

**ANA PAULA AZAMBUJA**

**MECANISMOS EMBRIONÁRIOS DE DIFERENCIAÇÃO DE PRECURSORES  
CORONÁRIOS: PRINCÍPIOS PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA CELULAR**

Tese apresentada ao  
Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2009

**ANA PAULA AZAMBUJA**

**MECANISMOS EMBRIONÁRIOS DE DIFERENCIAÇÃO DE PRECURSORES  
CORONÁRIOS: PRINCÍPIOS PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA CELULAR**

Tese apresentada ao  
Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade de São Paulo, para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração:  
Biologia Celular e Tecidual

Orientador:  
Prof. Dr. José Xavier Neto

São Paulo  
2009

## RESUMO

Azambuja AP. Mecanismos embrionários de diferenciação de precursores coronários: princípios para aplicação em terapia celular [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Os vasos coronários derivam do proepicárdio (PE), uma estrutura embrionária transitória formada por precursores do epicárdio e dos constituintes de vasos coronários, as células endoteliais e musculares lisas (CoSMC). *In vivo* observa-se um marcante atraso entre a diferenciação endotelial e a integração de CoSMC diferenciados à parede do vaso. Os mecanismos que controlam o atraso entre a formação de tubos endoteliais e a diferenciação de CoSMC *in vivo* ainda não são conhecidos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi identificar os mecanismos que inibem a diferenciação a CoSMC *in vivo*. Baseados na perda progressiva da expressão de raldh2, a principal enzima de síntese de ácido retinóico (AR), nós exploramos a sinalização por AR como um possível inibidor da diferenciação a CoSMC. Através de um vetor adenoviral não replicativo de expressão de raldh2 e da inibição *in vivo* da síntese de AR nós demonstramos que a sinalização por AR bloqueia a diferenciação a CoSMC dos precursores coronários. Nós também identificamos o VEGF como um fator chave no controle da diferenciação a CoSMC. Em conjunto, nossos dados suportam o modelo que a síntese de AR e VEGF durante o desenvolvimento cardíaco foi co-optada para o bloqueio da diferenciação a CoSMC até o estabelecimento de uma vasta malha vascular.

Palavras-chave: Ácido retinóico. Desenvolvimento cardíaco. Coronárias. Músculo liso. Endotélio. Terapia Celular.

## ABSTRACT

Azambuja AP. Embryonic mechanisms of coronary precursor differentiation: principles for cell therapy [Ph.D. Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Coronary vessels derive from the proepicardium, a transient embryonic structure formed by precursor cells of the epicardium, and the constituents coronary vessels such as endothelial and smooth muscle cells (CoSMC). *In vivo* there is a clear gap between the endothelial differentiation and the integration of differentiated CoSMC into the endothelial tubes. The mechanisms underlying the delayed *in vivo* CoSMC differentiation have not been addressed. Based on the progressive loss of expression of *raldh2*, the main retinoic acid (RA) synthesizing enzyme during coronary precursor differentiation, we explored the RA signaling as a possible candidate inhibitor of precocious CoSMC differentiation. Using a nonreplicative adenoviral *raldh2* expression system and *in vivo* inhibition of RA synthesis we showed that RA signaling act as a brake to slow coronary smooth muscle differentiation in PE-derived cells We also identified VEGF as key factor acting on the control of CoSMC differentiation. Together our results support a model that AR and VEGF synthesis during cardiac development was co-opted to block the CoSMC differentiation of coronary precursors before an extensive endothelial network of tubes is established.

Key Words: Retinoic acid. Heart development. Coronary. Smooth muscle. Endothelium. Cell therapy.

# **1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O coração dos vertebrados é um órgão complexo, formado por diversos tipos celulares que apresentam funções interdependentes desde o desenvolvimento embrionário até o funcionamento do órgão no indivíduo adulto. Nos últimos anos grandes avanços foram alcançados no que diz respeito à compreensão dos processos envolvidos no desenvolvimento cardíaco. Para tanto diversos modelos animais foram empregados, de invertebrados como a mosca da fruta, *Drosophila melanogaster*, a vertebrados como peixes, aves e mamíferos, levando ao reconhecimento de diferentes vias genéticas ativadas durante as etapas de formação do coração vertebrado, dos complexos processos morfogênicos atuantes, bem como dos tipos celulares envolvidos na sinalização ou estruturação deste órgão.

Por uma visão aplicada, tais avanços têm aberto novas perspectivas de intervenção e prevenção de diversos tipos de cardiopatias. Assim, esta relação entre a pesquisa básica e a aplicada tem possibilitado, por exemplo, a identificação de candidatos a efetores ou moduladores de cardiopatias congênitas, entre os diversos genes envolvidos no desenvolvimento cardíaco, ou ainda, tendo como base os processos celulares que ocorrem durante a formação deste órgão, projetar ações para a intervenção no remodelamento tecidual inerente a doenças cardiovasculares.

Entre tais perspectivas, a utilização de células pluripotentes, como as células tronco por exemplo, em casos de doenças cardiovasculares – a Terapia Celular Cardíaca – vem sendo intensamente explorada, visando tanto à recuperação da contratilidade pela ampliação da malha circulatória quanto pela adição de miócitos saudáveis em casos mais graves.

Entretanto, diferentes protocolos experimentais e clínicos de terapia celular cardíaca têm apresentado eficiência modesta, com benefícios transitórios (Dimmeler e Zeiher, 2009). Ainda, há pouca evidência de que estes benefícios estejam associados à diferenciação das células administradas em tipos celulares úteis ao coração (Reinecke, *et al.*, 2008). Estes fatos indicam a necessidade de um aprimoramento dos protocolos de revascularização cardíaca no que se refere ao tipo celular a ser utilizado, ao seu potencial vasculogênico/miogênico e, ao número e forma de administração destes tipos celulares.

Outro ponto importante a ser levantado em relação a técnicas de terapia celular em geral diz respeito a características inerentes das células-tronco. Entre tais características as mais marcantes são (1) a sua potencialidade (amplo potencial de diferenciação a diferentes linhagens celulares) e (2) a sua capacidade proliferativa. No contexto terapêutico, no entanto, estas características podem representar o lado negativo da terapia celular: (1) a potencialidade de diferenciação pode levar a formação de tecidos contendo representantes de várias linhagens germinativas, o que pode ser deletério à função cardíaca; e (2) a capacidade proliferativa pode resultar em um efeito tumorigênico. Este risco abre a perspectiva da utilização em terapia celular de células mais específicas para cada objetivo terapêutico, ou seja, a utilização de células precursoras, com um potencial de diferenciação menor, porém previamente definido e direcionado para cada necessidade terapêutica.

Com isso, tendo em vista a futura utilização deste conhecimento no incremento das técnicas de revascularização cardíaca, se faz necessária a exploração da biologia do desenvolvimento do coração e da circulação coronária visando compreender o processo de formação das coronárias e os fatores envolvidos na diferenciação das células precursoras destes vasos, identificando assim possíveis modelos aplicáveis à terapia celular.

Dentro deste contexto, as células precursoras da circulação coronária, provenientes da estrutura embrionária conhecida como proepicárdio (PE), vêm sendo classificadas como células multipotentes, sendo o seu potencial vasculogênico e angiogênico explorado em diversos sistemas. Tendo esta potencialidade em vista e, considerando que a sua utilização como modelo terapêutico de angiogênese coronária depende do profundo conhecimento dos mecanismos adotados por estes precursores, este trabalho buscou identificar os fatores que modulam o destino celular das células derivadas do PE, controlando assim a sua diferenciação e possibilitando a formação de uma ampla malha circulatória responsável pela irrigação do coração.

## 1.1 Embriogenia vascular

O sucesso do desenvolvimento embrionário depende diretamente do estabelecimento de uma malha vascular e do transporte de nutrientes e metabólitos para os diferentes tecidos em formação no embrião. Nesta seção serão apresentados os eventos que levam, já em estágios precoces do desenvolvimento embrionário, à formação de um plexo vascular primitivo, assim como eventos responsáveis pela aquisição da identidade vascular e pela estabilização do vaso sangüíneo.

### 1.1.1 De precursores mesodérmicos a malha vascular

As primeiras evidências do início do desenvolvimento de elementos vasculares são observadas concomitantemente à formação do primeiro par de somitos. Neste estágio, com a formação da mesoderme lateral do saco vitelínico, sob a influência da endoderme, precursores provenientes do epiblasto se diferenciam em aglomerados sólidos – as ilhotas sanguíneas – onde uma massa interna de células hematopoiéticas é recoberta por células achatadas que se tornarão células endoteliais [revisado por (Risau e Flamme, 1995; Flamme, *et al.*, 1997)].

Assim, o primeiro passo para a formação de uma malha vascular é a diferenciação de células endoteliais a partir de precursores mesodérmicos conhecidos como angioblastos. Ao processo caracterizado pela diferenciação *in situ* de angioblastos a células endoteliais dando início a vascularização pela formação de ilhotas sanguíneas de um tecido dá-se o nome de vasculogênese [revisado por (Risau e Flamme, 1995)]. Na seqüência, esta malha primitiva é prontamente expandida e remodelada pelo processo de angiogênese, que marca a ramificação do tecido endotelial pré-existente (Flamme, *et al.*, 1997). O processo de angiogênese é reconhecido em diversos tipos de tecido e ocorre pela liberação de mitógenos e moléculas atrativas a células endoteliais promovendo a ramificação e



expansão do plexo vascular (Flamme, *et al.*, 1997). Portanto, durante o desenvolvimento os vasos sanguíneos podem ser formados por dois processos: (1) a vasculogênese, formação de tecido vascular a partir de precursores mesenquimais e (2) a angiogênese, formação de novos vasos pela expansão e ramificação de vasos pré-existentes.

Durante a gênese do sistema cardiovascular é interessante notar que existe uma clara divisão entre as células provenientes da mesoderme recém formada que darão origem aos precursores cardíacos (mesoderme anterior) e os precursores de vasos e sangue (mesoderme posterior). Esta separação parece estar relacionada a fatores expressos pela endoderme anterior. Assim, a ausência de sinalização por moléculas da família wnt, tanto pela não expressão destes genes, quanto pela expressão de inibidores da via wnt na endoderme anterior, desencadeia, na mesoderme anterior, o programa de diferenciação cardíaca (Marvin, *et al.*, 2001). Esta dicotomia pôde ser demonstrada (1) pela indução de genes cardíacos específicos na mesoderme lateral posterior pelo inibidor da via wnt, dkk-1, e (2) pela formação de eritrócitos precoces na mesoderme pré-cardíaca através da super expressão de wnt-3a e wnt-8c (Marvin, *et al.*, 2001).

Outro fator crucial em todas as etapas do desenvolvimento vascular é fator de crescimento de endotélio, VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*). Sua importância é demonstrada pelo fato de que o receptor de maior afinidade ao VEGF, o receptor tirosina quinase VEGFR-2/FLK-1, é o primeiro marcador molecular da linhagem celular hemangioblástica (Yamaguchi, *et al.*, 1993). Ainda, a deleção de um único alelo de vegf leva à formação anormal de vasos sanguíneos e à letalidade em embriões de camundongo (Carmeliet, *et al.*, 1996; Ferrara, *et al.*, 1996).

### **1.1.2 Identidade vascular**

A aquisição da identidade vascular, arterial ou venosa, é um assunto que tem sido amplamente explorado nos últimos anos. Estas pesquisas têm demonstrado que o aparecimento desta identidade precede o início da circulação sanguínea local

e diferenças fisiológicas como oxigenação e pressão sangüínea. Com isso, marcadores moleculares têm sido identificados, demonstrando diferenças de expressão gênica precoces entre artérias e veias. Entre tais marcadores pode-se citar a expressão de genes de ligantes transmembrânicos da família das ephrins e seus receptores. Wang e colaboradores (1998) demonstraram que enquanto ephrin-B2 é expressa no endotélio de artérias, seu receptor, eph-B4, é expresso no endotélio de veias em estágios precoces de angiogênese. Além disso, os autores sugerem que a presença destes marcadores é necessária à manutenção dos fenótipos arteriais e venosos e que sinalização recíproca entre estes dois tipos de vasos é crucial à morfogênese da malha capilar (Wang, *et al.*, 1998).

Entretanto, evidências sugerem que os mecanismos iniciais de especificação destes dois tipos vasculares envolvem, por um lado, (1) a sinalização via o receptor NOTCH e seus ligantes DELTA e JAGGED, que atuam na especificação do fenótipo arterial (Lawson e Weinstein, 2002) e, (2) a ativação do receptor nuclear COUP-TFII, que atua como um regulador do fenótipo venoso pela inibição da sinalização por NOTCH (You, *et al.*, 2005).

### **1.1.3 Diferenciação de células musculares lisas**

Outro momento importante no desenvolvimento vascular é a estabilização do vaso, caracterizada pela constância no diâmetro da luz, salvo alterações fisiológicas, pelo recrutamento de outros tipos celulares (células musculares lisas e fibroblastos) para a composição da parede de vaso e pelo não aparecimento de novas ramificações.

As células musculares lisas, nos vasos maduros, são células altamente especializadas que apresentam a capacidade de contração, regulando assim o diâmetro do vaso, a pressão sanguínea e a distribuição do fluxo sanguíneo [revisado por (Owens, *et al.*, 2004)]. Diferentemente de células musculares cardíacas e esqueléticas, que são terminantemente diferenciadas, as células musculares lisas podem sofrer mudanças fenotípicas de acordo com diferentes

condições fisiológicas ou patológicas. Assim, as células musculares lisas com capacidade contrátil, caracterizadas por um repertório de proteínas contráteis e canais iônicos, e pela baixa capacidade proliferativa e sintética, podem assumir um fenótipo semelhante ao encontrado durante o desenvolvimento inicial do vaso, caracterizado por altos índices de proliferação, migração e produção de matriz extracelular e baixa capacidade de contração decorrente da regulação negativa de proteínas contráteis (Owens, *et al.*, 2004; Yoshida e Owens, 2005).

O processo de recrutamento de precursores musculares lisos pelas células endoteliais e de diferenciação aos vários tipos de células musculares lisas não está completamente elucidado. Entretanto trabalhos têm demonstrado a participação da sinalização por Angiopietina e seu receptor TIE-2 neste processo (Davis, *et al.*, 1996; Suri, *et al.*, 1996). No modelo proposto por Folkman e D'Amore (1996) a produção de Angiopietina-1 por células mesenquimais ativaria receptores TIE-2 no endotélio levando à produção e liberação de sinais de recrutamento destas células mesenquimais. Entre tais possíveis fatores figuram o PDGF-BB (*Platelet-Derived Growth Factor*) e o HB-EGF (*Heparin Binding EGF-like Growth Factor*). Ainda segundo este modelo, após o contato da célula mesenquimal com o endotélio, haveria a ativação da sinalização por TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor*) responsável pela diferenciação da célula mesenquimal a célula muscular lisa e pelo estímulo à deposição de matriz extracelular (Folkman e D'Amore, 1996).

Outro ponto ainda não elucidado, diz respeito aos fatores envolvidos no processo de alternância dos fenótipos contrátil e secretor/proliferativo. Evidências provenientes principalmente de experimentos *in vitro* apontam que este processo envolve a expressão do fator de transcrição SRF (*Serum Response Factor*) que se liga a SREs (*Serum Response Element*) presentes em uma série de genes marcadores de célula muscular lisa como  $\alpha$ -actina de músculo liso (SM $\alpha$ A), SM22 $\alpha$ , calponina, caldesmon (Landerholm, *et al.*, 1999) e também em genes envolvidos com a proliferação celular (Du, *et al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2004). É descrito que a alternância entre o fenótipo contrátil e proliferativo das células musculares lisas é dependente da formação de complexos protéicos, SFR/ELK1 ou SRF/Miocardina, nos SREs, respectivamente. Assim, a ligação de SRF ao coativador Miocardina é necessária e suficiente para a ativação da transcrição de marcadores de

diferenciação (proteínas contráteis) (Du, *et al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2004). Por outro lado, quando há a sinalização por PDGF ou soro, a fosforilação do fator de transcrição ELK1 desloca a Miocardina do complexo, bloqueando a transcrição de genes de diferenciação e permitindo a proliferação deste tipo celular (Du, *et al.*, 2003; Wang, *et al.*, 2004).

## **1.2 Embriogenia cardíaca**

O desenvolvimento cardíaco se caracteriza por ser um processo complexo, dependente da interação de diversas famílias gênicas e da participação de diferentes tipos celulares integrados em eventos morfogênicos contínuos. Outra característica importante da formação do coração, é que este órgão se forma inicialmente de maneira isolada, sendo secundária a sua integração à malha vascular pré-existente. Com isso, nesta seção serão abordados, de maneira resumida, os processos responsáveis pela formação do coração tubular e sua integração à malha vascular, assim como os eventos morfogênicos que levam ao aumento de complexidade do coração levando a formação de um órgão multicameral.

### **1.2.1 De precursores ao tubo cardíaco**

De maneira sintética, pode-se afirmar que os primeiros eventos especificamente relacionados ao desenvolvimento cardíaco têm início durante a fase de gástrula. Durante este processo, responsável pela formação dos três folhetos germinativos – ectoderme, mesoderme e endoderme (Stern, 2004) – os precursores cardíacos, inicialmente localizados bilateralmente no terço posterior do epiblasto, em uma organização médio-lateral, ingressam pela fenda primitiva constituindo o mesoderma pré-cardíaco (Gannon e Bader, 1995). É interessante

notar que é nestes estágios precoces do desenvolvimento cardíaco que ocorre a partição destes precursores cardíacos em linhagens independentes de precursores musculares e de precursores endocárdicos (Mikawa, 1998).

A expressão dos primeiros marcadores moleculares que permitem diferenciar os precursores cardíacos tem início após a migração do mesoderma pré-cardíaco em direção anterior e lateral formando o crescente cardíaco. Entre tais marcadores pode-se destacar: os fatores de transcrição GATA4, NKX2.5, TBX5 e MF2C (Brand, 2003).

Durante este estágio, os precursores cardíacos são padronizados em relação aos eixos antero-posterior e direita-esquerda. Acredita-se que o ácido retinóico (AR) tenha um papel crucial no estabelecimento do eixo antero-posterior (Niederreither, *et al.*, 1999; Xavier-Neto, *et al.*, 2000). Em um primeiro momento, a síntese AR por tecidos posteriores ao campo cardíaco atuaria na especificação dos precursores posteriores (seio venoso e átrios), enquanto que o avanço anterior desta síntese, marcado por uma onda caudo-rostral da enzima-chave na síntese de AR – RALDH2, confere a estes precursores posteriores a capacidade de síntese de altos níveis de AR, determinando seu destino posterior (Hochgreb, *et al.*, 2003). Assim, neste momento, os precursores cardíacos podem ser reconhecidos de forma organizada no crescente cardíaco, onde os precursores do tronco arterial e venosos assumem posições mais anteriores no crescente, enquanto que os precursores arteriais e do seio venoso se encontram em uma posição mais posterior. Esta padronização antero-posterior é importante para a integração do coração na circulação embrionária pré-existente, uma vez que leva a uma correta conexão de segmentos de influxo (seio venoso e átrio) ao sistema venoso e segmentos de efluxo (ventrículos e tronco arterial) ao sistema arterial (Hochgreb, *et al.*, 2003).

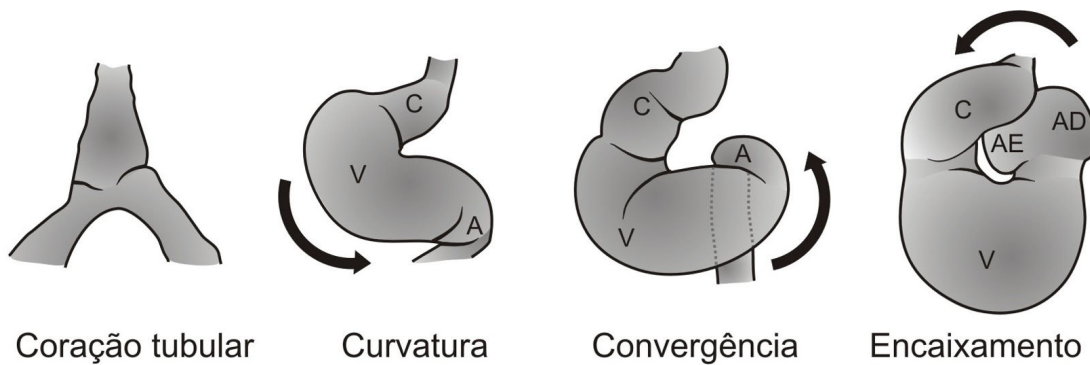
Paralelamente aos processos de padronização do campo cardíaco, tem início um processo de transformação do mesoderma cardíaco de mesênquima a epitélio. Este processo é acompanhado pela perda da expressão de N-caderina pelos precursores endocárdicos e o deslocamento destes precursores o que leva a formação de um tubo endocárdico interno recoberto por um manto de miocárdio externo (Linask, *et al.*, 1997). Acompanhando o processo de dobramento lateral do corpo do embrião, há a fusão dos tubos endocárdicos laterais formando o tubo

cardíaco composto por uma camada tubular interna de endocárdio, um manto externo de miocárdio e uma camada intermediária, a geléia cardíaca (Kaufman e Navaratnam, 1981; DeRuiter, *et al.*, 1992). O tubo cardíaco que se forma com a fusão é delimitado anterior e lateralmente pelo manto miocárdico e dorsalmente pelo endoderma do intestino anterior.

### **1.2.2 Do coração tubular a câmaras cardíacas**

O recém formado tubo cardíaco já apresenta função contrátil, porém, se assemelha muito mais a um tubo peristáltico que a um órgão complexo formado por múltiplas câmaras. Com isso, após a formação do tubo cardíaco, este passa por uma série de processos dinâmicos que o transformarão em uma estrutura complexa capaz de atender a demanda do embrião em desenvolvimento e do organismo adulto. O primeiro destes eventos morfogênicos é um dobramento do tubo para o lado direito posicionando os precursores do ventrículo sistêmico do lado esquerdo do embrião. A este processo segue-se o processo de convergência, que se caracteriza pela migração anterior do átrio comum e do seio venoso sobre os ventrículos. O terceiro evento marca o posicionamento dos coxins do tronco arterial entre as valvas do canal átrio-ventricular e é conhecido como encaixamento em cunha (Figura 1) (Kirby e Waldo, 1995; Manner, 2000).

Concomitantemente a estes eventos morfogênicos uma série de outros eventos ocorre no coração levando a um marcante aumento da complexidade deste órgão. Entre tais eventos podemos citar a gênese da circulação coronária e o espessamento da parede miocárdica, que serão discutidos com maiores detalhes posteriormente, a formação de septos e válvulas, e o advento do sistema de condução.



**Figura 1. Eventos morfogênicos do desenvolvimento cardiovascular.** A conversão do coração tubular em um órgão multicameral se inicia com a contorção do tubo cardíaco para a direita (curvatura), que posiciona os precursores do ventrículo direito e conotrônco à direita e os precursores do ventrículo sistêmico à esquerda. A convergência é a migração anterior do átrio comum e dos seios venosos sobre os ventrículos, enquanto que o encaixamento em cunha é o posicionamento dos Coxins do tronco cardíaco exatamente entre os primórdios das valvas tricúspide e mitral.

### 1.3 Desenvolvimento coronário

Durante a história evolutiva dos vertebrados, estes organismos desenvolveram duas maneiras de oxigenar o miocárdio: (1) através de canais que facilitam a troca entre o sangue presente no lúmen do coração e o seu miocárdio esponjoso e (2) através de vasos – as coronárias – capazes de levar o sangue ricamente oxigenado a um miocárdio compacto (Farmer, 1999).

Assim, pode-se observar que durante as etapas iniciais do desenvolvimento embrionário de aves e mamíferos toda a nutrição do tecido miocárdico ocorre pela difusão através do endocárdio, entretanto, com o aumento de complexidade deste órgão e com o aumento da espessura do miocárdio esta difusão torna-se insuficiente. Com isso, a hipóxia do tecido cardíaco funciona como um gatilho molecular para o início do desenvolvimento da circulação coronária do embrião, um sistema vascular capaz de garantir ao miocárdio a irrigação necessária ao seu

desenvolvimento e funcionamento<sup>1</sup>.

Tendo como base o desenvolvimento de aves nesta seção serão apresentados, de forma geral, os eventos morfogênicos que levam a formação desta malha vascular, enquanto que as bases moleculares destes processos serão discutidas em seções posteriores.

### 1.3.1 O proepicárdio

O início do desenvolvimento coronário é marcado pelo aparecimento de uma estrutura transitória no septo transverso, em íntimo contato com o canal átrio-ventricular e o broto hepático, durante as etapas finais do dobramento cardíaco, mais precisamente, 9.5 dpc (dias pós coito) em embriões de camundongos e HH16 em embriões de aves (Manner, 1993). Esta estrutura, conhecida como proepicárdio (PE) é formada por uma série de dobramentos mesoteliais da parede do celoma que recobrem um pequeno grupo de células mesenquimais (Viragh e Challice, 1981).

A importância do PE foi inicialmente demonstrada por experimentos onde o contato entre o PE e o coração foi impedido pela introdução de um pedaço de membrana da casca do ovo entre estas estruturas levando a um atraso na formação do epicárdio, ao desenvolvimento de um miocárdio ventricular hipoplásico e à deficiência (subdesenvolvimento) coronária (Manner, 1993).

Na seqüência, uma série de experimentos demonstraram que o PE é uma estrutura embrionária transitória que concentra os precursores do epicárdio, a camada mais externa do coração, e das coronárias – as células endoteliais e as células musculares lisas – e de fibroblastos intersticiais (Mikawa e Fischman, 1992; Mikawa e Gourdie, 1996; Dettman, *et al.*, 1998; Perez-Pomares, *et al.*, 1998;

---

<sup>1</sup> No contexto evolutivo o surgimento das coronárias acompanha a progressiva septação ventricular e a substituição de um miocárdio esponjoso por um tecido compacto. Estas características estão relacionadas à transição da vida para o ambiente terrestre e o aumento da capacidade de manutenção de exercício e podem ser observadas em alguns répteis, em aves e mamíferos (Farmer, 1999).



Vrancken Peeters, *et al.*, 1999). No coração, as células provenientes do PE contribuem ainda com a formação de septos e válvulas, e ainda, com a sinalização para o espessamento da parede do miocárdio (discutido posteriormente) e para a formação do sistema de condução do coração (Gittenberger-de Groot, *et al.*, 1998; Chen, *et al.*, 2002; Stuckmann, *et al.*, 2003; Manner, *et al.*, 2005; Eralp, *et al.*, 2006). Trabalhos recentes têm demonstrado, através de técnicas de cultivo celular e análise de linhagem celular (Cre-LoxP<sup>2</sup>), que o PE não só apresenta capacidade de diferenciação a cardiomiócitos *in vitro* (Kruithof, *et al.*, 2006), como também contribui substancialmente com miócitos no septo interventricular e nas paredes atrial e ventricular (Cai, *et al.*, 2008; Zhou, *et al.*, 2008a).

O desenvolvimento coronário representa uma série de processos complexos e dinâmicos que, por razões didáticas, podem ser apresentados em cinco diferentes etapas: (1) migração de células do PE para o coração, (2) formação do epicárdio, (3) transformação epitélio-mesenquimal e formação do espaço subepicárdico, (4) formação de tubos endoteliais e (5) diferenciação de células musculares lisas coronárias (CoSMC – *Coronary Smooth Muscle Cells*). O esquema representado na Figura 2 resume as diferentes etapas na formação das coronárias de embriões de aves.

### **1.3.2 Migração das células do PE para o coração**

Uma série de estudos tem demonstrado a existência de dois diferentes mecanismos de transferência das células do PE até o miocárdio através da cavidade pericárdica. No primeiro mecanismo, predominante em peixes e alguns mamíferos, agregados celulares formados pelas vilosidades do PE atravessam passivamente o fluido da cavidade pericárdica alcançando a superfície nua do miocárdio em diferentes pontos, de onde se inicia a migração sobre a parede do

---

<sup>2</sup> A técnica de análise de linhagem celular pelo sistema Cre/LoxP pode ser bastante imprecisa uma vez que níveis basais de expressão em outros tipos celulares podem levar a expressão gênica indesejada ativando o sistema (Lewandoski, 2001).

miocárdio (Perez-Pomares, *et al.*, 1997; Manner, *et al.*, 2001). Estudos com embriões de anfíbios e aves demonstraram a predominância de um segundo mecanismo de transferência de células. Nestes organismos uma ponte de matriz extracelular se forma entre o PE e o coração, o que permite a ligação direta de vilosidades desta estrutura com o miocárdio (Manner, *et al.*, 2001; Nahirney, *et al.*, 2003). Segundo Nahirney e colaboradores (2003) esta ponte de matriz extracelular é rica em proteoglicanos tipo heparam sulfato. Com isso, os autores sugerem que esta ponte poderia atuar não somente como uma ligação física entre as duas estruturas, mas também como um centro de sinalização e regulação da transferência de células do PE, uma vez que matrizes ricas em proteoglicanos de heparam sulfato podem atuar também como estoques de fatores de crescimento com papel em sinalização parácrina (Nahirney, *et al.*, 2003).

### **1.3.3 Formação do epicárdio**

Através de interações adesivas com o miocárdio as células provenientes do PE iniciam migração e proliferação sobre este órgão. Este processo culmina com a criação do epicárdio, a membrana que recobre externamente o coração. Durante a última década, a geração de animais *knockout* (animais deficientes na expressão de determinado gene) foi um passo importante para a elucidação da formação do epicárdio, bem como das moléculas envolvidas neste processo. Desta forma, destacou-se a importância das moléculas de adesão celular VCAM-1, expressa no miocárdio (Kwee, *et al.*, 1995), e a subunidade  $\alpha$ -4 da integrina, expressa nas células derivadas do PE (Yang, *et al.*, 1995), no reconhecimento e migração das células do PE sobre o miocárdio, na formação e manutenção do epicárdio. Animais deficientes para estas moléculas de adesão perecem por volta de 10.5 dias de desenvolvimento apresentando fenótipos comuns como má formação coronária, hipoplasia ventricular e hemorragia intrapericárdica como consequência da não formação do epicárdio (Kwee, *et al.*, 1995; Yang, *et al.*, 1995).

### 1.3.4 Formação do espaço subepicárdico

Durante a fase inicial de formação do epicárdio, as células desta monocamada apresentam-se diretamente aderidas à superfície do miocárdio. Subseqüentemente, entretanto, um espaço preenchido por matriz extracelular surge entre estas duas camadas celulares [revisor por (Wessels e Perez-Pomares, 2004)]. Inicialmente, este espaço subepicárdico se forma nas junções atrioventricular, conoventricular e interventricular, surgindo posteriormente ao longo dos ventrículos e na porção ventral dos átrios (Perez-Pomares, *et al.*, 1997). O espaço subepicárdico é rico em elementos de matriz extracelular como colágeno tipo IV, fibronectina e laminina (Kalman, *et al.*, 1995). Contudo, a organização desta matriz é descontínua, observando-se nichos de maior acúmulo nas regiões do canal atrioventricular e do septo interventricular, formando microambientes propícios à hematopoiese e vasculogênese (Kalman, *et al.*, 1995). Isso se dá, provavelmente, devido ao acúmulo de fatores de crescimento produzidos pelo miocárdio como FGFs (*Fibroblast Growth Factor*), VEGFs, TGFbs e BMPs (*Bone Morphogenetic Protein*) (Wessels e Perez-Pomares, 2004).

Em todos os vertebrados estudados, o recém formado espaço subepicárdico é prontamente povoado por células mesenquimais que, sofrendo drásticas mudanças em seu citoesqueleto, se destacam do epicárdio, em um processo conhecido como transformação epitélio-mesenquimal (Dettman, *et al.*, 1998; Manner, *et al.*, 2001; Wessels e Perez-Pomares, 2004). Como conseqüência as células derivadas do epicárdio adquirem capacidade migratória invadindo o miocárdio. É interessante notar que este processo ocorre em estágios precoces à completa formação do epicárdio que ocorre em embriões de aves entre os estágios HH24-25 (Xavier-Neto, *et al.*, 2000; Perez-Pomares, *et al.*, 2002b). Assim já nos estágios HH19 e HH23 em embriões de aves é possível observar células migratórias derivadas do epicárdio invadindo o espaço subepicárdico e o miocárdio, respectivamente (Lie-Venema, *et al.*, 2005).

Os mecanismos inerentes ao processo de transformação epitélio-mesenquimal ainda não foram completamente elucidados. Entretanto a expressão do gene *slug* no epicárdio e em células derivadas do epicárdio parece marcar

células competentes a sofrer tal transformação (Carmona, *et al.*, 2000) uma vez que este gene está relacionado ao processo de transformação epitélio-mesenquimal (Duband, *et al.*, 1995). Ainda, a expressão da molécula de adesão BVES em derivados do PE pode fornecer indícios sobre este processo. Assim, BVES é encontrado na membrana lateral das células do epicárdio, atuando na manutenção da integridade epitelial deste tecido (Wada, *et al.*, 2001). Porém, respondendo a sinais provavelmente provenientes do miocárdio, determinadas células do epicárdio passam a remover BVES da superfície celular, acumulando-o na região perinuclear, despreendendo-se da camada epitelial do epicárdio, dando início ao processo de transformação epitélio mesenquimal (Wada, *et al.*, 2001). Dentre os fatores que podem estar envolvidos com a sinalização deste processo pode-se citar, FOG-2 (*Friend of Gata-2*), FGF e VEGF (Tevosian, *et al.*, 2000; Morabito, *et al.*, 2001)

### **1.3.5 Formação de tubos endoteliais**

A capacidade de formação de tubos endoteliais pelas células do PE tem sido muito explorada nos últimos anos. Após uma série de trabalhos utilizando o sistema de quimeras codorna/galinha ter demonstrado esta atividade no coração embrionário (Poelmann, *et al.*, 1993; Perez-Pomares, *et al.*, 2002a; Lie-Venema, *et al.*, 2005), Guadix e colaboradores demonstraram, *in vivo*, que o PE possui um alto poder de formação de vasos em diferentes estruturas embrionárias (Guadix, *et al.*, 2006). Resultados recentes do nosso grupo têm demonstrado, também, que esta capacidade é mantida em sítios adultos (Oliveira, dados não publicados).

Diferentemente do proposto previamente, as coronárias se formam a partir do processo de vasculogênese (Munoz-Chapulí, *et al.*, 2002), caracterizado pela diferenciação *in situ* de precursores vasculares, formando ilhotas sangüíneas que acabam por se interconectar, formando uma malha vascular [revisado por (Risau e Flamme, 1995)].

A diferenciação endotelial e a formação de estruturas vasculares primitivas têm início assim que as primeiras células mesenquimais são observadas no espaço

subepicárdico. Lie-Venema e colaboradores (2005) descrevem as primeiras células positivas para o marcador endotelial específico de codornas, QH1, assim como os primeiros vasos com luz no estágio HH19 na região da curvatura interna do coração (Lie-Venema, *et al.*, 2005).

Durante os estágios iniciais do desenvolvimento coronário o padrão de formação dos tubos endoteliais está diretamente relacionado às áreas de maior deposição de matriz no espaço subepicárdico e conseqüente maior acúmulo de células mesenquimais derivadas do epicárdio. Assim, as primeiras células endoteliais são identificadas no coração na região do seio venoso e curvatura interna, seguido do canal átrio-ventricular e, por volta do estágio HH23-24, estas células são encontradas no miocárdio atrial e ventricular (Poelmann, *et al.*, 1993; Lie-Venema, *et al.*, 2005). A partir do estágio HH32 é observada a conexão do plexo coronário com o tronco da aorta e o endocárdio atrial (Vrancken Peeters, *et al.*, 1997a; Vrancken Peeters, *et al.*, 1997b), o que leva a um remodelamento e reorganização da malha vascular por todo o coração (Vrancken Peeters, *et al.*, 1997b).

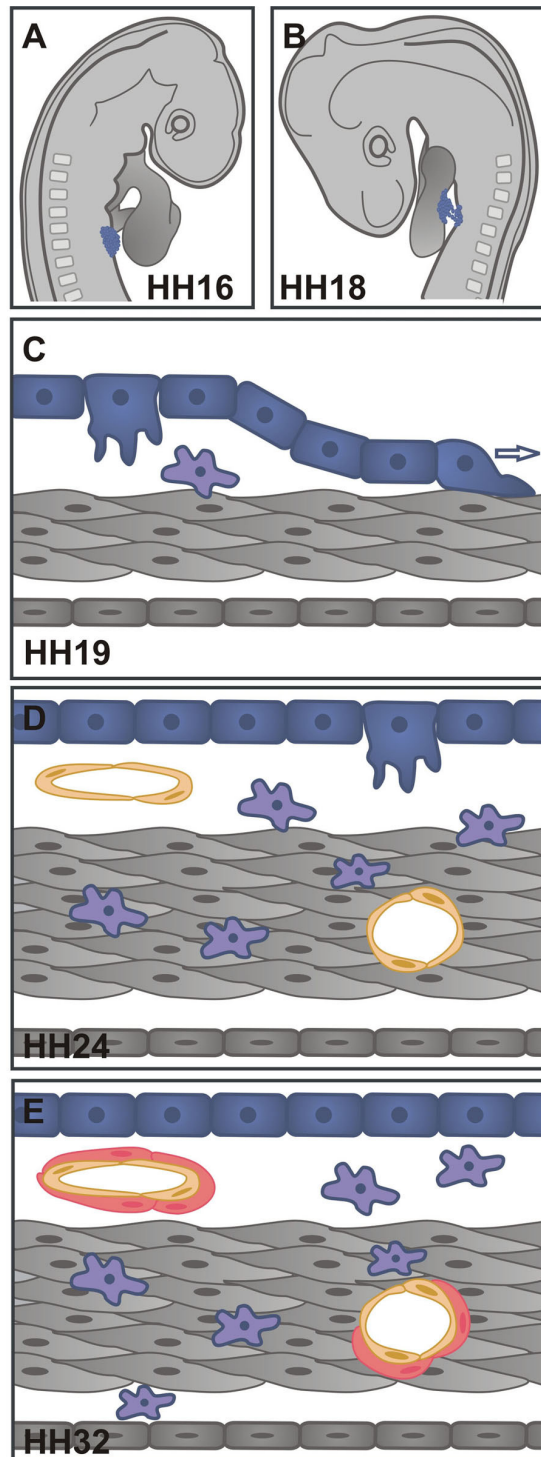
### **1.3.6 Diferenciação de células musculares lisas (CoSMC)**

O processo de remodelamento que ocorre na malha vascular coronária a partir da sua ligação com o tronco da aorta é também caracterizado pelo surgimento de CoSM. A associação temporal do surgimento de CoSMC com a ligação da malha coronária ao tronco da aorta levou a especulação de que o recrutamento deste tipo celular à parede do vaso estaria relacionado ao do aumento de pressão e pelo surgimento de um fluxo sanguíneo direcionado na malha vascular. (Vrancken Peeters, *et al.*, 1997a; Vrancken Peeters, *et al.*, 1997b).

A diferenciação a CoSMC ocorre a partir de precursores mesenquimais provenientes do epicárdio. Estudos envolvendo quimeras codorna/galinha indicaram que a população de células invasivas derivadas do epicárdio é composta por duas populações: a primeira é responsável pela disseminação de precursores endoteliais,

enquanto que a segunda é negativa para marcadores endoteliais (Gittenberger-de Groot, *et al.*, 1998). Tem-se sugerido que esta segunda população daria origem a CoSMC e a fibroblastos cardíacos (Dettman, *et al.*, 1998; Gittenberger-de Groot, *et al.*, 1998).

Os mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação destas células serão discutidos posteriormente, juntamente com os prováveis motivos que fazem com que *in vivo*, os precursores coronários multipotenciais priorizem a diferenciação endotelial retardando a diferenciação muscular lisa.



**Figura 2. Etapas na formação das coronárias.** (A) Esquema de um embrião de codorna no estágio HH16 destacando (azul) o proepicárdio (PE). (B) esquema de um embrião de codorna no estágio HH18 destacando (azul) a ligação do PE ao coração em desenvolvimento. (C) Início da formação do epicárdio em HH19. Notar que mesmo antes da completa formação do epicárdio as primeiras células mesenquimais derivadas do PE já são observadas no subepicárdio (Lie-Venema, *et al.*, 2005). (D) conforme a transformação epitélio-mesenquimal de grupos de células do epicárdio prossegue os primeiros tubos endoteliais são observados em HH24 na região átrio-ventricular (Vrancken Peeters, *et al.*, 1997b). (E) apenas no estágio HH32 são observadas as primeiras CoSMC compondo a parede do vaso (Vrancken Peeters, *et al.*, 1997b; Vrancken Peeters, *et al.*, 1997a).

## 1.4 Mecanismos moleculares do desenvolvimento coronário

Nos últimos anos tem se acumulado informação considerável sobre a biologia celular e molecular das células do PE e derivadas. Vários mecanismos de diferenciação têm sido sugeridos, assim como tem sido descrita uma série de marcadores moleculares dos fenótipos precursores e definitivos [revisado por (Wessels e Perez-Pomares, 2004)].

A complexidade das vias genéticas que envolvem a morfogênese coronária vem sendo demonstrada através da convergência de fenótipos relacionados ao desenvolvimento do eixo PE/epicárdio em animais deficientes em moléculas diversas como fatores de transcrição, receptores nucleares e moléculas de adesão. Entre tais fenótipos pode-se citar: a ausência de epicárdio, má formação coronária, hipoplasia ventricular e ainda a hemorragia intrapericárdica caracterizada pela falta de conexão entre a malha coronária (neste caso deficiente) e o tronco da aorta, que acaba assim por derramar sangue dentro da cavidade pericárdica (Kwee, *et al.*, 1995; Yang, *et al.*, 1995; Tevosian, *et al.*, 2000; Crispino, *et al.*, 2001; Katz, *et al.*, 2003; Watt, *et al.*, 2004). Esta convergência de fenótipos demonstra ainda a importância do eixo PE/epicárdio na embriogenia cardíaca assim como a interdependência entre os diferentes tipos celulares envolvidos nesta etapa do desenvolvimento. A Tabela 1 mostra a convergência de fenótipos entre animais deficientes em genes envolvidos com a morfogênese do eixo PE/epicárdio.

Nesta seção serão abordados os mecanismos moleculares envolvidos nas diferentes etapas do desenvolvimento coronário, assim como em eventos cardíacos diretamente dependentes da interação com as células derivadas do PE, como o espessamento da parede ventricular.



**Tabela 1. Modelos animais para alterações no eixo PE/epicárdio.**

<b>Gene/ Alteração</b>	<b>Fenótipo cardíaco</b>	<b>Fonte</b>
$\alpha$ -4 integrina	Hemorragia intrapericárdica, miocárdio ventricular hipoplásico, descolamento do epicárdio e subdesenvolvimento coronário.	(Yang, <i>et al.</i> , 1995)
epo/epor	Miocárdio ventricular hipoplásico, descolamento do epicárdio, subdesenvolvimento do espaço subepicárdico e ausência de estruturas capilares (coronárias)	(Wu, <i>et al.</i> , 1999)
ets1,2 (antisense)	Alterações no desenvolvimento do miocárdio, hemorragia subepicárdica e má formação (subdesenvolvimento) e distribuição da circulação coronária.	(Macias, <i>et al.</i> , 1998)
fog1	Hemorragia intrapericárdica, hipoplasia ventricular, defeitos de septação ventricular.	(Katz, <i>et al.</i> , 2003)
fog2	Hemorragia intrapericárdica, miocárdio ventricular hipoplásico e anormalidades (subdesenvolvimento) coronárias.	(Tevosian, <i>et al.</i> , 2000)
gata4	Ausência de PE, hipoplasia ventricular, defeitos de septação ventricular.	(Crispino, <i>et al.</i> , 2001; Watt, <i>et al.</i> , 2004)
rxr $\alpha$	Apoptose do PE, miocárdio ventricular hipoplásico, má formação do epicárdio, diminuição no número de ilhotas sangüíneas no espaço subepicárdico,	(Sucov, <i>et al.</i> , 1994; Kastner, <i>et al.</i> , 1997; Chen, <i>et al.</i> , 2002)
vcam	Miocárdio ventricular hipoplásico, defeitos no septo interventricular, ausência do epicárdio, hemorragia intrapericárdica.	(Kwee, <i>et al.</i> , 1995)
wt1	Miocárdio ventricular hipoplásico, hemorragia intrapericárdica, má formação do epicárdio (epicárdio descontínuo), pequeno número de células derivadas do epicárdio e ausência de coronárias.	(Moore, <i>et al.</i> , 1999)
ablação manual do PE	Miocárdio ventricular hipoplásico, atraso na formação do epicárdio, pequeno número de células derivadas do epicárdio e deficiência (subdesenvolvimento) coronária.	(Manner, 1993)

#### 1.4.1 A origem do PE

Apesar de a contribuição das células derivadas do PE ter sido intensamente estudada nos últimos anos, os fatores e mecanismos envolvidos com a formação

desta estrutura durante o desenvolvimento embrionário ainda são pouco conhecidos.

Os primeiros passos para a compreensão da origem do PE vieram da identificação de moléculas marcadoras que possibilitam o reconhecimento das células do PE desde estágios iniciais do seu desenvolvimento. Assim, nos últimos anos diversas moléculas foram propostas como marcadoras da linhagem celular PE/epicárdio, entre elas figuram fatores de transcrição como o WT1 (*Wilms Tumor-1*), o TBX18 e a Epicardina (também reconhecida como Capsulina, TCF21 e POD); moléculas estruturais como a citoqueratina e enzimas como a RALDH2 (Viragh, *et al.*, 1993; Robb, *et al.*, 1998; Xavier-Neto, *et al.*, 2000; Carmona, *et al.*, 2001; Kraus, *et al.*, 2001). Apesar de nenhuma destas moléculas apresentarem expressão exclusiva no PE, a sua combinação tem sido usada como padrão no reconhecimento das células do PE.

Outro ponto importante no estudo da origem do PE é a sua localização. O PE se forma a partir do mesotélio do pericárdio em íntimo contato com o endoderma do broto hepático (Manner, 1992; Viragh, *et al.*, 1993; Manner, *et al.*, 2001; Nahirney, *et al.*, 2003). Baseados na importância da interação mesoderme-endoderme na formação do coração (Schultheiss, *et al.*, 1997) e do fígado (Duncan, 2003), e partindo da hipótese de que o broto hepático poderia contribuir com a formação do PE através da liberação de sinais de indução, Ishii e colaboradores demonstraram que, dentro de uma janela temporal específica, o broto hepático é capaz de induzir a expressão de marcadores de PE como wt1, tbx18 e epicardina em células mesoteliais. Tal indução foi demonstrada tanto *in vitro*, a partir de co-culturas de explantes de mesoderme lateral com o broto hepático, quanto *in vivo*, a partir do implante de um broto hepático de codorna na região lateral-posterior de embriões de galinha (Ishii, *et al.*, 2007). Apesar da ativação de genes marcadores da linhagem do PE, Ishii e colaboradores não encontraram características morfológicas típicas do PE ou avaliaram a potencialidade das células induzidas.

Recentemente, Zhou e colaboradores demonstraram, através da análise de linhagens celulares pelo sistema Cre-LoxP, que o PE descende de uma população de precursores que expressam nkx2.5 e isl1, marcadores precoces da linhagem cardíaca. O fato de as células do PE não apresentarem expressão de nkx2.5 e isl1

sugere que estes precursores *nkx2.5+/isl1+* se encontram em uma posição precoce na hierarquia do desenvolvimento do PE, anterior à diferenciação e formação desta estrutura. Foi demonstrado ainda que, apesar de as células do PE não apresentarem expressão de *nkx2.5*, a sua expressão em células precursoras é crucial para o correto desenvolvimento desta estrutura. Com isso, este trabalho sugere que o PE e o coração compartilham uma origem comum durante o desenvolvimento embrionário (Zhou, *et al.*, 2008b). Esta hipótese é reforçada pela demonstração da capacidade de diferenciação das células do PE em cardiomiócitos *in vitro* (Kruithof, *et al.*, 2006). Experimentos *in vitro* de Kruitoff e colaboradores aproximam ainda mais as linhagens cardíaca e proepicárdica. Seus experimentos apontam que a região de influxo cardíaca pode ser dividida em três regiões distintas reguladas pela expressão de diferentes genes das famílias *bmp* e *fgf*: (1) uma zona de diferenciação miocárdica, (2) uma zona de diferenciação epicárdica e (3) uma zona de transição, onde a diferenciação, miocárdica ou epicárdica, é barrada pela expressão de *fgf2* e *bmp2* (Kruithof, *et al.*, 2006).

#### **1.4.2 O papel do ácido retinóico**

O AR é um morfógeno lipossolúvel que possui grande importância em diversos momentos do desenvolvimento embrionário que vão desde a padronização do eixo antero-posterior do embrião cordado pela regulação de genes da família Homeobox (Holland e Holland, 1996) até a padronização próximo-distal de membros de embriões de galinhas (Tickle, *et al.*, 1982). Durante o desenvolvimento cardíaco o AR também possui um papel importante participando da regulação de diferentes processos ao longo de toda a formação do órgão como a padronização antero-posterior do campo cardíaco (Hochgreb, *et al.*, 2003), o espessamento da parede do miocárdio (Chen, *et al.*, 2002; Stuckmann, *et al.*, 2003) e o desenvolvimento coronário (Perez-Pomares, *et al.*, 2002b).

A síntese de AR nos animais envolve a ingestão de precursores como o retinol (Vitamina A) ou o caroteno uma vez que o AR não pode ser sintetizado *de*

*novo* nestes organismos. Resumidamente a via canônica de síntese do AR envolve duas reações de oxidação sucessivas do retinol. A primeira reação é reversível e leva a formação de retinaldeído, um composto altamente instável e tóxico. Esta reação ocorre pela ação das álcool desidrogenas (ADHs) ou, alternativamente, pelas desidrogenases microsomais de cadeia curta (SDRs) [revisado por (Simoes-Costa, *et al.*, 2008)]. Uma vez que as ADHs possuem um amplo padrão de expressão, sendo a ADH3 ubíqua (Molotkov, *et al.*, 2002), todas as células do embrião são capazes de sintetizar retinaldeído. Com isso a regulação da produção de AR recai sobre as RALDHs, enzimas da família das aldeído desidrogenases responsáveis pela segunda reação de oxidação que transforma o retinaldeído em AR (Zhao, *et al.*, 1996).

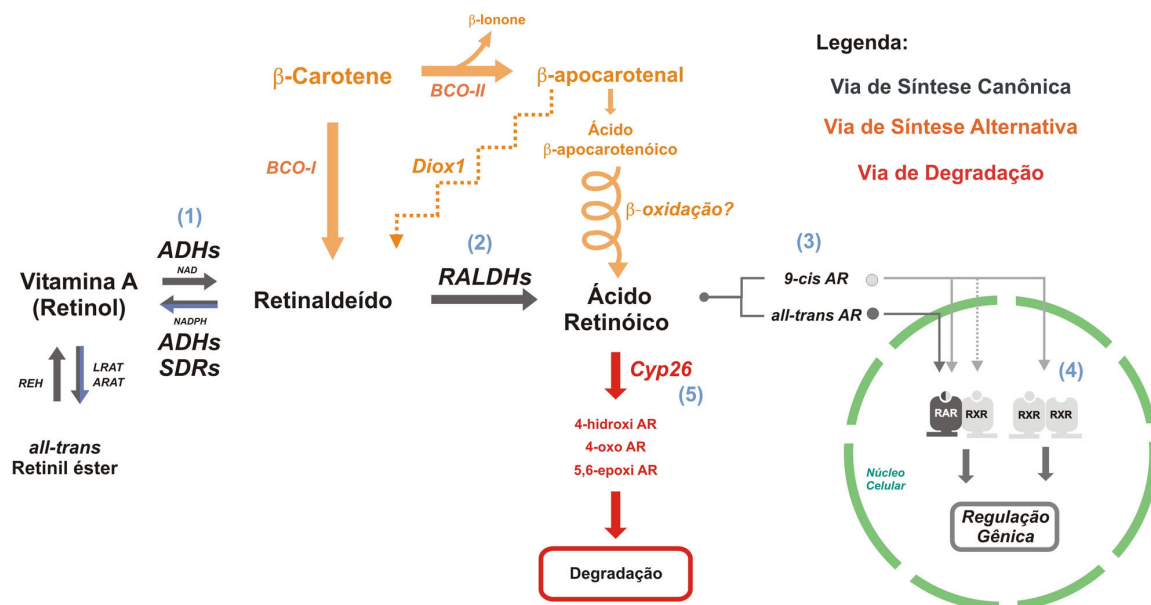
As raldh possuem padrões de expressão bem definidos e dinâmicos que, corroborando com a sua importância no controle da produção de AR, apresentam grande sobreposição com regiões responsivas ao AR (Rossant, *et al.*, 1991). Entre as diferentes raldh identificadas até o momento a raldh2 é a que apresenta maior importância durante o desenvolvimento embrionário, sendo a primeira a ser expressa em embriões de galinhas e camundongos (Niederreither, *et al.*, 1997). A importância da raldh2 é ainda demonstrada pela semelhança entre os fenótipos apresentados por embriões submetidos à restrição de AR e por embriões de camundongo mutantes para esta enzima (Niederreither, *et al.*, 1999).

A disponibilidade de AR pode ser regulada ainda pela degradação deste morfógeno por uma classe de enzimas do citocromo P450, as CYP26. Evidências para a ação das CYP26 como agentes protetores à sinalização por AR foram obtidas através do silenciamento do gene *cyp26a1* em embriões de camundongos, resultando em problemas de padronização do tubo neural e redução da cauda (Abu-Abed, *et al.*, 2001). Ademais, a demonstração de que animais *cyp26a1*<sup>-/-</sup> *raldh2* <sup>+/-</sup> apresentam defeitos mais tênues indica que a redução na produção de AR é capaz de, parcialmente, resgatar o fenótipo relacionado a ausência de *cyp26a1* (Niederreither, *et al.*, 2002).

Na célula o AR se liga e ativa receptores nucleares, RAR e RXR, que atuam como fatores de transcrição ao se ligarem a elementos responsivos a AR presentes em regiões regulatórias de diversos genes (Chambon, 1996). Estes receptores

atuam como heterodímeros, RAR/RXR, induzindo o silenciamento de genes pelo recrutando co-repressores na ausência de AR ou ainda, ativando a expressão gênica, na presença de AR pela associação a coativadores (Aranda e Pascual, 2001). A grande redundância entre as variantes de RAR e RXR somado a sua ampla distribuição tecidual indicam que todas as células embrionárias são responsivas ao AR (Dolle, *et al.*, 1994; Cui, *et al.*, 2003).

A Figura 3 resume as vias de síntese, sinalização e degradação do AR.



**Figura 3. Metabolismo do ácido retinóico (AR).** Em preto, a via canônica de síntese do AR. (1) A vitamina A é obtida através da dieta. A síntese do retinaldeído ocorre pela oxidação reversível catalisada por álcool desidrogenases (ADHs) ou desidrogenases microsomais de cadeia curta (SDRs). (2) O retinaldeído é oxidado a AR pelas retinaldeído desidrogenases (RALDHs). (3) Após a síntese do AR, este atua no núcleo da célula se ligando aos receptores nucleares RAR e RXR, que regulam a expressão gênica. Em vermelho, a via de degradação do AR. (5) As CYP26s oxidam o AR a diferentes metabólitos como o 4-hidroxi AR, o 4-oxo-AR e o 5,6-epoxi AR. Estes compostos são subsequentemente degradados até se tornarem inativos. Em laranja a via alternativa de síntese de AR a partir de βcaroteno.

### 1.4.2.1 Proliferação do miocárdio

Durante os estágios iniciais do desenvolvimento do coração tubular sua parede é constituída por poucas camadas de cardiomiócitos. O processo de espessamento do miocárdio tem início durante o estágio de dobramento do coração quando a este órgão se juntam as células derivadas do PE, dando início a formação do epicárdio.

Os mecanismos moleculares envolvidos na proliferação do miocárdio começaram a ser elucidados na década passada quando Sucov e colaboradores (1994), buscando compreender o papel da sinalização por AR, demonstraram que embriões mutantes para o receptor RXR $\alpha$  apresentavam parede ventricular hipoplásica com defeitos de septação ventricular decorrentes da diferenciação precoce dos cardiomiócitos da face epicárdica (zona compacta) do coração (Sucov, *et al.*, 1994). Entretanto, uma série de trabalhos subseqüentes demonstrou que este fenótipo não é decorrente da perda de RXR $\alpha$  nos cardiomiócitos (Chen, *et al.*, 1998; Tran e Sucov, 1998; Subbarayan, *et al.*, 2000), no endocárdio, ou nas células da crista neural que também participam do desenvolvimento cardíaco (Chen, *et al.*, 2002). Com isso as atenções se voltaram para o epicárdio, tecido que apresenta alta expressão de raldh2 (Moss, *et al.*, 1998; Xavier-Neto, *et al.*, 2000). Em 2002 Chen e colaboradores demonstraram, através da geração de mutantes condicionais, que a perda da expressão de RXR $\alpha$  exclusivamente no epicárdio é capaz de recapitular o fenótipo do mutante RXR $\alpha$  (Chen, *et al.*, 2002). Estes autores demonstraram ainda que o epicárdio, via sinalização por AR, libera sinais tróficos que levam a proliferação de cardiomiócitos em cultura (Chen, *et al.*, 2002). De acordo com estes resultados foi demonstrado que o epicárdio é necessário à proliferação do miocárdio e que o bloqueio da sinalização por AR inibe tal indução (Stuckmann, *et al.*, 2003).

Estes dados, somados à convergência de fenótipos apresentados por animais mutantes para diferentes proteínas como deficiência na formação do epicárdio e a hipoplasia ventricular (ver Tabela 1) levaram a sedimentação da relação entre o epicárdio em formação, o espessamento da parede do miocárdio e a sinalização por AR. Posteriormente, Lavine e colaboradores (2005) indicaram o

FGF9 como um forte candidato a ser o fator trófico liberado pelo epicárdio. Esta indicação foi baseada não somente no fato de que este fator de crescimento é expresso no epicárdio, como também nos fatos de que o FGF9 é induzido por AR e que animais mutantes para *Fgf9* apresentam hipoplasia ventricular (Lavine, *et al.*, 2005).

#### 1.4.2.2 Manutenção do estado indiferenciado

De maneira simplificada, todos os processos envolvidos na formação das coronárias ocorrem a partir de um cenário onde os precursores coronários se encontram em estágio relativamente indiferenciado no epicárdio e no espaço subepicárdico, sendo que o processo de diferenciação de tais precursores ocorre a partir do momento em que estas células mesenquimais entram em contato com sinais provenientes principalmente do miocárdio.

Nesses estágios parcialmente indiferenciados, as células derivadas do epicárdio expressam uma série de marcadores característicos como os fatores de transcrição SLUG (Carmona, *et al.*, 2000) e ETS (Macias, *et al.*, 1998; Lie-Venema, *et al.*, 2003) envolvidos no processo de transformação epitélio mesenquimal; o receptor de eritropoetina (EpoR), provavelmente relacionado a resposta de vias angiogênicas; o fator de transcrição tipo *zinc finger* WT1 (*Wilms' tumor transcription factor*) (Moore, *et al.*, 1999; Carmona, *et al.*, 2001; Perez-Pomares, *et al.*, 2002b), e a enzima chave na síntese de AR, a RALDH2<sup>3</sup> (Moss, *et al.*, 1998; Xavier-Neto, *et al.*, 2000); além de uma série de moléculas de adesão como Bves (Reese, *et al.*, 1999), e a subunidade  $\alpha$ -4 de integrina (Yang, *et al.*, 1995). Embora alguns destes

---

<sup>3</sup> Enquanto em embriões de aves a expressão de *raldh2* pode ser observada já no proepicárdio (Xavier-Neto, *et al.*, 2000), em embriões de camundongos esta expressão somente é aparente no epicárdio (Moss, *et al.*, 1998).

genes sejam apenas marcadores do fenótipo indiferenciado ou efetores da interação adesiva entre epicárdio e miocárdio, é possível que RALDH2 e WT1 estejam envolvidos na manutenção do estágio indiferenciado ou na regulação da diferenciação das células derivadas do PE. (Perez-Pomares, *et al.*, 2002b; Guadix, *et al.*, 2006).

O WT1 é um fator de transcrição do tipo “dedos de zinco”, identificado como fator candidato no desenvolvimento de um tumor pediátrico renal de alta frequência (Little, *et al.*, 1999; Lee e Haber, 2001; Roberts, 2005; Scholz e Kirschner, 2005). Durante o desenvolvimento embrionário, o wt1 apresenta uma ampla expressão gênica, estando envolvido na formação dos rins, de neurônios, da glândula adrenal e do epicárdio (Moore, *et al.*, 1999; Roberts, 2005). Em animais deficientes na expressão de wt1, além da má formação de outros órgãos, há diferenciação prematura para músculo liso e crescimento insuficiente da circulação coronária (Moore, *et al.*, 1999).

Embora animais deficientes para raldh2 pereçam antes do estágio de desenvolvimento das coronárias, há evidências múltiplas na literatura de que o AR é necessário para o desenvolvimento coronário. Animais deficientes em raldh2 apresentam um defeito endotelial intrínseco e animais *knockout* para RXR $\alpha$  apresentam um menor número de ilhotas endoteliais no coração (Chen, *et al.*, 2002).

Evidências circunstanciais para esta hipótese também são encontradas nos padrões de expressão destes genes durante o desenvolvimento coronário. Assim, observa-se uma forte expressão de WT1 no PE, no epicárdio, nas células subepicárdicas, e nas células que invadem o miocárdio. É observado um gradiente decrescente de expressão da face epicárdica do coração (zona compacta) até a face endocárdica do coração (zona trabeculada), onde poucas células WT1-positivas são encontradas. Isso indica que à medida que as células derivadas do epicárdio entram em processo de diferenciação, a expressão de WT1 é progressivamente perdida (Perez-Pomares, *et al.*, 2002b). Paralelamente, a expressão de RALDH2 foi demonstrada no PE (em embriões de aves), no epicárdio e nas células derivadas em um padrão muito semelhante ao de WT1, criando assim, no espaço subepicárdico, um ambiente rico em AR. A exemplo do que ocorre com



WT1, a expressão de RALDH2 também se reduz à medida em que os precursores epicárdicos penetram no coração e ativam a expressão de marcadores de diferenciação (Perez-Pomares, *et al.*, 2002b).

### **1.4.3 Diferenciação dos precursores coronários**

O processo de diferenciação dos precursores coronários tem início após a transformação epitélio-mesenquimal e o povoamento do espaço subepicárdico e do miocárdio pelas células derivadas do epicárdio. Atualmente, existem elementos suficientes para se acreditar que os precursores coronários atuam de maneira semelhante a progenitores vasculares bipotenciais (endoteliais/musculares lisos). Neste modelo os fatores de crescimento VEGF e PDGF seriam cruciais na decisão do destino a ser tomado por estas células (Munoz-Chapuli, *et al.*, 2002; Guadix, *et al.*, 2006).

A hipótese de que as células derivadas do epicárdio atuam pelo menos como progenitores bipotenciais é reforçada por dados onde progenitores derivados de células tronco e positivos para a expressão do receptor de VEGF, FLK1, seriam responsivos tanto a VEGF, quanto a PDGF. Ainda neste modelo, estes fatores seriam responsáveis pelo destino destes precursores, endotelial ou muscular liso, respectivamente. Quando cultivados na presença de VEGF, os progenitores se diferenciam em células endoteliais, enquanto que, quando cultivados na presença de PDGF ou soro, as células sofrem diferenciação a células musculares lisas (Yamashita, *et al.*, 2000). Consistente com esta hipótese, recentemente foi demonstrada a co-expressão de receptores de VEGF e PDGF nas células proepicárdicas e epicárdicas (Guadix, *et al.*, 2006).

### 1.4.3.1 Diferenciação endotelial

A diferenciação dos precursores coronários ao fenótipo endotelial está intimamente relacionada ao espessamento da parede do miocárdio e a conseqüente hipóxia deste tecido (Yue e Tomanek, 1999). Assim, a proliferação dos cardiomiócitos e o aumento da espessura do miocárdio, estimulada indiretamente pela sinalização por AR via epicárdio, torna insuficiente a difusão de oxigênio a partir do endocárdio. O desencadeamento da hipóxia do tecido em proliferação leva a expressão de HIF (*Hipoxia Inducible Factor*) um fator de transcrição que tem como alvo, entre outros genes, o vegf (Tomanek e Zheng, 2002). Diversas evidências suportam esta hipótese. Assim, foi demonstrado que, em cultura, a hipóxia leva a um aumento na proliferação e migração de células endoteliais a partir de um explante cardíaco. Ademais este efeito pode ser parcialmente abolido pela inibição da sinalização por VEGF (Yue e Tomanek, 1999). Este efeito vasculogênico sobre o explante cardíaco é também observado pela adição de VEGF e/ou FGF-2 em cultura (Tomanek, *et al.*, 2001b; Zheng, *et al.*, 2001; Tomanek, *et al.*, 2002). A ação destes fatores sobre o desenvolvimento coronário parece ser interdependente uma vez que a inibição da ação de um bloqueia o efeito vasculogênico do outro (Tomanek, *et al.*, 2001b).

Outro papel importante do VEGF durante o desenvolvimento vascular está relacionado à aquisição da identidade vascular. A sinalização por VEGF atua positivamente sobre a expressão de genes da família notch que por sua vez ativa a expressão de eprinB2 definindo a diferenciação arterial (Lawson, *et al.*, 2002). Por sua vez, em células endoteliais venosas expressão de notch é inibida por COUP-TFII, que ativa EphB4 e a diferenciação venosa (You, *et al.*, 2005). É interessante notar que o nível de expressão de VEGF no coração tubular de ratos é maior na zona compacta do miocárdio justamente onde ocorre a diferenciação arterial (Tomanek, *et al.*, 1999).

Recentemente foi demonstrado que durante o desenvolvimento coronário diferentes isoformas de VEGF participam do processo de aquisição da identidade vascular. Neste modelo as artérias, que se formam na zona compacta do miocárdio, sofrem a influencia dos altos níveis de expressão local de VEGF, principalmente a

isoforma pouco solúvel VEGF164, desencadeando a cascata de diferenciação arterial. Por outro lado, as veias, que se formam no espaço subepicárdico, sofreriam a influencia da isoforma VEGF120 altamente solúvel e de baixa expressão o que resultaria em baixos níveis de NOTCH pela ativação de COUP-TFII e expressão de EphB4 (van den Akker, *et al.*, 2008).

#### 1.4.3.2 Diferenciação de CoSMC

A diferenciação a CoSMC e sua incorporação à parede do vaso é tardia durante o desenvolvimento coronário. Como descrito anteriormente, CoSMC são identificadas no coração apenas após a ligação da malha coronária ao tronco da aorta (Vrancken Peeters, *et al.*, 1997a; Vrancken Peeters, *et al.*, 1997b). Este fato levou a formulação de um modelo onde o aumento de pressão sofrido pelas células endoteliais com a ligação a circulação sistêmica levaria a produção de fatores indutores da diferenciação muscular lisa (Vrancken Peeters, *et al.*, 1997b).

Entretanto, ainda hoje os eventos relacionados com a diferenciação muscular lisa não estão completamente elucidados. Isso ocorre em parte porque precursores de CoSMC parecem ser regulados de maneira diferente de outras células musculares lisas. Assim, enquanto é descrito que o PDGF-BB atua na maioria das células musculares lisas como um potente mitógeno responsável pela perda de expressão de diversos marcadores específicos desta linhagem (Dandre e Owens, 2004), em precursores coronários este fator é responsável pela indução da transformação epitélio-mesenquimal e pela promoção de moléculas marcadoras como calponina, SM22 $\alpha$  e SM $\gamma$ A (Lu, *et al.*, 2001). Ao encontro destes dados, recentemente foi descrito que camundongos deficientes do receptor PDGFR $\beta$  apresentam uma série de alterações coronárias incluindo a completa ausência de CoSMC (Mellgren, *et al.*, 2008).

Outro fator que parece possuir um efeito semelhante nos precursores coronários é o TGF $\beta$ . É descrito que o tratamento com TGF $\beta$  leva a perda de características epiteliais e a diferenciação a CoSMC em culturas primárias e

imortalizadas de células derivadas do epicárdio (Compton, *et al.*, 2006; Austin, *et al.*, 2008). Ainda, camundongos com deleção do receptor TGF $\beta$ R3 apresentam defeitos severos no desenvolvimento coronário (Compton, *et al.*, 2007).

De uma maneira geral todas estas vias de sinalização e diferenciação de CoSMC parecem convergir na sinalização via SRF uma vez que tratamentos de explantes de PE com dominantes negativos para este fator bloquearam a expressão de marcadores como calponina, SM22 $\alpha$  e SM $\gamma$ A sem haver porém, o bloqueio da transformação epitélio-mesenquimal (Landerholm, *et al.*, 1999).

### **1.5 Organização temporal da diferenciação de precursores coronários: busca por mecanismos de controle da diferenciação a CoSMC**

Apesar do crescente número de publicações relativas ao processo de diferenciação dos precursores coronários a CoSMC pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos no controle desta diferenciação. Com isso, o marcante atraso fisiológico entre a formação de tubos endoteliais e a diferenciação de CoSMC se mantém como um dos pontos menos compreendidos do desenvolvimento coronário. Assim, enquanto *in vivo* a diferenciação muscular lisa somente é aparente após uma extensiva formação de tubos endoteliais (Vrancken Peeters, *et al.*, 1997a; Vrancken Peeters, *et al.*, 1997b), uma série de fatos indicam a existência de um mecanismo ativo no coração embrionário que visa controlar a diferenciação muscular lisa precoce permitindo a formação e o estabelecimento de uma vasta malha vascular. Entre estes, pode-se citar: (1) quando o PE é removido do organismo, e cultivado, uma maciça diferenciação a CoSMC é observada (Landerholm, *et al.*, 1999); (2) fatores necessários à expressão de marcadores da linhagem muscular lisa estão presentes no coração embrionário em estágios precoces ao início da diferenciação muscular lisa (Van Den Akker, *et al.*, 2005; Nosedá, *et al.*, 2006). Estes indícios nos levaram a questionar quais os mecanismos responsáveis por controlar a diferenciação muscular lisa durante o desenvolvimento embrionário.

Neste contexto, acreditamos que o controle sobre a diferenciação muscular lisa dos precursores coronários pode ser resultado do equilíbrio entre fatores característicos da célula no seu estado indiferenciado e fatores diretamente relacionados à sua diferenciação a um dos diferentes fenótipos assumidos pelas células derivadas do PE. Com base nisso, neste trabalho nós buscamos identificar os mecanismos responsáveis por, durante o desenvolvimento coronário, inibir a diferenciação muscular lisa destes precursores permitindo, com isso, a formação prévia de tubos endoteliais.

Nossos candidatos a efetores neste controle foram selecionados a partir da observação das duas maiores decisões a serem tomadas pelas células derivadas do epicárdio: a manutenção de um estado indiferenciado e a “escolha” de qual rota de diferenciação a ser seguida, a endotelial ou a muscular lisa. Assim, neste trabalho, avaliamos o papel de duas moléculas no controle da diferenciação a CoSMC: (1) o AR, molécula apontada como participante da via de manutenção do estado indiferenciado dos precursores coronários (Perez-Pomares, *et al.*, 2002b), e (2) o VEGF, amplamente reconhecido como forte indutor do fenótipo endotelial (Tomanek, *et al.*, 2002). A avaliação do papel destes dois fatores em abordagens *in vivo* e *in vitro* nos permitiu o desenvolvimento de um modelo sólido dos mecanismos de controle sobre a diferenciação a CoSMC, preenchendo uma lacuna no conhecimento do processo de desenvolvimento coronário e fornecendo bases para a sua aplicação em modelos de revascularização cardíaca.

## **2 CONCLUSÕES**

- Características típicas das células do PE, como formação de monocamada, presença de estruturas migratórias e expressão de citoqueratina, são mantidas no PE em cultura. Entretanto, a cultura do PE é marcada por uma diferenciação precoce de precursores coronários ao fenótipo CoSMC. De acordo com a expressão do marcador SM $\alpha$ A dois fenótipos de CoSMC são reconhecidos: o fenótipo periférico e o fenótipo denso.
- A existência de um controle sobre a diferenciação muscular lisa *in vivo* é reforçada pelo baixo grau de diferenciação muscular lisa encontrado quando o PE é co-cultivado sobre uma monocamada de cardiomiócitos. Este sistema de co-cultura parece manter a célula do PE em um ambiente mais próximo ao observado *in vivo* orientando-a a diferenciação endotelial.
- O AR atua sobre os precursores coronários *in vitro* inibindo a expressão de SM $\alpha$ A. A redução da expressão de SM $\alpha$ A na cultura do PE após a suplementação com AR é decorrente de um bloqueio da diferenciação muscular lisa uma vez que o AR não apresenta nenhum efeito sobre a proliferação de CoSMC ou sobre a morte celular programada dos precursores coronários.
- A importância da sinalização por AR *in vivo* foi demonstrada pela diferenciação precoce dos precursores coronários a CoSMC no subepicárdio em decorrência da inibição da via de síntese deste morfógeno. Esta diferenciação precoce a CoSMC foi acompanhada da redução da expressão de citoqueratina.
- A ativação da via de sinalização autócrina de AR, através da super-expressão de RALDH2 (AdRaldh2eGFP) e da suplementação com precursores da via de síntese de AR inibe a diferenciação muscular lisa dos precursores coronários.

- O AR inibe a diferenciação muscular lisa dos precursores coronários através da sua ação em duas etapas consecutivas da diferenciação dos precursores coronários.
- Outro mecanismo embrionário de controle sobre a diferenciação muscular lisa de precursores coronários é controlado pelo fator de crescimento VEGF, uma vez que tanto a suplementação com este fator quanto a sua expressão forçada são responsáveis por uma diminuição do número de CoSMC em cultura.
- Em resumo acreditamos que a célula mesenquimal derivada do epicárdio tem a sua diferenciação muscular lisa bloqueada durante os estágios iniciais do desenvolvimento coronário em decorrência dos altos níveis de produção de AR, pela expressão de RALDH2 por células do epicárdio e dele derivadas, e de pela produção de VEGF pelo miocárdio. Assim, o AR e o VEGF controlam a diferenciação dos precursores coronários permitindo a formação inicial de uma vasta malha vascular acompanhada tardiamente pela diferenciação de CoSMC que passam a compor a parede do vaso.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

<sup>4</sup>Abu-Abed S, Dolle P, Metzger D, Beckett B, Chambon P, Petkovich M. The retinoic acid-metabolizing enzyme, CYP26A1, is essential for normal hindbrain patterning, vertebral identity, and development of posterior structures. *Genes Dev.* 2001;15(2):226-40.

Aikawa E, Kawano J. Formation of coronary arteries sprouting from the primitive aortic sinus wall of the chick embryo. *Experientia.* 1982;38(7):816-8.

Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1269-304.

Austin AF, Compton LA, Love JD, Brown CB, Barnett JV. Primary and immortalized mouse epicardial cells undergo differentiation in response to TGFbeta. *Dev Dyn.* 2008;237(2):366-76.

Azambuja AP. Um modelo de cultura para precursores coronários [Mestrado]. Curitiba: UFPR; 2006.

Becker C, Lacchini S, Muotri AR, da Silva GJ, Castelli JB, Vassallo PF, et al. Skeletal muscle cells expressing VEGF induce capillary formation and reduce cardiac injury in rats. *Int J Cardiol.* 2006;113(3):348-54.

Bogers AJ, Gittenberger-de Groot AC, Dubbeldam JA, Huysmans HA. The inadequacy of existing theories on development of the proximal coronary arteries and their connexions with the arterial trunks. *Int J Cardiol.* 1988;20(1):117-23.

Bogers AJ, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Peault BM, Huysmans HA. Development of the origin of the coronary arteries, a matter of ingrowth or outgrowth? *Anat Embryol (Berl).* 1989;180(5):437-41.

Bohnsack BL, Hirschi KK. Red light, green light: signals that control endothelial cell proliferation during embryonic vascular development. *Cell Cycle.* 2004;3(12):1506-11.

Bohnsack BL, Lai L, Dolle P, Hirschi KK. Signaling hierarchy downstream of retinoic acid that independently regulates vascular remodeling and endothelial cell proliferation. *Genes Dev.* 2004;18(11):1345-58.

Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol.* 2003;258(1):1-19.

Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, et al. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature.* 2008;454(7200):104-8.

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 1996;380(6573):435-9.

Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Macias D, Perez-Pomares JM, Garcia-Garrido L, Munoz-Chapuli R. Immunolocalization of the transcription factor Slug in the developing avian heart. *Anat Embryol (Berl).* 2000;201(2):103-9.

---

<sup>4</sup> De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Carmona R, Gonzalez-Iriarte M, Perez-Pomares JM, Munoz-Chapuli R. Localization of the Wilm's tumour protein WT1 in avian embryos. *Cell Tissue Res.* 2001;303(2):173-86.

Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 1996;10(9):940-54.

Chen J, Kubalak SW, Chien KR. Ventricular muscle-restricted targeting of the RXRalpha gene reveals a non-cell-autonomous requirement in cardiac chamber morphogenesis. *Development.* 1998;125(10):1943-9.

Chen TH, Chang TC, Kang JO, Choudhary B, Makita T, Tran CM, et al. Epicardial induction of fetal cardiomyocyte proliferation via a retinoic acid-inducible trophic factor. *Dev Biol.* 2002;250(1):198-207.

Compton LA, Potash DA, Mundell NA, Barnett JV. Transforming growth factor-beta induces loss of epithelial character and smooth muscle cell differentiation in epicardial cells. *Dev Dyn.* 2006;235(1):82-93.

Compton LA, Potash DA, Brown CB, Barnett JV. Coronary vessel development is dependent on the type III transforming growth factor beta receptor. *Circ Res.* 2007;101(8):784-91.

Crispino JD, Lodish MB, Thurberg BL, Litovsky SH, Collins T, Molkentin JD, et al. Proper coronary vascular development and heart morphogenesis depend on interaction of GATA-4 with FOG cofactors. *Genes Dev.* 2001;15(7):839-44.

Cui J, Michaille JJ, Jiang W, Zile MH. Retinoid receptors and vitamin A deficiency: differential patterns of transcription during early avian development and the rapid induction of RARs by retinoic acid. *Dev Biol.* 2003;260(2):496-511.

Dandre F, Owens GK. Platelet-derived growth factor-BB and Ets-1 transcription factor negatively regulate transcription of multiple smooth muscle cell differentiation marker genes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(6):H2042-51.

Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell.* 1996;87(7):1161-9.

DeRuiter MC, Poelmann RE, VanderPlas-de Vries I, Mentink MM, Gittenberger-de Groot AC. The development of the myocardium and endocardium in mouse embryos. Fusion of two heart tubes? *Anat Embryol (Berl).* 1992;185(5):461-73.

Dettman RW, Denetclaw W, Jr., Ordahl CP, Bristow J. Common epicardial origin of coronary vascular smooth muscle, perivascular fibroblasts, and intermyocardial fibroblasts in the avian heart. *Dev Biol.* 1998;193(2):169-81.

Dimmeler S, Zeiher AM. Cell Therapy of Acute Myocardial Infarction: Open Questions. *Cardiology.* 2009;113):155-60.

Dolle P, Fraulob V, Kastner P, Chambon P. Developmental expression of murine retinoid X receptor (RXR) genes. *Mech Dev.* 1994;45(2):91-104.

Du KL, Ip HS, Li J, Chen M, Dandre F, Yu W, et al. Myocardin is a critical serum response factor cofactor in the transcriptional program regulating smooth muscle cell differentiation. *Mol Cell Biol*. 2003;23(7):2425-37.

Duband JL, Monier F, Delannet M, Newgreen D. Epithelium-mesenchyme transition during neural crest development. *Acta Anat (Basel)*. 1995;154(1):63-78.

Duncan SA. Mechanisms controlling early development of the liver. *Mech Dev*. 2003;120(1):19-33.

Eralp I, Lie-Venema H, Bax NA, Wijffels MC, Van Der Laarse A, Deruiter MC, et al. Epicardium-derived cells are important for correct development of the Purkinje fibers in the avian heart. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2006;288(12):1272-80.

Farmer CG. Evolution of the vertebrate cardio-pulmonary system. *Annu Rev Physiol*. 1999;61(573-92).

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996;380(6573):439-42.

Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol*. 1997;173(2):206-10.

Folkman J, D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*. 1996;87(7):1153-5.

Gannon M, Bader D. Initiation of cardiac differentiation occurs in the absence of anterior endoderm. *Development*. 1995;121(8):2439-50.

Gittenberger-de Groot AC, Vrancken Peeters MP, Mentink MM, Gourdie RG, Poelmann RE. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res*. 1998;82(10):1043-52.

Guadix JA, Carmona R, Munoz-Chapuli R, Perez-Pomares JM. In vivo and in vitro analysis of the vasculogenic potential of avian proepicardial and epicardial cells. *Dev Dyn*. 2006.

Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*. 1951;88:49-92.

Hatcher CJ, Diman NY, Kim MS, Pennisi D, Song Y, Goldstein MM, et al. A role for Tbx5 in proepicardial cell migration during cardiogenesis. *Physiol Genomics*. 2004;18(2):129-40.

Hirakow R. Development of the cardiac blood vessels in staged human embryos. *Acta Anat (Basel)*. 1983;115(3):220-30.

Hochgreb T, Linhares VL, Menezes DC, Sampaio AC, Yan CY, Cardoso WV, et al. A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. *Development*. 2003;130(22):5363-74.

Holland LZ, Holland ND. Expression of AmphiHox-1 and AmphiPax-1 in amphioxus embryos treated with retinoic acid: insights into evolution and patterning of the chordate nerve cord and pharynx. *Development*. 1996;122(6):1829-38.

Hutchins GM, Kessler-Hanna A, Moore GW. Development of the coronary arteries in the embryonic human heart. *Circulation*. 1988;77(6):1250-7.

Ishii Y, Langberg JD, Hurtado R, Lee S, Mikawa T. Induction of proepicardial marker gene expression by the liver bud. *Development*. 2007;134(20):3627-37.

Kalman F, Viragh S, Modis L. Cell surface glycoconjugates and the extracellular matrix of the developing mouse embryo epicardium. *Anat Embryol (Berl)*. 1995;191(5):451-64.

Kastner P, Messaddeq N, Mark M, Wendling O, Grondona JM, Ward S, et al. Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. *Development*. 1997;124(23):4749-58.

Katz SG, Williams A, Yang J, Fujiwara Y, Tsang AP, Epstein JA, et al. Endothelial lineage-mediated loss of the GATA cofactor Friend of GATA 1 impairs cardiac development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(24):14030-5.

Kaufman MH, Navaratnam V. Early differentiation of the heart in mouse embryos. *J Anat*. 1981;133(Pt 2):235-46.

Kirby ML, Waldo KL. Neural crest and cardiovascular patterning. *Circ Res*. 1995;77(2):211-5.

Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene Tbx18. *Mech Dev*. 2001;100(1):83-6.

Kruithof BP, van Wijk B, Somi S, Kruithof-de Julio M, Perez Pomares JM, Weesie F, et al. BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Dev Biol*. 2006;295(2):507-22.

Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, Stewart CL, Buck C, Buck CA, et al. Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development*. 1995;121(2):489-503.

Lai L, Bohnsack BL, Niederreither K, Hirschi KK. Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis. *Development*. 2003;130(26):6465-74.

Landerholm TE, Dong XR, Lu J, Belaguli NS, Schwartz RJ, Majesky MW. A role for serum response factor in coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells. *Development*. 1999;126(10):2053-62.

Lavine KJ, Yu K, White AC, Zhang X, Smith C, Partanen J, et al. Endocardial and epicardial derived FGF signals regulate myocardial proliferation and differentiation in vivo. *Dev Cell*. 2005;8(1):85-95.

Lavine KJ, White AC, Park C, Smith CS, Choi K, Long F, et al. Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development. *Genes Dev*. 2006;20(12):1651-66.

Lavine KJ, Long F, Choi K, Smith C, Ornitz DM. Hedgehog signaling to distinct cell types differentially regulates coronary artery and vein development. *Development*. 2008;135(18):3161-71.

Lawson ND, Vogel AM, Weinstein BM. sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation. *Dev Cell*. 2002;3(1):127-36.

Lawson ND, Weinstein BM. Arteries and veins: making a difference with zebrafish. *Nat Rev Genet*. 2002;3(9):674-82.

Lee SB, Haber DA. Wilms tumor and the WT1 gene. *Exp Cell Res*. 2001;264(1):74-99.

Lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet*. 2001;2(10):743-55.

Lie-Venema H, Gittenberger-de Groot AC, van Empel LJ, Boot MJ, Kerkdijk H, de Kant E, et al. Ets-1 and Ets-2 transcription factors are essential for normal coronary and myocardial development in chicken embryos. *Circ Res*. 2003;92(7):749-56.

Lie-Venema H, Eralp I, Maas S, Gittenberger-De Groot AC, Poelmann RE, DeRuiter MC. Myocardial heterogeneity in permissiveness for epicardium-derived cells and endothelial precursor cells along the developing heart tube at the onset of coronary vascularization. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2005;282(2):120-9.

Linask KK, Knudsen KA, Gui YH. N-cadherin-catenin interaction: necessary component of cardiac cell compartmentalization during early vertebrate heart development. *Dev Biol*. 1997;185(2):148-64.

Little M, Holmes G, Walsh P. WT1: what has the last decade told us? *Bioessays*. 1999;21(3):191-202.

Lu J, Landerholm TE, Wei JS, Dong XR, Wu SP, Liu X, et al. Coronary smooth muscle differentiation from proepicardial cells requires rhoA-mediated actin reorganization and p160 rho-kinase activity. *Dev Biol*. 2001;240(2):404-18.

Macias D, Perez-Pomares JM, Garcia-Garrido L, Carmona R, Munoz-Chapuli R. Immunoreactivity of the ets-1 transcription factor correlates with areas of epithelial-mesenchymal transition in the developing avian heart. *Anat Embryol (Berl)*. 1998;198(4):307-15.

Manner J. The development of pericardial villi in the chick embryo. *Anat Embryol (Berl)*. 1992;186(4):379-85.

Manner J. Experimental study on the formation of the epicardium in chick embryos. *Anat Embryol (Berl)*. 1993;187(3):281-9.

Manner J. Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *Anat Rec*. 2000;259(3):248-62.

Manner J, Perez-Pomares JM, Macias D, Munoz-Chapuli R. The origin, formation and developmental significance of the epicardium: a review. *Cells Tissues Organs*. 2001;169(2):89-103.

Manner J, Schlueter J, Brand T. Experimental analyses of the function of the proepicardium using a new microsurgical procedure to induce loss-of-proepicardial-function in chick embryos. *Dev Dyn*. 2005;233(4):1454-63.

Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev.* 2001;15(3):316-27.

Mellgren AM, Smith CL, Olsen GS, Eskiocak B, Zhou B, Kazi MN, et al. Platelet-derived growth factor receptor beta signaling is required for efficient epicardial cell migration and development of two distinct coronary vascular smooth muscle cell populations. *Circ Res.* 2008;103(12):1393-401.

Mikawa T, Fischman DA. Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(20):9504-8.

Mikawa T, Gourdie RG. Pericardial mesoderm generates a population of coronary smooth muscle cells migrating into the heart along with ingrowth of the epicardial organ. *Dev Biol.* 1996;174(2):221-32.

Mikawa T. Cardiac lineages. In: Harvey RP, Rosenthal N, editors. *Heart Development*. San Diego: Academic Press; 1998.

Molotkov A, Fan X, Deltour L, Foglio MH, Martras S, Farres J, et al. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(8):5337-42.

Moore AW, McInnes L, Kreidberg J, Hastie ND, Schedl A. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. *Development.* 1999;126(9):1845-57.

Morabito CJ, Dettman RW, Kattan J, Collier JM, Bristow J. Positive and negative regulation of epicardial-mesenchymal transformation during avian heart development. *Dev Biol.* 2001;234(1):204-15.

Moss JB, Xavier-Neto J, Shapiro MD, Nayeem SM, McCaffery P, Drager UC, et al. Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* 1998;199(1):55-71.

Munoz-Chapuli R, Gonzalez-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, Macias D, Perez-Pomares JM. Cellular precursors of the coronary arteries. *Tex Heart Inst J.* 2002;29(4):243-9.

Nahirney PC, Mikawa T, Fischman DA. Evidence for an extracellular matrix bridge guiding proepicardial cell migration to the myocardium of chick embryos. *Dev Dyn.* 2003;227(4):511-23.

Niederreither K, McCaffery P, Drager UC, Chambon P, Dolle P. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev.* 1997;62(1):67-78.

Niederreither K, Subbarayan V, Dolle P, Chambon P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet.* 1999;21(4):444-8.

Niederreither K, Abu-Abed S, Schuhbaur B, Petkovich M, Chambon P, Dolle P. Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nat Genet.* 2002;31(1):84-8.

Nosedá M, Fu Y, Niessen K, Wong F, Chang L, McLean G, et al. Smooth Muscle  $\alpha$ -actin is a direct target of Notch/CSL. *Circ Res*. 2006;98(12):1468-70.

Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*. 2004;84(3):767-801.

Perez-Pomares JM, Macías D, García-Garrido L, Muñoz-Chapulí R. Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Dev Dyn*. 1997;210(2):96-105.

Perez-Pomares JM, Macías D, García-Garrido L, Muñoz-Chapulí R. The origin of the subepicardial mesenchyme in the avian embryo: an immunohistochemical and quail-chick chimera study. *Dev Biol*. 1998;200(1):57-68.

Perez-Pomares JM, Carmona R, González-Iriarte M, Atencia G, Wessels A, Muñoz-Chapulí R. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol*. 2002a;46(8):1005-13.

Perez-Pomares JM, Phelps A, Sedmerova M, Carmona R, González-Iriarte M, Muñoz-Chapulí R, et al. Experimental studies on the spatiotemporal expression of WT1 and RALDH2 in the embryonic avian heart: a model for the regulation of myocardial and valvuloseptal development by epicardially derived cells (EPDCs). *Dev Biol*. 2002b;247(2):307-26.

Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MM, Bokenkamp R, Hogers B. Development of the cardiac coronary vascular endothelium, studied with antiendothelial antibodies, in chicken-quail chimeras. *Circ Res*. 1993;73(3):559-68.

Reese DE, Zavaljevski M, Streiff NL, Bader D. bves: A novel gene expressed during coronary blood vessel development. *Dev Biol*. 1999;209(1):159-71.

Reinecke H, Minami E, Zhu WZ, Laflamme MA. Cardiogenic differentiation and transdifferentiation of progenitor cells. *Circ Res*. 2008;103(10):1058-71.

Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Neth Heart J*. 2007;15(3):100-8.

Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1995;11(73-91).

Robb L, Mifsud L, Hartley L, Biben C, Copeland NG, Gilbert DJ, et al. epicardin: A novel basic helix-loop-helix transcription factor gene expressed in epicardium, branchial arch myoblasts, and mesenchyme of developing lung, gut, kidney, and gonads. *Dev Dyn*. 1998;213(1):105-13.

Roberts SG. Transcriptional regulation by WT1 in development. *Curr Opin Genet Dev*. 2005;15(5):542-7.

Rossant J, Zirngibl R, Cado D, Shago M, Giguere V. Expression of a retinoic acid response element-hsp $\beta$  transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev*. 1991;5(8):1333-44.

Scholz H, Kirschner KM. A role for the Wilms' tumor protein WT1 in organ development. *Physiology (Bethesda)*. 2005;20:54-9.



Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev.* 1997;11(4):451-62.

Simoes-Costa MS, Azambuja AP, Xavier-Neto J. The search for non-chordate retinoic acid signaling: lessons from chordates. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2008;310(1):54-72.

Smart N, Riley PR. Derivation of epicardium-derived progenitor cells (EPDCs) from adult epicardium. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2009;Chapter 2(Unit2C

Stern CD. *Gastrulation: from cells to embryo.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press; 2004.

Stuckmann I, Evans S, Lassar AB. Erythropoietin and retinoic acid, secreted from the epicardium, are required for cardiac myocyte proliferation. *Dev Biol.* 2003;255(2):334-49.

Subbarayan V, Mark M, Messadeq N, Rustin P, Chambon P, Kastner P. RXRalpha overexpression in cardiomyocytes causes dilated cardiomyopathy but fails to rescue myocardial hypoplasia in RXRalpha-null fetuses. *J Clin Invest.* 2000;105(3):387-94.

Sucov HM, Dyson E, Gumeringer CL, Price J, Chien KR, Evans RM. RXR alpha mutant mice establish a genetic basis for vitamin A signaling in heart morphogenesis. *Genes Dev.* 1994;8(9):1007-18.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 1996;87(7):1171-80.

Tevosian SG, Deconinck AE, Tanaka M, Schinke M, Litovsky SH, Izumo S, et al. FOG-2, a cofactor for GATA transcription factors, is essential for heart morphogenesis and development of coronary vessels from epicardium. *Cell.* 2000;101(7):729-39.

Tickle C, Alberts B, Wolpert L, Lee J. Local application of retinoic acid to the limb bud mimics the action of the polarizing region. *Nature.* 1982;296(5857):564-6.

Tomanek RJ, Ratajska A, Kitten GT, Yue X, Sandra A. Vascular endothelial growth factor expression coincides with coronary vasculogenesis and angiogenesis. *Dev Dyn.* 1999;215(1):54-61.

Tomanek RJ, Sandra A, Zheng W, Brock T, Bjercke RJ, Holifield JS. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor differentially modulate early postnatal coronary angiogenesis. *Circ Res.* 2001a;88(11):1135-41.

Tomanek RJ, Zheng W, Peters KG, Lin P, Holifield JS, Suvarna PR. Multiple growth factors regulate coronary embryonic vasculogenesis. *Dev Dyn.* 2001b;221(3):265-73.

Tomanek RJ, Holifield JS, Reiter RS, Sandra A, Lin JJ. Role of VEGF family members and receptors in coronary vessel formation. *Dev Dyn.* 2002;225(3):233-40.

Tomanek RJ, Zheng W. Role of growth factors in coronary morphogenesis. *Tex Heart Inst J.* 2002;29(4):250-4.

Tran CM, Sucov HM. The RXRalpha gene functions in a non-cell-autonomous manner during mouse cardiac morphogenesis. *Development.* 1998;125(10):1951-6.

Van Den Akker NM, Lie-Venema H, Maas S, Eralp I, DeRuiter MC, Poelmann RE, et al. Platelet-derived growth factors in the developing avian heart and maturing coronary vasculature. *Dev Dyn*. 2005;233(4):1579-88.

van den Akker NM, Caolo V, Wisse LJ, Peters PP, Poelmann RE, Carmeliet P, et al. Developmental coronary maturation is disturbed by aberrant cardiac vascular endothelial growth factor expression and Notch signalling. *Cardiovasc Res*. 2008;78(2):366-75.

van Genderen HO, Kenis H, Hofstra L, Narula J, Reutelingsperger CP. Extracellular annexin A5: functions of phosphatidylserine-binding and two-dimensional crystallization. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1783(6):953-63.

Viragh S, Challice CE. The origin of the epicardium and the embryonic myocardial circulation in the mouse. *Anat Rec*. 1981;201(1):157-68.

Viragh S, Gittenberger-de Groot AC, Poelmann RE, Kalman F. Early development of quail heart epicardium and associated vascular and glandular structures. *Anat Embryol (Berl)*. 1993;188(4):381-93.

Vrancken Peeters MP, Mentink MM, Poelmann RE, Gittenberger-de Groot AC. Cytokeratins as a marker for epicardial formation in the quail embryo. *Anat Embryol (Berl)*. 1995;191(6):503-8.

Vrancken Peeters MP, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MM, Hungerford JE, Little CD, Poelmann RE. Differences in development of coronary arteries and veins. *Cardiovasc Res*. 1997a;36(1):101-10.

Vrancken Peeters MP, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MM, Hungerford JE, Little CD, Poelmann RE. The development of the coronary vessels and their differentiation into arteries and veins in the embryonic quail heart. *Dev Dyn*. 1997b;208(3):338-48.

Vrancken Peeters MP, Gittenberger-de Groot AC, Mentink MM, Poelmann RE. Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium. *Anat Embryol (Berl)*. 1999;199(4):367-78.

Wada AM, Reese DE, Bader DM. Bves: prototype of a new class of cell adhesion molecules expressed during coronary artery development. *Development*. 2001;128(11):2085-93.

Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*. 1998;93(5):741-53.

Wang Z, Wang DZ, Hockemeyer D, McAnally J, Nordheim A, Olson EN. Myocardin and ternary complex factors compete for SRF to control smooth muscle gene expression. *Nature*. 2004;428(6979):185-9.

Watt AJ, Battle MA, Li J, Duncan SA. GATA4 is essential for formation of the proepicardium and regulates cardiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(34):12573-8.

Wessels A, Perez-Pomares JM. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004;276(1):43-57.

Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development*. 1999;126(16):3597-605.

- Xavier-Neto J, Shapiro MD, Houghton L, Rosenthal N. Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart. *Dev Biol.* 2000;219(1):129-41.
- Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J. flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development.* 1993;118(2):489-98.
- Yamashita J, Itoh H, Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, et al. Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature.* 2000;408(6808):92-6.
- Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development.* 1995;121(2):549-60.
- Yang K, Doughman YQ, Karunamuni G, Gu S, Yang YC, Bader DM, et al. Expression of active Notch1 in avian coronary development. *Dev Dyn.* 2009;238(1):162-70.
- Yoshida T, Owens GK. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circ Res.* 2005;96(3):280-91.
- You LR, Lin FJ, Lee CT, DeMayo FJ, Tsai MJ, Tsai SY. Suppression of Notch signalling by the COUP-TFII transcription factor regulates vein identity. *Nature.* 2005;435(7038):98-104.
- Yue X, Tomanek RJ. Stimulation of coronary vasculogenesis/angiogenesis by hypoxia in cultured embryonic hearts. *Dev Dyn.* 1999;216(1):28-36.
- Zhao D, McCaffery P, Ivins KJ, Neve RL, Hogan P, Chin WW, et al. Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur J Biochem.* 1996;240(1):15-22.
- Zheng W, Seftor EA, Meininger CJ, Hendrix MJ, Tomanek RJ. Mechanisms of coronary angiogenesis in response to stretch: role of VEGF and TGF-beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(2):H909-17.
- Zhou B, Ma Q, Rajagopal S, Wu SM, Domian I, Rivera-Feliciano J, et al. Epicardial progenitors contribute to the cardiomyocyte lineage in the developing heart. *Nature.* 2008a;454(7200):109-13.
- Zhou B, von Gise A, Ma Q, Rivera-Feliciano J, Pu WT. Nkx2-5- and Isl1-expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008b;375(3):450-3.