

ROBERTA MASCIOLI CRAVO

**CONTROLE DA EXPRESSÃO DO GENE *ALDH1A2* (*RALDH2*) DURANTE O
DESENVOLVIMENTO: UMA ABORDAGEM FILOGENÉTICA**

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
2008

RESUMO

Cravo RM. Controle da expressão do gene *aldh1a2* (*raldh2*) durante o desenvolvimento: uma abordagem filogenética [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

O ácido retinóico (AR) é essencial para a embriogênese. A principal enzima sintetizadora de AR durante o desenvolvimento é a ALDH1A2 (RALDH2), uma retinaldeído desidrogenase que converte retinaldeído a AR. Para entendermos como o gene da *aldh1a2* é regulado identificamos regiões evolutivamente conservadas (ECRs) em vertebrados e testamos seu potencial regulatório. Identificamos uma ECR localizada no intron1 da *aldh1a2*, conservada em anfíbios, aves e mamíferos que atua como um *enhancer* em estruturas derivadas de ectoderme, endoderme e mesoderme. Animais transgênicos transientes e permanentes mostram a ativação desse *enhancer* na região da placa do teto do tubo neural e epicárdio, local onde esse *enhancer* é ativado em células derivadas do órgão pro-epicárdico após o contato e/ou proximidade com células do miocárdio. A identificação de um *enhancer* conservado no gene da *aldh1a2* suporta a idéia de que esse gene possui uma regulação modular e mostra que a abordagem evolutiva é uma eficiente ferramenta para a identificação de mecanismos de controle desse gene.

Palavras-chave: Ácido retinóico, *aldh1a2*, placa do teto, evolução, desenvolvimento, epicárdio, *enhancer*.

ABSTRACT

Cravo RM. Search for regulatory elements in the *aldh1a2* (*raldh2*) gene during development: a phylogenetic approach [Ph.D. Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2008.

Retinoic acid (RA) is essential for embryogenesis. The key RA synthetic enzyme during early development is ALDH1A2 (RALDH2), a retinaldehyde dehydrogenase that converts retinaldehyde into RA. To understand how *aldh1a2* is regulated we screened the gene for evolutionary conserved regions (ECRs) among vertebrates and assayed their regulatory potential. We describe an *aldh1a2* intron 1 ECR (identified as RALDH2.2) that is conserved in amphibians, avians and mammals and acts as an enhancer in derivatives of ectoderm, endoderm and mesoderm. Transient and stable transgenesis in mice reveal strong activity of the *raldh2* intron 1 enhancer at the roof plate of the neural tube and at the growing epicardium. Transgenic mice indicate that the enhancer is activated in proepicardium-derived cells by contact and/or close proximity to the myocardium. The identification of an *aldh1a2* conserved enhancer supports the idea of a modular regulation and shows that the evolutionary approach is an efficient tool to identify control mechanisms of the *aldh1a2* gene.

Key Words: Retinoic acid, *aldh1a2*, roof plate, evolution, development, epicardium, enhancer.

1 INTRODUÇÃO

O ácido retinóico (AR) é fundamental para a embriogenia precoce e a organogênese. O AR está envolvido no estabelecimento do plano corporal e é essencial para a correta especificação e padronização de diversos tecidos tais como medula espinhal, pulmão, broto dos membros, rim, olhos e coração (Conlon, 1995; Niederreither *et al.*, 1999; Niederreither *et al.*, 2000; Malpel *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 1997; Mendelsohn *et al.*, 1999; McCaffery *et al.*, 1999; Moss *et al.*, 1998; Xavier-Neto *et al.*, 2001; Hochgreb *et al.*, 2003; Wilson e Maden, 2005). O excesso de AR causa a posteriorização do embrião, enquanto que a deficiência de AR provoca a anteriorização do mesmo (revisado em Ross *et al.*, 2000; Mark *et al.*, 2006; Marlétaz *et al.*, 2006).

O AR foi um dos primeiros morfógenos a serem identificados. A distribuição de seus locais de síntese e degradação são os principais determinantes de sua cadeia de sinalização. A ativação da sinalização pelo AR começa com a síntese deste morfógeno, que então se difunde estabelecendo gradientes de concentração. A distribuição de enzimas catabólicas limita o campo de células capaz de alterar a sua transcrição em resposta à ativação dos receptores nucleares de AR (revisado em Blomhoff e Blomhoff, 2006). Assim, para entender exatamente como esse morfógeno age, é necessário identificar onde e como o AR é sintetizado e degradado.

A sinalização pelo AR desempenha um importante papel na formação do coração e do tubo neural. No tubo neural, o AR está envolvido na padronização anteroposterior e dorsoventral, na indução da diferenciação neural e na regulação da diferenciação de motoneurônios. O excesso de AR durante o desenvolvimento gera uma série de malformações, incluindo espinha bífida e malformação da notocorda (revisado em Maden, 2006).

Além do tubo neural, o coração é um dos órgãos mais afetados pelas diferentes concentrações de AR durante o desenvolvimento (Kastner *et al.*, 1994). O excesso de AR durante a gestação leva a diversos defeitos cardíacos, tais como transposição das grandes artérias, defeitos na formação dos septos e reversão da lateralidade do coração (Dickman e Smith, 1996). Estudos mais recentes mostram que altas doses de AR levam a hipertrofia dos átrios e a malformação dos ventrículos, enquanto que a privação de AR causa um aumento exagerado no tamanho dos ventrículos e átrios mal desenvolvidos (Xavier-Neto *et al.*, 1999, revisado em Xavier-Neto *et al.*, 2001). O AR está envolvido na padronização

anteroposterior do coração, na formação do epicárdio e da circulação coronariana (Moss *et al.*, 1998; Xavier-Neto *et al.*, 1999; Xavier-Neto *et al.*, 2001, Hochgreb *et al.*, 2003). Nos últimos anos, trabalhos de nosso grupo têm mostrado que o AR e a ALDH1A2 (a principal enzima sintetizadora de AR durante o desenvolvimento) são fundamentais para a formação das câmaras cardíacas e que este é um mecanismo evolutivamente conservado em diferentes espécies (Xavier-Neto *et al.*, 1999; Xavier-Neto *et al.*, 2001, Hochgreb *et al.*, 2003, Simões-Costa *et al.*, 2005). Embora os padrões de expressão da *aldh1a2* já sejam conhecidos, ainda pouco se sabe sobre a regulação deste gene.

Nas próximas seções descreveremos o metabolismo e sinalização do AR, sua ação no tubo neural e coração, sua conservação em diferentes organismos cordados, assim como a importância da *aldh1a2* no desenvolvimento embrionário.

1.1 Metabolismo e sinalização do ácido retinóico

O AR é um composto sintetizado a partir da vitamina A (álcool retinol). Os animais são incapazes de sintetizar vitamina A e obtém retinol através de sua dieta na forma de carotenóides (como β -carotenos que são convertidos, primeiramente em β -apocarotenóides e subsequentemente em AR) ou da mobilização de estoques endógenos (na forma de retinaldeídos ligados a proteínas citoplasmáticas ou na forma de retinil ésteres armazenados, principalmente no fígado) (Lubzens *et al.*, 2003; Irie *et al.*, 2004; revisado em Blomhoff e Blomhoff, 2006 e Simões-Costa *et al.*, 2008). O transporte dos retinóides do seu local de armazenamento para as células ocorre através da corrente sanguínea, onde o retinol é liberado e circula pelo corpo ligado à uma proteína conhecida como *retinol-binding protein* (RBP). Nas células alvo, o complexo retinol-RBP interage com um receptor de superfície celular específico, denominado STRA6 (Kawaguchi *et al.*, 2007) que retira o retinol do complexo retinol-RBP e o transporta através da membrana plasmática até o citoplasma, onde esse é liberado e poderá, então ser metabolizado. Estudos mostram que mutações no gene STRA6 levam a uma série de malformações sistêmicas e são geralmente letais no período perinatal (Pasutto *et al.*, 2007). Uma vez dentro do citoplasma, o retinol se liga a *retinol-binding protein 1* (RBP1) e é oxidado, através de duas reações sucessivas a AR.

A primeira reação da biossíntese de AR consiste na oxidação de retinol a retinaldeído e é conduzida pelas álcool desidrogenases (ADHs) tais como ADH1, ADH3 e ADH4. Enquanto as enzimas ADH1 e ADH4 possuem uma distribuição tecidual específica, a ADH3 é ubíqua em organismos amniotos (Molotkov *et al.*, 2002; Duester *et al.*, 2003) e portanto nestes organismos, pode-se considerar que todas as células embrionárias são capazes de oxidar retinol a retinaldeído. A oxidação de retinol a retinaldeído também pode ser conduzida pelas enzimas da família das desidrogenases/redutases de cadeia curta (SDRs - *short-chain dehydrogenase/reductases*). Dois membros desta família, RDH5 e RDH11, possuem um importante papel na oxidação de retinol a retinaldeído no sistema visual de camundongos adultos (Shang *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005) e estudos recentes mostram que outro membro da família das SDRs, a RDH10, desempenha um importante papel na síntese de AR, principalmente na região craniofacial e na região do tronco (Sandell *et al.*, 2007). Embriões nocaute para RDH10 perdem a capacidade de oxidar retinol a retinaldeído e apresentam diversas anomalias na região craniofacial, região dos membros e em outros órgãos tais como olhos, ouvidos e pulmões, além de morrerem por volta de 13.0 dpc (dias pós-coito). Os membros da família das SDRs, além de oxidar retinol a retinaldeído, também são capazes de realizar a reação inversa e converter retinaldeído a retinol (revisado em Ross *et al.*, 2000).

Na segunda etapa da via biossintética do AR, o retinaldeído é oxidado de forma irreversível pelas retinaldeído desidrogenases (ALDH1As ou RALDHs) a AR. Em contraste com as ADHs, as ALDH1As possuem uma distribuição tecidual mais restrita, delimitando, assim, as zonas de síntese de AR. Além disso, as ALDH1As estão sujeitas a uma regulação mais dinâmica do ponto de vista espacial e temporal (Niederreither *et al.*, 1997; Duester *et al.*, 2003). Dentre as ALDH1As conhecidas e descritas (ALDH1A1, ALDH1A2 e ALDH1A3), a ALDH1A2 (também conhecida como RALDH2) é, sem dúvida, a mais importante durante o desenvolvimento embrionário. A ALDH1A2 possui uma alta especificidade para retinaldeído e é a primeira ALDH1A a ser expressa em embriões de galinha e de camundongo no início do desenvolvimento (Zhao *et al.*, 1996; Ulven *et al.*, 2000; Xavier-Neto *et al.*, 2000; Blentic *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003). A ALDH1A2 é a principal enzima sintetizadora de AR na região do tronco (Niederreither *et al.*, 2002) e do coração em desenvolvimento (Moss *et al.*, 1998). Além disso, estudos mostram que animais

nocaute para *aldh1a1* e *aldh1a3* são viáveis e apresentam apenas expressão reduzida de AR na região dos olhos e região nasal (Dupé *et al.*, 2003, Fan *et al.*, 2003). Ao contrário, animais nocaute para a *aldh1a2* apresentam diversos defeitos no desenvolvimento, entre os quais eixo anteroposterior de tamanho reduzido, defeitos na formação do coração, membros e cabeça, além de morte uterina por volta de 10.5 dpc (Niederreither *et al.*, 1999, revisado em Duester *et al.*, 2003). Além disso, estudos mostram que a *aldh1a2* de humano, camundongo e galinha apresenta uma seqüência de aminoácidos bastante conservada, 94 a 98% de homologia ((Zhao *et al.*, 1996; Ono *et al.*, 1998; Swindell *et al.*, 1999) enquanto *aldh1a2*, *aldh1a1* e *aldh1a3* possuem apenas 70% de homologia entre si (Fan *et al.*, 2003).

Além das ALDH1As, outra enzima conhecida como RALDH4 também é capaz oxidar retinaldeído a AR (Lin *et al.*, 2003) porém, ao contrário das ALDH1As, a enzima RALDH4 apresenta preferência por *9-cis* retinaldeído e é expressa principalmente na região dos rins e fígado de camundongos adultos (Lin e Napoli, 2000; Lin *et al.*, 2003). Estudos filogenéticos também mostram que enquanto os genes *aldh1a1*, *aldh1a2* e *aldh1a3* são genes parálogos e pertencem a família das ALDH1As, o gene que codifica RALDH4 é um gene ortólogo da RALDH12 de humanos (Lin *et al.*, 2003). Estudos filogenéticos recentes mostram que este gene juntamente com a ALDH8A1 de peixe (*Danio rerio*) pertence a família da ALDH8 (Xavier-Neto *et al.*, não publicado).

Uma vez sintetizado no citoplasma, o AR se liga à duas proteínas citoplasmáticas conhecidas como CRABP1 e CRABP2 (*cellular retinoic-acid-binding proteins 1 and 2*) e poderá, então, atuar de forma parácrina e/ou autócrina. Para atuar de forma parácrina, o AR é transportado para fora do citoplasma da célula e é captado pelas células vizinhas. Para atuar de forma autócrina, o AR é transportado para dentro do núcleo da célula, assistido pela proteína CRABP2 (Budhu e Noy, 2002, revisado em Blomhoff e Blomhoff, 2006). Uma vez no núcleo, o AR se liga a duas famílias de receptores nucleares específicos, conhecidas como RAR (*retinoic acid receptor*) e RXR (*retinoid x receptors*). Cada uma destas famílias é composta de três isoformas (α , β e γ) (Kastner *et al.*, 1997, revisado em Chambon, 1996). Os receptores do tipo RAR podem ser ativados tanto por *all-trans* AR quanto por *9-cis* AR. Ao contrário, os receptores da família RXR só podem ser ativados por *9-cis* AR (revisado em Chambon, 1996 e Chambon, 2005). Os receptores nucleares só são

capazes de se ligar a seqüências específicas do DNA conhecidas como regiões responsivas a AR (RARE – *retinoic acid response elements* ou *retinoid X response elements* - RXRE) quando estão em forma de heterodímeros RAR/RXR ou como homodímeros RXR/RXR. Os receptores RXR, além de formarem heretodímeros com RAR também são capazes de formarem heterodímeros com receptores de hormônio tireodiano (TRs), receptores de vitamina D (VDRs), receptores ativadores da proliferação de peroxissomos (PPAR) e com receptores nucleares (revisado em Ross *et al.*, 2000 e McGrane, 2007).

As diferentes isoformas de RAR e RXR são amplamente expressas durante a embriogênese. Dentre as três diferentes isoformas de RAR, a isoforma α é expressa de modo ubíquo, enquanto as isoformas β e γ possuem um padrão de expressão mais restrito (Dollé *et al.*, 1990; Mendelsohn *et al.*, 1994; revisado em Ross *et al.*, 2000 e Blomhoff e Blomhoff, 2006). Dentre os receptores do tipo RXR, a isoforma RXR β possui um padrão mais amplo de expressão enquanto as demais isoformas possuem um padrão de expressão mais restrito (Dollé *et al.*, 1994, revisado em Ross *et al.*, 2000).

Estudos mostram que animais nocaute para apenas uma das isoformas de RAR são completamente viáveis, embora apresentem algumas malformações congênitas (tabela com todas as anomalias disponível em Mark *et al.*, 2006). Ao contrário, animais nocaute para duas ou mais isoformas de RAR morrem no útero e apresentam defeitos severos de desenvolvimento. De fato, embriões duplo nocaute para as isoformas α e γ (Wendling *et al.*, 2001, Mark *et al.*, 2006) possuem defeitos semelhantes aos encontrados em animais nocaute para o gene *aldh1a2* (Niederreither *et al.*, 1999).

Ao contrário dos resultados obtidos nos estudos com animais nocaute para RAR, animais nocaute para a isoforma RXR α morrem no início do desenvolvimento e apresentam defeitos severos no miocárdio ventricular e na septação do ventrículo (Kastner *et al.*, 1994; Kastner *et al.*, 1997, revisado Ross *et al.*, 2000, Mark *et al.*, 2006), o que sugere que RXR α está envolvido na transdução do sinal de AR durante o desenvolvimento do miocárdio. Animais nocaute simples para RXR β e RXR γ e animais duplo nocaute para β e γ não apresentam defeitos morfogênicos, mesmo na ausência de um alelo para RXR α . Esses estudos sugerem que RXR α é o mais importante durante a morfogênese embrionária (revisado em Mark *et al.*, 2006). Para complementar esses estudos, animais duplo nocaute para uma isoforma de

cada receptor RXR/RAR confirmam que RXR α é, de fato, de extrema importância para o desenvolvimento embrionário, uma vez que defeitos relacionados a ausência de vitamina A são sempre recorrentes em embriões mutantes RXR α /RAR (Ross *et al.*, 2000; Blomhoff e Blomhoff, 2006; Mark *et al.*, 2006). Em resumo, apesar das análises dos padrões de expressão dos receptores de AR assim como dos fenótipos obtidos à partir de suas inativações individuais e combinadas sugerirem que há uma redundância funcional entre os diferentes tipos de receptores nucleares e suas isoformas, os estudos sobre os receptores RXR/RAR confirmam a importância deste heterodímero como uma unidade funcional importante para a transdução do sinal de AR em diversos tecidos (Kastner *et al.*, 1994, Azaïs-Braesco e Pascal, 2000, revisado em Ross *et al.*, 2000; Blomhoff e Blomhoff, 2006; Mark *et al.*, 2006).

Após ativar seus receptores nucleares, o AR deixa o núcleo da célula e é catabolizado no citoplasma por enzimas da superfamília do citocromo P450, entre as quais podemos citar as enzimas da classe CYP26 (CYP26a, CYP26b e CYP26c) que possuem alta especificidade para oxidar AR a 4-hidroxi-ácido retinóico, 4-oxo-ácido retinóico e 5,8-epoxy-ácido retinóico (Perlmann *et al.*, 2002). Animais nocaute para CYP26a morrem durante o desenvolvimento embrionário e possuem diversos defeitos tais como espinha bífida, truncamento da região lumbar e sacral, malformação de rins e trato urogenital, além de posteriorização da vértebra cervical e padronização anormal do mesencéfalo (Abu-Abed *et al.*, 2001). Os defeitos observados em embriões nocautes para CYP26 se assemelham aos efeitos teratogênicos do AR, o que sugere que a presença destas enzimas define áreas protegidas da ação do AR (Abu-Abed *et al.*, 2001; Niederreither *et al.*, 2002). Embora a maioria das enzimas da superfamília do citocromo P450 atuem na degradação de AR, Chambers e colaboradores (2007) identificaram e caracterizaram uma enzima pertencente a esta família capaz de sintetizar AR. A enzima CYP1B1 é capaz de produzir AR a partir de retinol e está envolvida na regulação de mecanismos moleculares associados com a padronização dorsoventral do tubo neural (Chambers *et al.*, 2007).

Em resumo, a ação do AR pode ser regulada através de dois níveis: 1) através da maquinaria que governa o metabolismo de AR, nos diferentes tecidos através do controle da taxa de síntese e da taxa de degradação de AR e 2) através da maquinaria de sinalização do AR, através da tradução do sinal de AR por seus receptores RXR e RAR, os quais atuam como fatores de transcrição dependentes

de ligante e que regulam diretamente a transcrição gênica. Assim, a síntese e a degradação são importantes determinantes da cadeia de sinalização pelo AR e, embora os primeiros estudos sobre a sinalização desse morfógeno tenham focado na expressão diferenciada de seus receptores, estudos sobre a caracterização das enzimas sintetizadoras com grande especificidade para o AR mostrou que a cadeia biossintética do AR é, de fato, controlada fundamentalmente pela disponibilidade local de ALDH1As (enzimas responsáveis pela oxidação irreversível de retinaldeído a AR), uma vez que todas as outras atividades enzimáticas e demais precursores de AR podem ser encontrados de forma ubíqua.

Na figura 1 estão esquematizadas as principais enzimas envolvidas na via de síntese e de degradação do AR, assim, como seu modo de ação no núcleo celular.

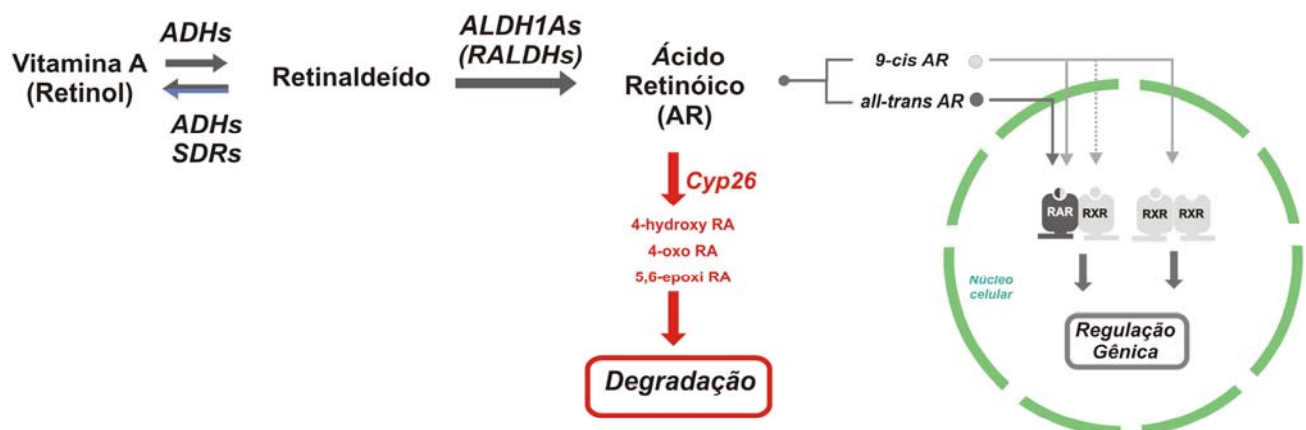


Figura 1. Sinalização e metabolismo do AR. A via canônica de síntese do AR está sinalizada em preto. Nesta via, a vitamina A é oxidada a retinaldeído pelas ADHs. Essa reação é reversível. Em seguida, o retinaldeído é oxidado de forma irreversível a AR pelas ALDH1As. *9-cis* AR e *all-trans* AR atuam na regulação gênica através de seus receptores nucleares RAR e RXR (via em verde). A via de degradação de AR está sinalizada em vermelho. Neste processo, o AR é degradado pelas enzimas CYP26. Figura modificada a partir de Simões-Costa *et al.*, 2008, com autorização dos autores.

1.2 O AR e a expressão de *aldh1a2* em cordados

Uma das características mais utilizadas para descrever e classificar os seres vivos é a existência ou não de simetria em seu corpo. Animais e plantas podem ser assimétricos, ter simetria radial ou simetria bilateral. A maioria dos animais tem simetria bilateral, também chamada de simetria planar. Neste caso, um único plano sagital (corte vertical que se estende da região anterior para a região posterior) passa ao longo do maior eixo corpóreo e é capaz de dividi-lo em duas metades iguais (direita e esquerda). Em contrapartida, animais com simetria radial possuem o corpo organizado em volta de um eixo principal, e qualquer plano de secção que passe ao longo deste eixo resulta em metades que são imagens especulares umas das outras (Brusca e Brusca, 2003).

Animais bilaterais são triploblásticos (possuem três camadas germinativas: endoderma, mesoderma e ectoderma) e podem ser divididos em dois grupos: deuterostomos e protostomos. Nos deuterostomos, o ânus é formado primeiro através da abertura do blastóporo, enquanto que nos organismos protostomos, a abertura do blastóporo forma a boca e mais tarde, o ânus (Brusca e Brusca, 2003). No grupo dos deuterostomos estão incluídos os hemicordados, equinodermas e os cordados. Animais cordados possuem, ao menos durante uma fase de suas vidas, notocorda, fendas branquiais e tubo nervoso dorsal, e são subdivididos em tunicados, cefalocordados e vertebrados (Figura 2).

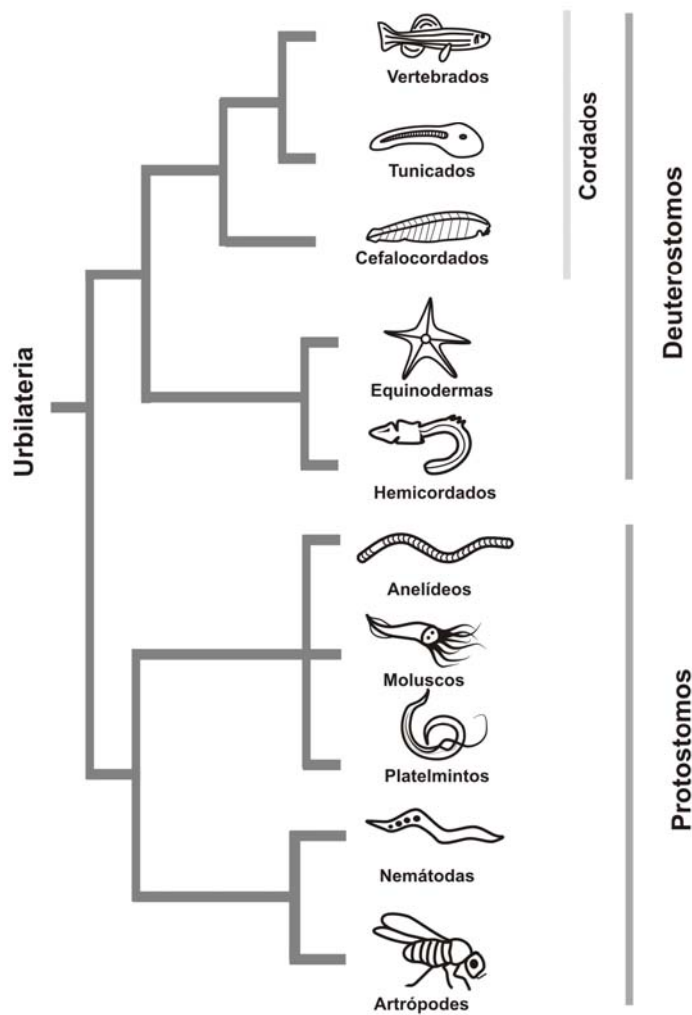


Figura 2. Filogenia molecular de metazoários. Tradicional filogenia molecular de metazoários com foco em urbilateria (ancestral de todos os animais com simetria bilateral) e seus descendentes. Urbilateria deu origem aos animais deuterostomos e protostomos. Figura modificada a partir de Simões-Costa *et al.*, 2008, com autorização dos autores.

Dentre as diferentes enzimas envolvidas na maquinaria do AR, estudos mostram que o padrão de expressão da *aldh1a2* é bastante conservado em organismos vertebrados como *Mus musculus* (camundongo), *Gallus gallus* (galinha), *Xenopus laevis* (sapo) e *Danio rerio* (peixe paulistinha ou peixe zebra) (Niederreither *et al.*, 1997; Berggren *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001; Grandel *et al.*, 2002). Esses estudos mostram que a *aldh1a2* possui um padrão de expressão dinâmico, tanto do ponto de vista espacial quanto temporal, uma vez que esta enzima pode ser detectada em diferentes órgãos durante diferentes fases embrionárias. De modo geral, durante o desenvolvimento dos vertebrados a *aldh1a2*

é detectada logo no início da gastrulação, principalmente na região do mesoderma. Conforme os embriões se desenvolvem, a *aldh1a2* passa a ser expressa na região do mesoderma lateral, mesoderma paraxial e mesoderma somático e, em estágios mais avançados, pode ser detectada em vários órgãos principalmente no coração e medula espinhal, além de rins, olhos e sistema nervoso central (Niederreither *et al.*, 1997; Berggren *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001; Grandel *et al.*, 2002). Além disso, esses estudos mostram que o padrão de expressão da ALDH1A2 e CYP26 são complementares e não se sobrepõe durante as diversas fases analisadas. Isso sugere que juntas, essas enzimas são as principais responsáveis pela formação de um gradiente de sinalização de AR, que desempenha importante papel na regulação de diferentes genes em diferentes tecidos ao longo do desenvolvimento embrionário (Niederreither *et al.*, 1997; Berggren *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001; Grandel *et al.*, 2002).

A expressão de *aldh1a2* não está conservada apenas nos organismos vertebrados. Em 2003, Nagatomo e Fujiwara mostram que o tunicado *Ciona intestinalis* possui genes homólogos a ALDH1A2 e a CYP26 e que o padrão de expressão destes genes é bastante semelhante ao padrão encontrado nos vertebrados (Nagatomo e Fujiwara, 2003). Em cefalocordados foram identificados, recentemente, genes ortólogos para *aldh1a* (Cañestro *et al.*, 2006, Martélaz *et al.*, 2006), porém ainda não se sabe qual é o padrão de expressão destes genes ao longo do desenvolvimento desses organismos. Durante muitos anos acreditou-se que os cefalocordados eram os organismos vivos mais próximos dos vertebrados, porém estudos filogenéticos recentes mostraram que os tunicados são de fato os organismos vivos mais próximos de vertebrados (Oda *et al.*, 2004; Delsuc *et al.*, 2006, Bourlat *et al.*, 2006; Wada *et al.*, 2006; revisado em Schubert *et al.*, 2006 e Cañestro *et al.*, 2007). Tunicados e vertebrados possuem alterações genéticas raras em genes da família das caderinas e inserções de aminoácidos no gene do colágeno fibrilar (Oda *et al.*, 2004; Wada *et al.*, 2006; revisado em Cañestro *et al.*, 2007). Para complementar, análises comparativas entre 146 genes nucleares de 14 deuterostomos diferentes mostram que os cefalocordados agrupam melhor com equinodermas do que com vertebrados e tunicados (Delsuc *et al.*, 2006).

A sinalização e a padronização dos eixos do corpo pelo AR não é uma característica exclusiva dos cordados como foi sugerido por Fujiwara e Kawamura em 2003. A recente identificação de genes ortólogos envolvidos na via de síntese,

sinalização e degradação de AR em organismos não-cordados (Marlétaz *et al.*, 2006; Cañestro *et al.*, 2006; Simões-Costa *et al.*, 2008) sugere que a sinalização por retinóides é uma característica ancestral de deuterostomos e possivelmente de animais bilaterais (Simões-Costa *et al.*, 2008).

1.3 O AR, *aldh1a2* e tubo neural

No tubo neural, a sinalização pelo AR está envolvida na padronização anteroposterior, padronização dorsoventral e na diferenciação neuronal (Maden, 2006; Wilson e Maden, 2005; Maden, 2007). Durante as diversas etapas de diferenciação e formação da medula espinhal, o AR atua diversas vezes, sempre de forma parácrina (Maden, 2006).

Estudos realizados em embriões de galinha mostram que a notocorda e os somitos juntamente com quatro moléculas sinalizadoras (AR, FGFs, Shh e BMPs) são os principais responsáveis pela padronização dorsoventral do tubo neural. Nesse o processo, o AR produzido no mesoderma paraxial, inibe a ação dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs - *fibroblast growth factor*), que mantém as células do tubo neural indiferenciadas e que são produzidos principalmente na região caudal do mesoderma. Para complementar, a proteína Shh (*sonic hedgehog*), sintetizada na região da notocorda e na região do piso do tubo neural, age na indução de tipos celulares ventrais, enquanto que BMPs (*bone morphogenetic proteins*) produzidos na região do teto do tubo neural são responsáveis pela indução de tipos celulares dorsais. Tanto Shh quanto BMPs agem na forma de um gradiente de expressão (Maden, 2006; Wilson e Maden, 2005; Maden, 2007).

Já no processo de padronização anteroposterior do tubo neural, o AR desempenha importante papel na organização posterior do mesencéfalo e anterior da medula espinhal. A padronização anteroposterior ocorre através de um gradiente de AR, que difunde da região do mesoderma paraxial cervical para a região anterior da placa neural. O AR produzido induz a expressão de genes do tipo Hox na região cervical do tubo neural. Genes do tipos Hoxc são expressos de maneira diferenciada ao longo do eixo anteroposterior do tubo neural e para que a ação do AR seja restrita a região posterior do embrião, na região do mesoderma anterior, o

AR é degradado graças a expressão da enzima CYP26 (Maden, 2006; Maden, 2007).

Além do seu papel na padronização e diferenciação neural, o AR também desempenha um importante papel na especificação de subtipos de neurônios. Na primeira etapa da especificação, altas concentrações de AR e baixas concentrações de FGF, combinado com Shh proveniente da notocorda e região ventral do tubo neural são fatores importantes para a geração, primeiramente, de motoneurônios e em seguida de neurônios da coluna motora lateral (LMC - *lateral motor column*). Uma vez gerados, os neurônios LMC precisam de uma nova sinalização de AR para se diferenciarem em dois subtipos: neurônios da coluna motora lateral lateral (LMCL) e neurônios da coluna motora lateral medial (LMCM). Os neurônios LMCL são responsáveis pela inervação dos músculos dorsais dos membros, enquanto os neurônios LMCM inervam os músculos ventrais dos membros e estão localizados no corno ventral. Até esse estágio do desenvolvimento, todo o AR era proveniente do mesoderma paraxial, porém a partir do estágio HH19 em galinhas e estágio 12.5 dpc em camundongos, a ALDH1A2 começa a ser expressa em motoneurônios da região braquial e da região lombar do tubo neural (Niederreither *et al.*, 1997; Sockanathan e Jessell, 1998; Zhao *et al.*, 1996, revisado em Wilson e Maden, 2005). Durante o processo de diferenciação, os neurônios LMCL precisam migrar de sua região de origem na região ventricular do tubo, para sua posição final, na região lateral do tubo. Durante este processo de migração, estes neurônios passam por uma zona de neurônios da LMC que expressam ALDH1A2 e geram AR, induzindo aqueles a se diferenciarem a neurônios do tipo LMCL (revisado em Wilson e Maden, 2005).

1.4 AR, *aldh1a2* e o coração em desenvolvimento

O coração é o primeiro órgão a se tornar funcional durante o desenvolvimento de mamíferos e de aves, e o correto funcionamento deste órgão é essencial para o desenvolvimento embrionário. Vários estudos demonstraram que a formação do coração é severamente prejudicada pelo excesso ou deficiência de AR (Heine *et al.*, 1985; Osmond *et al.*, 1991; Stainier e Fishman, 1992; Yutzey *et al.*, 1994; Twal *et al.*, 1995; Xavier-Neto *et al.*, 1999; Chazaud *et al.*, 1999; Niederreither *et al.*, 1999 e Niederreither *et al.*, 2001). De modo geral, altas doses de AR levam a

hipertrofia dos átrios e a malformação dos ventrículos, enquanto que a privação de AR durante o início do desenvolvimento causa um aumento exagerado no tamanho dos ventrículos e átrios mal desenvolvidos (Xavier-Neto *et al.*, 1999).

Atualmente, o modelo mais aceito para a formação das câmaras cardíacas tem a sinalização pelo AR e a expressão de *aldh1a2* como pontos centrais. De acordo com este modelo, a presença de AR em precursores cardíacos posteriores ativa o desenvolvimento de átrios, enquanto que a ausência de AR em precursores cardíacos anteriores permite o desenvolvimento dos ventrículos (Xavier-Neto *et al.*, 1999a; Chazaud *et al.*, 1999; Niederreither *et al.*, 1999; Rosenthal e Xavier-Neto, 2000; Xavier-Neto *et al.*, 2001, Hochgreb *et al.*, 2003).

A sinalização pelo AR para a formação das câmaras cardíacas ocorre através de duas fases bem distintas. A primeira fase é caracterizada pelo aumento da proximidade entre os precursores sino-atriais e o mesoderma lateral posterior que está expressando *aldh1a2*. Nesta fase, a sinalização pelo AR é consistente com a difusão deste morfógeno. Já a segunda fase é caracterizada pelo contato entre os precursores cardíacos posteriores e os arcos bilaterais de *aldh1a2*, originados através de uma onda caudo-rostral de expressão desta enzima no mesoderma lateral (Rosenthal e Xavier-Neto, 2000; Hochgreb *et al.*, 2003). Os arcos de expressão da ALDH1A2 são responsáveis pela diferenciação das câmaras cardíacas em embriões de camundongo e galinha (Hochgreb *et al.*, 2003). É muito provável que os arcos de expressão de *aldh1a2* sejam um mecanismo ancestral de formação das câmaras cardíacas em vertebrados. Esta idéia é apoiada pela conservação da seqüência do gene da *aldh1a2* ao longo da evolução e pela conservação do seu padrão de expressão em forma de onda entre os vertebrados, tais como anfíbios e peixes (Simões-Costa *et al.*, não publicado). Os arcos de expressão da ALDH1A2 estão presentes também em tunicados (como *Ciona intestinalis*), porém estes organismos possuem corações peristálticos sem câmaras cardíacas, e portanto, os arcos de expressão da ALDH1A2 podem estar desempenhando outras funções, não-cardíacas, nestes organismos. A conservação dos arcos de expressão de ALDH1A2 entre tunicados e vertebrados sugere que o gene da *aldh1a2* desempenha papéis diferentes nos cordados e que em organismos vertebrados esse gene foi recrutado para desempenhar um papel determinante na formação das câmaras cardíacas (Simões-Costa *et al.*, 2005).

A ALDH1A2 e o AR também desempenham um importante papel na formação do epicárdio e da circulação coronariana (Xavier-Neto *et al.*, 2000, Pérez-Pomares *et al.*, 2002). Nesse caso, a síntese de ALDH1A2 ocorre no órgão pró-epicárdico, um aglomerado de precursores da circulação coronariana, localizado abaixo do coração que está em contato com os precursores hepáticos em uma região embrionária conhecida como septo transversal (Xavier-Neto *et al.*, 2000). No septo transversal as células do órgão pró-epicárdico apresentam uma morfologia semelhante a uvas em cacho, e dessa localização se desprendem para se fixar no miocárdio. Chegando ao miocárdio estas células mudam a sua morfologia tornando-se achatadas e começam a migrar anteriormente pelo coração criando uma camada unicelular, o epicárdio. A migração anterior dessas células é revelada pela sua marcação através de anticorpos contra ALDH1A2 e fica claro que a migração se dá do polo posterior para o polo anterior do coração, com o tronco sendo a última estrutura a ser recoberta pelo epicárdio (Xavier-Neto *et al.*, 2000). Uma vez criado o epicárdio, essas células se desprendem e perfuram o miocárdio invadindo tanto as trabéculas do miocárdio quanto o tecido dos coxins endocárdicos. No miocárdio, as células oriundas do epicárdio vão dar origem aos vasos da circulação coronariana, enquanto que nos coxins é provável, mas ainda não estabelecido, que essas células influenciem a formação dos septos e válvulas cardíacas (Xavier-Neto *et al.*, 2000, Pérez-Pomares *et al.*, 2002).

1.5 Regulação do gene *aldh1a2*

Como descrito acima, o AR desempenha importantes papéis no desenvolvimento embrionário e a expressão da ALDH1A2, a principal enzima sintetizadora de AR nos estágios iniciais do desenvolvimento, é extremamente dinâmica e de grande importância em órgãos como o coração e o tubo neural. A grande conservação desta enzima, sua presença em organismos cordados vertebrados e invertebrados, seus diferentes papéis ao longo do desenvolvimento de diversos órgãos e sua característica dinâmica de ativação e desativação dentro de um mesmo órgão em formação sugerem a importância filogenética da ALDH1A2 e a idéia de que sua expressão em cordados é controlada por módulos regulatórios, específicos para cada tecido e/ou fase embrionária.

Embora os padrões de expressão da *aldh1a2* e seus papéis durante o desenvolvimento já estejam bem estabelecidos em várias espécies, pouco se conhece sobre a regulação deste gene. Em 2001, Wang e colaboradores mostraram que um fragmento da região 5' do gene da *aldh1a2* de camundongos clonada frente ao gene repórter da luciferase é capaz de ativar a expressão deste gene em diferentes tipos celulares, tais como células embrionárias de rim humano (EBNA), células do tipo Leydig de camundongo (TM3) e células derivadas de Sertoli (TM4). Este estudo também mostrou que a atividade do promotor não é influenciada pela presença de AR no meio (Wang *et al.*, 2001). Além disso, Ono e colaboradores (1998) mostram que a *aldh1a2* é um gene alvo para TAL1 e LMO em células T de pacientes com leucemia linfoblástica. Neste estudo, foi identificado um sítio para GATA, localizado num promotor críptico do intron 2 da *aldh1a2*, responsável pela ativação de uma proteína truncada da ALDH1A2 em células T de leucemia linfoblástica através da formação de um complexo formado por GATA3, TAL-1 e LMO (Ono *et al.*, 1998). Apesar desses trabalhos, ainda pouco se conhece sobre a regulação deste gene.

Para entender como um determinado gene é regulado, é necessário identificar quais são os seus elementos *cis*-regulatórios (seqüências regulatórias que controlam a expressão do gene de interesse presentes na mesma fita de DNA). O método mais utilizado para a identificação de elementos *cis*-regulatórios é a comparação entre genomas de espécies filogeneticamente distantes, como peixes e humanos. Atualmente, diversas ferramentas de bioinformática estão disponíveis para localizar, comparar e identificar regiões evolutivamente conservadas ao longo de um determinado gene em diversas espécies. Este processo é conhecido como análise de conservação filogenética ou *phylogenetic footprinting*. A comparação entre espécies filogeneticamente distantes pode revelar grupos bem definidos de seqüências conservadas com probabilidade significativa de conter elementos de controle da expressão gênica (Boffelli *et al.*, 2003; Ovcharenko *et al.*, 2004; Nóbrega e Pennacchio, 2004; Gómez-Skarmeta *et al.* 2006). Porém, a simples identificação destas regiões filogeneticamente conservadas não é um indicativo do papel regulatório da mesma, já que blocos podem estar conservados devido a heterogeneidades nas taxas de mutação ao longo do genoma e/ou tempo insuficiente de divergência. Assim, o papel regulatório dessas regiões só pode ser caracterizado através de ensaios funcionais. Para tanto, uma das técnicas mais

utilizadas é a técnica de gene repórter. Nesta técnica, os elementos *cis*-regulatórios identificados são clonados frente a um gene que codifica uma proteína facilmente detectável por coloração citológica ou ensaio enzimático (por exemplo: GFP – *green fluorescent protein*, HAP – *human alkaline phosphatase* e sistema LacZ) e em seguida, são realizados experimentos funcionais, tais como cultura de células, eletroporação de embriões e obtenção de animais transgênicos.

Assim, para começarmos a entender como o gene da ALDH1A2 é regulado, utilizamos, primeiramente, diversas ferramentas de bioinformática para localizar, comparar e identificar regiões evolutivamente conservadas (ECRs – *Evolutionary Conserved Regions*). Em seguida, utilizamos experimentos de transgênese em camundongos para testar se as ECRs identificadas são, de fato, regiões regulatórias.

6 CONCLUSÃO

Em resumo, os resultados apresentados nesse trabalho mostram que a combinação entre análises de bioinformática e ensaios funcionais é um eficiente método para identificar regiões regulatórias evolutivamente conservadas. Nesse trabalho, mostramos pela primeira vez um *enhancer* responsável pela regulação da principal enzima sintetizadora de AR nos estágios iniciais do desenvolvimento, a *aldh1a2*. Nossos dados suportam a hipótese de que a expressão do gene *aldh1a2* é governada por diversos módulos regulatórios que são ativados e reprimidos num dinâmico padrão tecido específico e estágio dependente. Além disso, a identificação de um *enhancer* neural e epicárdico conservado em mamíferos e aves é de grande importância para começarmos a elucidar os mecanismos que regulam o gene da *aldh1a2*. A identificação de todos os mecanismos regulatórios da *aldh1a2* será de grande importância para determinar possíveis regiões regulatórias que possam ser responsáveis pela ativação dos diferentes programas ontogenéticos dessa enzima durante o desenvolvimento embrionário.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abu-Abed S, Dollé 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.

Akin ZN, Nazarali AJ. Hox genes and their candidate downstream targets in the developing central nervous system. *Cell Mol Neurobiol.* 2005;25(3-4):697-741.

Akker E, Forlani S, Chawengsaksophak K, Graaff W, Beck F, Meyer BI, Deschamps J. Cdx1 and Cdx2 have overlapping functions in anteroposterior patterning and posterior axis elongation. *Development.* 2002;129, 2181-2193.

Alanentalo T, Chatonnet F, Karlen M, Sulniute R, Ericson J, Andersson E, Ahlgren U. Cloning and analysis of Nkx6.3 during CNS and gastrointestinal development. *Gene Expr Patterns.* 2006;6(2):162-70.

Allende ML, Manzanares M, Tena JJ, Feijóo CG, Gómez-Skarmeta JL. Cracking the genome's second code: enhancer detection by combined phylogenetic footprinting and transgenic fish and frog embryos. *Methods.* 2006;39(3):212-9.

Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML. Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene.* 2006;25(57):7492-504.

Azaïs-Braesco V, Pascal G. Vitamin A in pregnancy: requirements and safety limits. *Am J Clin Nutr.* 2000 May;71(5 Suppl):1325S-33S.

Bates MD, Wells JM, Venkatesh B. Comparative genomics of the Hlx homeobox gene and protein: conservation of structure and expression from fish to mammals. *Gene.* 2005;352:45-56.

Berggren K, McCaffery P, Drager U, Forehand CJ. Differential distribution of retinoic acid synthesis in the chicken embryo as determined by immunolocalization of the retinoic acid synthetic enzyme, ALDH1A2. *Dev Biol.* 1999;210: 288-304.

Blentic A, Gale E, Maden M. Retinoic acid signalling centers in the avian embryo identified by sites of expression of synthesizing and catabolising enzymes. *Dev Dyn.* 2003;227:114-127.

Blomhoff R, Blomhoff HK. Overview of retinoid metabolism and function. *J Neurobiol.* 2006;66(7):606-30.

Boffelli D, McAuliffe J, Ovcharenko D, Lewis KD, Ovcharenko I, Pachter L, Rubin EM. Phylogenetic shadowing of primate sequences to find functional regions of the human genome. *Science.* 2003;299(5611):1391-4.

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. c2003 – [updated 2005 June 15; cited 2006 May 16]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Böhne A, Brunet F, Galiana-Arnoux D, Schultheis C, Volff JN. Transposable elements as drivers of genomic and biological diversity in vertebrates. *Chromosome Res.* 2008;16(1):203-15.

Boncinelli E, Simeone A, Acampora D, Mavilio F. HOX gene activation by retinoic acid. *Trends Genet.* 1991;7(10):329-34.

Bourlat SJ, Juliusdottir T, Lowe CJ, Freeman R, Aronowicz J, Kirschner M et al. Deuterostome phylogeny reveals monophyletic chordates and the new phylum Xenoturbellida. *Nature.* 2006;444(7115):85-8.

Brusca RC, Brusca GJ. *Invertebrates*. 2^a ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2003.

Budhu AS, Noy N. Direct channeling of retinoic acid between cellular retinoic acid-binding protein II and retinoic acid receptor sensitizes mammary carcinoma cells to retinoic acid-induced growth arrest. *Mol Cell Biol.* 2002;22(8):2632-41.

Cañestro C, Postlethwait JH, Gonzalez-Duarte R, Albalat R. Is retinoic acid genetic machinery a chordate innovation?. *Evol Dev.* 2006;5:394-406.

Cañestro C, Yokoi H, Postlethwait JH. Evolutionary developmental biology and genomics. *Nat Rev Genet.* 2007;8(12):932-42.

Cartry J, Nichane M, Ribes V, Colas A, Riou JF, Pieler T et al. Retinoic acid signalling is required for specification of pronephric cell fate. *Dev Biol.* 2006;299(1):35-51.

Chambers D, Wilson L, Maden M, Lumsden A. RALDH-independent generation of retinoic acid during vertebrate embryogenesis by CYP1B1. *Development.* 2007;134(7):1369-83.

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

Chambon P. The nuclear receptor superfamily: a personal retrospect on the first two decades. *Mol Endocrinol.* 2005;19(6):1418-28.

Charron F, Nemer M. GATA transcription factors and cardiac development. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10(1):85-91.

Chazaud C, Chambon P, Dollé P. Retinoic acid is required in the mouse embryo for left-right asymmetry determination and heart morphogenesis. *Development.* 1999;126(12):2589-96.

Chen H, Lun Y, Ovchinnikov D, Kokubo H, Oberg KC, Pepicelli CV, Gan L, Lee B, Johnson RL. Limb and kidney defects in Lmx1b mutant mice suggest an involvement of LMX1B in human nail patella syndrome. *Nat Genet.* 1998;19(1):51-5

Chen Y, Pollet N, Niehrs C, Pieler T. Increased XRALDH2 activity has a posteriorizing effect on the central nervous system of *Xenopus* embryos. *Mech Dev.* 2001;101(1-2):91-103.

Chizhikov VV, Millen KJ. Mechanisms of roof plate formation in the vertebrate CNS. *Nat Rev Neurosci.* 2004;5(10):808-12.

Conlon RA. Retinoic acid and pattern formation in vertebrates. *Trends Genetic.* 1995;11:314-319.

Dasen JS, Liu JP, Jessell TM. Motor neuron columnar fate imposed by sequential phases of Hox-c activity. *Nature.* 2003;425(6961):926-33.

Delsuc F, Brinkmann H, Chourrout D, Philippe H. Tunicates and not cephalochordates are the closest living relatives of vertebrates. *Nature.* 2006;439(7079):965-8.

Dickman ED, Smith SM. Selective regulation of cardiomyocyte gene expression and cardiac morphogenesis by retinoic acid. *Dev Dyn.* 1996;206(1):39-48.

Doevendans PA, van Bilsen M. Transcription factors and the cardiac gene programme. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996;28(4):387-403.

Dollé P, Ruberte E, Leroy P, Morriss-Kay G, Chambon P. Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. I. A systematic study of their differential pattern of transcription during mouse organogenesis. *Development.* 1990;110(4):1133-51.

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

Dressler GR. The cellular basis of kidney development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:509-29.

Dreyer SD, Zhou G, Baldini A, Winterpacht A, Zabel B, Cole W, Johnson RL, Lee B. Mutations in LMX1B cause abnormal skeletal patterning and renal dysplasia in nail patella syndrome. *Nat Genet.* 1998;19(1):47-50.

Duester G, Mic FA, Molotkov A. Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid. *Chem Biol.* 2003;Interact 143-144:201-10.

Dupé V, Matt N, Garnier JM, Chambon P, Mark M, Ghyselinck NB. A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:14036-41.

Duret L, Bucher P. Searching for regulatory elements in the human noncoding sequences. *Curr Opin Struct Biol.* 1997;7:399-406.

Easwaran V, Pishvaian M, Salimuddin, Byers S. Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Curr Biol.* 1999;9(23):1415-8.

Fan X, Molotkov A, Manabe S, Donmoyer CM, Deltour L, Foglio MH, Cuenca AE, Blaner WS, Lipton SA, Duester G. Targeted disruption of *Aldh1a1* (*Raldh1*) provides evidence for a complex mechanism of retinoic acid synthesis in the developing retina. *Mol Cell Biol.* 2003;23:4637-48.

Fujiwara S, Kawamura K. Acquisition of retinoic acid signaling pathway and innovation of the chordate body plan. *Zool Sci.* 2003;20(7):809-18.

Gaunt SJ, Drage D, Cockley A. Vertebrate caudal gene expression gradients investigated by use of chick *cdx-A/lacZ* and mouse *cdx-1/lacZ* reporters in transgenic mouse embryos: evidence for an intron enhancer. *Mech Dev.* 2003;120(5):573-86.

Gilbert SF. *Developmental Biology*. 7^a ed. Sunderland: Sinauer Associates; 2003.

Giraldo P, Montoliu L. Size matters: use of YACs, BACs and PACs in transgenic animals. *Transgenic Res.* 2001;10(2):83-103.

Gómez-Skarmeta JL, Lenhard B, Becker TS. New technologies, new findings, and new concepts in the study of vertebrate cis-regulatory sequences. *Dev Dyn.* 2006 Apr;235(4):870-85.

Grandel H, Lun K, Rauch GJ, Rhinn M, Piotrowski T, Houart C, Sordino P, Küchler AM, Schulte-Merker S, Geisler R, Holder N, Wilson SW, Brand M. Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development.* 2002;129:2851-65.

Guazzi S, Price M, De Felice M, Damante G, Mattei MG, Di Lauro R. Thyroid nuclear factor 1 (TTF-1) contains a homeodomain and displays a novel DNA binding specificity. *EMBO J.* 1990;9(11):3631-9.

Hardison RC. Conserved noncoding sequences are reliable guides to regulatory elements. *Trends Genet.* 2000;16:369-372.

Heine UI, Roberts AB, Munoz EF, Roche NS, Sporn MB. Effects of retinoid deficiency on the development of the heart and vascular system of the quail embryo. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1985;50(2):135-52.

Hochgreb T, Linhares VL, Menezes DC, Sampaio AC, Yan CYI, Cardoso WV, Rosenthal N, Xavier-Neto J. A caudorostral wave of *RALDH2* conveys anteroposterior information to the cardiac field. *Development.* 2003;130:5363-5374.

Igarashi T, Abe M, Oikawa M, Nukiwa T, Sato Y. Retinoic acids repress the expression of *ETS-1* in endothelial cells. *Tohoku J Exp Med.* 2001;194(1):35-43.

Irie T, Kajiwara S, Kojima N, Senoo H, Seki T. Retinal is the essential form of retinoid for storage and transport in the adult of the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2004;139:597-606.

Kastner P, Grondona JM, Mark M, Gansmuller A, LeMeur M, Decimo D, Vonesch JL, Dollé P, Chambon P. Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell*. 1994;78(6):987-1003.

Kastner P, Mark M, Ghyselinck N, Krezel W, Dupé V, Grondona JM, Chambon P. Genetic evidence that the retinoid signal is transduced by heterodimeric RXR/RAR functional units during mouse development. *Development*. 1997;124(2):313-26.

Kawaguchi R, Yu J, Honda J, Hu J, Whitelegge J, Ping P, Wiita P, Bok D, Sun H. A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science*. 2007;315(5813):820-5.

Kim TS, Maeda A, Maeda T, Heinlein C, Kedishvili N, Palczewski K, Nelson PS. Delayed dark adaptation in 11-cis-retinol dehydrogenase-deficient mice: a role of RDH11 in visual processes in vivo. *J Biol Chem*. 2005;280(10):8694-704.

Kothary R, Clapoff S, Darling S, Perry MD, Moran LA, Rossant J. Inducible expression of an hsp68-lacZ hybrid gene in transgenic mice. *Development*. 1989;105:707-714.

Krawchuk D, Kania A. Identification of genes controlled by LMX1B in the developing mouse limb bud. *Dev Dyn*. 2008;237(4):1183-92

Kumar S, Hedges SB. A molecular timescale for vertebrate evolution. *Nature*. 1998 Apr 30;392(6679):917-20.

Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol*. 2007;73(1):1-14.

Letamendia A, Labbé E, Attisano L. Transcriptional regulation by Smads: crosstalk between the TGF-beta and Wnt pathways. *J Bone Joint Surg Am*. 2001;83-A Suppl 1(Pt 1):S31-9.

Lin M, Napoli JL. cDNA cloning and expression of a human aldehyde dehydrogenase (ALDH) active with 9-cis-retinal and identification of a rat ortholog, ALDH12. *J Biol Chem*. 2000;275:40105-40112.

Lin M, Zhang M, Abraham M, Smith SM, Napoli JL. Mouse retinal dehydrogenase 4 (RALDH4), molecular cloning, cellular expression, and activity in 9-cis-retinoic acid biosynthesis in intact cells. *J Biol Chem*. 2003;278:9856-9861.

Liu C, Morrissey EE, Whitsett JA. GATA-6 is required for maturation of the lung in late gestation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283(2):L468-75.

Lu HC, Revelli JP, Goering L, Thaller C, Eichele G. Retinoid signalling is required for the establishment of a ZPA and for the expression of Hoxb-8, a mediator of ZPA formation. *Development*. 1997;124: 1643-1651.

Lubzens E, Lissauer L, Levavi-Sivan B, Avarre JC, Sammar M. Carotenoid and retinoid transport to fish oocytes and eggs: what is the role of retinol binding protein?. *Mol Aspects Med*. 2003;24:441-57.

Maden M, Gale E, Kostetskii I, Zile M. Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr Biol*. 1996;6(4):417-26.

Maden M. Retinoids and spinal cord development. *J Neurobiol*. 2006;66(7):726-38.

Maden M. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. *Nat Rev Neurosci*. 2007;8(10):755-65.

Malpel S, Mendelsohn C, Cardoso WV. Regulation of retinoic acid signaling during lung morphogenesis. *Development*. 2000;127:3057-3067.

Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:451-80.

Marlétaz F, Holland LZ, Laudet V, Schubert M. Retinoic acid signaling and the evolution of chordates. *Int J Biol Sci*. 2006;2:38-47.

McCaffery P, Wagner E, O'Neil J, Petkovich M, Drager UC. Dorsal and ventral territories defined by retinoic acid synthesis, break-down and nuclear receptor expression. *Mec Dev*. 1999;82:119-130.

McGrane MM. Vitamin A regulation of gene expression: molecular mechanism of a prototype gene. *J Nutr Biochem*. 2007;18(8):497-508.

McMahon JA, Takada S, Zimmerman LB, Fan CM, Harland RM, McMahon AP. Noggin-mediated antagonism of BMP signaling is required for growth and patterning of the neural tube and somite. *Genes Dev*. 1998;12(10):1438-52.

Mendelsohn C, Mark M, Dollé P, Dierich A, Gaub MP, Krust A, Lampron C, Chambon P. Retinoic acid receptor beta 2 (RAR beta 2) null mutant mice appear normal. *Dev Biol*. 1994;166(1):246-58.

Mendelsohn C, Batourina E, Fung S, Gilbert T, Dodd J. Stromal cells mediate retinoid-dependent functions essential for renal development. *Development*. 1999;126:1139-1148.

Meyer BI, Gruss P. Mouse Cdx-1 expression during gastrulation. *Development*. 1993;117(1):191-203.

Molotkov A, Fan X, Deltour L, Foglio MH, Martras S, Farrés J, Parés X, Duester G. Stimulation of retinoic acid production and growth by ubiquitously expressed alcohol dehydrogenase Adh3. *PNAS*. 2002;99:5337-5342.

Moss JB, Xavier-Neto J, Shapiro MD, Mayhem SM, McCaffery P, Dräger UC, Rosenthal N. Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* 1998;199:55-71.

Nagatomo K, Fujiwara S. Expression of *Raldh2*, *Cyp26* and *Hox-1* in normal and retinoic acid-treated *Ciona intestinalis* embryos. *Gene Expr Patterns.* 2003;3:273-7.

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

Niederreither K, Subbarayan V, Dollé P, Chambon P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. *Nat Genet.* 1999;21:444-448.

Niederreither K, Vermot J, Schuhbauer B, Chambon P, Dollé P. Retinoic acid synthesis and hindbrain patterning in the mouse embryo. *Development.* 2000;127:75-85.

Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbauer B, Chambon P, Dollé P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development.* 2001;128(7):1019-31.

Niederreither K, Vermot J, Schuhbauer B, Chambon P, Dollé P. Embryonic retinoic acid synthesis is required for forelimb growth and anteroposterior patterning in the mouse. *Development*, v.129, n.15, Aug, p.3563-74. 2002.

Nishida W, Nakamura M, Mori S, Takahashi M, Ohkawa Y, Tadokoro S et al. A triad of serum response factor and the GATA and NK families governs the transcription of smooth and cardiac muscle genes. *J Biol Chem.* 2002;277(9):7308-17.

Nóbrega MA, Pennacchio LA. Comparative genomic analysis as a tool for biological discovery. *J. Physiology.* 2004;554:31-39.

Oda H, Akiyama-Oda Y, Zhang S. Two classic cadherin-related molecules with no cadherin extracellular repeats in the cephalochordate amphioxus: distinct adhesive specificities and possible involvement in the development of multicell-layered structures. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 13):2757-67.

Ono Y, Fukuhara N, Yoshie O. TAL1 and LIM-only proteins synergistically induce retinaldehyde dehydrogenase 2 expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia by acting as cofactors for GATA3. *Mol Cell Biol.* 1998;18(12):6939-50.

Oosterveen T, Meijlink F, Deschamps J. Expression of retinaldehyde dehydrogenase II and sequential activation of 5' *Hoxb* genes in the mouse caudal hindbrain. *Gene Expr Patterns.* 2004;4(3):243-7.

Osmond MK, Butler AJ, Voon FC, Bellairs R. The effects of retinoic acid on heart formation in the early chick embryo. *Development*. 1991;113(4):1405-17.

Ostendorff HP, Tursun B, Cornils K, Schlüter A, Drung A, Güngör C, Bach I. Dynamic expression of LIM cofactors in the developing mouse neural tube. *Dev Dyn*. 2006;235(3):786-91.

Ovcharenko I, Nobrega MA, Loots GG, Stubbs L. ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res*. 2004;W280-6.

Patient RK, McGhee JD. The GATA family (vertebrates and invertebrates). *Curr Opin Genet Dev*. 2002;12(4):416-22.

Pasutto F, Sticht H, Hammersen G, Gillessen-Kaesbach G, Fitzpatrick DR, Nürnberg G et al. Mutations in STRA6 cause a broad spectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hypoplasia, and mental retardation. *Am J Hum Genet*. 2007;80(3):550-60.

Pennacchio LA, Rubin EM. Genomic strategies to identify mammalian regulatory sequences. *Nat Rev Genet*. 2001;2:100-109.

Pennacchio LA, Rubin EM. Comparative genomic tools and databases: providing insights into the human genome. *J Clin Invest*. 2003;111:1099-106.

Pérez-Pomares JM, Carmona R, González-Iriarte M, Atencia G, Wessels A, Muñoz-Chápuli R. Origin of coronary endothelial cells from epicardial mesothelium in avian embryos. *Int J Dev Biol*. 2002;46:1005-1013.

Perlmann, T. Retinoid metabolism: a balancing act. *Nat Genet*. 2002;31(1):7-8.

Peterkin T, Gibson A, Patient R. Redundancy and evolution of GATA factor requirements in development of the myocardium. *Dev Biol*. 2007;311(2):623-35.

Poulin F, Nobrega MA, Plajzer-Frick I, Holt A, Afzal V, Rubin EM, Pennacchio LA. In vivo characterization of a vertebrate ultraconserved enhancer. *Genomics*. 2005;85:774-81.

Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res*. 1995;23(23):4878-84.

Raouf A, Seth A. Ets transcription factors and targets in osteogenesis. *Oncogene*. 2000;19(55):6455-63.

Rosenthal N, Xavier-Neto J. From the bottom of the heart: anteroposterior decisions in cardiac muscle differentiation. *Curr Opin Cell Biol*. 2000 Dec;12(6):742-6.

Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1021-54.

Rossant J, Zirngibl R, Cado D, Shago M, Giguère V. Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 1991;5:1333-44.

Sandell LL, Sanderson BW, Moiseyev G, Johnson T, Mushegian A, Young K, Rey JP, Ma JX, Staehling-Hampton K, Trainor PA. RDH10 is essential for synthesis of embryonic retinoic acid and is required for limb, craniofacial, and organ development. *Genes Dev.* 2007;21:1113-24.

Schubert M, Escriva H, Xavier-Neto J, Laudet V. Amphioxus and tunicates as evolutionary model systems. *Trends Ecol Evol.* 2006;21(5):269-77.

Sepulveda JL, Vlahopoulos S, Iyer D, Belaguli N, Schwartz RJ. Combinatorial expression of GATA4, Nkx2-5, and serum response factor directs early cardiac gene activity. *J Biol Chem.* 2002;277(28):25775-82. Epub 2002 Apr 30.

Shang E, Lai K, Packer AI, Paik J, Blaner WS, de Moraes Vieira M, Gouras P, Wolgemuth DJ. Targeted disruption of the mouse cis-retinol dehydrogenase gene: visual and nonvisual functions. *J Lipid Res.* 2002;43(4):590-7.

Simões-Costa MS, Vasconcelos M, Sampaio AC, Cravo, RM, Linhares VL, Hochgreb T, Chao YIY, Davidson B, Xavier-Neto J. The evolutionary origin of the cardiac chambers. *Dev. Biol.* 2005;277(1):1-15.

Simões-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.

Sockanathan S, Jessel TM. Motor neuron-derived retinoid signaling specifies the subtype identity of spinal motor neurons. *Cell.* 1998;94:503-514.

Stainier DY, Fishman MC. Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity. *Dev Biol.* 1992;153(1):91-101.

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

Swindell EC, Thaller C, Sockanathan S, Petkovich M, Jessel TM, Eichele G. Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. *Dev Biol.* 1999;216:282-296.

Thaler JP, Lee SK, Jurata LW, Gill GN, Pfaff SL. LIM factor Lhx3 contributes to the specification of motor neuron and interneuron identity through cell-type-specific protein-protein interactions. *Cell.* 2002;110(2):237-49.

Twal W, Roze L, Zile MH. Anti-retinoic acid monoclonal antibody localizes all-trans-retinoic acid in target cells and blocks normal development in early quail embryo. *Dev Biol.* 1995 Apr;168(2):225-34.

Uchikawa M, Ishida Y, Takemoto T, Kamachi Y, Kondoh H. Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals. *Dev Cell.* 2003;4:509-519.

Ulven SM, Gundersen TE, Weedon MS, Landaas VO, Sakhi AK, Fromm SH, Geronimo BA, Moskaug JO, Blomhoff R. Identification of endogenous retinoids, enzymes, binding proteins, and receptors during early postimplantation development in mouse: important role of retinal dehydrogenase type 2 in synthesis of all-trans-retinoic acid. *Dev Biol.* 2000;220:379-91.

Vermot L, Schunbaur B, Mouellic H, McCaffery P, Garnier J, Hentsch D, Brulet P, Niederreither K, Chambon P, Dollé P, Roux I. Retinaldehyde dehydrogenase 2 and Hoxc8 are required in the murine braquial spinal cord for the specification of Lim1+ motoneurons and the correct distribution of Islet1+ motoneurons. *Development.* 2005;132:1611-1621.

Wada H, Makabe K. Genome duplications of early vertebrates as a possible chronicle of the evolutionary history of the neural crest. *Int J Biol Sci.* 2006;2(3):133-41.

Wang X, Sperkova Z, Napoli JL. Analysis of mouse retinal dehydrogenase type 2 promoter and expression. *Genomics.* 2001;74(2):245-50.

Weidenfeld J, Shu W, Zhang L, Millar SE, Morrisey EE. The WNT7b promoter is regulated by TTF-1, GATA6, and Foxa2 in lung epithelium. *J Biol Chem.* 2002;277(23):21061-70.

Wendling O, Ghyselinck NB, Chambon P, Mark M. Roles of retinoic acid receptors in early embryonic morphogenesis and hindbrain patterning. *Development.* 2001;128(11):2031-8.

Wilson L, Gale E, Maden M. The role of retinoic acid in the morphogenesis of the neural tube. *J Anat.* 2003;203(4):357-68.

Wilson L, Gale E, Chambers D, Maden M. Retinoic acid and the control of dorsoventral patterning in the avian spinal cord. *Dev Biol.* 2004;269:433-446.

Wilson L, Maden M. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol.* 2005;282:1-13.

Wingert RA, Selleck R, Yu J, Song HD, Chen Z, Song A *et al.* The cdx genes and retinoic acid control the positioning and segmentation of the zebrafish pronephros. *PLoS Genet.* 2007;3(10):1922-38.

Wolpert L. Principles of development. 2^a ed. Oxford: Oxford University Press; 2002.

Woolfe A, Goodson M, Goode DK, Snell P, McEwen GK, Vavouri T et al. Highly conserved non-coding sequences are associated with vertebrate development. *PLoS Biol.* 2005;3(1):e7.

Xavier-Neto J, Pereira AC, Junqueira ML, Carmona R, Krieger JE. Rat angiotensin converting enzyme promoter regulation by β adrenergics and cAMP in endothelium. *Hypertension.* 1999;34:31-38.

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;219:129-141.

Xavier-Neto J, Rosenthal N, Silva FA, Matos TGF, Hochgreb T, Linhares VLF. Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation. *Genesis.* 2001;31:97-104.

Yaden BC, Savage JJ, Hunter CS, Rhodes SJ. DNA recognition properties of the LHX3b LIM homeodomain transcription factor. *Mol Biol Rep.* 2005;32(1):1-6.

Yutzey KE, Rhee JT, Bader D. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart. *Development.* 1994 Apr;120(4):871-83.

Zhang Y, Rath N, Hannenhalli S, Wang Z, Cappola T, Kimura S et al. GATA and Nkx factors synergistically regulate tissue-specific gene expression and development in vivo. *Development.* 2007 Jan;134(1):189-98.

Zhao D, McCaffery P, Ivins KJ, Neve RL, Hogan P, Chin WW, Drager UC. Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur J Biochem.* 1996;240:15-22.