do quepe de ATP dos filamentos de actina sob a membrana plasmática. Além do lamelípódio, alguns tipos celulares apresentam nessa região estruturas filamentosas, ricas em actina, chamadas de filopódios. Cdc42 é a Rho-GTPase necessária para a organização destas estruturas através do recrutamento da proteína WASP, que também ativa o complexo Arp2/3.

Novas adesões pontuais célula-substrato (complexos focais) aparecem por todo o lamelípódio. Esse processo é dependente de Rac, havendo uma inter-relação entre formação de complexos focais e ativação de Rac. Esse *feedback* é muito importante, uma vez que os contatos devem ser dinâmicos, para que o lamelípódio possa se deslocar. A medida que a célula movimenta-se, complexos focais maturam-se em contatos focais em um processo dependente de Rho. Contatos

focais são estruturas achatadas e alongadas associadas com o término de fibras de estresse.

A contração do corpo celular é dependente de contração dos complexos de actina e miosina (fibras tensionais ou de estresse), sendo este evento dependente de Rho. Essa GTPase age ativando ROCK, que, por sua vez, afeta a fosforilação da cadeia leve da miosina (MLC), seja inibindo a fosfatase da MLC ou fosforilando diretamente a MLC. Rho também atua através de Dia, que ajuda na organização das fibras de estresse, através da extensão dos filamentos de actina pré-existentes.

Finalmente, para a célula completar um ciclo de migração, ela precisa realizar o desgarramento de sua parte posterior. Isso constitui o passo limitante para a taxa de migração celular. As Rho-GTPases parecem não estar diretamente associadas com a degradação dos contatos focais nesta região, embora os mecanismos regulando o desgarramento da cauda variem de célula para célula.

Além desses eventos relacionados com o citoesqueleto de actina, há várias indicações de que essas GTPases estão associadas com outros processos necessários para a migração celular. Entre eles podemos citar a regulação da secreção e/ou ativação de proteases secretadas; e associação com a regulação dos microtúbulos (Jaffe & Hall, 2005; Ridley, 2001b).

Rho-GTPases também estão envolvidas no controle da polarização celular durante a migração. Integrinas na parte frontal da célula em migração parecem gerar um sinal essencial para ativação localizada de Cdc42. Isto, por sua vez, ativa o complexo Par6-aPKC (*atypical protein kinase C*). aPKC causa inativação de GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*), que leva à acumulação de APC (*adenomatous polyposis coli*) no término mais dos microtúbulos especificamente na parte frontal da célula. Estes microtúbulos marcados são capturados por um complexo cortical na membrana

desconhecido, permitindo que tensão seja exercida. Esta força re-alinha os microtúbulos, induzindo re-orientação do centróssomo para frente do núcleo, no sentido da direção de migração (Hall, 2005).

2.7. Rho-GTPases e Morfogênese

Uma vez que as Rho-GTPases são responsáveis direta ou indiretamente por vários processos celulares, como migração, diferenciação, ativação gênica, progressão no ciclo celular e apoptose, pode-se inferir que estas pequenas proteínas estão envolvidas em diversos eventos durante a morfogênese.

GTPases da família Rho parecem ser essenciais para o normal desenvolvimento do coração. Wei *et al.*, em 2002, criaram camundongos transgênicos que sobre-expressavam Rho-GDI α , um inibidor das GTPases RhoA, RhoB, Rac1, Rac2 e Cdc42. Todos os embriões transgênicos no dia embrionário 9,5 apresentaram problemas com relação ao dobramento, septação e maturação ventricular do coração. Os corações transgênicos permaneceram lineares e dilatados, envoltos por pericárdio distendido. Análise histológica mostrou uma trabeculação pobre, ausência de coxins endocárdicos e fina parede ventricular. Dessa forma, os autores sugerem que Rho-GTPases são determinantes essenciais para os sinais de proliferação celular nos estágios de maturação e dobramento do coração de mamíferos. Para eles, essas pequenas proteínas poderiam estar envolvidas nas mudanças de forma e de adesão das células, por regular as interações entre cardiomiócitos e proteínas da matriz assimetricamente expressas.

Em 2003, Kaarbo *et al.* mostraram por hibridização *in situ* e imunohistoquímica que a expressão de RhoA aumenta na região formadora do coração em

embriões de galinha entre os estágios 6 a 9 de HH. Além disso, com a injeção de siRNA específico para RhoA em embriões entre os estágios 4 e 6 de HH, houve bloqueio da fusão do tubo cardíaco e formação de *cardia* bífida. Dessa forma, os autores concluem que RhoA é essencial para a embriogênese normal.

Outro evento morfogenético envolvendo a EMT em que Rho-GTPases possuem um papel essencial é a formação da crista neural. Em 1998, Liu & Jessell, utilizando-se de hibridização *in situ* e imunolocalização, detectaram alta expressão de *rhoB* no dorso do tubo neural – local de origem das células da crista neural – na região do tronco de embriões de galinha nos estágios 10 e 20 de HH. Essa expressão persistia somente nas primeiras fases de migração das células da crista neural. Os autores também localizaram alto nível de expressão de *rhoA* na parte lateral do dorso do tubo neural e de *rhoC* na notocorda de embriões de galinha no estágio 10.

Em adição, os autores realizaram ensaios funcionais com explantes da placa neural de embriões de galinha no estágio 10. Utilizando-se da exoenzima C3 para inibição de Rho-GTPases, eles concluíram que a atividade de *rhoB* deve contribuir para a formação e destacamento do tubo neural das células da crista neural. Ainda neste estudo, foi verificado que a inibição de *rhoB* não foi capaz de impedir a migração tardia de células de crista neural em cultura. Conseqüentemente, os autores indagaram que outras GTPases da família Rho devam estar envolvidas no processo de migração tardia das células que já sofreram EMT, como Rac e Cdc42.

Henderson, Ybot-Gonzalez & Copp (2000) procuraram detectar, por sua vez, a expressão do RNAm para RhoB em embriões de camundongos de 9,5 a 11,5 dias embrionários através de hibridização *in situ*. Ao contrário do estudo de Liu & Jessell (1998), eles encontraram a expressão do RNAm apenas em células da crista neural em migração. Esta expressão manteve-se nos derivados da crista neural por pelo menos um dia embrionário. Segundo os autores, essa diferença no padrão de

expressão entre embriões de galinha e camundongos é devida a diferenças nos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento da crista neural. É interessante notar que os autores também detectaram expressão de RNAm para RhoB nas células dos coxins endocárdicos das regiões átrio-ventriculares (AV) e do tronco arterioso nos corações embrionários.

ROCK, efetor *downstream* para RhoA e RhoB, também está envolvida com a EMT em coxins endocárdicos AV. Em 2004, Zhao & Rivkees inibiram a ação desta quinase com o uso do inibidor Y27632 e de um dominante negativo em cultura de coxins endocárdicos AV de embriões de camundongo. Os autores observaram inibição do número de células mesenquimais, distúrbio na organização do citoesqueleto e bloqueio da formação de lamelipódio e filopódio.

Posteriormente, Sakabe *et al.* (2006) detectaram a presença de ROCK-1 e ROCK-2 na região dos coxins endocárdicos AV em embriões de galinha entre os estágios 14 e 18 de HH. Adicionalmente, os autores bloquearam a ação de ROCK com o uso do inibidor Y27632 em cultura de coxins endocárdicos AV de embriões de galinha, mostrando bloqueio na formação de células mesenquimais. Entretanto a inibição de ROCK não impediu a expressão de marcadores de transformação celular como actina alfa de músculo liso, JB3 (fibrilina-II) e M38 (pró-colágeno tipo 1). Coletivamente, estes dados sugerem um papel importante para ROCKs durante a migração/invasão de células mesenquimais durante a EMT em coxins endocárdicos AV.

Visando um entendimento mais global das vias de sinalização envolvendo Rho-GTPases nos eventos morfogênicos, em especial na EMT, Del Barrio & Nieto (2002), através de sobre-expressão de *slug* no tubo neural da região cranial de embriões de galinha, detectaram indução na expressão de *rhoB*. Assim, os autores postularam que Slug possa ativar direta ou indiretamente essa Rho-GTPase.

Entretanto, com relação à EMT nos coxins endocárdicos, não se sabe a real ação de Rho-GTPases (RhoA, RhoB, Rac1 e Cdc42) nos modelos estudados – galinha ou camundongo. Além disso, não há um posicionamento dessas Rho-GTPases, em especial RhoA, nas vias de sinalização para EMT nessas regiões, seja *upstream* (TGF- β , Slug, Rho-GAP, Rho-GEF) ou *downstream* (efetores – ROCK, Dia). Além disso, o papel dessas GTPases na migração das células mesenquimais não é certo.

3. HIPÓTESE

As GTPases da família Rho estão envolvidas com a transição epitélio-mesenquimal relacionada à formação das células dos coxins endocárdicos AVC a partir de células endoteliais. Estas GTPases também se relacionam com a migração dessas células para o interior da geléia cardíaca nessa região.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Verificar a presença e função de Rho-GTPases, em especial RhoA, dentro do coração em desenvolvimento, com ênfase na região dos coxins endocárdicos AV de embriões de galinha em diferentes estágios.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a localização espacial e temporal de RhoA em tecidos dos coxins endocárdicos AV de embriões de galinha;
- Determinar a localização espacial de RhoA, Cdc42 e Rac1 nas células endoteliais ativadas e mesenquimais originadas a partir de coxins endocárdicos AV de embriões de galinha;
- Localizar espacial e tridimensionalmente o citoesqueleto de actina nas células endoteliais ativadas e mesenquimais originadas a partir de coxins endocárdicos AV de embriões de galinha;
- Investigar as funções da subfamília Rho, em especial RhoA, durante as etapas da EMT (ativação e invasão) utilizando explantes de coxins endocárdicos AV de embriões de galinha;
- Verificar o efeito da inibição por siRNA contra RhoA em alguns genes relacionados à EMT;
- Verificar o papel de RhoA na proliferação e apoptose das células mesenquimais originadas a partir das células endoteliais do AVC;
- Determinar a relação entre o estímulo por TGF- β de explantes dos coxins endocárdicos AV de embriões de galinha em cultura e a expressão de RNAm para *rhoA*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Embriões

Ovos de galinha Leghorn Branca fertilizados foram obtidos da *Texas A&M University, Department of Poultry Sciences*, e da Universidade Federal de Viçosa, incubados a 38°C e os embriões coletados entres os estágios 14 e 18 de HH.

5.2. Microscopia de Imunofluorescência

5.2.1. Localização no tecido dos coxins endocárdicos AV

Embriões foram coletados na solução de Tyrode e a região do coração dissecada. As amostras foram fixadas em uma solução de metanol 80% e DMSO (dimetilsulfóxido) 20% a -20°C por uma semana. Esta solução fixadora mostra melhor preservação da antigenicidade dos epitopos em tecidos embrionários em relação a outros fixadores.

Os corações foram, então, lavados em etanol 100%, clarificados em xilol e incluídos em *paraplast*. Seguindo-se à inclusão, foi realizada microtomia de 8µm de espessura. Cortes em diferentes planos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a identificação da localização estrutural dos cortes em relação ao coração embrionário utilizando-se protocolo padrão. Após isso, foi realizada a técnica de imuno-histoquímica indireta em secções adjacentes contendo regiões do coração de interesse, ou seja, a região do canal átrio-ventricular.

A imuno-histoquímica é capaz de identificar com precisão a molécula alvo. Para sua realização são utilizados anticorpos contra a molécula de interesse.

Para a detecção, normalmente é utilizado um segundo anticorpo conjugado a um fluorocromo. Por isso, este tipo de imuno-histoquímica também é chamado de imunofluorescência indireta.

O protocolo seguido para imunofluorescência foi:

Desparafinização: realizada com xilol – temperatura ambiente;

Hidratação: série decrescente de etanol passando por água destilada até PBS (*phosphate-buffered saline* – tampão fosfato salino) – temperatura ambiente;

Etapa de bloqueio: PBS + BSA 1% (*bovine serum albumin* – albumina de soro bovino) + Tween 20 0,1% – 60 minutos – temperatura ambiente;

Incubação com anticorpo primário: anticorpo policlonal de coelho contra RhoA (Santa Cruz Biotechnology, sc-179); diluição em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% – 1:100 – *overnight* a 4°C em câmara úmida;

Controle negativo: incubação com solução de bloqueio diluída 10X;

Lavagem das lâminas: 4 banhos em PBS – 5 minutos cada;

Incubação com anticorpo secundário: anticorpo de cabra contra anticorpo de coelho conjugado com Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, A-11010); diluição em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% – 1:500 – 60 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida;

Marcação do núcleo: incubação com DAPI (Sigma) em PBS (1:10.000) – 15 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida;

Lavagem das lâminas: 4 banhos em PBS – 5 minutos cada;

Montagem das lâminas com lamínulas: solução de montagem Prolong Gold (Molecular Probes).

Os experimentos foram repetidos três vezes e os resultados foram analisados através de microscopia de fluorescência com deconvolução (Delta-Vision Deconvolution Microscope) e microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta), usando-se os programas *Applied Precision SoftWorx Explorer*® (versão 1.1), *Carl Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510*® (versão 3.2) e *Adobe Photoshop CS*® (versão 8.0).

5.2.2. Localização *in vitro*

Progresso significativo no entendimento do desenvolvimento do canal átrio-ventricular de corações de vários organismos foi devido a um sistema de cultura em gel de colágeno tridimensional. Para examinar a migração de células mesenquimais, Bernanke & Markwald (1982) empregaram géis de colágeno desenvolvidos por Elsdale & Bard (1972) para formar um substrato de migração na presença de várias glicosaminoglicanas. Posteriormente, este sistema foi adaptado por Runyan & Markwald (1983) para desenvolver um ensaio biológico para o processo de transformação celular e descrito em Markwald *et al.* (1984). Desta forma, gel de colágeno foi preparado de acordo com protocolo descrito por estes grupos de pesquisadores. Resumidamente:

- Tubo A: 1,0mL de colágeno + 1,5mL de água destilada estéril;
- Tubo B: 1,0mL de meio 199 10X (Gibco BRL) + 1,0mL de NaHCO₃ 2.2%.

Para a polimerização, 1,2mL da solução do tubo A eram misturados com 300µl da solução do tubo B, colocados em placas de 4 poços (300µL por poço) e incubados por 15 minutos a 37°C. Após este período meio 199 completo (1% de soro de galinha, Sigma + 1% de ITS Premix (5µg/mL de insulina, 5µg/mL de transferrina, 5ng/mL de selênio), Collaborative Biosciences + 1% de coquetel de penicilina –

estreptomomicina – fungizona, Gibco BRL) era adicionado sobre os géis, que permaneciam a 37°C até a colocação dos explantes. A concentração final de colágeno no gel era aproximadamente de 2,0mg/ml.

Explantes de coxins endocárdicos AV de embriões de galinha no estágio 17 de HH foram coletados em solução de Tyrode e lavados em meio 199 1X. Os explantes eram, então, colocados sobre o gel de colágeno tipo I após remoção do meio completo e incubados a 37°C, 5% CO₂, *overnight* para adesão. Na manhã seguinte, novo meio completo era adicionado e a incubação prosseguia até o período de 24 horas a partir da colocação dos explantes sobre o gel. As culturas eram lavadas com PBS 1X a temperatura ambiente e fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% por 25 minutos a temperatura ambiente. Os géis fixados eram então processados para imunofluorescência da seguinte forma:

Lavagem: PBS por 1 hora a temperatura ambiente;

Permeabilização: Triton-X a 0,2% por 5 minutos a temperatura ambiente;

Etapa do Bloqueio: PBS + BSA 1% + Tween 20 0,1% *overnight* a 4°C;

Incubação com anticorpo primário: anticorpos policlonais de coelho contra RhoA (Santa Cruz Biotechnology, sc-179); contra Cdc42 (Santa Cruz Biotechnology, sc-87); contra Rac1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-217) – diluição em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% – 1:100 – *overnight* a 4°C;

Controle negativo: incubação com solução de bloqueio diluída 10X;

Lavagem: 4x em PBS – 5 minutos cada; temperatura ambiente;

Incubação com anticorpo secundário: anticorpo de cabra contra anticorpo de coelho conjugado com Alexa Fluor 488 ou 546 (Molecular Probes, A-11008 e A-11010); diluição em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% – 1:500 – 2 horas a temperatura ambiente;

Lavagem: 4x em PBS – 5 minutos cada; temperatura ambiente;

Marcação do citoesqueleto de actina: faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, A-12379) – diluição em PBS – 5:100 – 15 minutos a temperatura ambiente; ou anticorpo monoclonal de camundongo contra alfa-actina de músculo liso conjugado com Cy3 (Sigma, C-6198) – diluição em PBS com BSA 0,1% e Tween 20 0,01% – 1:500 – 2 horas a temperatura ambiente;

Lavagem: 4x em PBS – 5 minutos cada; temperatura ambiente;

Marcação do núcleo: incubação com DAPI (Sigma) em PBS (1:10.000) – 15 minutos a temperatura ambiente;

Lavagem: 4x em PBS – 5 minutos cada; temperatura ambiente;

Montagem com lamínulas: os géis foram transferidos para lâminas de microscopia convencionais e a solução Prolong Gold (Molecular Probes) usada para a montagem.

O mesmo protocolo foi utilizado para a colocação de RhoA e ROCK1 e ROCK2. Entretanto, após incubação com o anticorpo de coelho contra RhoA e anticorpo de burro contra anticorpo de coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, A-21206), seguiu-se de incubação com o anticorpo de cabra contra ROCK1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-6055) ou contra ROCK2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-1851; 1:100, *overnight* a 4°C) com posterior incubação com anticorpo de coelho contra anticorpo de cabra conjugado com Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, A-21085; 2 horas a temperatura ambiente). O citoesqueleto de actina foi marcado com faloidina conjugada com Alexa Fluor 660 (Molecular Probes, A-22285) e núcleos com DAPI.

Todos os anticorpos contra Rho-GTPases utilizados foram produzidos a partir de peptídios isolados das proteínas de humanos. Entretanto, a homologia de GTPases entre as espécies é grande e os anticorpos já foram testados e utilizados por

Santos-Bredariol, Santos & Hamassaki-Britto (2002) e por Sakabe *et al.* (2006) em tecidos de embriões de galinha.

Para o estudo do citoesqueleto, as culturas foram incubadas apenas com faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 como descrito acima. Uma série de imagens foi capturada no plano z (série z) e a imagem remontada tridimensional ou bidimensionalmente, com a projeção de todas as fatias e pseudocoloração da imagem bidimensional com uma escala de cores relacionada à profundidade de determinada estrutura no plano z (*depth coding*).

Os experimentos foram repetidos três vezes e os resultados foram analisados através de microscopia de fluorescência com deconvolução (Delta-Vision Deconvolution Microscope) e microscopia confocal (Zeiss LSM 510 Meta), como descrito acima.

5.3. PCR em Tempo Real Quantitativo (qPCR): Método de Quantificação Relativa

RNA total foi extraído de segmentos de canais átrio-ventriculares de embriões nos estágios 14 a 18 de HH ou de explantes AVC cultivados em gel de colágeno sem ou com tratamento. Para a extração foi usado o reagente Trizol (Gibco BRL) de acordo com o seguinte protocolo:

- Homogeneização dos tecidos;
- Incubação das amostras homogeneizadas por 5 minutos a temperatura ambiente;
- Adição de 0,2mL de clorofórmio por 1mL de Trizol utilizado;
- Agitação dos tubos vigorosamente pelas mãos por 15 segundos;
- Incubação por 3 minutos a temperatura ambiente;

- Centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C;
- Transferência da fase aquosa para novo tubo;
- Precipitação do RNA pela mistura de 0,5ml de isopropanol por 1mL de Trizol usado;
- Incubação das amostras por 10 minutos a temperatura ambiente;
- Centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C;
- Remoção do sobrenadante e lavagem da *pellet* de RNA com 1mL de etanol 75% por 1mL de Trizol usado;
- Centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C;
- Remoção do sobrenadante e secagem do *pelet* de RNA por 15 minutos a temperatura ambiente;
- Ressuspensão do RNA 10µL de água livre de DNase e RNase.

Em seguida, RNA total era tratado com 1µL de *TURBO DNase* miturada a 10X *TURBO DNase Buffer* (0,1V) por 30 minutos a 37°C. A enzima era então inativada com o *DNase Inactivation Reagent* (kit TURBO DNA-Free, Ambion). Após isto, a mistura era centrifugada por 2 minutos a 10.000 x g e o sobrenadante (RNA) transferido para novo tubo. O RNA era então precipitado através de mistura com etanol 100% (2,5X) + NH₄OAC 5M (1/10). A mistura era incubada *overnight* a -80°C e então centrifugada a 14.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante era jogado fora e a *pellet* de RNA lavada duas vezes com etanol 75% como descrito anteriormente. O RNA era ressuspendido em água livre de DNase e RNase.

cDNA foi transcrito usando-se o kit *iScript cDNA Synthesis* (Bio-Rad). Este kit utiliza-se tanto de *primers* hexâmeros randômicos quanto de oligo(dT). Para a transcrição, RNA total era misturado com 1µL de *iScript Reverse Transcriptase* + 4µL de *iScript Reaction Mix* para um volume total de 20µL. As incubações foram feitas em

termociclador para PCR seguindo o seguinte perfil: 5 minutos a 25°C; 30 minutos a 42°C; 5 minutos a 85°C.

O PCR em tempo real quantitativo foi realizado usando-se o Platinum SYBR Green qPCR supermix UDG (Invitrogen). O *supermix* contém: SYBR Green I, 60U/mL de Platinum Taq DNA-polimerase, 40mM de Tris-HCl (pH 8,4), 100mM de KCl, 6mM de MgCl₂, 400µM de dGTP/dATP/dCTP/dUTP, 40U/mL de UDG e estabilizadores. SYBR Green I é um corante fluorescente que se liga diretamente em DNA de fita dupla (dsDNA). No qPCR, na medida em que dsDNA acumula, o corante produz um sinal detectável que é proporcional à concentração de DNA. UDG e dUTP são inclusos na mistura para prevenir a reamplificação de qualquer contaminação com produtos de PCR anteriores.

Um método confiável de quantificação por RT-PCR requer correção para variações experimentais em transcrições reversas individuais e eficiência de cada reação de PCR. Duas estratégias podem ser empregadas para a quantificação por qPCR: quantificação absoluta e quantificação relativa ou comparada (Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2004). A quantificação absoluta relata o sinal de PCR por entrada do número de cópias usando-se uma curva de calibração/padrão. A confiabilidade neste método exige a condição de que as eficiências de amplificação para o RNA alvo e a curva padrão tanto na reação de transcrição reversa quanto na cinética subsequente do PCR sejam “idênticas”. Para tal é preconizada a utilização de um plasmídeo de DNA contendo a seqüência do gene de interesse diluído 10 vezes em série. Dessa forma, após a aplicação de uma série de fórmulas matemáticas, consegue-se a quantificação absoluta de seu RNA de interesse. Entretanto, este método está na dependência da precisão de pipetamento e torna-se inviável quando se amplifica simultaneamente várias seqüências de interesse (com o Rotor Gene 3000 pode-se realizar até 72 reações de PCR simultaneamente), necessitando-se de curva

padrão específica para cada RNA alvo. Um outro problema com o uso de curvas padrão baseadas em DNA está no fato de que elas estão sujeitas apenas ao passo do PCR, enquanto que as amostras de RNAm alvo precisam ser primeiramente transcritas reversamente. Isto aumenta o potencial para variabilidade dos resultados de qPCR e os resultados de amplificação podem não ser comparáveis estritamente com os resultados das amostras desconhecidas (Bustin, 2000; Pfaffl, 2004).

Por sua vez, a quantificação relativa ou comparada mede mudanças relativas nos níveis de expressão de RNAm (Pfaffl, 2004). A quantificação de mudanças relativas na expressão gênica através de qPCR requer certas fórmulas matemáticas, como o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, e a normalização da quantidade de RNA adicionado às reações de transcrição reversa. Normalmente um gene controle (gene *housekeeping* – normalizador) é utilizado para normalizar as amostras por diferenças na quantidade de RNA total adicionada na reação de transcrição reversa (Livak & Schmittgen, 2001). O normalizador ideal deve ser expresso em um nível constante entre diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do desenvolvimento, não pode ser afetado pelo tratamento experimental e deve ser expresso aproximadamente no mesmo nível que o RNA em estudo (Bustin, 2000). Mesmo conseguindo-se um normalizador ideal, a diferença de eficiências de amplificação entre as reações envolvendo o RNA de interesses e o RNA controle pode ser uma variável de relevância na quantificação. Devido à natureza exponencial do PCR, diferenças menores nas eficiências de amplificação das reações de PCR resultarão em grandes diferenças no produto final. Além disso, sabe-se que inúmeros genes considerados de expressão constante em um organismo adulto apresentam variações durante o desenvolvimento embrionário. Por exemplo, GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), um normalizador ainda bastante usado, não apresenta nível constante, estando envolvido em diversas funções celulares, como transporte nuclear

de RNA, replicação e reparo do DNA, fusão da membrana exocítica, organização do citoesqueleto e atividade fosfotransferase (Bustin, 2002).

Em nosso modelo de estudo, dados de *microarray* após a inibição da EMT por anti-TGF β 2 e anti-TGF β 3 de explantes de coxins endocárdicos de embriões de galinha em cultura mostraram que genes considerados *housekeeping* para este organismo (como GAPDH e actina beta) estavam sendo afetados pelo tratamento, além de variar entre estágios de desenvolvimento (Runyan, dados não publicados). Desta forma, o laboratório do Dr. Runyan buscou alternativas para a normalização e quantificação das reações de PCR. Primeiramente, para a quantificação, optou-se pelo método da quantificação relativa ou comparada, no qual os níveis de expressão relativa de amostras são quantificados com relação a um controle (calibrador) quando não é possível a realização de curva padrão. Baseado no ponto de *takeoff* (C_T) e na eficiência da reação, o programa calcula a concentração relativa de cada amostra em comparação à amostra controle (calibrador) previamente escolhida pelo usuário. O número apresentado é expresso em notação científica (Rotor-Gene 3000). Dessa forma, quando comparamos segmentos de canais AV em diferentes estágios, utilizamos como calibrador a amostra proveniente de segmentos de embriões no estágio 14. Quando comparamos diferenças entre tratamentos, o calibrador era a amostra de RNA proveniente do grupo controle (tratado com siRNA controle, por exemplo).

Segundo, para resolver o problema da ausência de normalizador, optou-se pela normalização por RNA ou cDNA total, na qual a mesma quantidade de cDNA era adicionada em cada reação de PCR. Bustin (2000) cita esta forma de normalização como opção na quantificação de amostras derivadas de tecidos sólidos ou cânceres. Entretanto, nesta época, seu grupo não possuía dados suficientes sobre a variação de níveis de RNA total entre células com alto índice de proliferação ou a

presença de RNA ribossômico como parte do RNA total, nem possuía um método confiável de aferição dos níveis de RNA total. Assim, ele classifica este método como pouco confiável. Porém, em 2002, após realizar testes envolvendo estas questões, o autor não notou variação significativa na quantidade de RNA total por célula, concluindo que normalização por RNA total é um método válido se o pesquisador possuir instrumentos precisos de medição. Segundo o autor, este problema resolve-se com a utilização de corantes de ácidos nucleicos como RiboGreen (Invitrogen) ou Oligreen (Invitrogen) e medição por fluorômetro (Turner Biosystems) ou biochips. Além disso, de acordo com Livak & Schmittgen (2001), o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ e normalização por dados gerados pela própria reação de qPCR (quantificação do nível de expressão do gene *housekeeping*) são usados quando não é prático medir a quantidade de RNA adicionado por outros métodos. Porém, os autores mostram que é possível a normalização por alguma medida externa à reação de qPCR, como o uso da absorbância UV do RNA para determinar a quantidade de RNA total adicionada à reação de cDNA. Neste caso, o método de quantificação é o $2^{-\Delta C_T}$.

Nós optamos pelo uso da medição de cDNA total com o uso do reagente Oligreen em fluorômetro (Turner Biosystems). O reagente Oligreen é um corante fluorescente ultra-sensível de ácido nucleico usado para a quantificação de oligonucleotídeos e DNA de fita única (ssDNA) em solução. A detecção linear deste reagente em um fluorômetro padrão varia de 100pg/mL a 1µg/mL, possibilitando detecções precisas da quantidade de cDNA em solução. Curva padrão de quantificação de um cDNA com concentração conhecida é usada para a quantificação. Dessa forma, medindo-se cDNA total ao invés de RNA total, eliminou-se a variação decorrente de problemas na eficiência da transcrição reversa que poderia ocorrer após a medição do RNA total com Ribogreen.

Apesar da existência de embasamento teórico e científico para esta forma de normalização (Bustin, 2000, 2002; Livak & Schmittgen, 2001; Pfaffl, 2004), alguns pesquisadores têm criticado tal procedimento. Dessa forma, o laboratório do Dr. Runyan buscou validar tal metodologia. O uso de RNA ribossômico como normalizador é uma alternativa para normalização (Bustin 2002). Assim, foi realizada comparação da normalização por apenas cDNA total com a normalização por alguns genes *housekeeping* e RNAr. Os resultados mostraram que não há diferença estatisticamente significativa entre normalização por apenas cDNA total e por RNAr (Tavares & Runyan, dados não publicados). Isto valida a normalização por RNA ou cDNA total. Na verdade, o próprio Bustin (2002) já havia mostrado isto, quando preconiza que experimentos *in vitro* devam preferencialmente ser normalizados ou pelo número total de células, ou por RNA total ou por RNAr.

Assim, em cada reação de PCR, 50ng de cDNA total, diluídos em 10µl de água livre de DNase e RNase, eram adicionados a 15µL de *Master Mix* (12,5µL de *SYBR Green qPCR supermix* + 0,25µL de *primer forward* – 500nM por reação + 0,25µL de *primer backward* + 2µL de água). Para evitar problemas eventuais de pipetamento, em cada experimento, a média de três reações (tréplicas) foi calculada para cada gene e cada experimento foi repetido independentemente com amostras diferentes.

O perfil da reação de PCR foi:

- Incubação com UDG: 2 min a 50°C;
- Desnaturação inicial: 2 min a 95°C;
 - 40 ciclos: Desnaturação: 15s a 94°C; Anelamento: 30s a 58°C; Extensão e leitura da fluorescência: 45s a 72°C;
- Curva de desnaturação: de 65°C a 99°C.

O qPCR foi realizado usando-se o Rotor Gene 3000 (Corbett Research). Este termociclador apresenta-se como uma centrífuga de baixa rotação. Desta forma, os tubos de cada reação de PCR ficam sujeitos às mesmas variações de temperatura que possam ocorrer no interior da máquina. Ao mesmo tempo, a leitura dos níveis de fluorescência é feita e os resultados analisados com o programa Rotor Gene 6 (Corbett Research). Os resultados foram avaliados pelo teste t de Student.

Os primers foram desenhados de acordo com a 3'ORF (*open reading frame* – região de leitura aberta) dos genes de interesse. O tamanho do produto final de PCR era entre 100 e 150 pares de base (pb). Foram escolhidos os primers que apresentaram melhor curva de desnaturação (melting) – Fig. 6. A seqüência dos *primers* utilizados encontra-se na tabela 2:

TABELA 2 – Seqüência dos primers utilizados

Primer	Forward	Backward
RhoA	5'-GTTGGCTTTGTGGGATAC-3'	5'-CAGAAATGCTTCACTTCCG-3'
Rho B	5'-GACCTGCCTCCTCATCGTCTTCAG-3'	5'-TCCACCTGCTTGCCGTCCA-3'
Cyclin b2	5'-AGGGGTGGAGAATGCCGTGA-3'	5'-TGCCAGGTCCTTTCGTAGCCTT-3'
β-catenin	5'-GTTGCAACACCCTCATTCT-3'	5'-TCCCCCATTGAGAATATCCA-3'
Runx2	5'-AACCCAACTTGCCCAACCAGA-3'	5'-GCCTCCAAACGGACTCATCCAT-3'
Cdc42	5'-TGCCAAGAACAAGCAGAAGCCC-3'	5'-GGCAGCCAATATCGCCTCATCA-3'
Rac1	5'-AACCAATGCGTTTCCTGGGGA-3'	5'-GGGGGTAGGAGAGTGGGCGTAG-3'
18S rRNA	5'-ACTCAACACGGGAAACCTCA-3'	5'-ATGCCAGAGTCTCGTTCGTT-3'

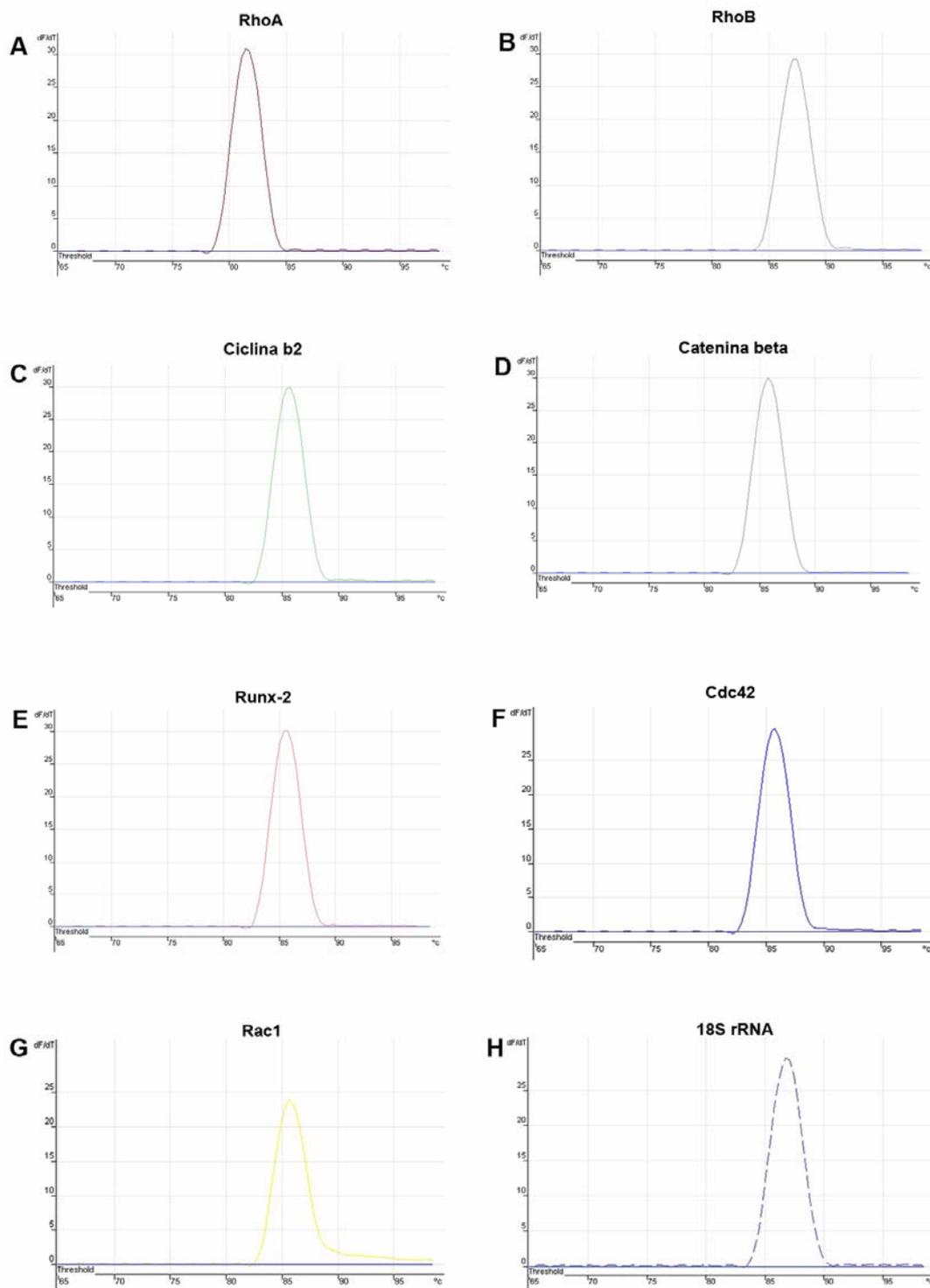


Figura 6 – Curva de desnaturação para os produtos analisados

Visualização da cinética de dissociação dos produtos amplificados. A temperatura da amostra é aumentada em uma taxa linear (eixo x) e a fluorescência de cada amostra registrada (eixo y) após o término da reação de PCR. Cada pico no gráfico representa um produto amplificado (amplicon).

5.4. Inibição de Rho pela Exoenzima C3

A exotoxina C3 do *Clostridium botulinum* causa a ADP-ribosilação de RhoA, B e C, mas não de outras GTPases desta família (Cdc42, Rac). Desta forma, constitui-se como ferramenta eficaz no estudo da atividade destas proteínas (Lerm, Schmidt & Aktories, 2000). A exoenzima C3 (Biosource) foi usada a uma concentração de 0,25ng/μL. Esta concentração foi selecionada após teste com várias concentrações (0,05ng/μL até 1,00 ng/μL).

Dessa forma, anteriormente a colocação dos explantes, a toxina foi adicionada aos géis misturada a meio 199 completo. Explantes de AVC de embriões no estágio 14 de HH foram então colocados sobre os géis após remoção do meio completo com a toxina e incubados *overnight* a 37°C, 5% de CO₂ para adesão. Nova adição de toxina e meio completo foi realizada na manhã seguinte e a incubação continuou até o período máximo de 24 horas após a colocação dos explantes no gel. Culturas controle receberam apenas meio completo. Os géis foram lavados com PBS 1X a temperatura ambiente e fixados com PFA 4% por 25 minutos a temperatura ambiente.

O crescimento endotelial a partir dos explantes e a invasão de células mesenquimais no gel de colágeno foram qualitativa e quantitativamente analisados usando-se *Hoffman Modulation Contrast optics*. Foram contadas células ativadas, definidas como células isoladas na superfície do gel, e células mesenquimais, definidas como células inteiramente no interior da matriz do gel. Um total de 32 explantes (16 no grupo controle e 16 no grupo experimental) foi examinado e os dados analisados pelo teste *t* de Student.

5.5. Inibição funcional de RhoA por Antisense DNA

Em Biologia do Desenvolvimento, várias metodologias são utilizadas para a inibição funcional de determinadas proteínas, objetivando assim verificar seus papéis durante determinados eventos celulares e morfogênicos.

Um dos métodos é o uso de *antisense DNA*. Conforme descrito por Runyan *et al.* (1999), eles constituem oligonucleotídeos específicos construídos para hibridização com o RNAm alvo, impedindo a tradução em proteína ou degradação da mensagem. Dessa forma, *antisense (AS) DNAs* foram desenhados contra 3 diferentes segmentos da 3'ORF de RhoA (NM_204704), além de uma seqüência controle (*scrambled*), sem homologia significativa com o genótipo de *Gallus gallus*. AS DNAs foram adquiridos de Integrated DNA Technologies e testados, escolhendo-se aquele que apresentou melhor resultado. As seqüências usadas foram:

- RhoA *antisense* DNA – 5'-TCCCACCACCACCAGCTT-3'
- *Antisense* controle (*scrambled*) – 5'-ACCCTCTTCACGCCAACC-3'

Oligonucleotídeos AS foram diluídos em meio 199 1X a uma concentração de 40ng/μL e a transfecção foi realizada com Oligofectamine reagent (Invitrogen) de acordo com Runyan *et al.* (1999). Resumidamente, explantes de AVC de embriões no estágio 14 de HH foram coletados em meio 199 1X e, então, adicionados os tratamentos – RhoA AS DNA ou AS DNA controle. Os explantes foram incubados por 45 minutos a 37°C, 5% CO₂ para a transfecção e colocados sobre os géis de colágeno com o mínimo de transferência de sobrenadante. Após o período de adesão (*overnight*, 37°C, 5% CO₂), novo meio 199 1X com os tratamentos foram adicionados às culturas por 45 minutos a 37°C, 5% CO₂. Meio 199 completo foi então

adicionado e a incubação seguiu-se até um período de 24 horas após a colocação dos explantes sobre os géis.

Para a análise qualitativa, as culturas foram fixadas em PFA 4% por 25 minutos a temperatura ambiente. Comparou-se um total de 12 explantes (6 explantes para grupo controle e 6 explantes para grupo tratado com AS), analisando-se a morfologia do crescimento endotelial na superfície do gel, bem como a invasão de células mesenquimais no interior do gel.

O efeito do AS foi verificado por análise quantitativa dos níveis de fluorescência de RhoA, após técnica de imunofluorescência indireta conforme descrito anteriormente. Para tal, as imagens dos géis foram capturadas e a fluorescência de 10 explantes (5 explantes por grupo) quantificada com o Alpha Innotech Alpha Array imager. No total, 192 áreas foram quantificadas por grupo, subtraindo-se a fluorescência do *background*. Teste *t* de Student foi usado para verificar significância entre os níveis de fluorescência do grupo controle e tratado.

5.6. Inibição de RNAm para RhoA por siRNA

O uso de AS DNAs mostrou-se eficaz para um estudo qualitativo da ação de RhoA durante a EMT. Para uma análise quantitativa, bem como um estudo do efeito da inibição de RhoA em outros genes por qPCR, optou-se pelo uso de *small interfering RNAs* (siRNAs) homólogos a 3'ORF de RhoA (NM_204704). dsRNAs (*double strand RNAs*), bem como siRNAs, têm sido usados com sucesso para a inibição de RNAm em embriões de galinha (Pekarik *et al.*, 2003; Rao *et al.*, 2004). Além disso, o uso de siRNAs mostrou-se incapaz de iniciar uma resposta do tipo

interferon em galinha (Chesnutt & Niswander, 2004) e mais eficiente que dsRNAs na redução da mensagem para determinada proteína (Rao *et al.*, 2004).

Para a construção dos siRNAs foi usado o kit Silencer siRNA Construction (Ambion). Este kit produz siRNAs a partir de transcrição *in vitro* de *templates* homólogos aos genes de interesse. Três seqüências foram escolhidas para a produção dos siRNAs, além de uma seqüência controle (*scrambled*). Escolheu-se a seqüência que resultou em melhor resultado na inibição da mensagem para RhoA, como verificado por qPCR:

- RhoA-siRNA – 5'-AATTATGTAGCAGATATTGAA-3' (nucleotídeos 121 a 141)
- siRNA controle (*scrambled*) – 5'-AACTGCATTGAAAGGCAGTCG-3'

Após teste com várias concentrações (1nM até 100nM), ambos siRNAs foram diluídos em meio 199 1X a uma concentração de 10nM e transfectados usando-se siPORT NeoFX (Ambion), conforme descrito pelo fabricante e por Runyan *et al.*, 1999.

Explantos de AVC de embriões no estágio 14 de HH foram coletados em meio 199 1X e, então, adicionados os tratamentos – RhoA-siRNA ou siRNA controle. Os explantes foram incubados por 45 minutos a 37°C, 5% CO₂ para a transfecção. Eles foram, então, colocados sobre os géis de colágeno com o mínimo de transferência de sobrenadante. Após o período de adesão (*overnight*, 37°C, 5% CO₂), novo meio 199 1X com os tratamentos foram adicionados às culturas por 45 minutos a 37°C, 5% CO₂. Meio 199 completo foi então adicionado e a incubação seguiu-se até um período de 24 horas após a colocação dos explantes sobre os géis.

Para a análise qualitativa e quantitativa, as culturas foram fixadas em PFA 4% por 25 minutos a temperatura ambiente e analisados conforme descrito para as culturas tratadas com C3 (n = 28, 12 explantes para cada grupo). Para o RT-qPCR,

o reagente Trizol (Gibco BRL) foi usado para a extração de RNA como descrito anteriormente.

5.6. Tratamento com Anti-TGF- β 2 e Anti-TGF- β 3

O tratamento com anticorpos neutralizantes tem sido utilizado largamente para o estudo da ação de membros da família do TGF- β durante a EMT em coxins endocárdicos AV em cultura (Potts & Runyan, 1989; Boyer *et al.*, 1999; Romano & Runyan, 2000; Camenisch *et al.*, 2002). Assim, anticorpos neutralizantes contra TGF- β 2 (IgG de cabra, R&D Systems) e contra TGF- β 3 (IgG de cabra, R&D Systems) foram utilizados para o estudo das respectivas isoformas no nível de expressão de RhoA. Após teste com várias concentrações e de acordo com experiência prévia no uso dos anticorpos em cultura de AVC, estes foram diluídos em meio 199 completo a uma concentração de 10 μ g de anti-TGF- β 2 e 20 μ g de anti-TGF- β 3 em 300 μ L de meio. Explantes de AVC de embriões no estágio 14 (antes do início da EMT) e 16 (após o início da EMT) de HH foram dissecados e coletados em meio 199 1X e colocados sobre os géis de colágeno. Seguiu-se um período de incubação por 4h (37°C, 5% CO₂) com os anticorpos diluídos. Como controle, géis receberam meio 199 completo com IgG de cabra ou apenas meio 199 completo. RNA total foi extraído usando-se o reagente Trizol (Gibco BRL) e as amostras processadas para qPCR como descrito anteriormente (n = 12).

5.7. Detecção do Índice de Proliferação Celular In Vitro

A detecção do índice de proliferação nas culturas de explantes de coxins endocárdicos AV foi realizada com o uso de BrdU (bromodeoxiuridina). Este composto incorpora-se no DNA no lugar de timidina na fase S da mitose, permitindo a medida da frequência de células sintetizando DNA em estudos de ativação celular e proliferação.

Explantos de AVC de embriões no estágio 14 foram cultivados em géis de colágeno com a exoenzima C3, Rho-siRNA ou controles. Após o período de 20 horas de incubação (37°C, 5% CO₂), os géis foram incubados com 100µM de BrdU (BD Biosciences) diluídos em meio completo por 4 horas (37°C, 5% CO₂). As culturas foram lavadas em PBS 1X e fixadas em PFA 4% por 25 minutos a temperatura ambiente.

A incorporação de BrdU foi detectada por técnica de imunofluorescência indireta. O protocolo seguido foi o seguinte:

- Lavagem em PBS 1X – 6X de 5 minutos – temperatura ambiente;
- Permeabilização do tecido com Triton-X-100 a 0,1% - 15 minutos – temperatura ambiente;
- Adição de 30µL de DNase I (100 U/mL) em tampão – 30 minutos – 37°C;
- Lavagem em PBS 1X – 4X de 5 minutos – temperatura ambiente;
- Incubação dos explantes com solução de bloqueio – 1 hora – temperatura ambiente;
- Incubação com anticorpo primário de camundongo contra BrdU (BD Biosciences) – *overnight* – 4°C;
- Controle negativo: incubação com solução de bloqueio diluída 10X;
- Lavagem em PBS 1X – 5X de 5 minutos – temperatura ambiente;
- Incubação com anticorpo secundário de cabra contra IgG de camundongo conjugado a Alexa Fluor 546 (Molecular Probes, A-11003);

- Lavagem com PBS 1X – 5X de 10 minutos – temperatura ambiente;
- Incubação com DAPI – 15 minutos – temperatura ambiente;
- Lavagem com PBS 1X – 4X de 5 minutos – temperatura ambiente;
- Montagem com lamínulas: os géis foram transferidos para lâminas de microscopia convencionais e a solução Prolong Gold (Molecular Probes) usada para a montagem.

Os géis foram analisados usando-se o DeltaVision Deconvolution Microscope. A percentagem de células positivas para BrdU/Células positivas para DAPI foram contadas em 6 explantes por tratamento. Os resultados foram avaliados pelo teste *t* de Student.

5.8. Detecção do Índice de Apoptose In Vitro

Para a determinação do índice de apoptose, a coloração por TUNEL (TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling) foi feita usando-se o DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega). Este kit é capaz de medir o número de células apoptóticas com DNA fragmentado pela incorporação catalítica de 12-dUTP(a) conjugado com fluoresceína.

Explantes de AVC de embriões no estágio 14 foram cultivados em géis de colágeno com a exoenzima C3, Rho-siRNA ou controles. Após o período de 24 horas de incubação (37°C, 5% CO₂), os géis foram fixados em PFA 4% por 25 minutos a temperatura ambiente. Para o TUNEL foi usado protocolo de acordo com as instruções do fabricante, adaptado para a cultura em gel de colágeno:

- Lavagem em PBS 1X – 3X de 5 minutos – temperatura ambiente;
- Permeabilização do tecido com Triton-X-100 a 0,1% - 15 minutos – temperatura ambiente;

- Lavagem em PBS 1X – 2X de 5 minutos – temperatura ambiente;
- Incubação dos géis com Tampão de Equilíbrio (cacodilato de potássio 200nM; Tris-HCl 25mM; DTT 0,2mM; BSA 0,25mg/mL; cloreto de cobalto 2,5mM) – 10 minutos – temperatura ambiente;
- Controle positivo: incubação com DNase I (10U/mL) em tampão – 10 minutos – temperatura ambiente;
- Incubação com Tampão de incubação rTdT (tampão de equilíbrio + mistura de nucleotídeos + enzima rTdT) – 1 hora – 37°C;
- Controle negativo: incubação com tampão de equilíbrio + mistura de nucleotídeos – sem enzima rTdT;
- Adição de SSC 2X para término da reação – 15 minutos – temperatura ambiente;
- Lavagem em PBS 1X – 4X de 5 minutos – temperatura ambiente;
- Incubação com DAPI – 15 minutos – temperatura ambiente;
- Lavagem com PBS 1X – 4X de 5 minutos – temperatura ambiente;
- Montagem com lamínulas: os géis foram transferidos para lâminas de microscopia convencionais e a solução Prolong Gold (Molecular Probes) usada para a montagem.

Os géis foram analisados usando-se o DeltaVision Deconvolution Microscope. A porcentagem de células positivas para TUNEL/Células positivas para DAPI foram contadas em 6 explantes por tratamento. Os resultados foram avaliados pelo teste *t* de Student.

6. RESULTADOS

6.1. Padrão temporal de expressão de RhoA em segmentos de AVC

Nós analisamos os corações de embriões de galinha coletados durante os estágios 14 a 18 de HH. Este é o período de formação dos coxins endocárdicos no AVC e de EMT no endocárdio desta região (Markwald *et al.*, 1984). Para investigar o padrão temporal de expressão de RhoA, segmentos do AVC do estágio 14 ao 18 foram analisados por qPCR. Embora RhoA tenha sido identificado em todos os estágios analisados, o nível de expressão variou entre estágios. Como pode ser visto na FIG. 7, o nível de RNAm para RhoA mostra um pequeno aumento no estágio 16 e então, um grande aumento de expressão nos estágios 17 e 18, momento de formação e migração das células mesenquimais. Os níveis de expressão estão indicados em relação ao nível do estágio 14 (quantificação relativa).

6.2. Padrão temporal e espacial de localização de RhoA em segmentos de AVC

Para uma localização espacial e temporal de RhoA, secções de coxins endocárdicos AV nos estágios 14, 16 e 17 foram examinados por imunofluorescência usando-se um anticorpo contra RhoA. RhoA foi identificada no miocárdio em todos os estágios (FIG. 8). Nos estágios 14 e 16, esta Rho-GTPase é expressa uniformemente pelo miocárdio (FIG.8A, B). Entretanto, no estágio 17, a marcação de RhoA parece ser maior na camada externa do miocárdio, ou possivelmente, na camada epicárdica que está começando a formar-se em sua superfície (FIG. 8C).

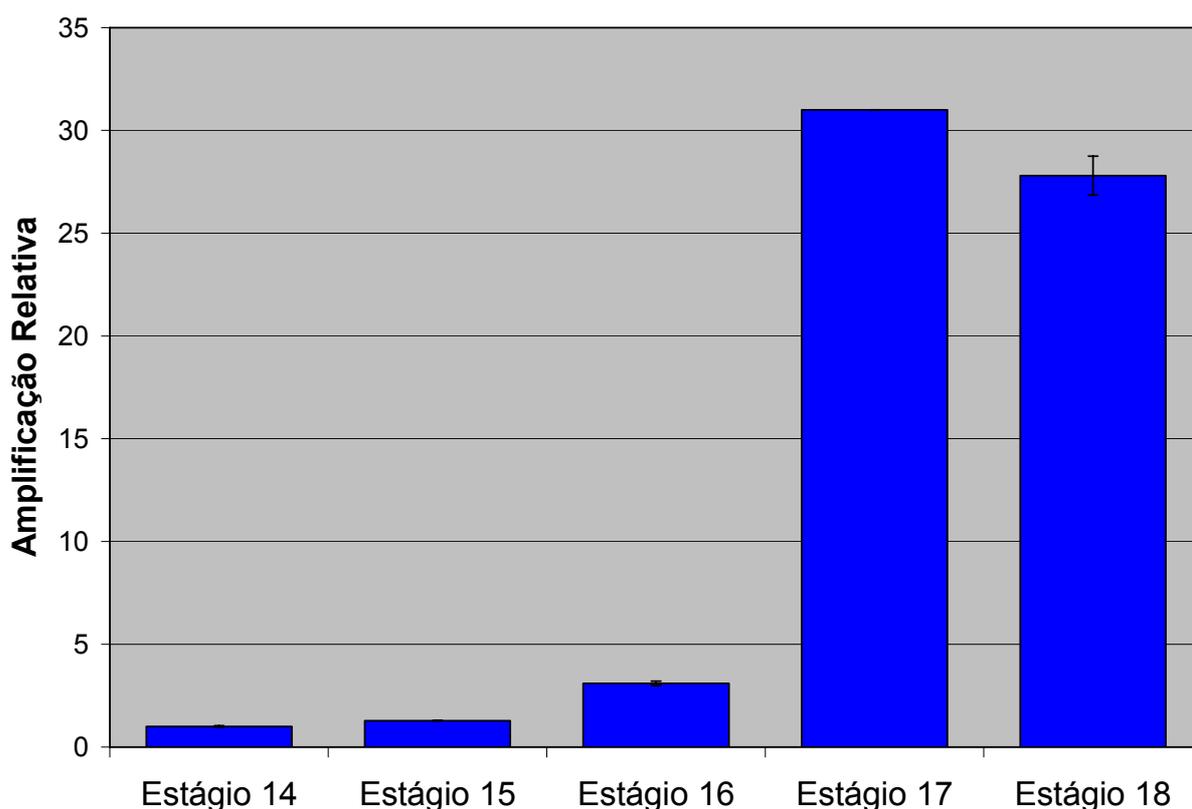


FIGURA 7 – Medida do nível de RNAm para RhoA em segmentos de canais átrio-ventriculares de embriões de galinha por PCR em tempo real quantitativo.

Segmentos de AVC nos estágios 14 a 18 foram analisados por qPCR. RNAm para RhoA foi detectado em todos os estágios analisados. Houve um pequeno aumento na expressão no estágio 16, seguido por um grande aumento nos estágios 17 e 18. As medidas foram normalizadas pela medida de cDNA total em cada reação pelo uso de fluorômetro. O eixo Y mostra mudanças relativas ao estágio 14. Os dados mostram média de duas réplicas com um total de seis medidas para cada estágio. Barras de desvio estão presentes em todos os estágios.

Além disso, RhoA foi localizada no citoplasma das células endoteliais no estágio 14 (FIG. 8A). Este padrão de expressão manteve-se e aparentemente aumentou durante o estágio 16 (FIG. 8B). No estágio 17, células que se destacavam do endocárdio e que migravam no interior da geléia cardíaca também expressavam esta Rho-GTPase, com a maioria das células mesenquimais marcadas (FIG. 8C). Coletivamente, estes resultados mostram que RhoA está presente durante o período de regulação da EMT no AVC e que mudanças em sua expressão são concomitantes com a EMT.

6.3. RhoA é expressa nas células derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV e colocaliza-se com ROCK-1 e ROCK-2

Outros pesquisadores mostraram que a localização de RhoA varia com o tipo celular (Yonemura, Hirao-Minakuchi & Nishimura, 2004). A localização espacial de RhoA foi examinada em células endoteliais e mesenquimais derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV em cultura com gel de colágeno. As FIG. 9A e 9B mostram que células endoteliais ativadas na superfície do gel expressam RhoA. Células endoteliais foram também marcadas com faloidina (F-actina). Células mesenquimais que estavam migrando dentro do gel também expressam RhoA, como pode ser visto na FIG. 9C (colocalização com actina alfa de músculo liso). Como visto na FIG. 9, RhoA apresenta-se localizada em um padrão vesicular, sugerindo associação com membranas intracitoplasmáticas. Além disso, a distribuição de RhoA parece variar entre estes dois tipos celulares, com maior presença perinuclear nas células mesenquimais.

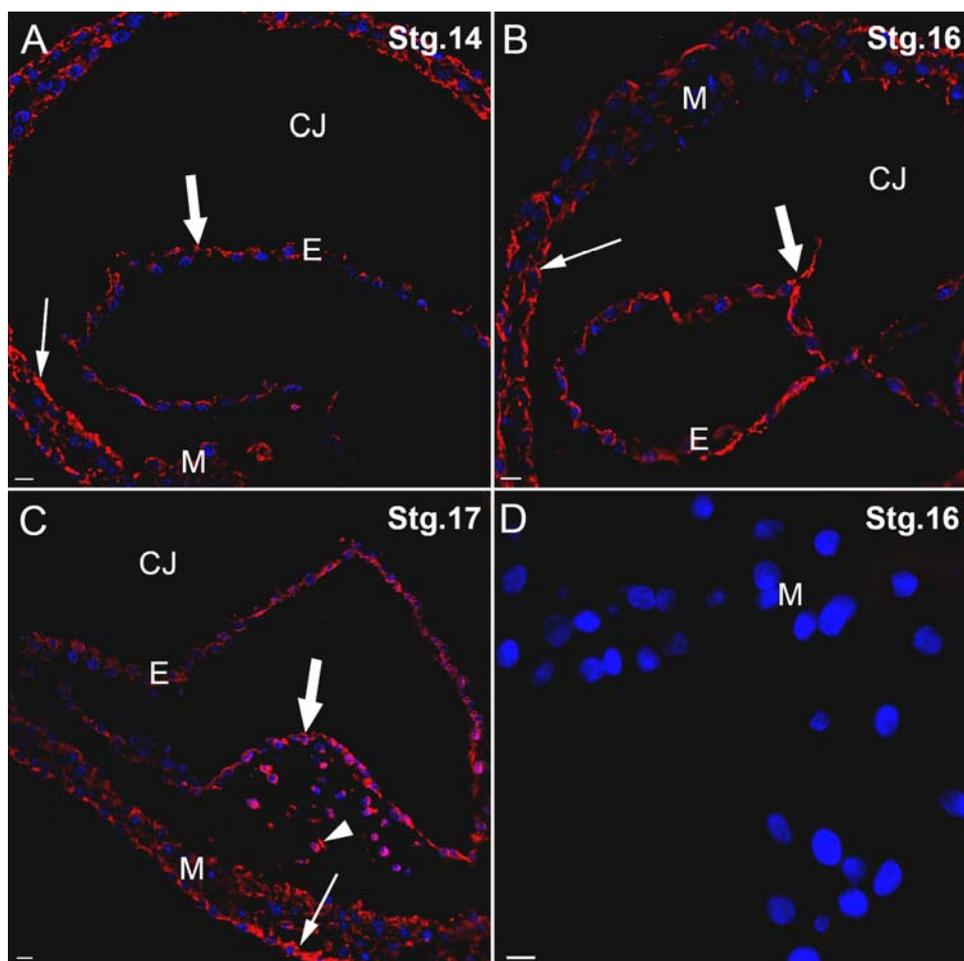


FIGURA 8 – Imunolocalização de RhoA na região do canal átrio-ventricular de embrião de galinha.

Secções da região dos coxins endocárdicos AV de embriões de galinha nos estágios 14, 16 e 17 foram marcadas por anticorpo contra RhoA (vermelho) e DAPI para núcleos (azul). **A.** No estágio 14, RhoA está presente no citoplasma de células endoteliais (seta grande) e no miocárdio (seta); **B.** No estágio 16, RhoA localiza-se ainda no miocárdio (seta) e parece apresentar marcação um pouco mais forte nas células endoteliais; **C.** Durante o estágio 17, RhoA está presente no miocárdio com presença maior na camada externa (seta). Células endoteliais continuam a apresentar RhoA (seta grande) e, neste estágio, células mesenquimais que se destacaram do endocárdio e estão migrando no interior da geléia cardíaca também possuem marcação para esta Rho-GTPase (ponta de seta); **D.** Controle – secção de estágio 16 incubada apenas com anticorpo secundário. CJ: geléia cardíaca; E: endotélio; L: lúmen; M: miocárdio. Barra: 10µm

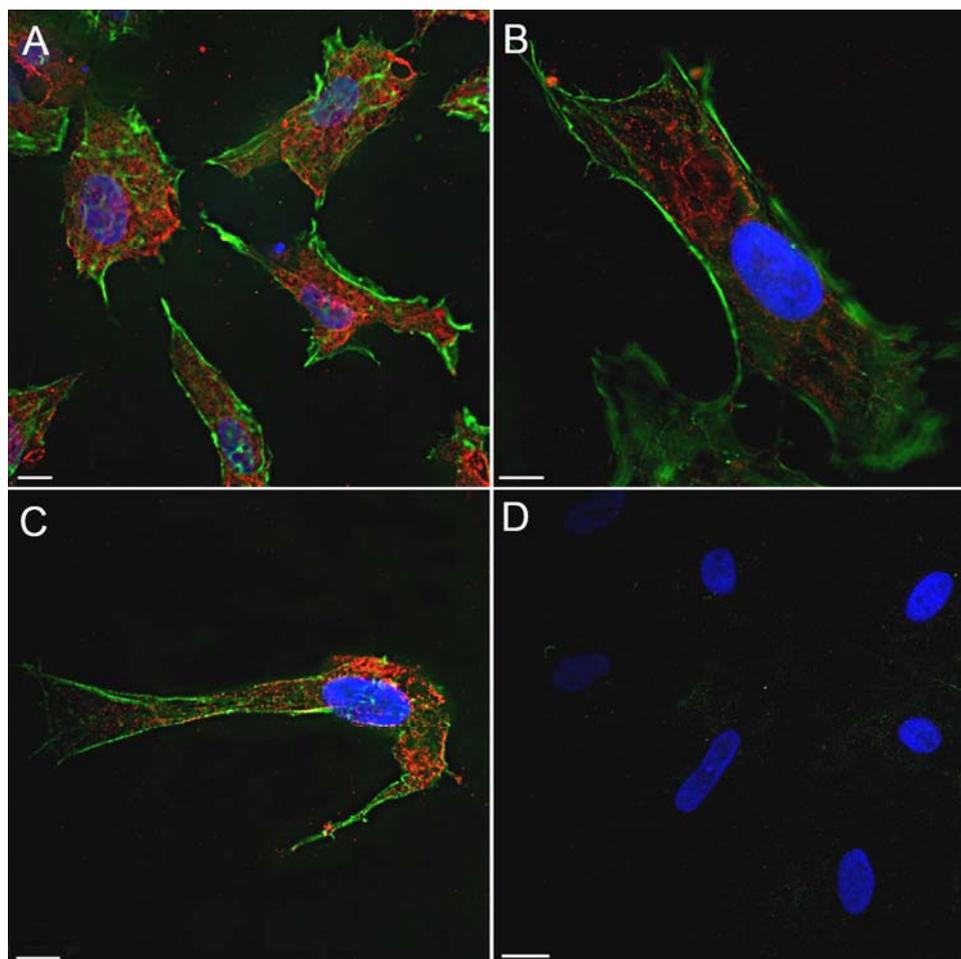


FIGURA 9 – Imunolocalização de RhoA em cultura de explantes de coxins endocárdicos em gel de colágeno.

Explantes de AVC de embriões no estágio 17 foram cultivados em gel de colágeno, fixados com PFA 4% após 24 horas de incubação e, então, marcados para RhoA. RhoA foi detectada nas células derivadas dos explantes. **A, B:** Colocalização de RhoA (vermelho), F-actina (verde) e DAPI (azul). RhoA está presente nas células endoteliais na superfície do gel e parece estar associada com membranas intracelulares, como pode ser observado pelo padrão de distribuição vesicular dentro das células, ou distribuída pelo citoplasma. **C:** Colocalização de RhoA (vermelho), actina alfa de músculo liso (verde) e DAPI (azul). Células mesenquimais também expressam RhoA. Esta GTPase parece adquirir um padrão perinuclear, com menor marcação nos prolongamentos celulares. **D:** Controle – amostra incubada apenas com anticorpo secundário e DAPI (azul). Barra: 10 μ m (A, D), 6 μ m (B, C)

ROCK-1 e ROCK-2 foram previamente localizadas e relacionadas com a EMT que ocorre na região dos coxins AV de embriões de galinha (Sakabe *et al.*, 2006). Dessa forma, nós procuramos verificar se RhoA estaria associada com estas duas quinases durante a EMT. Como mostra a FIG. 10, RhoA e ROCK-1 apresentam um alto índice de colocalização (amarelo, FIG. 10C), sugerindo associação entre estas duas proteínas. ROCK-2 também colocaliza-se com RhoA (amarelo, FIG. 11C), porém em menor grau, sugerindo também associação entre elas e ativação de ROCK-2 por RhoA. Estes resultados demonstram que RhoA continua a ser expressa em cultura como visto *in vivo* e sugere provável mudança de localização citoplasmática de RhoA entre células endoteliais ativadas e células mesenquimais migratórias. Além disso, os dados sugerem provável ativação de ROCK-1 e ROCK-2 por RhoA.

6.4. O citoesqueleto de actina sofre rearranjo estrutural durante a EMT

Em diversos modelos verifica-se rearranjo estrutural do citoesqueleto de actina durante transformações celulares fenotípicas, sendo a família de GTPases Rho classicamente relacionadas com tais mudanças (Hall, 1998). Dessa forma, buscou-se verificar a conformação estrutural tridimensional do citoesqueleto de actina nas células endoteliais ativadas na superfície do gel de colágeno e nas células mesenquimais migrando no interior do gel. Como se verifica na FIG. 12A, a actina nas células endoteliais ativadas localiza-se no cortex celular e em numerosas fibras de estresse pelo citoplasma das células. Nas células mesenquimais (FIG. 12B), verifica-se a presença da actina no córtex celular, com acúmulo em regiões na membrana plasmática, sugestivas de adesões focais e dispersa pelo citoplasma, com ausência de fibras de estresse. Estes dados mostram rearranjo estrutural do citoesqueleto de actina durante a EMT, sugerindo a ação de GTPases da família Rho em tal evento.

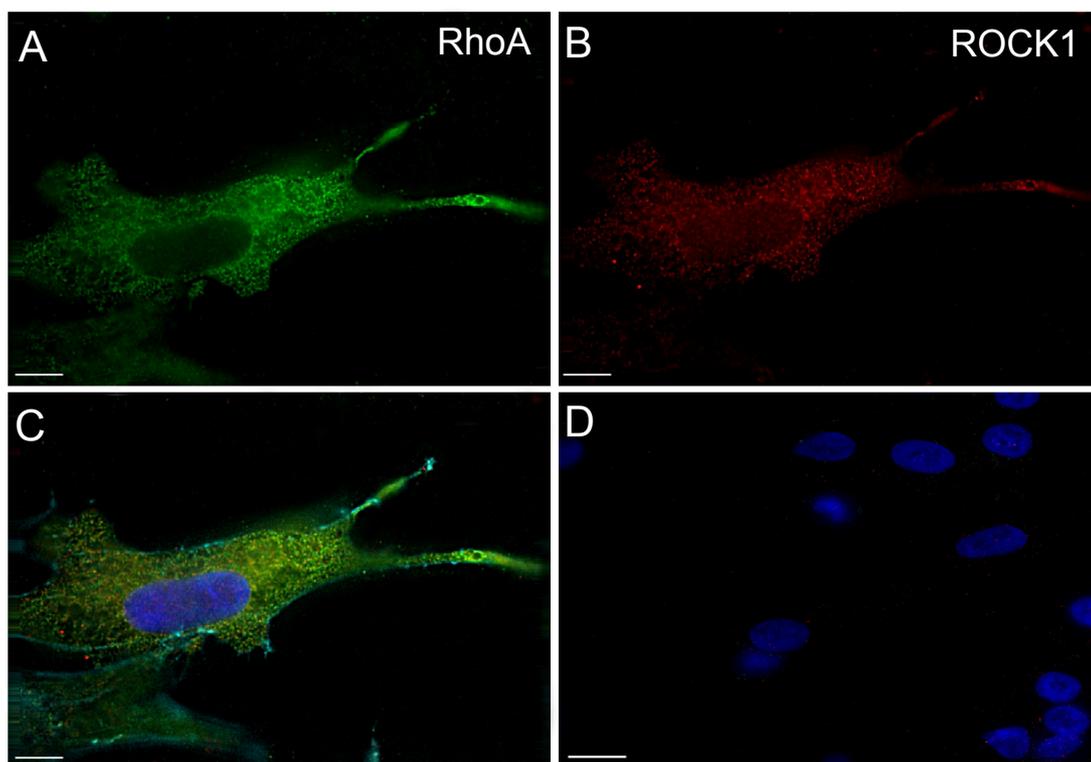


FIGURA 10 – Imunolocalização de RhoA e ROCK1 em cultura de explantes de coxins endocárdicos em gel de colágeno.

Explantes de AVC de embriões no estágio 17 foram cultivados em gel de colágeno, fixados com PFA 4% após 24 horas de incubação e, então, marcados para RhoA e ROCK1. **A:** Imunolocalização de RhoA (verde) em célula mesenquimal. **B:** Imunolocalização de ROCK1 (vermelho). Esta quinase apresenta padrão vesicular de localização (membranas intracitoplasmáticas), semelhante à RhoA. **C:** Colocalização de RhoA (verde), ROCK1 (vermelho), F-actina (ciano) e DAPI (azul). RhoA e ROCK1 mostram padrão vesicular de localização, com intensa colocalização entre as duas proteínas no corpo celular (amarelo).. **D:** Controle – amostra incubada apenas com os anticorpos secundários e DAPI (azul). Barra: 6 μ m (A-C), 10 μ m (D)

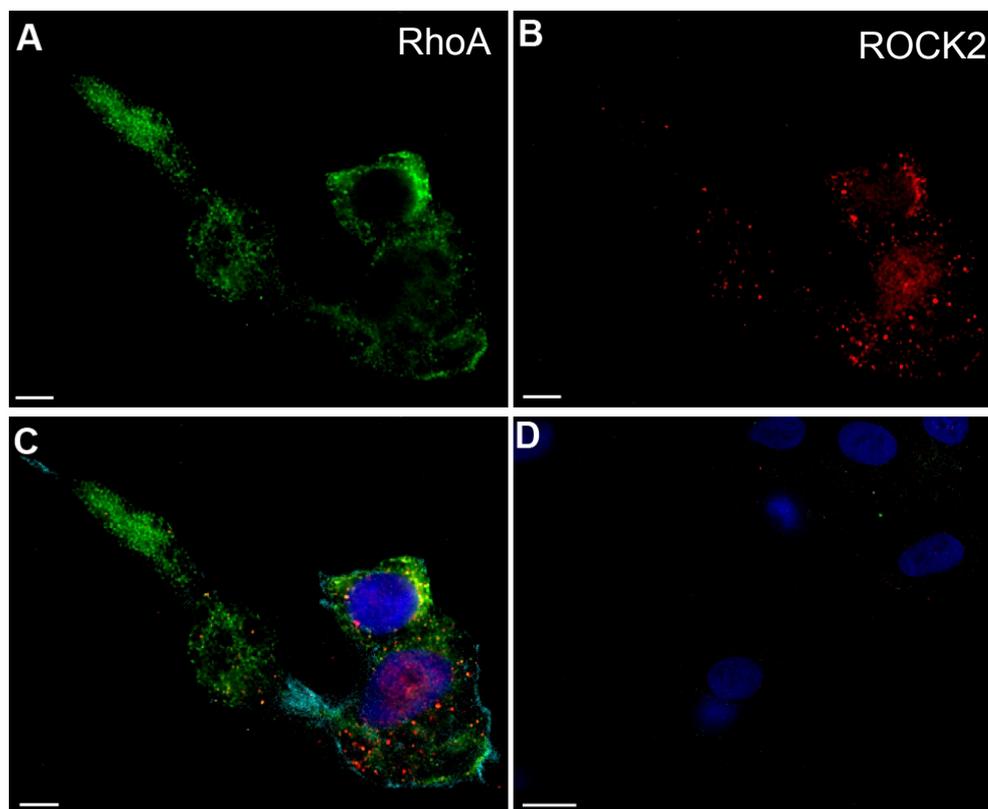


FIGURA 11 – Imunolocalização de RhoA e ROCK2 em cultura de explantes de coxins endocárdicos em gel de colágeno.

Explantes de AVC de embriões no estágio 17 foram cultivados em gel de colágeno, fixados com PFA 4% após 24 horas de incubação e, então, marcados para RhoA e ROCK2. **A:** Imunolocalização de RhoA (verde) em célula mesenquimal. **B:** Imunolocalização de ROCK2 (vermelho). Esta quinase apresenta-se dispersa pela célula, com menor presença em membranas intracitoplasmáticas. **C:** Colocalização de RhoA (verde), ROCK2 (vermelho), F-actina (ciano) e DAPI (azul). RhoA e ROCK2 mostraram colocalização (amarelo) em região perinuclear, porém menos intensa que a colocalização verificada para ROCK1. **D:** Controle – amostra incubada apenas com os anticorpos secundários e DAPI (azul). Barra: 6 μ m (A-C), 10 μ m (D)

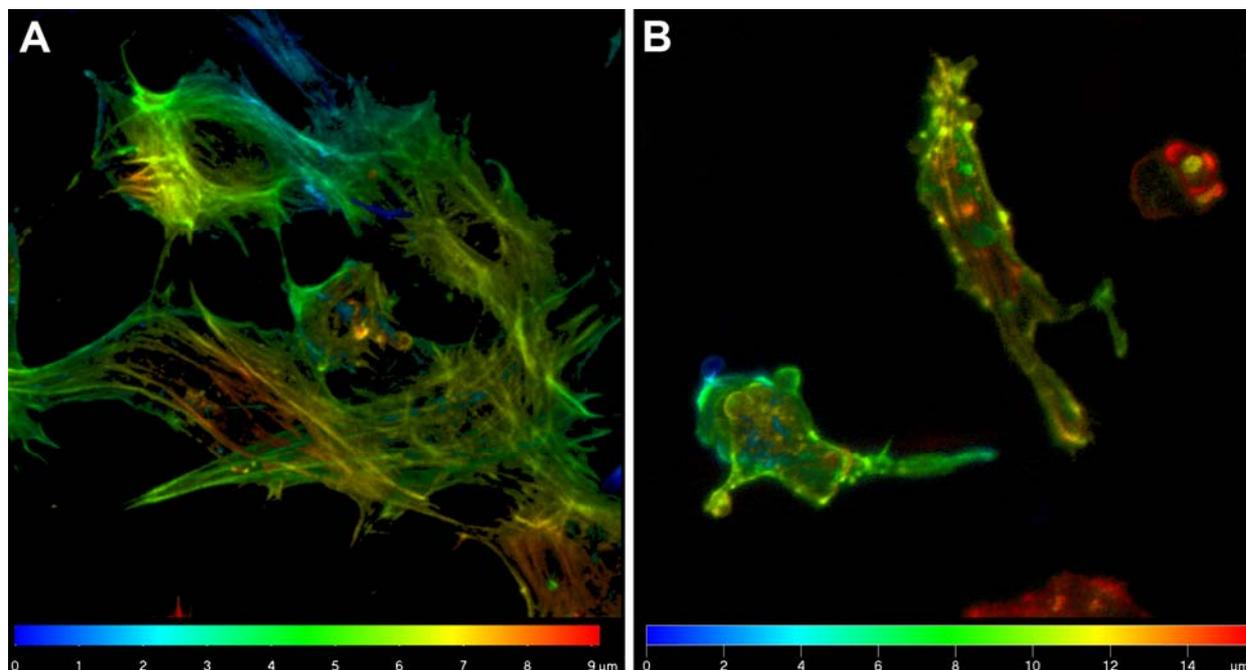


FIGURA 12 – Localização tridimensional do citoesqueleto de actina em cultura de explantes de coxins endocárdicos em gel de colágeno.

Explantes de AVC de embriões no estágio 17 foram cultivados em gel de colágeno, fixados com PFA 4% após 24 horas de incubação e, então, marcados para actina. As figuras representam a projeção bidimensional de secção tridimensional de 9 μ m (A) e de 14 μ m (B), a partir de série Z. As cores representam a profundidade das estruturas nas projeções de acordo com a legenda. **A.** Nas células endoteliais ativadas, a actina localiza-se no córtex celular e em numerosas fibras de estresse. **B.** Nas células mesenquimais no interior do gel, a actina está localizada também no córtex celular, dispersa pelo citoplasma e em prováveis adesões focais na membrana plasmática.

6.5. Inibição de Rho bloqueia invasão mesenquimal em explantes de coxins em cultura

O aumento de mensagem para RhoA no estágio 17 e a imunolocalização desta Rho-GTPase nos coxins endocárdicos AV sugerem um papel importante para RhoA no fenômeno de mudança celular que ocorre durante a EMT. A exoenzima C3 é um inibidor para a subfamília Rho (RhoA, RhoB e RhoC) e tem sido usada como uma ferramenta no estudo das funções de Rho durante vários eventos celulares (Lerm, Schmidt & Aktories, 2000). Explantes de coxins endocárdicos AV de embriões no estágio 14 foram dissecados e cultivados sobre gel de colágeno tipo 1 com ou sem C3. Após 24 horas, os géis foram fixados e observados com Hoffman Modulation Contrast Optics.

Nas culturas controle (FIG. 13A, B), um grande crescimento endotelial com muitas células ativadas foi observado na superfície do gel (medida do número de células isoladas sem célula vizinha adjacente; média de 88 células por explante; setas na FIG. 13A) e muitas células mesenquimais foram detectadas dentro do gel (média de 44 células por explante; setas na FIG. 13B). Embora nós tenhamos observado pequena diminuição no crescimento endotelial e no número de células endoteliais ativas na superfície do gel em culturas tratadas com C3 (média de 71 células por explante; setas na FIG. 13C), este decréscimo (19,3%) não foi significativo (FIG. 13E). Por outro lado, um decréscimo significativo (FIG. 13E) no número de células mesenquimais dentro da matriz do gel foi medido em culturas de explantes tratados com C3 (redução de 38,1%; média de 27 células por explante; setas na FIG. 13D). Estes dados mostram que a subfamília Rho está envolvida na EMT que ocorre na região analisada, particularmente relacionada com a invasão de células mesenquimais.

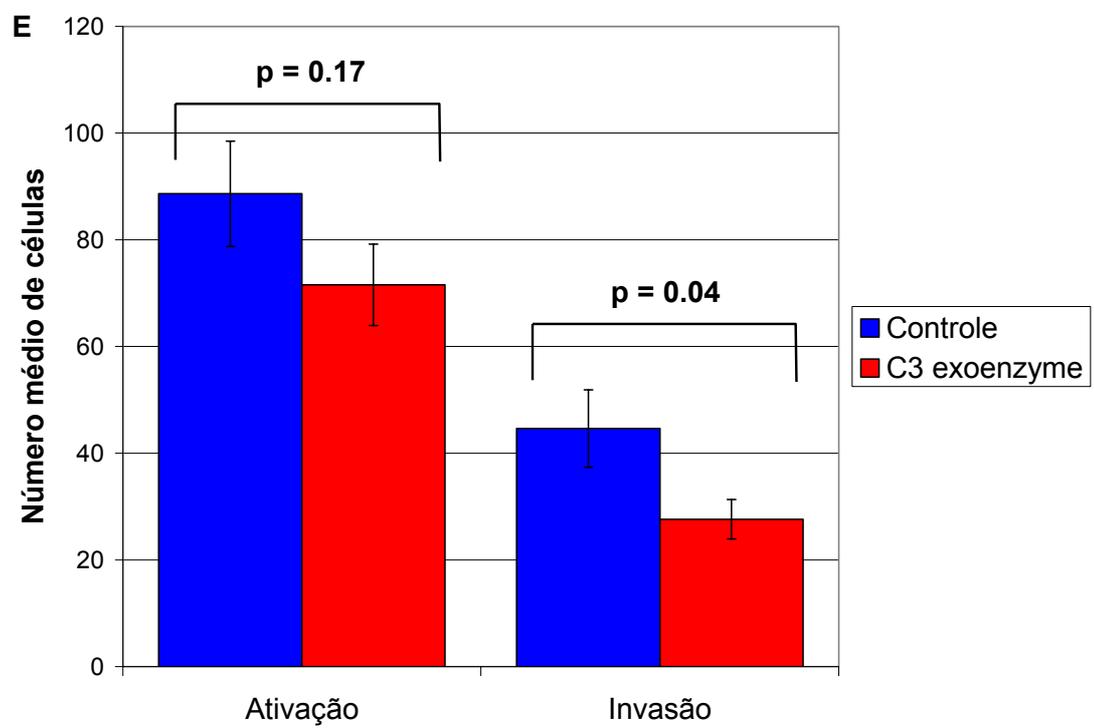
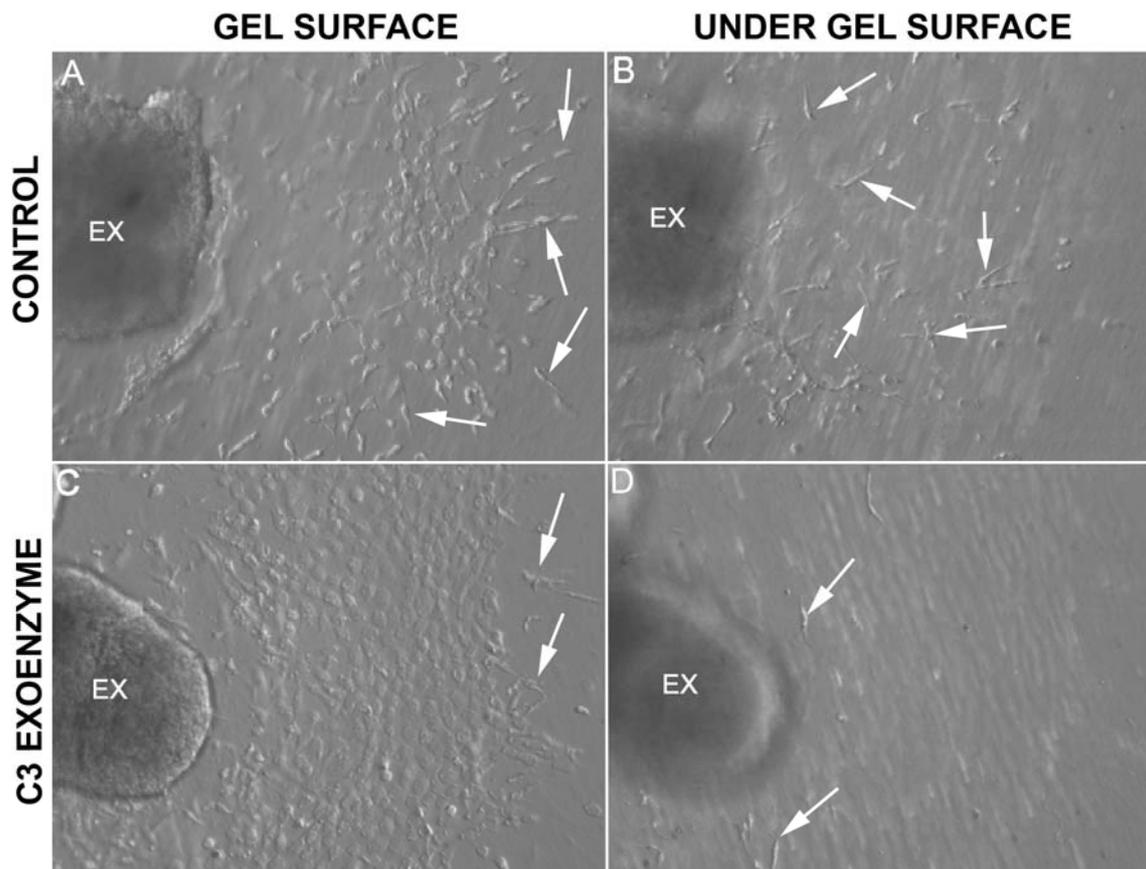


FIGURA 13 – Inibição de Rho pela exoenzima C3 bloqueia a invasão mesenquimal em explantes de coxins endocárdicos em cultura.

Explantes de AVC de embriões no estágio 14 foram cultivados em gel de colágeno na presença da exoenzima C3, inibidor da subfamília Rho (RhoA, RhoB e RhoC) e incubados por 24 horas. **A, B:** Explantes cultivados com meio completo mostraram um grande crescimento endotelial com muitas células ativadas (setas em A) na superfície do gel e muitas células mesenquimais dentro do gel (setas em B). **C, D:** Quando culturas foram tratadas com C3, uma pequena, mas estatisticamente não significativa, diminuição do crescimento endotelial e de células ativadas foi detectado (setas em C). Entretanto, uma diminuição significativa do número de células mesenquimais dentro da matriz do gel foi medida em culturas de explantes tratadas com C3 (setas em D).

EX: miocárdio do explante.

E: Análise quantitativa do número de células endoteliais ativadas e de células mesenquimais dentro do gel de colágeno com ou sem C3; n = 16 explantes para cada grupo.

6.6. Redução de RNAm para RhoA bloqueia a invasão mesenquimal em explantes de coxins em cultura

Embora seja comumente utilizada para o estudo da atividade de Rho-GTPases, a exoenzima C3 inibe inespecificamente todas as três isoformas de Rho (RhoA, RhoB e RhoC). Assim, buscando uma inibição específica de RhoA, nós empregamos de *antisense DNA* e siRNA contra RhoA. Após 24 horas de tratamento com 10nM de siRNA, nós observamos resultados similares àqueles obtidos com o uso de C3. Em explantes cultivados com seqüência controle (*scrambled*, culturas controle, FIG. 15A e 15B), nós detectamos crescimento endotelial com muitas células endoteliais ativadas (média de 43 células por explante, setas na FIG. 15A) na superfície do gel, e várias células mesenquimais dentro do gel (média de 16 células por explante, setas na FIG. 15B). Por outro lado, nas culturas tratadas com RhoA-siRNA, nós observamos redução significativa (FIG. 15E) do número de células mesenquimais no gel (média de 6 células por explante, redução de 68%, setas na FIG. 15D). O número de células endoteliais ativadas também foi significativamente reduzido (FIG. 15E), mas em menor grau (média de 28 células por explante, redução de 33%, setas na FIG. 15C). A inibição de mensagem para RhoA foi confirmada em cada experimento por qPCR (redução de 84% em relação ao controle, FIG. 16).

Culturas tratadas com *antisense DNA* mostraram resultados similares àqueles obtidos com tratamento por RhoA-siRNA (FIG. 14). Estes resultados suportam um papel para RhoA na EMT que ocorre na região dos coxins endocárdicos AV de embriões de galinha. Uma vez que houve um decréscimo maior no número de células mesenquimais do que no número de células endoteliais ativadas, RhoA parece estar mais envolvida no controle da etapa de invasão durante a EMT.

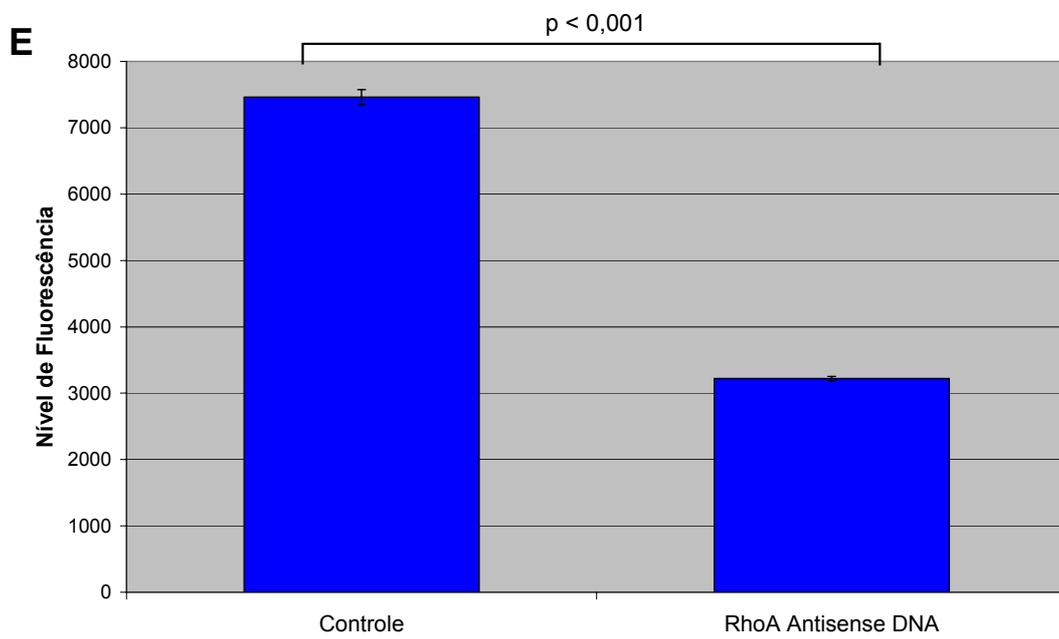
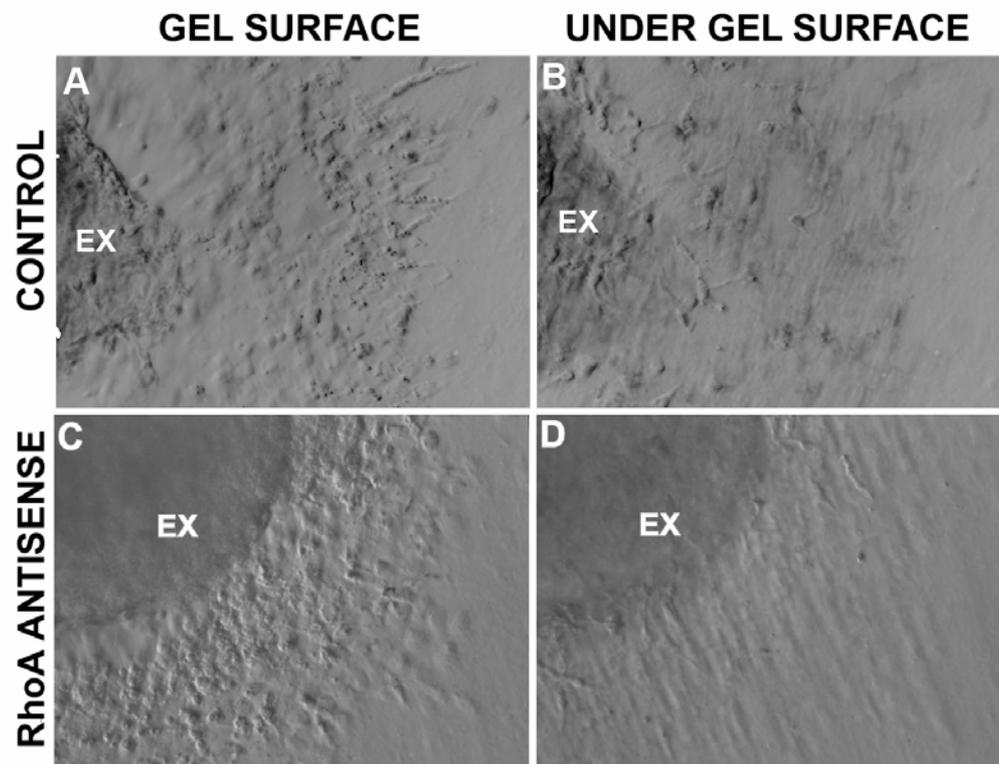


FIGURA 14 – Inibição funcional de RhoA por antisense DNA bloqueia a EMT em explantes de coxins endocárdicos em cultura.

Explantes de AVC de embriões no estágio 14 foram cultivados em gel de colágeno após transfecção com antisense DNA contra RhoA e incubados por 24 horas. **A, B:** Explantes transfectados com antisense controle (*scrambled*) mostraram crescimento endotelial e EMT normais na superfície do gel e número normal de células mesenquimais dentro do gel. **C, D:** Quando explantes foram transfectados com antisense DNA contra RhoA, observou-se bloqueio da EMT com géis mostrando camada epitelial mais compacta, com menos células ativadas, além de redução de células mesenquimais no interior dos géis.

EX: miocárdio do explante.

E: Análise quantitativa do nível de fluorescência após marcação para RhoA com anticorpo fluorescente no gel de colágeno com tratamento por RhoA-Antisense DNA ou controle. Redução de 56,8% no nível de fluorescência para o grupo tratado com relação ao controle; n = 10 explantes (5 explantes por grupo).

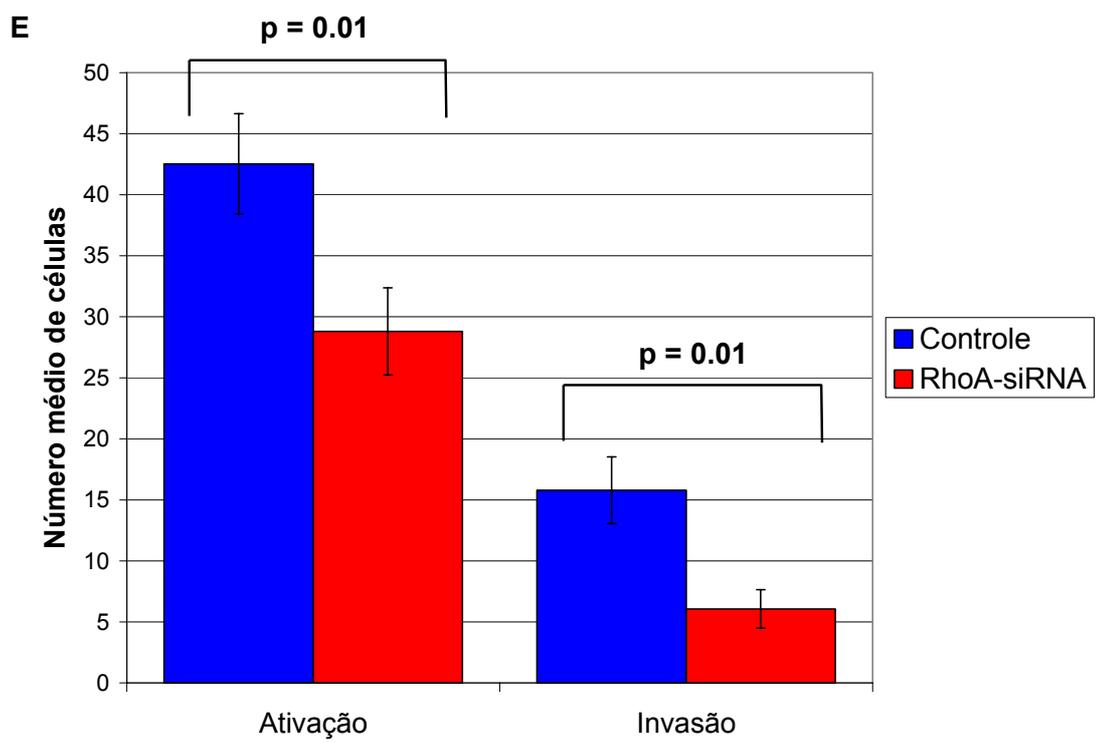
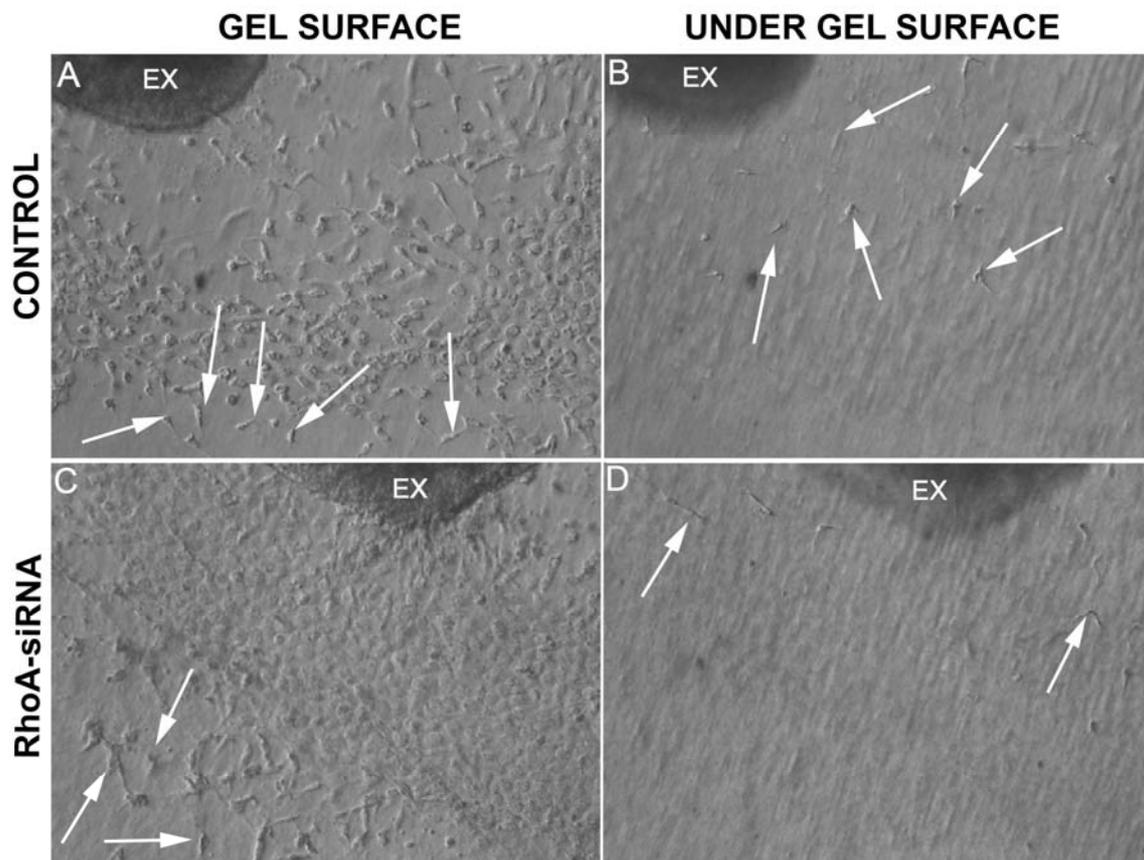


FIGURA 15 – Redução do RNAm para RhoA por siRNA bloqueia a EMT em explantes de coxins endocárdicos em cultura.

Explantes de AVC de embriões no estágio 14 foram cultivados em gel de colágeno após transfecção com RhoA-siRNA e incubados por 24 horas. **A, B:** Explantes transfectados com siRNA controle (*scrambled*) mostraram crescimento endotelial com muitas células ativadas (setas em A) na superfície do gel e um número de células mesenquimais dentro do gel (setas em B). **C, D:** Quando explantes foram transfectados com RhoA-siRNA, uma redução significativa no número de células mesenquimais foi observada (setas em D). O número de células endoteliais ativadas também foi significativamente reduzido, embora em um menor grau (setas em C).

EX: miocárdio do explante

E: Análise quantitativa do número de células endoteliais ativados e de células mesenquimais no gel de colágeno com tratamento por RhoA-siRNA ou siRNA controle; n = 15 explantes para cada grupo.

6.7. Redução de RNAm para RhoA afeta vários genes relacionados à EMT

Vários genes estão relacionados à EMT que ocorre no AVC e podem ser usados como marcadores deste processo (Gitler *et al.*, 2003; Person, Klewer & Runyan, 2005). Através de qPCR, o nível de expressão de alguns destes genes foi determinado após inibição da mensagem para RhoA por siRNA em cultura de explantes. Como mostrado na FIG. 16, o nível de RNAm para RhoA foi reduzido em 84% após tratamento com RhoA-siRNA. A perda RhoA por siRNA produz concomitante redução mensagem para RhoB (62%), ciclina beta 2 (84%) e catenina beta (75%). Já o nível de RNAm para runx-2 não foi significativamente reduzido. Estes dados relacionam RhoA à regulação de vários genes envolvidos na EMT, diretamente ou indiretamente, e reafirmam um papel para este Rho-GTPase durante o processo de EMT.

6.8. Tratamento com Anti-TGF- β 2 ou Anti-TGF- β 3 diminui o nível de mensagem para RhoA

Boyer *et al.* (1999) mostrou que TGF- β 2 e TGF- β 3 apresentam diferentes papéis durante a EMT que ocorre nos coxins endocárdicos AV de embriões de galinha. O primeiro está relacionado com a etapa de ativação enquanto o último com a etapa de invasão. Assim, nós examinamos se estas duas isoformas regulam a expressão de RNAm para RhoA. Para tal, culturas de explantes de AVC de embriões no estágio 14 e 16 foram tratadas com anticorpos neutralizantes contra TGF- β 2 e contra TGF- β 3 por 4 horas. O nível de mensagem para RhoA presente foi comparado com culturas controle através de qPCR (FIG. 17).

Nas culturas de AVC de embriões no estágio antes do início da EMT nesta região (estágio 14, FIG. 17A), a neutralização da atividade biológica de TGF- β 2 causou aumento de 234% no nível de mensagem para RhoA, enquanto a neutralização da atividade de TGF- β 3 causou aumento de 97%. Ambas as inibições mostraram-se estatisticamente significativas.

Com relação às culturas de explantes de embriões no estágio 16 (após o início da EMT, FIG. 17B), o tratamento com anti-TGF- β 2 causou redução de 96,2% no nível de RNAm para RhoA, enquanto anti-TGF- β 3 causou redução de 88,6%. Ambas as inibições mostraram-se estatisticamente significativas. Coletivamente, os dados relacionam a regulação gênica de RhoA com a sinalização por TGF- β . Além disso, pode-se inferir que a expressão de RhoA é regulada negativamente pela via de TGF- β nesta região antes do início da EMT, ocorrendo mudança na regulação de RhoA por TGF- β , que passa a ser positiva, durante as etapas de ativação e invasão.

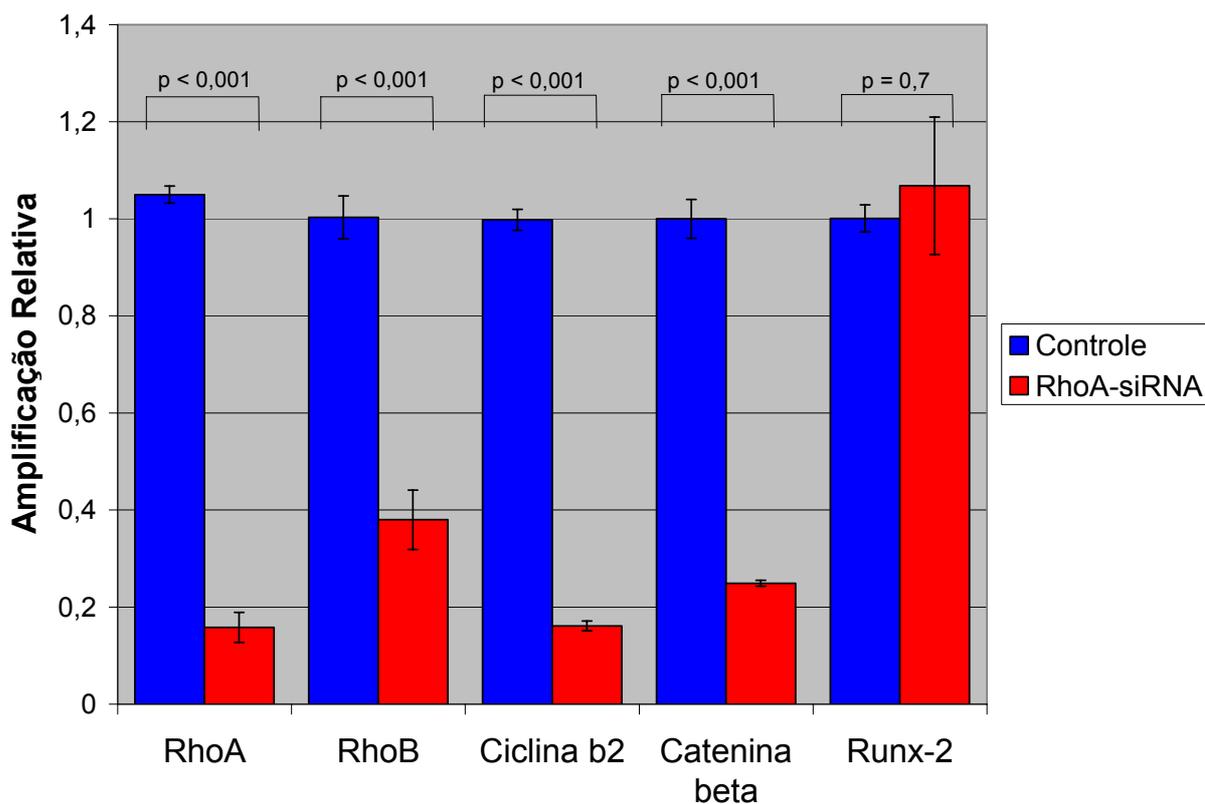


FIGURA 16 – Diminuição do nível de RNAm para RhoA afeta alguns genes relacionados à EMT.

O nível de expressão de alguns genes após inibição de RNAm para RhoA por tratamento com siRNA em explantes de embriões no estágio 14 cultivados por 24 horas foi medido por qPCR. O nível de expressão de RhoA foi reduzido em 84%. Os níveis de RhoB (62% de redução), ciclina b2 (84%) e catenina beta (75%) foram reduzidos significativamente ($p < 0,001$). Entretanto, RNAm para Runx-2 não foi significativamente reduzido ($p = 0,7$); $n = 12$.

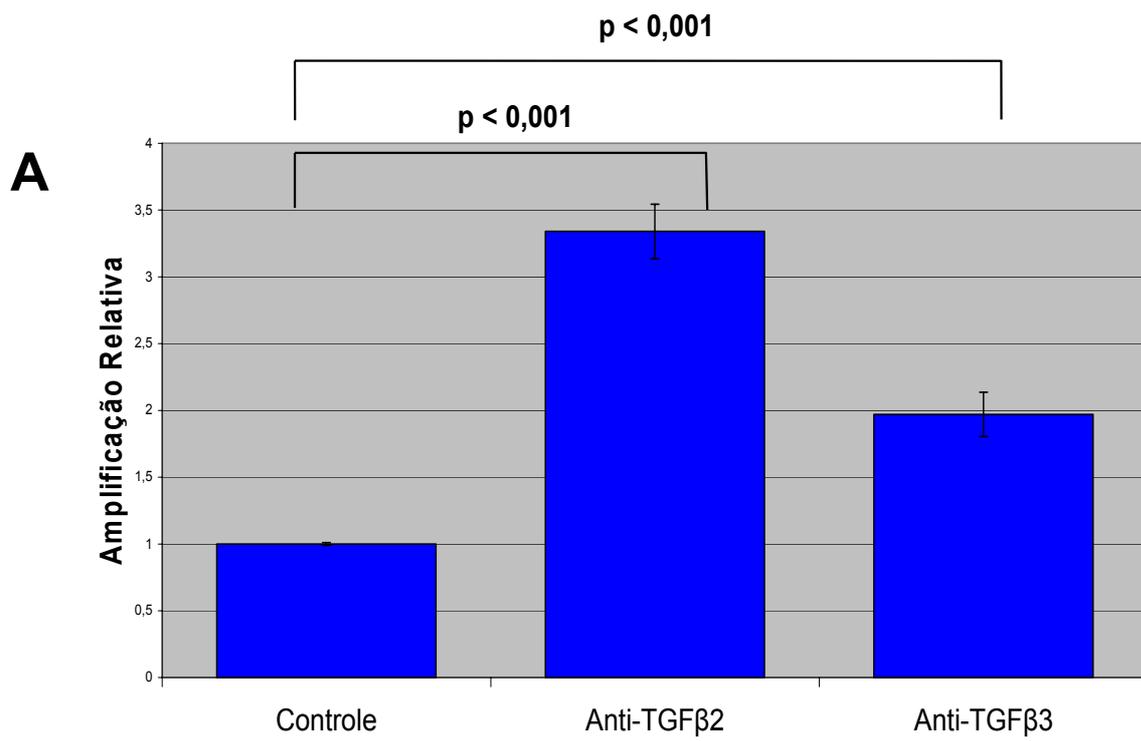
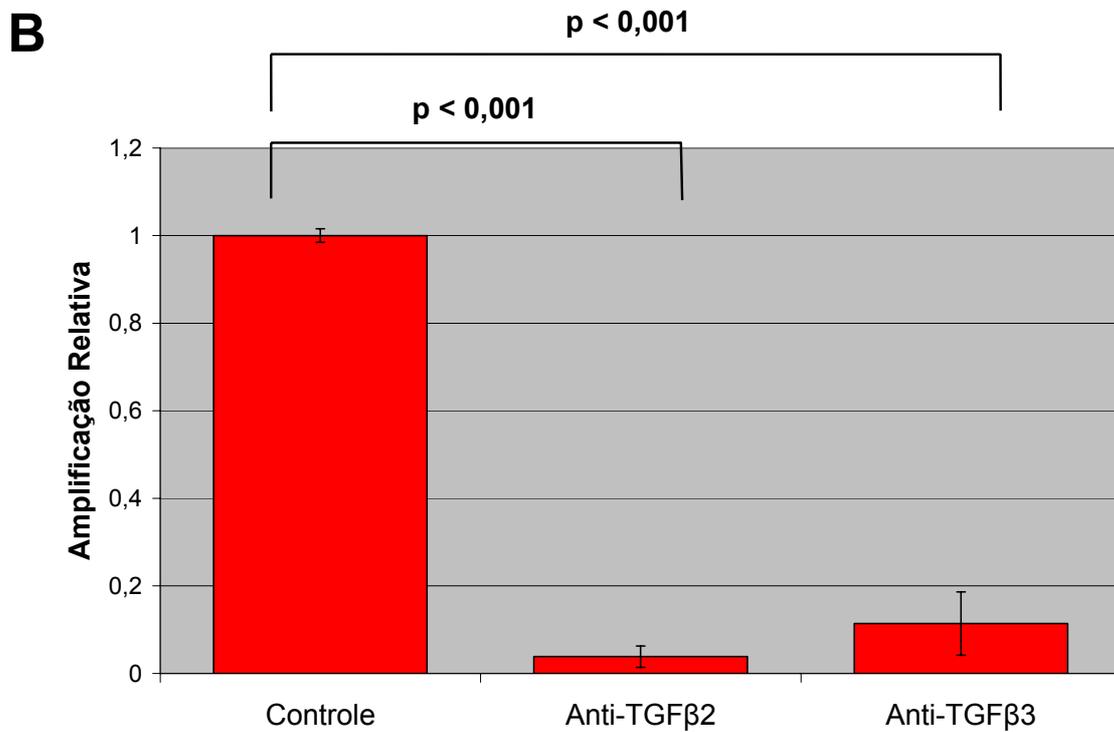
Explantes de Embriões no Estágio 14**Explantes de Embriões no Estágio 16**

FIGURA 17 – Tratamento com anticorpos contra TGF- β afeta o nível de mensagem para RhoA.

Explantes de AVC de embriões no estágio 14 (A) e 16 (B) foram cultivados em gel de colágeno na presença de anticorpos neutralizantes contra TGF- β 2 e TGF- β 3 por 4 horas. O nível de RNAm para RhoA foi comparado com culturas controle por qPCR.

A. Tratamento com ambos os anticorpos causou grande aumento nos níveis de mensagem para RhoA (anti-TGF- β 2: 234%; anti-TGF- β 3: 97%). **B.** Neutralização da atividade biológica das duas isoformas causou grande redução no nível de RNAm para RhoA (anti-TGF- β 2: 96,2%; anti-TGF- β 3: 88,6%). n = 12.

6.9. Tratamento com exoenzima C3 ou siRNA não afeta proliferação ou apoptose

Person *et al.* (2005) mostrou que a inibição por Frzb em culturas de explantes de AVC diminuiu o número de células mesenquimais devido à inibição da proliferação celular e não por efeito direto na EMT. Além disso, uma forma dominante negativa de Wnt-9a reduziu o número de células mesenquimais através do estímulo de apoptose. Para explorar se a perda de mesênquima neste estudo deveu-se a mudanças na proliferação celular ou a morte celular aumentada, ensaios de incorporação de BrdU e TUNEL foram realizados em culturas tratadas com a exoenzima C3 ou com RhoA-siRNA. A TAB. 3 mostra que não houve diferença significativa entre controles de grupos tratados para ambos os tratamentos. Estes dados apontam que mudanças no número de células mesenquimais produzidas por estes tratamentos foram devidas a efeito direto no processo de EMT.

TABELA 3 – Medidas de proliferação e apoptose *in vitro*

Tratamento	Índice de BrdU ¹	N*	p ³	Índice de Tunel ²	N*	p ³
Controle	27.97	421		3.15	557	
Exoenzima C3	31.83	406	0.395	2.64	448	0.745
siRNA controle	28.80	395		3.15	405	
RhoA siRNA	32.45	396	0.703	2.92	448	0.896

* Número total de células contadas por tratamento em um total de 6 explantes;

1. Porcentagem de núcleos positivos para BrdU (Número de células positivas/N);

2. Porcentagem de DNA marcado com FITC-12-dUTP (Número de células marcadas/N);

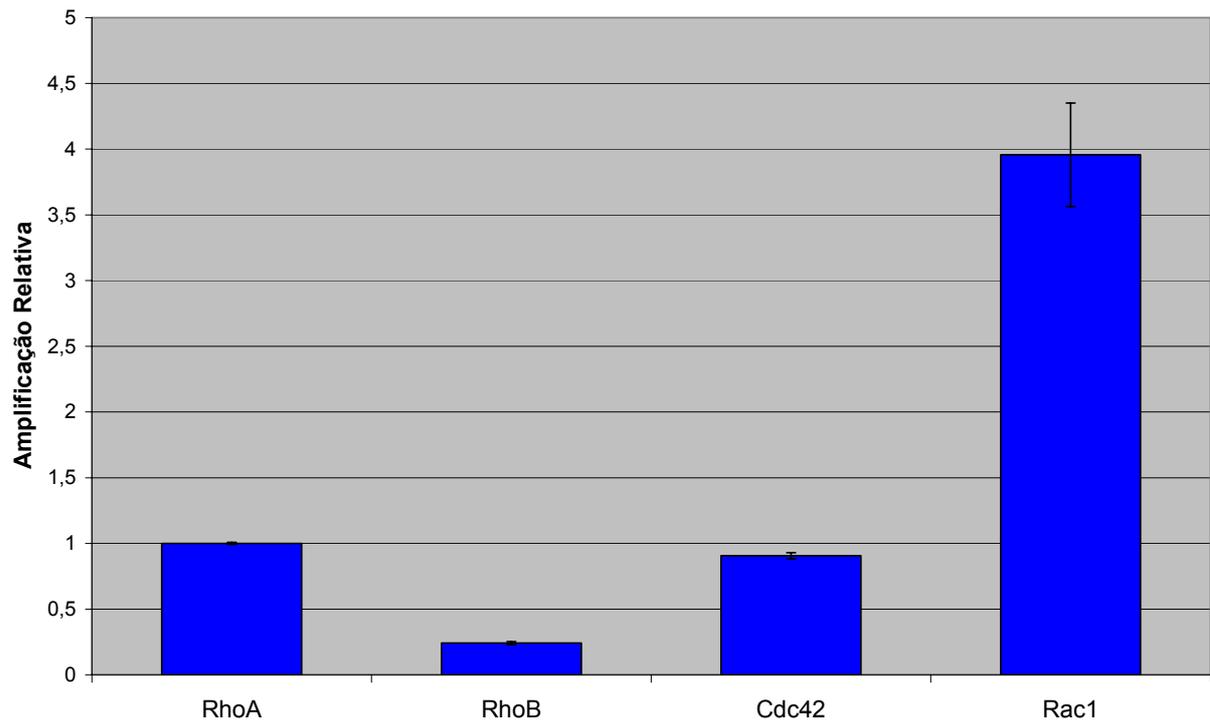
3. Valor de p (teste *t* de Student).

6.10. Comparação entre os níveis de RNAm para RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1 em segmentos de AVC de embriões no estágio 17 e em células derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV

Além da análise de RhoA, outras Rho-GTPses foram analisadas por qPCR em segmentos de AVC de embriões no estágio 17, período de EMT ativa. Como pode ser visto na FIG. 18A, RhoA e Cdc42 mantiveram aproximadamente o mesmo nível de expressão, enquanto RhoB apresentou um nível 4 vezes inferior de expressão. Rac1 por sua vez apresentou um nível de expressão que é 4 vezes maior que o nível de expressão de RhoA. Os níveis de expressão estão indicados em relação ao nível de RhoA (quantificação relativa).

Os níveis de expressão de RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1 também foram analisados em explantes de coxins endocárdicos AV de embriões no estágio 16. Após 4 horas de cultura, os explantes atingem temporalmente o estágio 17. Como pode ser observado na FIG. 18B, o padrão de expressão manteve-se similar ao observado na FIG. 18A, porém com variação no nível de expressão das Rho-GTPases. RhoB apresentou o menor nível de expressão (aproximadamente 21 vezes menor), enquanto Rac1 apresentou o maior nível (aproximadamente 2 vezes maior). O nível de expressão de Cdc42 manteve-se próximo ao nível de expressão de RhoA. Os níveis de expressão estão indicados em relação ao nível de RhoA (quantificação relativa). Coletivamente, os resultados mostram a expressão de RhoA, RhoB, Rac1 e Cdc42 em sítios de EMT ativa do coração embrionário de galinha e indicam semelhança no padrão de expressão das mesmas entre os ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Canais Átrio-Ventriculares

A

Explantos de Coxins Endocárdicos AV

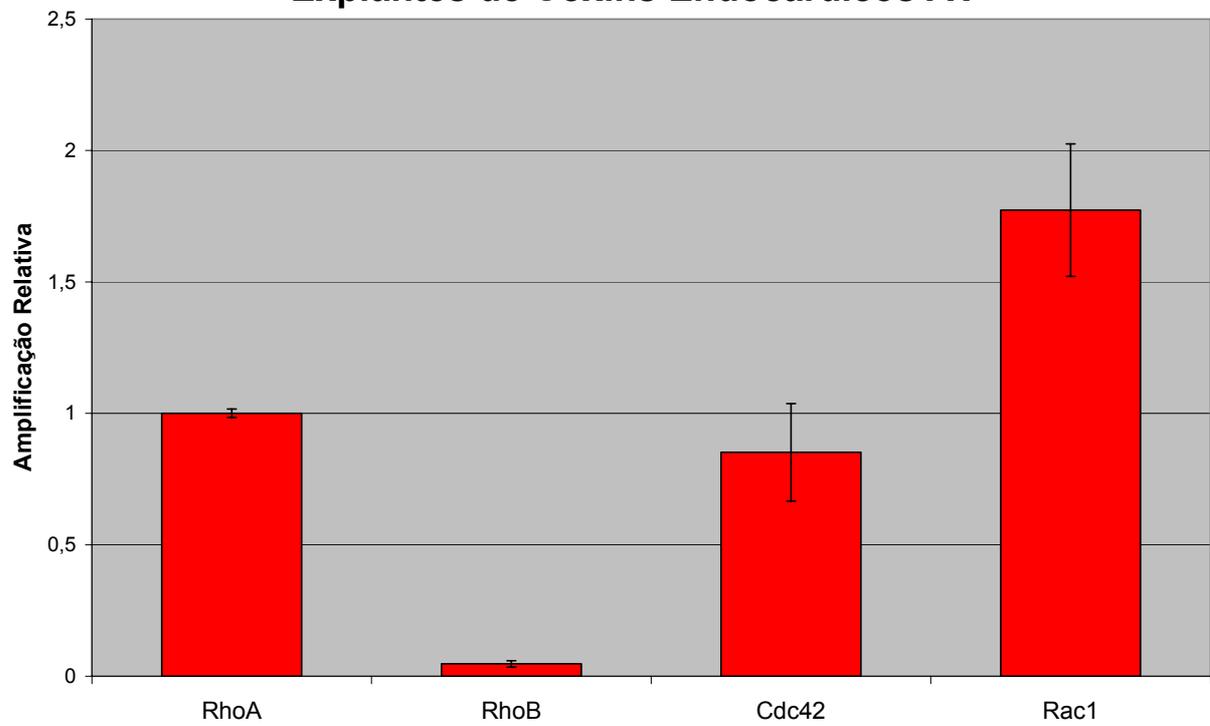
B

FIGURA 18 – Medida do nível de RNAm para RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1 em segmentos de canais átrio-ventriculares de embriões de galinha no estágio 17 e em células derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV de embriões de galinha no estágio 16 por PCR em tempo real quantitativo.

O nível de expressão de RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1 em segmentos de AVC no estágio 17 (A) e em explantes de embriões no estágio 16 cultivados por 4 horas (B) foi medido por qPCR. O eixo Y mostra mudanças relativas a RhoA. **A.** O nível de RhoB apresentou-se aproximadamente 4 vezes menor que o nível para RhoA. Cdc42 apresentou expressão similar ao nível de expressão para RhoA. Rac1, por sua vez, apresentou um nível de expressão aproximadamente 4 vezes maior. **B.** Observa-se padrão de expressão das Rho-GTPases similar àquele obtido em segmentos de AVC, embora em escala diferente – RhoB apresentou nível 21 vezes menor, enquanto Rac1 apresentou nível aproximadamente 2 vezes maior. As medidas foram normalizadas pela medida de cDNA total em cada reação pelo uso de fluorômetro. Os dados mostram média de duas réplicas com um total de seis medidas para cada estágio.

6.11. Cdc42 é expressa nas células derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV

A localização de Cdc42 foi investigada em células endoteliais e mesenquimais derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV em cultura. Esta Rho-GTPase está presente nas células endoteliais na superfície do gel (FIG. 19A e 19B), bem como nas células mesenquimais que estavam migrando dentro do gel (FIG. 19C). Cdc42 também se apresenta em um padrão vesicular, sugerindo associação com membranas intracitoplasmáticas. Os dados mostram que Cdc42 continua a ser expressa em cultura como visto *in vivo* (Tavares & Kitten, 2004), não sugerindo mudança de localização citoplasmática de Cdc42 entre células endoteliais ativadas e células mesenquimais migratórias.

6.12. Rac1 é expressa nas células derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV

Rac1 também foi detectada nas células endoteliais e mesenquimais derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV em cultura. A FIG. 20A mostra que as células endoteliais na superfície do gel próximas ao explante apresentam um baixo nível de Rac1. Entretanto, as células endoteliais ativadas periféricas passam a expressá-la em maior quantidade (FIG 20B). Esta expressão diminui quando as células mesenquimais estão migrando no interior do gel (FIG. 20C). O padrão vesicular de localização é repetido, embora se note um padrão pontilhado de localização, sugerindo presença maior deste GTPase não associada a membranas intracitoplasmáticas. Os dados apontam que Rac1 está presente em cultura como visto *in vivo* (Tavares & Kitten, 2004), sugerindo expressão desta GTPase quando as células endoteliais iniciam o processo de transformação e invasão.

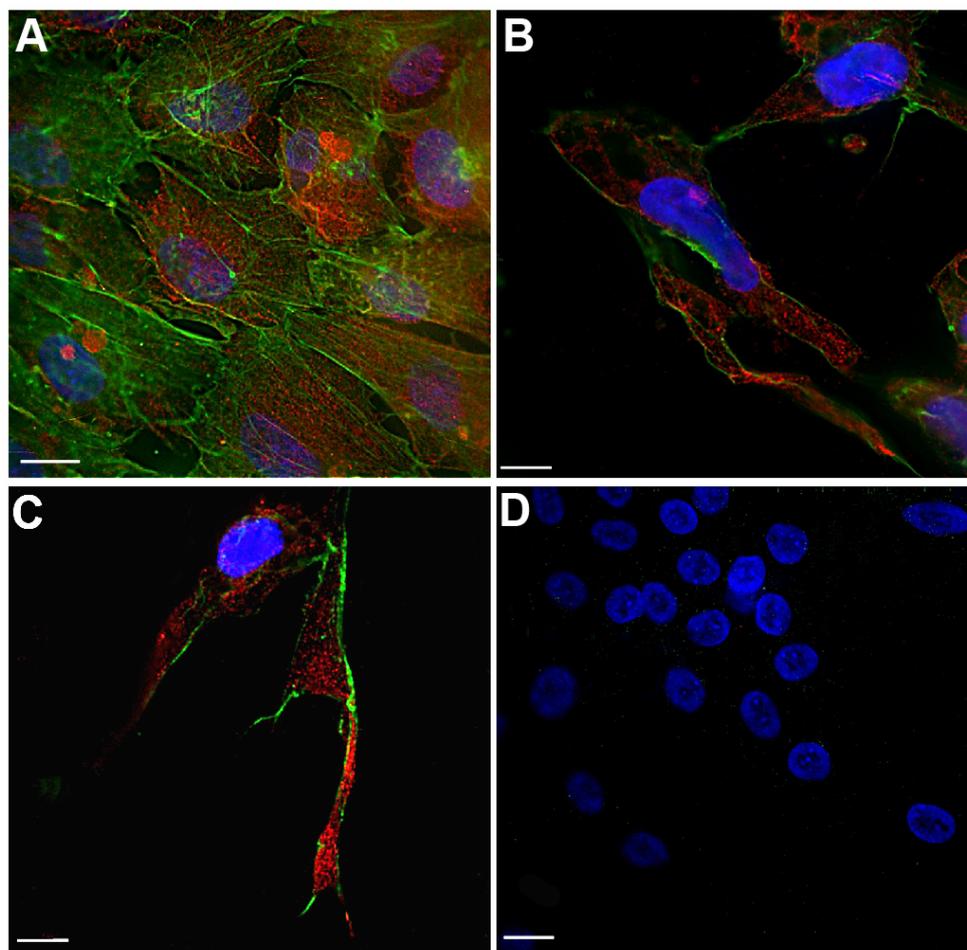


FIGURA 19 – Imunolocalização de Cdc42 em cultura de explantes de coxins endocárdicos em gel de colágeno.

Explantes de AVC de embriões no estágio 17 foram cultivados em gel de colágeno, fixados com PFA 4% após 24 horas de incubação e, então, marcados para Cdc42. Cdc42 foi detectada nas células derivadas dos explantes. **A, B:** Colocalização de Cdc42 (vermelho), F-actina (verde) e DAPI (azul). Cdc42 mostra-se localizada nas células endoteliais na superfície do gel distribuída pelo citoplasma e em um padrão vesicular, sugerindo associação com membranas intracelulares. **C:** Colocalização de Cdc42 (vermelho), actina alfa de músculo liso (verde) e DAPI (azul). Cdc42 também está presente nas células mesenquimais em padrão semelhante ao observado em células endoteliais ativadas. **D:** Controle – amostra incubada apenas com anticorpo secundário e DAPI (azul). Barra: 10 μ m (A, D), 6 μ m (B, C)

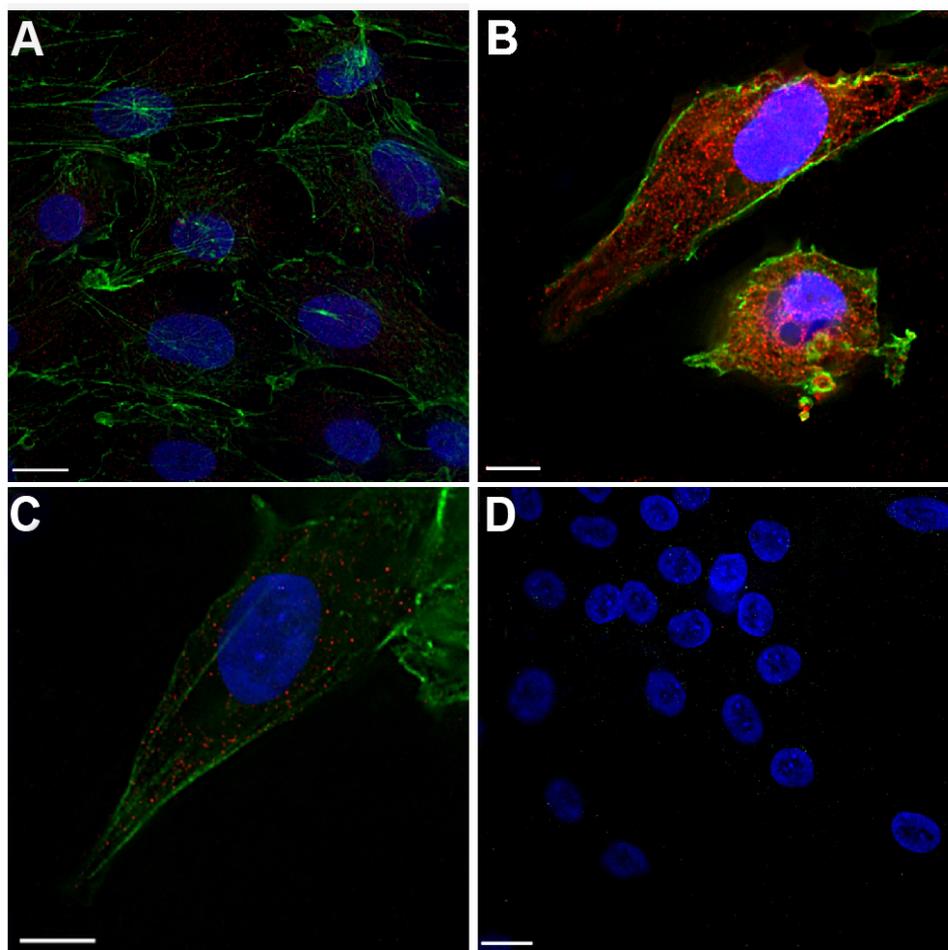


FIGURA 20 – Imunolocalização de Rac1 em cultura de explantes de coxins endocárdicos em gel de colágeno.

Explantes de AVC de embriões no estágio 17 foram cultivados em gel de colágeno, fixados com PFA 4% após 24 horas de incubação e, então, marcados para Rac1. Rac1 foi detectada nas células derivadas dos explantes. **A, B:** Colocalização de Rac1 (vermelho), F-actina (verde) e DAPI (azul). Células endoteliais na superfície do gel próximas ao explante apresentam baixo nível de expressão de Rac1 em um padrão disperso pelo citoplasma (A). Entretanto, células endoteliais ativadas periféricas passam a expressar Rac1 em maior quantidade (B). **C:** Colocalização de Rac1 (vermelho), actina alfa de músculo liso (verde) e DAPI (azul). Células mesenquimais também apresentam um baixo nível de Rac1. **D:** Controle – amostra incubada apenas com anticorpo secundário e DAPI (azul). Barra: 10 μ m (A, D), 6 μ m (B, C)

7. DISCUSSÃO

7.1. *RhoA é expressa no canal átrio-ventricular do coração de galinha*

A formação das células mesenquimais nos coxins endocárdicos AV através de EMT ocorre durante os estágios 15 a 19 de HH no coração embrionário (Runyan & Markwald, 1983). No intervalo entre os estágios 13 a 17, um estímulo indutivo complexo é produzido pelo miocárdio e secretado na matriz extracelular dos coxins endocárdicos (Krug, Runyan & Markwald, 1985; Krug, Mjaatvedt & Markwald, 1987; Mjaatvedt, Lepera & Markwald, 1987). No estágio 16, células endoteliais do AVC são ativadas em resposta a estes estímulos, sofrendo hipertrofia, separação e extensão de filopódios na matriz extracelular subjacente (Markwald *et al.*, 1978; Kinsella & Fitzharris, 1980; Mjaatvedt & Markwald, 1989). Estas respostas celulares correspondem ao processo de ativação observado *in vitro* no ensaio de gel de colágeno (Boyer *et al.*, 1999). No estágio 17, inicia-se a invasão celular e muitas células mesenquimais podem ser observadas dentro da geléia cardíaca (Markwald *et al.*, 1977, 1984).

Células sofrendo EMT passam por diversas alterações de expressão gênica e fenotípica, como alteração do citoesqueleto e morfologia celular (Shook & Keller, 2003; Lee *et al.*, 2006). As células endoteliais que foram ativadas por sinais oriundos do miocárdio apresentam inúmeras fibras de estresse pelo citoplasma, enquanto as células mesenquimais migrando dentro de um gel de colágeno não apresentam ou apresentam poucas fibras de estresse, com a maior parte da actina dispersa pelo citoplasma e concentrada em possíveis adesões focais na membrana plasmática. Esta mudança estrutural do citoesqueleto de actina sugere participação ativa de GTPases da família Rho, como por exemplo RhoA, que está intimamente relacionada com a formação de fibras de estresse (Hall, 1998).

RhoA está localizada na região dos coxins endocárdicos AV do coração embrionário de galinha durante os estágios analisados (14 a 17). Embora esta Rho-GTPase estivesse presente na camada de células endoteliais antes do início da EMT, pode ser observado aumento na intensidade da marcação concomitante com a ativação. Marcação elevada de RhoA é mantida nas células mesenquimais invasivas observadas nas amostras de tecido. Rho-GTPases possuem um papel importante durante o desenvolvimento cardíaco de camundongo (Wei *et al.*, 2002) e galinha (Kaarbo *et al.*, 2003). Rho-GTPases também estão envolvidas com outros eventos durante a embriogênese em galinha como formação das células da crista neural a partir do dorso do tubo neural (Liu & Jessell, 1998) e das células precursoras da vasculatura coronária e fibroblastos cardíacos a partir do mesotélio epicárdico (Dokic & Dettman, 2006). Além disso, ROCK-1 e -2, efetores *downstream* de RhoA, estão presentes, funcionais (Sakabe *et al.*, 2006) e colocalizam-se com RhoA em sítios de EMT no coração de galinha.

Nós também medimos o nível de expressão de RNAm para RhoA na região dos coxins endocárdicos AV durante o desenvolvimento. Quando comparado ao nível de expressão encontrado em segmentos de AVC no estágio 14, foi observada um pequeno aumento no nível de mensagem para RhoA imediatamente antes do início da EMT. Entretanto, logo após, quando EMT pode ser observada morfológicamente e células mesenquimais estão presentes na geléia cardíaca, um nível de expressão muito maior de RhoA foi detectado. Dessa forma, estes achados sugerem que RhoA possui expressão e localização indicativas de papel importante para esta Rho-GTPase durante a EMT que ocorre para formação do tecido dos coxins endocárdicos AV de embriões de galinha.

7.2. RhoA é necessária para EMT normal na região dos coxins endocárdicos AV

A exoenzima C3 significativamente diminuiu o número de células mesenquimais invadindo a matriz extracelular em um ensaio *in vitro*. Este inibidor tem sido extensivamente utilizado para o estudo de Rho-GTPases em vários eventos celulares (Lerm, Schmidt & Aktories, 2000). Por exemplo, Liu & Jessell (1998) demonstraram um papel para RhoB durante a formação das células da crista neural usando a exoenzima C3. Entretanto, esta toxina bloqueia a ação de toda a subfamília Rho (RhoA, RhoB e RhoC). Uma vez que RhoB também está presente na região dos coxins endocárdicos AV (Tavares & Kitten, 2004), o decréscimo na invasão após o tratamento com C3 pode ser devido à inibição desta isoforma. Apesar disto, este resultado aponta que a subfamília Rho atua durante a EMT nesta região, especialmente na etapa de invasão.

Antisense DNAs têm sido extensivamente usados para a específica manipulação de expressão gênica (Runyan *et al.*, 1999). Entretanto, nós recentemente iniciamos o uso de siRNAs para o bloqueio de determinados genes. Apesar de mais lentos na ação, siRNAs parecem ser mais estáveis e eficientes no decréscimo do nível de RNAm. Ambos RhoA *antisense* e RhoA-siRNA perturbaram a EMT. Devido à demonstração mais efetiva da perda de RNAm por siRNA, nós optamos pelo uso destes inibidores. O tratamento com siRNA resultou em diminuição significativa no número de células mesenquimais, confirmando o efeito da exoenzima C3.

RhoA regula uma variedade de atividades celulares, como reorganização do citoesqueleto, migração celular, adesão celular e regulação gênica (Hall, 1998; Ridley, 2001). A EMT no AVC é uma transição fenotípica, ocorrendo em várias etapas,

na qual todas as células nesta região são ativadas por sinais oriundos do miocárdio, mas apenas uma porção das células endoteliais invade a matriz. Ativação é caracterizada por mudança na morfologia celular, perda de contatos celulares, polarização do Golgi, fluxo intracelular de cálcio, extensão de filopódios e expressão de marcadores como actina alfa de músculo liso (Krug, Runyan & Markwald, 1985; Runyan *et al.*, 1990; Boyer *et al.*, 1999). Apenas 7 a 10% da população de células endoteliais ativadas parecem invadir a geléia cardíaca, mas, com a exceção da expressão tardia de colágeno I (Sinning, Lepera & Markwald, 1988), não há marcador específico para células mesenquimais invasivas.

ROCK, um efetor *downstream* de RhoA, já foi descrito na região dos coxins endocárdicos e relacionado à etapa de invasão da EMT (Zhao & Rivkees, 2004; Sakabe *et al.*, 2006). Neste estudo, a inibição de mensagem para RhoA resultou em maior inibição da invasão do que da ativação. Isto aponta que RhoA está mediando as mudanças celulares, como reorganização do citoesqueleto, migração e talvez expressão de genes relacionados à EMT, durante a invasão das células mesenquimais no gel de colágeno. Esta observação mostra que, embora estas células não apresentem as estruturas classicamente relacionadas com a ação de RhoA, ou seja, as fibras de estresse, esta Rho-GTPase apresenta papel importante durante a invasão das células mesenquimais, atuando em outros aspectos do citoesqueleto de actina e expressão gênica.

A menor, porém significativa, redução na etapa de ativação endotelial pelo RhoA-siRNA indica que a atividade de RhoA também é necessária para algumas das mudanças fenotípicas observadas nesta etapa, como por exemplo a formação das inúmeras fibras de estresse presentes no citoplasma destas células. Nossa medida de ativação é essencialmente uma medida da separação de células endoteliais na superfície do gel de colágeno e inclui tanto reorganização da morfologia celular como

um elemento de migração. A medida é obtida contando-se células isoladas na superfície do gel. O presente trabalho mostra que a exoenzima C3 bloqueou apenas a invasão, mas não teve efeito significativo na ativação. A diferença entre o tratamento com RhoA-siRNA e exoenzima C3 pode ser explicada por mecanismos de inibição e especificidade de casa ensaio. A exoenzima C3 modifica os membros da família Rho incluindo ADP-ribose na Asn41, bloqueando a sinalização mediada por Rho (Lerm, Schmidt & Aktories, 2000). Por sua vez, o RhoA-siRNA foi desenhado para bloquear especificamente a mensagem para RhoA.

Baseado nos nossos achados, fica claro que RhoA não é exclusivamente usada para a EMT. Esta Rho-GTPase está presente pelo miocárdio e endotélio que não sofre EMT. Papéis de RhoA durante o desenvolvimento cardíaco incluem a fusão do tubo cardíaco (Kaarbo *et al.*, 2003) e trabeculação do miocárdio (Wei *et al.*, 2002). Com relação à EMT, é possível que a exoenzima C3 e siRNA estejam agindo nos cardiomiócitos inibindo a síntese e liberação de sinais indutivos, perturbando, assim, a EMT. Nós acreditamos que isto não seja provável, uma vez que as células endoteliais e mesenquimais apresentam um aumento na expressão de RhoA durante a EMT, além da expressão de RhoA parecer mudar dos cardiomiócitos endocárdicos (produtores de geléia cardíaca) para os cardiomiócitos epicárdicos. A sensibilidade de RhoA pelas isoformas de TGF- β , parte dos sinais indutivos da EMT, também sugere que endotélio e mesênquima são os alvos primários neste ensaio.

Trabalhos prévios no laboratório do Dr. Runyan relacionaram a atividade de isoformas específicas de TGF- β com as etapas da EMT (Boyer *et al.*, 1999). TGF- β 2 regula a separação inicial das células endoteliais enquanto TGF- β 3 está envolvida com as mudanças de morfologia celular necessárias à migração das células dentro da matriz extracelular. A atividade de receptores diferentes e específicos para TGF- β parece correlacionar-se com estas respostas (Boyer & Runyan, 2001). A relação entre

RhoA e EMT vista neste trabalho sugere que TGF- β possa ser um regulador da expressão desta Rho-GTPase. Bhowmick *et al.* (2001) mostraram que TGF- β 1 regula a EMT através de mecanismo dependente de RhoA em determinados tipos celulares. Além disso, Mukai *et al.* (2006) mostraram que TGF- β 1 aumenta o nível de expressão e protéico de RhoC em células MM1. Após o bloqueio das atividades biológicas de TGF- β 2 e TGF- β 3 por anticorpos neutralizantes, foi detectado aumento nos níveis de RNAm para RhoA em ambos os tratamentos em estágio anterior ao início da EMT (estágio 14 de HH). Isto aponta efeito repressor de TGF- β . Entretanto, o mesmo tratamento em estágio posterior ao início da EMT (estágio 16 de HH) reduziu os níveis de RNAm para RhoA, apontando, agora, um efeito estimulante da expressão desta GTPase. Em adição, estes dados sugerem que ambos TGF- β 1 e TGF- β 2 afetam a expressão de RhoA. Estudos preliminares com *microarray* sugerem que aproximadamente 25% dos genes responsivos à TGF- β em segmentos de AVC em galinha respondem a ambas isoformas, mas a maioria dos genes responde à apenas uma isoforma (Runyan, dados não publicados). A resposta a ambas isoformas pode ser devida à via de sinalização regulatória comum ou porque, como visto nos dados de siRNA, RhoA está envolvida em ambas as etapas de ativação e invasão. A mudança de resposta ao estímulo por TGF- β é, por sua vez, plausível e está de acordo com o fato de que a expressão de diversas moléculas sofre alteração no seu padrão de expressão e sensibilidade a estímulos durante os estágios de desenvolvimento.

Nós também verificamos a relação adicional entre RhoA e outros genes ligados à EMT. Perda de RNAm para RhoA diminuiu o nível de expressão de RhoB, catenina beta e ciclina b2. Isto suporta a idéia de que RhoA possa estar agindo no citoesqueleto, adesão celular e proliferação celular. Embora os dados não distingam entre uma ação direta ou indireta, uma vez que não se pode excluir uma alteração na

expressão gênica devido à falha geral na EMT após perda de RhoA, eles reforçam a hipótese de que RhoA está agindo na EMT.

Como mencionado anteriormente, RhoA possui várias funções além do controle do citoesqueleto de actina, como regulação gênica e controle do ciclo celular (Takai, Sasaki & Matozaki, 2001). Assim, o efeito observado na redução do número de células mesenquimais e endoteliais ativadas poderia ser devido a efeito de RhoA na proliferação celular ou aumento no nível de apoptose, ao invés de efeito nas vias de sinalização para EMT. Entretanto, os resultados de incorporação por BrdU e TUNEL demonstraram que os tratamentos pela exoenzima C3 e siRNA não afetaram nenhum destes dois aspectos, indicando efeito na EMT.

Dessa forma, os ensaios de perda de função da subfamília Rho pela exoenzima C3, de diminuição do nível protéico por *antisense* DNA e de mensagem por siRNA estabelecem RhoA como mediador para a EMT que ocorre nesta região. Além disso, os dados colocam RhoA como parte da via de sinalização por TGF- β , em ambas as etapas de ativação e proliferação. A interação provável de RhoA com ROCK como efetor *downstream*, e isoformas de TGF- β como reguladores *upstream*, começa a identificar uma via de sinalização para pelo menos alguns aspectos da EMT em coxins endocárdicos AV de embriões de galinha.

7.3. Cdc42 e Rac1 são expressas no canal átrio-ventricular do coração de galinha

Tavares & Kitten (2004) mostraram que Rac1, Cdc42 e RhoB estavam presentes em sítios de EMT *in vivo*. Nós continuamos também o estudo destas GTPases, localizando Cdc42 e Rac1 *in vitro*. Ambas GTPases foram localizadas nas células derivadas dos explantes, embora Rac1 apresentou-se reduzida nas células

mesenquimais. Durante a EMT, as células sofrem diversas mudanças estruturais, várias delas relacionadas com a ação de membros da família Rho. Como sugerido por Liu & Jessell (1998), Rac1 e Cdc42 devem atuar nas etapas de migração e invasão das células que sofreram EMT. Como Rac1 e Cdc42 também estão presentes no endocárdio (Tavares & Kitten, 2004), sugere-se que a ação dessas GTPases deve estar relacionada aos movimentos que as células dessa camada de tecido endotelial simples devem realizar durante a EMT. Além disso, as duas Rho-GTPases podem estar atuando no fechamento dos espaços deixados pelas células que abandonam a camada endotelial simples e adotam fenótipo migratório. Isso está de acordo com Rosenblatt, Raff & Cramer (2001), que verificaram que Rho-GTPases são importantes na formação do anel contrátil para reparação de feridas em camadas epiteliais simples.

Além disso, o nível de mensagem para estas GTPases foi estudado em segmentos e culturas de AVC. O padrão de expressão entre RhoA, RhoB, Cdc42 e Rac1 foi observado, sem preocupação com uma comparação quantitativa absoluta, pois embora as eficiências de amplificação dos primers sejam semelhantes, há certa diferença. O padrão de expressão mostrou-se similar tanto *in vivo* quanto *in vitro*, embora em escala diferente. Isto nos faz concluir que o ensaio de cultura em gel de colágeno conseguiu mimetizar o microambiente necessário à EMT nos coxins endocárdicos, pelo menos com relação à expressão de Rho-GTPases. RhoB apresentou o menor nível de expressão, muito inferior ao nível de RhoA. Isto sugere que esta Rho-GTPase possua um papel específico e restrito durante os eventos celulares que ocorrem na região estudada a semelhança do que ocorre durante a formação das células da crista neural (Liu & Jessell, 1998). Cdc42, por sua vez, apresentou um nível relevante de expressão, mostrando que esta GTPase deva possuir papel importante durante a EMT. Finalmente, Rac1 mostrou o maior nível de mensagem. Entretanto, como mostrado por imunofluorescência, esta GTPase

apresentou nível reduzido de proteína no AVC. Embora isto possa parecer discrepante, sabe-se que o nível de RNAm não está diretamente ligado ao nível de proteína, como ocorre com o receptor para transferrina (Theil, 1990). Desta forma, embora estas GTPases estejam presentes na região dos coxins endocárdicos de embriões de galinha, um estudo funcional a semelhança do realizado para RhoA faz-se necessário para clarificar o papel de cada uma destas Rho-GTPases durante a EMT que ocorre nesta região.

Muitos dos resultados obtidos durante a realização deste projeto foram publicados em junho de 2006 (anexo):

Tavares AL, Mercado-Pimentel ME, Runyan RB, Kitten GT.
TGFbeta-mediated RhoA expression is necessary for epithelial-mesenchymal transition in the embryonic chick heart.
Dev Dyn. 2006 Jun;235(6):1589-98.

8. CONCLUSÕES

No presente trabalho estudou-se o papel de Rho-GTPases, em especial RhoA, na formação do tecido dos coxins endocárdicos AV durante a morfogênese cardíaca. As principais conclusões deste estudo foram:

- RhoA está presente na região dos coxins endocárdicos AV de embriões de galinha em todos os estágios analisados e em todos os tipos celulares (células endoteliais, células mesenquimais e cardiomiócitos);
- O nível de expressão de RhoA aumenta consideravelmente durante o período de realização da EMT como verificado por qPCR em segmentos de AVC;
- RhoA continua a ser expressa nas células endoteliais e mesenquimais originadas a partir de coxins endocárdicos AV de embriões de galinha em cultura e, desta forma, permite o estudo de suas funções como descrito neste trabalho;
- A inibição da subfamília Rho pela exoenzima C3 causou diminuição significativa no número de células mesenquimais invadindo o gel de colágeno;
- A inibição de mensagem para RhoA por siRNA causou diminuição significativa em ambos os números de células endoteliais ativadas e de células mesenquimais invadindo o gel de colágeno;
- O bloqueio da ação biológica de TGF- β 2 e TGF- β 3 resultou em aumento no nível de expressão de RNAm para RhoA antes do início da EMT e diminuição do mesmo após o início da EMT;
- A diminuição no nível de mensagem para RhoA resultou em bloqueio significativo parcial da expressão de RhoB, catenina beta e ciclina b2;

- O bloqueio de Rho por C3 e de RhoA por siRNA não resultou em diminuição significativa na proliferação celular ou aumento da apoptose das células mesenquimais originadas a partir das células endoteliais do AVC;
- O citoesqueleto de actina sofre rearranjo estrutural durante a EMT, com presença de fibras de estressa nas células endoteliais ativadas;
- RNAm para RhoB, Rac1 e Cdc42 foi detectado em sítios de EMT por qPCR, mostrando diferentes níveis de expressão;
- Cdc42 e Rac1 também estão presentes nas células derivadas de explantes de coxins endocárdicos AV.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO, A.; PICK, E.; HALL, A.; TOTTY, N.; TEAHAN, C.G.; SEGAL, A.W. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature*, v.353, n.6345, p.668-70, 1991.
- ALBERTS, B. *et al.* *Molecular biology of the cell*. 4.ed. New York: Garland Science, 2002. 1463p.
- ALBLAS, J.; ULFMAN, L.; HORDIJK, P.; KOENDERMAN, L. Activation of RhoA and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes. *Mol. Bio. Cell*, v.12, p.2137-2145, jul.2001.
- AMANO, M.; FUKATA, Y.; KAIBUCHI, K. Regulation and functions of rho-associated kinase. *Experimental Cell Research* 261, p. 44-51, 2000.
- BEQAJ, S.; JAKKARAJU, S.; MATTINGLY, R.R.; PAN, D.; SCHUGER, L. High RhoA activity maintains the undifferentiated mesenchymal cell phenotype, whereas RhoA down-regulation by laminin-2 induces smooth muscle myogenesis. *J. Cell Bio.*, v.156, n.5, mar.2002, p.893-903.
- BERNANKE, D.H., MARKWALD, R.R. Migratory behavior of cardiac cushion tissue cells in a collagen-lattice culture system. *Developmental Biology* 91, 235-45, 1982.
- BHOWMICK, N.A.; GHIASSI, M.; AAKRE, M.; BROWN, K., SINGH, V.; MOSES, H.L. TGF-beta-induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.26, n.100, p.15290-1, 2003.
- BHOWMICK, N.A.; GHIASSI, M.; BAKIN, A.; AAKRE, M.; LUNDQUIST, C.A.; ENGEL, M.E.; ARTEAGA, C.L.; MOSES, H.L. Transforming growth factor-beta 1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, v.12, p.27-36, 2001.
- BOURNE, H.R., SANDERS, D.A., McCORMICK, F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, v.349, n.6395, p.117-26, 1991.
- BOYER, A.S.; AYERINSKAS, I.I.; VINCENT, E.B.; McKINNEY, L.; WEEKS D.L.; RUNYAN, R.B. Complementary activities of TGFβ2 and 3 in epithelial mesenchymal transformation in the embryonic heart. *Developmental Biology*, v.208, p.500-520, 1999.
- BOYER, A.S.; RUNYAN, R.B. TGF beta type III and TGF beta type II receptors have distinct activities during epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Developmental Dynamics*, v.221, p.454-459, 2001.
- BRAGA, V. Epithelial cell shape: cadherins and small GTPases. *Experimental Cell Research*, v.261, p.83-90, 2000.
- BURT, D.W. Evolutionary grouping of the transforming growth factor-beta superfamily. *Biochem Biophys Res Commun.*, v.184, p.590-5, 1992.
- BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.25, p.69-193, 2000.
- BUSTIN, S.A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.29, p.23-39, 2002.

CAMENISCH, T.D.; MOLIN, D.G.M.; PERSON, A.; RUNYAN, R.B.; DE GROOT, A.C.G.; McDONALD, J.A.; KLEWER, S.E. Temporal and distinct TGF β ligand requirements during mouse and avian endocardial cushion morphogenesis. *Developmental Biology*, v.248, p.170-181, 2002.

CHEN, S.; CRAWFORD, M.; DAY, R.M.; BRIONES, V.R.; LEADER, J.E.; JOSE, P.A.; LECHLEIDER, R.J. RhoA modulates Smad signaling during transforming growth factor-induced smooth muscle differentiation. *J. Biol. Chem.*, v.281, p.1765-70, 2006.

CHESNUTT, C.; NISWANDER, L. Plasmid-based short-hairpin RNA interference in the chicken embryo. *Genesis*, v.39, p.73-78, 2004.

DEL BARRIO, M.G.; NIETO, M.A. Overexpression of Snail family members highlights their ability to promote chick neural crest formation. *Development*, v.129, p.1583-93, 2002.

DERYNCK, R; ZHANG, Y. E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature*, v.425, p.577-584, 2003.

DOKIC, D.; DETTMAN, R.W. VCAM-1 inhibits TGF β stimulated epithelial-mesenchymal transformation by modulating Rho activity and stabilizing intercellular adhesion in epicardial mesothelial cells. *Developmental Biology*, v.299, n.2, p.489-504, 2006.

ELSDALE, T., BARD, J. Collagen substrata for studies on cell behavior. *J Cell Biol.* 54, 626-37, 1972.

FRAME, M.C.; BRUNTON, V.G. Advances in Rho-dependent actin regulation and oncogenic transformation. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v.12, p.36-43, 2002.

GAMPEL, A.; PARKER, P.J.; MELLOR, H. Regulation of epidermal growth factor receptor traffic by the small GTPase RhoB. *Current Biology*, v.9, p.955-8, 1999.

GEIGER, B.; BERSHADSKY, A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Current Opinion in Cell Biology*, v.13, p.584-592, 2001.

GITLER, A.D.; LU, M.M.; JIANG, Y.Q.; EPSTEIN, J.A.; GRUBER, P.J. Molecular markers of cardiac endocardial cushion development. *Developmental Dynamics*, v.228, p.643-650, 2003.

GROSHEVA, I.; SHTUTMAN, M.; ELBAUM, M.; BERSHADSKY, A.D. P120 catenin affects cell motility via modulation of activity of Rho-family GTPases: a link between cell-cell contact formation and regulation of cell locomotion. *J. Cell Sci.*, v.114, p.695-707, 2000.

HALL, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, v.279, p.509-514, 1998.

HALL, A. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochemical Society Transactions*, v.33, p.891-95, 2005.

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

HENDERSON, D.J.; YBOT-GONZALEZ, D.; COPP, A.J. RhoB is expressed in migrating neural crest and endocardial cushions of the developing mouse embryo. *Mechanisms of Development* 95, p.211-14, 2000.

JAFFE, A.B.; HALL, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v.21, p.247-69, 2005.

- JAHNER, D.; HUNTER, T. The ras-related gene rhoB is an immediate-early gene inducible by v-Fps, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in rat fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, v.11, n.7, p.3682-90, 1991.
- KAARBO, M.; CRANE, D.I.; MURRELL, W.G. RhoA is highly up-regulated in the process of early heart development of the chick and important for normal embryogenesis. *Developmental Dynamics*, v.227, p.35-47, 2003.
- KAARTINEN, V.; HAATAJA, L.; NAGY, A.; HEISTERKAMP, N.; GROFFEN, J. TGF β 3-induced activation of RhoA/Rho-kinase pathway is necessary but not sufficient for epithelio-mesenchymal transdifferentiation: implications for palatogenesis. *International Journal of Molecular Medicine*, v.9, p.563-70, 2002.
- KINSELLA, M.; FITZHARRIS, T. Origin of cushion tissue in the developing chick heart: cinematographic recordings of in situ formation. *Science*, v.207, p.1359-1360, 1980.
- KOZMA, R.; AHMED, S.; BEST, A.; LIM, L. The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, v.15, n.4, p.1942-52, 1995.
- KRUG, E.L.; MJAATVEDT, C.H.; MARKWALD, R.R. Extracellular matrix from embryonic myocardium elicits an early morphogenetic event in cardiac endothelial differentiation. *Developmental Biology*, v.2, n.120, p.348-355, 1987.
- KRUG, E.L.; RUNYAN, R.B.; MARKWALD, R.R. Protein extracts from early embryonic hearts initiate cardiac endothelial cytodifferentiation. *Developmental Biology*, v.2, n.112, p.414-426, 1985.
- LEE, J.M.; DEDHAR, S.; KALLURI, R. THOMPSON, E.W. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of Cell Biology*, v.172, n.7, p.973–981, 2006.
- LERM, M.; SCHMIDT, G.; AKTORIES, K. Bacterial protein toxins targeting Rho-GTPases. *FEMS Microbiology Letters*, v.188, p.1-6, 2000.
- LIU, J.P.; JESSELL, T.M. A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development*, v.125, p.5055-5067, 1998.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, v.25, p.402–408, 2001.
- LODISH, H. *et al. Molecular cell biology*. 4.ed. New York: W.H. Freeman and company, 1999. 1084p.
- MARKWALD, R.R.; FITZHARRIS, T.; BANK, H.; BERNANKE, D.H. Structural analysis on the matrical organization of glycosaminoglycans in developing endocardial cushions. *Developmental Biology*, v.2, n.62, p.292-316, 1978.
- MARKWALD, R.R.; FITZHARRIS, T.P.; MANASEK, F.J. Structural Development of Endocardial Cushions. *American Journal Of Anatomy*, v.148, p.85-119, 1977.
- MARKWALD, R.R.; RUNYAN, R.B.; KITTEN, G.T.; FUNDERBURG, F.M.; BERNANKE, D.H.; BRAUER, P.R. Use of collagen gel cultures to study heart development: proteoglycan and glycoprotein interactions during formation of endocardial cushion tissue, 1984. In: TRELSTAD, R.L, editor. *The Role of Extracellular Matrix in Development*. New York: Alan R. Liss, Inc. p.323-350.
- MASSAGUÉ, J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol.*, v.6, p.597-641, 1990.

MASSZI, A., DI CIANO, C., SIROKMANY, G.B., ARTHUR, W.T., ROTSTEIN O.D., WANG, J., MC CULLOCH, C.A.G., ROSIVALL, L., MUCSI, I., KAPUSI, A. Central role for Rho in TGF-induced-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, v.284, p.911-24, 2003.

MICHAELSON, D.; SILLETTI, J.; MURPHY, G.; D'EUSTACHIO, P.; RUSH, M.; PHILIPS, M.R. Differential localization of Rho GTPases in live cells: regulation by hypervariable regions and RhoGDI binding. *J. Cell Bio.*, v.152, n.1, p.111-126, jan.2001.

MJAATVEDT, C.H.; LEPERA, R.C.; MARKWALD, R.R. Myocardial specificity for initiating endothelial-mesenchymal cell transition in embryonic chick heart correlates with a particulate distribution of fibronectin. *Developmental Biology*, v.119, p.59-67, 1987.

MJAATVEDT, C.H.; MARKWALD, R.R. Induction of an epithelial-mesenchymal transition by an in vivo adheron-like complex. *Developmental Biology*, v.136, p.118-128, 1989.

MUKAI, M.; ENDO, H.; IWASAKI, T.; TATSUTA, M.; TOGAWA, A.; NAKAMURA, H.; INOUE, M. RhoC is essential for TGF- β 1-induced invasive capacity of rat ascites hepatoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.346, p.74–82, 2006.

NAKAJIMA, Y.; YAMAGISHI, T.; HOKARI, S.; NAKAMURA, H. Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: roles of transforming growth factor (TGF)- β and bone morphogenetic protein (BMP). *The Anatomical Record*, v.258, p.119-27, 2000.

NOBES, C.D.; HALL, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, v.81, n.1, p.53-62, 1995.

PEKARIK, V.; BOURIKAS, D.; MIGLINO, N.; JOSET, P.; PREISWERK, S.; STOECKLI, E.T. Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation. *Nature Biotechnology*, v.21, p.93-96, 2003.

PERSON, A.D.; GARRIOCK, R.J.; KRIEG, P.A.; RUNYAN, R.B.; KLEWER, S.E. Frzb modulates Wnt-9a-mediated beta-catenin signaling during avian atrioventricular cardiac cushion development. *Developmental Biology*, v.278, p.35-48, 2005.

PERSON, A.D.; KLEWER, S.E.; RUNYAN, R.B. Cell Biology of Cardiac Cushion Development. *International Review of Cytology*, v.243, p.287-335, 2005.

PFAFFL, M.W. Quantification strategies in real-time PCR. Chapter 3. In: Bustin, S.A. A-Z of quantitative PCR. 2004.

POTTS, J.D., DAGLE, J.M., WALDER, J.A., WEEKS, D.L., RUNYAN, R.B. Epithelial-mesenchymal transformation of embryonic cardiac endothelial cells is inhibited by a modified antisense oligodeoxynucleotide to transforming growth factor beta 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.88, p.1516-20, 1991.

POTTS, J.D.; RUNYAN, R.B. Epithelial-mesenchymal cell transformation in the embryonic heart can be mediated, in part, by transforming growth factor b. *Developmental Biology*, v.2, n.134, p.392-401, 1989.

- PROETZEL, G., PAWLOWSKI, S.A., WILES, M.V., YIN, M., BOIVIN, G.P., HOWLES, P.N., DING, J., FERGUSON, M.W., DOETSCHMAN, T. Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion. *Nat Genet.*, v.11, p.409-414, 1995.
- RAMSDELL, A.F.; MARKWALD, R.R. Induction of endocardial cushion tissue in the avian heart is regulated, in part, by TGFbeta-3-mediated autocrine signaling. *Dev Biol.*, v.188, p.64-74, 1997.
- RAO, M.; BARABAN, J.H.; RAJAI, F.; SOCKANATHAN, S. In vivo comparative study of RNAi methodologies by in ovo electroporation in the chick embryo. *Developmental Dynamics*, v.231, p.592-600, 2004.
- RIDLEY, A.J. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends in Cell Biology*, v.11, n.12, p.471-77, 2001.
- RIDLEY, A.J. Rho GTPases and cell migration. *Journal of Cell Sciences*, v.114, p.2713-22, 2001b.
- RIDLEY, A.J.; HALL, A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, v.70, n.3, p.389-99, 1992.
- RIDLEY, A.J.; PATERSON, H.F.; JOHNSTON, C.L.; DIEKMANN, D.; HALL, A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, v. 70, n.3, p.401-10, 1992.
- ROMANO, L.A., RUNYAN, R.B. Slug is an essential target of TGFbeta2 signaling in the developing chicken heart. *Developmental Biology* 223, 91-102, 2000.
- ROSENBLATT, J.; RAFF, M.C.; CRAMER, L.P. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Current Biology*, v.11, n.23, p.1847-57, 2001.
- ROTOR-Gene 3000 Help. Corberth Life Sciences.
- RUNYAN, R.B., MARKWALD, R.R. Invasion of mesenchyme into three-dimensional collagen gels: a regional and temporal analysis of interaction in embryonic heart tissue. *Developmental Biology* 95, 108-14, 1983.
- RUNYAN, R.B.; MARKWALD, R.R. Invasion of mesenchyme into three-dimensional collagen gels: A regional and temporal analysis of interaction in embryonic heart tissue. *Developmental Biology*, v.95, p.108-114, 1983.
- RUNYAN, R.B.; POTTS, J.D.; SHARMA, R.V.; LOEVER, C.P.; CHIANG, J.J.; BHALLA, R.C. Signal transduction of a tissue interaction during embryonic heart development. *Cell Regulation*, v.3, n.1., p.301-313, 1990.
- RUNYAN, R.B.; WENDLER, C.C.; ROMANO, L.A.; BOYER, A.S.; DAGLE, J.M.; WEEKS, D.L. Utilization of antisense oligodeoxynucleotides with embryonic tissues in culture. *Methods-A Companion To Methods In Enzymology*, v.18, p.316-324, 1999.
- SAHAI, E.; MARSHALL, C.J. Rho-GTPases and cancer. *Nature Reviews*, v.2, p.133-142, feb.2002.
- SAKABE, M.; IKEDA, K.; NAKATANI, K.; KAWADA, N.; IMANAKA-YOSHIDA, K.; YOSHIDA, T.; YAMAGISHI, T.; NAKAJIMA, Y. Rho kinases regulate endothelial invasion and migration during valvuloseptal endocardial cushion tissue formation. *Developmental Dynamics*, v.235, p.94-104, 2006.
- SANFORD, L. P., ORMSBY, I., GITTENBERGER-de Groot, A.C., SARIOLA, H., FRIEDMAN, R., BOIVIN, G.P., CARDELL, E.L., DOETSCHMAN, T. TGFβ2 knockout

mice have multiple development defects that are non overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Develop.*, v.124, p.2659- 2670, 1997.

SANTOS-BREDARIOL, A.S.; SANTOS, M.F.; HAMASSAKI-BRITTO, D.E. Distribution of the small molecular weight GTP-binding proteins Rac1, Cdc42, RhoA and RhoB in the developing chick retina. *Journal of Neurocytology*, v.31, p.149-59, 2002.

SAVAGNER, P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *BioEssays*, v.23, p.912-923, 2001.

SCHMITZ, A.A.P.; GOVEK, E.E.; BOTTFNER, B.; AELST, L.V. Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Experimental Cell Research*, v.261, p.1-12, 2000.

SCHUBERT, F.R.; MOOTOOSAMY, R.C.; WALTERS, E.H.; GRAHAM, A.; TUMIOTTO, L.; MUNSTERERG, A.E.; LUMSDEN, A.; DIETRICH, S. Wnt6 marks sites of epithelial transformation in the chick embryo. *Mechanisms of Development*, v.114, p.143-48, 2002.

SHOOK, D.; KELLER, R. Mechanisms, mechanics and functions of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mechanisms of development*, v.120, p.1351-83, 2003.

SINNING, A.R.; LEPERA, R.C.; MARKWALD, R.R. Initial expression of type I procollagen in chick cardiac mesenchyme is dependent upon myocardial stimulation. *Developmental Biology*, v.1, n.130, p.167-174, 1988.

SMALL, J.V.; KAVERINA, I.; KRYLYSHKINA, O.; ROTTNER, K. Cytoskeleton cross-talk during cell motility. *FEBS Letters* 452, p.96-99, 1999.

SONG, W.; MAJKA, S.M., McGUIRE, P.G. Hepatocyte growth factor expression in the developing myocardium: evidence for a role in the regulation of the mesenchymal cell phenotype and urokinase expression. *Developmental Dynamics*, v.214, p.92-100, 1999.

SUCOV, H.M. Molecular insights into cardiac development. *Annu.Rev.Physiol.*, v.60, p.287-308, 1998.

SYMONS, M.; SETTLEMAN, J. Rho family GTPases: more than simple switches. *Trends in Cell Biology*, v.11, n.12, p.471-77, oct. 2000.

TAKAI, Y.; SASAKI, T.; MATOZAKI, T. Small GTP-binding proteins. *Physiological Reviews*, v.81, n.1, p.153-208, jan.2001.

TAVARES, A.L., KITTEN, G.T. *Rho-GTPases RhoB, Rac1 e Cdc42 durante a Morfogênese Cardíaca*. 2004. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte..

THEIL, E.C. Regulation of ferritin and transferrin receptor mRNAs. *The Journal of Biological Chemistry*, v.265, n.9, p.4771-4774, 1990.

WEI, L.; YOSHIDA, K.I.; WANG, L.; ZHAN, S.; SCHNEIDER, M.D.; DEMAYO, F.J.; SCHWARTZ, R.J. Inhibition of Rho family GTPases by RhoGDP dissociation inhibitor disrupts cardiac morphogenesis and inhibits cardiomyocyte proliferation. *Development*, v.129, p.1705-14, 2002.

XIE, L.; LAW, B.K.; AAKRE, M.E.; EDGERTON, M.; SHYR, Y.; BHOWMICK, N.A.; MOSES, H.L. Transforming growth factor beta-regulated gene expression in a mouse mammary gland epithelial cell line. *Breast Cancer Research*, v.5, n.6, p.187-98, 2003.

YAMAGISHI, T.; NAKAJIMA, Y.; MIYAZONO, K.; NAKAMURA, H. Bone morphogenetic protein-2 acts synergistically with transforming growth factor- β 3 during endothelial-

mesenchymal transformation in the developing chick heart. *Journal of cellular physiology*, v.180, p.35-45, 1999.

YONEMURA, S.; HIRAO-MINAKUCHI, K.; NISHIMURA, Y. Rho localization in cells and tissues. *Exper. Cell Res.*, v.295, p.300-314, 2004.

ZHAO, Z.Y.; RIVKEES, S.A. Rho-associated kinases play a role in endocardial cell differentiation and migration. *Developmental Biology*, v.275, p.183-191, 2004.

ZUBIAUR, M.; SANCHO, J.; TERHORST, C.; FALLER, D.V. A small GTP-binding protein, Rho, associates with the platelet-derived growth factor type β receptor upon ligand binding. *The Journal of Biological Chemistry*, v.270, n.29, p.17221-8, 1995.

SUMMARY

Organogenesis of the heart involves the morphogenesis of cardiac valves and septa, which are derived from the endocardial cushions. The endothelium in these regions undergoes a process known as an epithelial-mesenchymal transition (EMT). During EMT endothelial cells acquire a mesenchymal phenotype and differentiate into fibroblasts as they migrate into the underlying extracellular matrix. Rho-GTPases have been previously shown to be involved with cytoskeleton control and gene regulation during the EMT. The aim of this work was to determine if there is any correlation between RhoA and the EMT that occurs in the endocardial cushions. RhoA was detected in all cells of the chick heart during the stages studied. Expression was elevated when EMT was actively occurring. Explants treated with C3 exoenzyme in collagen gel cultures showed a significant decrease in mesenchymal cell numbers. siRNA was used to inhibit RhoA mRNA, and both activated endothelial and mesenchymal cells decreased significantly with treatment. Loss of RhoA produced a reduction of RhoB, cyclin-b2 and β -catenin messages showing that these genes are regulated downstream of RhoA. In contrast, runx-2 was not reduced. Inhibition of TGF β 3 or TGF β 2 activity caused a large reduction of RhoA message. These data place RhoA in TGF β regulated pathways for both endothelial activation and mesenchymal invasion and demonstrate a functional requirement during EMT.

ANEXO

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)