

**Rodrigo Abe Castro Ferreira**

**UM MODELO DE PADRONIZAÇÃO  
DAS CAMÂRAS CARDÍACAS EM**  
*Danio rerio*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Xavier Neto

São Paulo

2008

## RESUMO

Castro RA. Um Modelo De Padronização Das Camâras Cardíacas Em *Danio rerio* [Dissertação (Mestrado em Biologia do Desenvolvimento)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2008.

O ácido retinóico (AR) é sintetizado no organismo a partir de oxidações sucessivas de seu precursor, o retinol. A última etapa de oxidação é catalisada pela ação das enzimas RALDHs. Na cardiogênese, o AR é importante para a geração dos átrios e o crescimento do miocárdio ventricular. Uma das decisões mais precoces durante a formação do coração é o estabelecimento de sua polaridade ântero-posterior (AP). Seu estabelecimento é crítico para a demarcação das regiões de efluxo (ventrículos) e de influxo (átrios). Segundo a proposta levantada pelo nosso grupo, uma onda caudo-rostral (CR) de expressão da RALDH2 é o mecanismo responsável pela padronização AP do coração dos vertebrados. Estudos em embriões de galinha e camundongo mostraram que a onda CR de RALDH2 é responsável pela especificação das identidades atriais e ventriculares nestes organismos. Embora a presença dessa onda tenha sido observada no peixe zebra (*Danio rerio*), não havia sido encontrada, ainda, em peixes, nenhuma correlação efetiva entre a presença da onda com sua ação de padronização AP no tubo cardíaco. Para testar o papel da sinalização pelo AR nesta padronização AP, manipulamos a via de AR do peixe zebra com um pulso do inibidor das enzimas RALDHs, DEAB, com AR exógeno e com um inibidor da enzima CYP26 (IC), que cataboliza o AR. Os resultados obtidos durante o período da onda CR de RALDH2, sugerem que os tratamentos com DEAB produzem átrios significativamente reduzidos, em média 24% menores que os do grupo controle, enquanto que os animais tratados com AR apresentam o domínio atrial significativamente expandido, com um aumento de 14% em relação ao grupo controle. Os animais tratados com IC produzem átrios significativamente expandidos, com um aumento médio de 16%. Enquanto que os animais tratados com DEAB e AR em um estágio bem posterior a formação da onda, não mostraram diferença significativa quando comparados com o controle. Estes dados sugerem uma forte correlação entre o evento da onda e a padronização das câmaras cardíacas, semelhante ao que ocorre nos demais amniotos. Portanto o padrão AP do coração em vertebrados é determinado pela presença ou ausência de AR e a onda de RALDH2 é um mecanismo ancestral de padronização dos vertebrados.

Palavras-chave: Ácido Retinóico. Padronização Ântero-Posterior do Coração. Peixe Zebra.

## ABSTRACT

Castro RA. A model for cardiac chambers patterning in *Danio rerio* [Master Thesis (Master in Sciences)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2008.

Retinoic acid (RA) is synthesized by successive oxidations of retinol. The last oxidation step is catalyzed by RALDHs enzymes. During the cardiogenesis, RA is important for atrial development and for growth of the ventricular myocardium. The establishment of the anteroposterior (AP) polarity is critical for the demarcation of outflow (ventricle) and inflow (atrium) regions. Our group proposes that a caudorostral (CR) wave of RALDH2 is the mechanism responsible for this patterning in vertebrates. Research in chick and mouse shows that the CR wave of RALDH2 is responsible for the specification of atria and ventricular identities in these organisms. Although the presence of the wave was confirmed in the zebrafish (*Danio rerio*), until now, there have been no attempts to correlate it to the inflow/outflow patterning of the zebrafish heart. To test the role of RA signaling in zebrafish AP patterning, we manipulated its signaling with a RALDH inhibitor, DEAB, with RA and with an inhibitor of its degrading enzyme, CYP26 (IC). DEAB treatments that coincide with expression of the RALDH2 wave produced reduced atria, in average, 24% smaller than controls, conversely, treatments with RA and IC, presented, respectively, increases of 14% and 16%. Animals treated with DEAB and RA during a stage posterior to the wave did not produce any significant differences in atrial or ventricular sizes. These data suggest a strong correlation between the wave event and cardiac chamber patterning, similar to the mechanism observed in others amniotes.

**Key words:** Retinoic acid. Anteroposterior heart patterning. Zebrafish.

## 1 INTRODUÇÃO

Diversos estudos em vertebrados ressaltam o papel da sinalização por ácido retinóico (AR) em uma série de fenômenos fundamentais para o desenvolvimento deste grupo, como na padronização ântero-posterior (AP) do coração, na padronização esquerda-direita, na organização dos brotos dos membros e na padronização do romboencéfalo, do olho e dos arcos branquiais (Hochgreb, et al., 2003; Pourquie, 2003; Mic, et al, 2004; Chambers, et al, 2007). Portanto, o estudo de mecanismos conservados envolvidos com a sinalização por AR pode colaborar para o entendimento das relações evolutivas que cercam a ancestralidade comum dentro do grupo dos vertebrados.

O AR é sintetizado a partir da oxidação sucessiva de seu precursor, o álcool retinol (vitamina A), proveniente da dieta. A síntese do AR começa com a oxidação reversível do retinol para retinaldeído. Esta etapa é conduzida por enzimas álcool-desidrogenases (ADHs) de vários tipos e com grande distribuição nos tecidos, por retinol desidrogenases tal como a RDH10 de expressão mais restrita, e por desidrogenases/redutases microssomais (SDRs). A conversão do retinaldeído em AR é mediada pela ação das retinaldeído desidrogenases (RALDHs), que oxidam irreversivelmente o retinaldeído em AR (Duester, 2000; Molotkov, et al., 2002; Hochgreb, et al., 2003; Simões-Costa, et al., 2008; Sandell, et al., 2007).

Durante a morfogenia cardíaca ocorre uma sucessão de fenômenos de padronização e diferenciação que demandam a sinalização pelo AR. A regulação dessa sinalização no coração se deve, em grande medida, à regulação da expressão do gene da *raldh2*, cujo padrão de expressão coincide quase totalmente com as regiões onde o AR é detectado (Moss, et al., 1998).

Uma das decisões mais precoces durante a formação do coração é o estabelecimento de sua polaridade ântero-posterior (AP). O estabelecimento desta polaridade é crítico para a demarcação das regiões miocárdicas de influxo e efluxo, que originarão, mais tardiamente, as câmaras atriais e ventriculares, respectivamente (Hochgreb, et al., 2003). A partir das evidências levantadas pelo nosso grupo, acreditamos que o padrão AP do coração em vertebrados é determinado pela presença ou ausência de AR: regiões posteriores que primeiro receberam a sinalização pelo AR darão origem a estruturas de influxo, como átrios e seio venoso, enquanto que as regiões

do tecido cardíaco anterior, que durante o período de especificação não entraram em contato com o AR, formarão estruturas de efluxo, como os ventrículos e o conotrônco (Moss, et al., 1998; Xavier-Neto, et al., 1999, 2000, 2001; Hochgreb, et al., 2003).

Em experimentos com embriões de amniotos, tais como a galinha e o camundongo, nosso grupo sugeriu que o mecanismo embrionário responsável pelo comprometimento dos destinos sino-atriais pode ser representado por duas etapas: a primeira, de especificação, caracteriza-se pela difusão de AR até os precursores cardíacos posteriores, especificando o destino sino-atrial nestas células, enquanto que a segunda etapa, de determinação, caracteriza-se por uma onda caudo-rostral de RALDH2 que invade o campo cardíaco posterior, conferindo aos precursores atriais a capacidade de sintetizar o seu próprio AR, fixando, assim, o seu destino atrial (Hochgreb, et al, 2003). Portanto, é possível que a onda de RALDH2 seja um mecanismo ancestral de formação das câmaras cardíacas em vertebrados. Esta hipótese lançada recentemente por nosso grupo é apoiada pela conservação do padrão da onda de expressão entre vertebrados mais basais, tais como anfíbios e peixes, sugerindo que a onda de RALDH2 é um mecanismo basal em vertebrados (Simões-Costa, dados não publicados). Este trabalho visa estudar a possível correlação entre a observação da onda com o seu papel na padronização AP do tubo cardíaco de peixes.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A VIA DE SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DO ÁCIDO RETINÓICO

O ácido retinóico (AR) é obtido através de duas oxidações sucessivas do retinol (Vitamina A). A primeira etapa de oxidação é reversível e consiste na transformação do retinol em retinaldeído, principalmente, pela ação de enzimas de duas famílias enzimáticas, as álcool desidrogenases (ADHs) e as desidrogenases/redutases microssomais (SDRs). As ADHs apresentam uma grande distribuição nos tecidos e são capazes de metabolizar as moléculas de 9-*cis* retinol e all-*trans* retinol em 9-*cis* retinaldeído e all-*trans* retinaldeído e respectivamente (Simões-Costa, et al., 2008). Já as enzimas SDRs metabolizam somente as moléculas de all-*trans* retinol. A segunda etapa de síntese do AR é irreversível e consiste na oxidação do retinaldeído em AR. As principais enzimas responsáveis por essa oxidação são as retinaldeído desidrogenases (RALDHs), que são capazes de oxidar, respectivamente, as moléculas de 9-*cis* retinaldeído e all-*trans* retinaldeído em AR 9-*cis* e AR all-*trans* e respectivamente (Labrecque, et al., 1995; Duester, 1996, 2000; Simões-Costa, et al., 2008). Aparentemente, alguns membros da família do citocromo P450 são capazes de oxidar retinaldeído em AR em pequenas quantidades. Experimentos *in vitro* com membros dessa família de citocromos, como a CYP1A2 (Roberts, et al., 1991), a CYP2J4 (Honkakoski e Negishi, 2000; Zhang, et al., 1998) e a CYP1B1 (Chambers, et al., 2007) sugerem essa capacidade de síntese em pequenas quantidades.

Além das enzimas diretamente envolvidas com a síntese de AR, tais como as ADHs e RALDHs, existem ainda uma série de enzimas que regulam a disponibilidade de AR nos sistemas biológicos, tais como: as proteínas celulares de ligação retinóica, *cellular retinoid binding proteins* (CRBP e CRABP), e a maioria dos membros da família do citocromo P450. (Napoli, 1999; Yost, et al., 1988). Alguns membros da família do citocromo P450, principalmente a subfamília CYP26, são responsáveis pela degradação do AR em: 4-hidroxi-AR, 4-*oxo*-AR e 5,8-*epoxy*-AR (Simões-Costa, et al., 2008). Devido à sua intensa participação na degradação do AR, a CYP26 favorece o estabelecimento de um gradiente de sinalização pelo AR, necessário para a

padronização ântero-posterior (AP) do coração (Hochgreb, et al., 2003), do romboencéfalo, do olho, dos arcos branquiais e da padronização esquerda-direita do corpo (Maden, 2007; Reijntjes, et al., 2004; Hernandez, et al., 2007; Chambers, et al., 2007; White, et al., 2007), além de proteger os tecidos do excesso de AR (Simões-Costa, et al., 2008).

### 2.1.1 O papel da enzima RALDH2

As ALDHs são responsáveis por uma série de transformações fisiológicas de aldeídos em ácidos, tais como a conversão irreversível do acetaldeído em ácido acético e do retinaldeído em AR (Duester, 2001). Em vertebrados a superfamília das ALDHs é representada por no mínimo 18 enzimas distintas, cujas formas RALDH1, RALDH2 e RALDH3 são capazes de catalizar a oxidação NAD-dependente do retinaldeído em AR (Yoshida, et al., 1998, Vasilou, et al., 1999). A expressão de RALDH1 é observada nos grupos de tecidos embrionários dependentes de retinóides, tais como o olho, o timo e os mesonéfrons. A RALDH3 é expressa na retina, no epitélio olfativo, na lâmina do intestino e nos rins (Niederreither, et al., 2002). Já a expressão de RALDH2 é observada na vesícula ótica, nos somitos, nos rins e no coração (Duester, 2001). A análise da estrutura terciária da molécula de RALDH2 revelou que os canais de entrada de substrato dessa enzima são capazes de discriminar as moléculas de retinaldeído de outras pequenas cadeias de aldeídos, além de apresentar um sítio de ativação capaz de acomodar mais formas de retinaldeídos quando comparada a estrutura terciária das demais RALDHs, o que, provavelmente, possibilita a eficiência catalítica de oxidação 15 vezes maior que a da RALDH1 (Duester, 2001; Lamb e Newcomer, 1999).

Camundongos com a mutação *knockout* para o gene da *raldh2* produzem má formações com alta letalidade (Mic, et al., 2003; Niederreither, et al., 1999), além de não desenvolverem nem o átrio e nem os brotos dos membros, morrendo posteriormente, possivelmente, por uma deficiência circulatória aguda. Uma análise mais detalhada dos fenótipos cardíacos dos animais *knockout* indica que alguns embriões desenvolveram um compartimento sino atrial rudimentar, o que sugere que mesmo uma pequena



quantidade de AR materno é capaz de recuperar em parte o fenótipo atrial (Xavier-Neto, et al., 2001).

## 2.2 A SINALIZAÇÃO POR AR

O AR sintetizado, nas suas duas formas *all-trans* e *9-cis*, ingressa no núcleo celular, onde se liga a dois membros da superfamília de receptores hormonais nucleares, os receptores nucleares de ácido retinóico (RARs) e ao receptor retinóico X (RXRs), que formam entre si o heterodímero, RAR-RXR. As moléculas de AR *all-trans* se ligam, exclusivamente, aos RARs, enquanto que as moléculas de AR *9-cis* podem se ligar tanto aos RARs quanto aos RXRs. Portanto, os RXRs transduzem exclusivamente os sinais de AR *9-cis*, enquanto que os RARs podem transduzir tanto os sinais de AR *9-cis* quanto os AR *all-trans*. (Simões-Costa, et al., 2008; Chambon, 1996). A formação do heterodímero RAR-RXR sem a presença de moléculas ligantes de AR, inativa o RXR, incapacitando-o de se ligar ativamente a qualquer outra molécula. Dessa forma o único receptor nuclear ativo na forma heterodimera é o RAR (Callejá, et al., 2006). Quando o RAR se liga as moléculas de AR *9-cis* e *all-trans*, ocorre uma mudança na conformação alostérica, que torna o RXR ativo para co-ativadores, sinergizarão a transdução (Vivat, et al., 1997). O complexo AR-RAR-RXR, liga-se especificamente a certas regiões regulatórias dos genes alvos, regiões conhecidas como elementos de resposta ao AR (RARE), modulando dessa forma a transcrição desses genes alvos (Chambers, et al., 2007). Zhang e colaboradores (1992) observaram que a molécula de AR *9-cis* pode estimular a formação de homodímeros de RXR ativos, o que sugere a possibilidade de dois mecanismos de transmissão do sinal do AR (Mic, et al., 2003).

Em vertebrados, a sinalização por AR atua diretamente sobre genes que contém domínios homeobox, tais como *hoxa1*, *hoxb1*, *hoxb4*, *hoxd5d* e *cdx1* (White, et al., 2007, Cañestro e Postlethwait, 2007; Maves e Kimmel, 2005). Esses genes são cruciais para a padronização corporal do embrião durante o desenvolvimento, além de regular a expressão de genes envolvidos com a própria via de sinalização e metabolização do AR, como nos casos dos genes *cyp26a1*, *rara*, *rarb* e *rary*, sendo estes últimos três, responsáveis pela codificação dos receptores nucleares de ácido retinóico (RARs) (White, et al., 2007).

### 2.2.1 O papel da enzima CYP26

A enzima CYP26 é um membro da superfamília do citocromo P450 que cataboliza o AR em 4-hidroxi-AR, 18-hidroxi-AR, 4-*oxo*-AR e 5,8-*epoxy*-AR. Após a degradação do AR pela CYP26 a única forma consideravelmente ativa é 4-*oxo*-AR (Reijntjes, et al., 2004; Raner, et al., 1996). Camundongos com a mutação *knockout* para o eletrodoador de todas as enzimas P450 microssomais apresentaram o aumento dos níveis de AR, a diminuição dos níveis de retinol, a inibição da vasculogênese e uma série de anormalidades fenotípicas (Otto, et al., 2003). Em camundongos *knockout* para o gene *cyp26a1* foram observadas alterações fenotípicas consistentes com o fenótipo de animais tratados com excesso de AR, tais como truncamento do corpo e padrão anormal do mesencéfalo (Abu-Abed, et al., 2001).

O AR exerce um efeito indutor direto sobre a expressão do gene *cyp26*. A redução da disponibilidade de AR reduz significativamente a expressão da CYP26, enquanto que o excesso de AR induz o aumento da região de expressão da CYP26 (Reijntjes, et al., 2004; Swindell, et al., 1999). Trabalhos sobre desenvolvimento do olho, do sistema nervoso e da formação do eixo caudo-rostral do embrião, observaram um padrão complementar entre as regiões que expressavam a CYP26 e as regiões de síntese de AR (Reijntjes, et al., 2004, Swindell, et al., 1999). Esse padrão complementar produz um gradiente de AR, o que garante que certos tecidos não produzam AR e a degradação do AR que eventualmente alcance essas regiões (Swindell, et al., 1999).

### **2.3 A PADRONIZAÇÃO ÂNTERO-POSTERIOR (AP) DO CORAÇÃO EM VERTEBRADOS**

O estabelecimento da polaridade AP do coração é um dos eventos mais precoces do desenvolvimento de vertebrados. Durante a padronização AP são demarcadas as regiões miocárdicas de influxo e efluxo, que originarão, mais tardiamente, as câmaras atriais e ventriculares, respectivamente (Hochgreb, et al., 2003). Diversos estudos em vertebrados sugerem a sinalização por AR como um dos principais fatores de padronização AP do coração de vertebrados (Sirbu, et al., 2008). Tratamentos com AR em embriões de galinha durante os estágios HH4 e HH7 (estágios de Hamburger e Hamilton) produzem no tubo cardíaco um truncamento da porção anterior e um aumento da porção caudal (Niederreither, et al., 2001), o que resulta num aumento do tamanho das regiões de influxo (átrios e seio venoso) em relação as regiões de efluxo (ventrículos e conotronco) (Hochgreb, et al., 2003; Osmond, et al., 1991). Esse truncamento do tubo cardíaco também foi observado em peixes zebras tratados com AR exógeno sob distintas concentrações (Stainier e Fishman, 1992). Os estudos em camundongos, também ressaltam o papel da sinalização por AR para o desenvolvimento posterior das câmaras cardíacas, para a diferenciação dos cardiomiócitos ventriculares e para a realização do “looping” cardíaco (Niederreither, et al., 2001). A ação do AR sob a padronização AP do coração não se restringe apenas ao grupo dos vertebrados.

Embora exista uma série de evidências apontando o AR como um forte candidato a ser o principal regulador da padronização AP do coração de vertebrados, existe, ainda, muito pouco consenso sobre o funcionamento exato do mecanismo de ação do AR na formação e padronização das câmaras cardíacas. Keegan e colaboradores (2005) revelaram que a perda de sinalização do AR gera um aumento e alteração da especificação da identidade das células progenitoras cardíacas (CPCs) na região da zona lateral marginal. Schoenebeck e Yelon (2007), a partir de uma série de evidências sugerem que a raiz do mecanismo de formação das câmaras cardíacas e, conseqüentemente, da padronização AP do coração está na especificação e padronização das CPCs. Yelon e seus colaboradores concluíram que a sinalização por AR é fundamental para restringir a produção e especificação das CPCs. Segundo o

modelo sugerido por esse grupo a formação das câmaras cardíacas e a padronização AP do coração estão relacionadas a sinalização de AR nos estágios iniciais de especificação das CPCs, a mutações em genes relacionados com a migração celular de cardiomiócitos, tais como *heart of glass (heg)*, *santa (krit1)*, e *valentine (ccm2)*, além de influências ambientais, como a ação de forças biomecânicas (Hove, et al., 2003). Embora esse modelo seja bem fundamentado, nosso grupo sugere que a sinalização por AR na padronização das câmaras cardíacas não se limita a restrição e especificação das CPCs. Evidências levantadas sugerem que uma “onda” de sinalização por AR especifica e determina as regiões de influxo e efluxo (Hochgreb, et al., 2003).

### **2.3.1 O mecanismo da onda de RALDH2 entre amniotos**

Nosso grupo sugere, a partir de uma série de evidências, que o mecanismo embrionário responsável pela distinção entre os segmentos AP cardíacos é uma onda caudo-rostral de expressão da RALDH2. Esta onda comunica aos precursores cardíacos mais posteriores a capacidade de sintetizar seu próprio AR em altas concentrações, o que determinaria seu destino sino-atrial. A determinação dos destinos sino-atriais pode ser representada por duas etapas: a primeira, de especificação, caracterizada pela difusão de AR até os precursores cardíacos posteriores, especificando o destino sino-atrial nestas células. A segunda etapa, de determinação, caracteriza-se por uma onda caudo-rostral de RALDH2 que invade o campo cardíaco posterior, conferindo aos precursores atriais a capacidade de sintetizar o seu próprio AR, fixando, assim, o seu destino atrial (Hochgreb, et al., 2003). Portanto, a padronização AP seria determinada pela presença ou ausência de AR. As regiões posteriores que primeiro receberam a sinalização pelo AR darão origem a estruturas de influxo, tais como átrios e seio venoso, enquanto que as regiões do tecido cardíaco anterior, que durante o período de especificação não entraram em contato com o AR, formarão estruturas de efluxo, ventrículos e conotronco (Moss, et al., 1998; Xavier-Neto, et al., 1999, 2000, 2001; Hochgreb, et al., 2003).

É provável que a onda de RALDH2 seja um mecanismo ancestral de formação das câmaras cardíacas em vertebrados. Esta hipótese, lançada por nosso grupo (Hochgreb, et al., 2003), é apoiada pela conservação da sequência do gene da *raldh2* ao

longo da evolução e pela conservação de seu padrão de expressão entre vertebrados mais basais tais como anfíbios e peixes, sugerindo que a onda de RALDH2 seja um mecanismo basal de padronização (Simões-Costa, et al., não publicado).

## 2.4 O PEIXE ZEBRA

O peixe zebra (*Danio rerio*) é um peixe de águas frescas tropicais, originário da Ásia Central (Engeszer, et al., 2007), membro da classe Actinopterygii, infraclasse Teleostei, ordem dos Cipriniformes, família Ciprinidae, cujo tempo de divergência molecular com os seres humanos é de aproximadamente 450 milhões de anos (Postlethwait, et al., 2000; Kumar e Hedges, 1998) O peixe zebra, popularmente conhecido como “zebrafish” ou “paulistinha”, é atualmente um excelente organismo modelo para os estudos de desenvolvimento dos vertebrados, apresentando características genéticas e anatômicas conservadas em relação a outros modelos extensivamente trabalhados, tais como o camundongo, a galinha e os sapos (Barbazuk, et al., 2000).

As técnicas utilizadas em *Danio rerio* em sua maioria foram desenvolvidas em outros modelos de vertebrados e posteriormente adaptadas a ele. Estudos desenvolvidos a partir da década de 80 em mutantes de peixe zebra proporcionaram modelos úteis para o estudo de dimorfologias humanas e das relações entre mutações gênicas pontuadas e adaptações estruturais durante o curso da evolução (Grunwald e Eisen, 2002)

Muitas são as características que fazem destes peixes organismos apropriados para estudos genéticos do desenvolvimento e da diferenciação. Entre elas estão: desenvolvimento externo, fácil visualização de seus órgãos internos durante a embriogênese, período relativamente curto de geração (aproximadamente 3 meses para alcançar a idade reprodutiva); tamanho pequeno quando adulto (de 3 a 4 cm), alta fecundidade, baixo custo de manutenção, o que facilita os trabalhos genéticos em grande escala (North e Zon, 2003) e formação relativamente rápida da maioria de seus órgãos, aproximadamente 24 horas pós-fecundação.

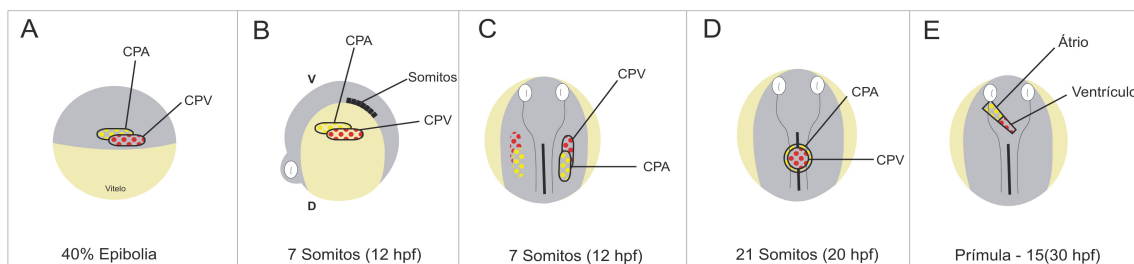
Além disso, o peixe zebra apresenta características especificamente importantes para o estudo do desenvolvimento cardiovascular, tais como: 1) rapidez na morfogênese

das câmaras cardíacas, que se inicia 24 horas pós-fecundação (hpf) e que, por volta de 36hpf, já permite intensa circulação (Stainier, et al., 1993) e 2) relativa tolerância do desenvolvimento embrionário precoce a alterações cardio-circulatórias graves, o que permite a identificação de defeitos cardíacos que em outros modelos levariam à morte embrionária (Pelster e Burggren, 1996; Driever e Fishman, 1996).

#### **2.4.1 A formação do coração do peixe zebra**

O coração embrionário do peixe zebra é basicamente um tubo contrátil constituído de duas câmaras: o ventrículo e o átrio. Cada câmara apresenta uma camada externa de miocárdio e uma interna de endocárdio. Molecularmente, as câmaras apresentam expressões gênicas específicas. O ventrículo, por exemplo, expressa o gene de miosina de cadeia pesada específica do ventrículo, chamado de *vmhc*, enquanto que o átrio expressa o gene específico de miosina de cadeia pesada atrial, o *amhc*.

Os estágios iniciais de formação do coração no peixe zebra são similares aos que ocorrem nos demais vertebrados. Durante a gastrulação, as células progenitoras cardíacas localizam-se bilateralmente no mesoderma lateral. Estas células migram medialmente, em ambos os lados da linha média do embrião, formando um primórdio de epitélio tubular. Estes epitélios posteriormente se fundem formando o tubo cardíaco definitivo onde se localizam as duas regiões contráteis: átrio e ventrículo (Vogel e Weinstein, 2000) (Figura 1). A coordenação seqüencial das contrações realizadas pelas câmaras gera um fluxo unidirecional do átrio para o ventrículo, através da vasculatura, onde ocorrem as trocas, e de volta ao fluxo originário, passando pelo átrio e, novamente, pelo ventrículo (Berdougo, et al., 2003).



**Figura 1: Cardiogênese do peixe zebra.** As figuras de “A” a “E” representam o desenvolvimento cardíaco do peixe zebra. Em “A” os dois conjuntos celulares que originarão as câmaras cardíacas, em amarelo (CPA) as células que contribuirão para a formação do átrio, e em vermelho (CPV), as células que contribuirão para o ventrículo. Em “B” e “C”, respectivamente, vista lateral e dorsal, do estágio de 7-somitos (12hpf), as células progenitoras cardíacas localizam-se bilateralmente no mesoderma lateral, onde posteriormente iniciam a sua migração para a linha média do embrião. Em “D” fusão dos epitélios formados por CPA e CPV, originando o tubo cardíaco. Em o tubo cardíaco formado com as duas câmaras cardíacas, átrio (amarelo) e ventrículo (vermelho). CPA: Células Progenitoras Cardíacas; CPV: Células Progenitoras Ventriculares; Hpf: Horas pós-fecundação. Figura baseada em Schoenebeck e Yelon (2007).

## 7 CONCLUSÃO

A manipulação da sinalização do AR em peixes produziu alterações significativas na relação entre os domínios atriais e ventriculares. A administração de um inibidor da principal enzima responsável pela síntese de AR, a RALDH2, produziu domínios atriais menores que os controles, o que evidencia tanto o papel da enzima RALDH2 como uma enzima chave na sinalização do AR, quanto a importância da sinalização pelo AR no desenvolvimento das câmaras cardíacas em peixes. Essa última constatação é reforçada a partir dos experimentos nos quais a enzima responsável pela degradação do AR, CYP26, foi inibida. Sem a ação da CYP26, o que se observou foi um aumento significativo do domínio atrial. Esses resultados sugerem que para a padronização das câmaras cardíacas em peixes, são necessários dois elementos: a sinalização do AR e o equilíbrio entre a sua síntese e degradação, respectivamente, mediadas pela RALDH2 e pela CYP26.

Os resultados da inibição da CYP no momento da padronização cardíaca sugerem que a perturbação do equilíbrio de síntese e degradação do AR altera as proporcionalidades dos domínios atriais e ventriculares. Possivelmente, a ausência da enzima que cataboliza o AR acarrete na expansão de sua sinalização para as células progenitoras cardíacas anteriores, que normalmente não receberiam tal comunicação. Segundo o modelo de padronização pela onda, durante o período de especificação, os tecidos cardíacos anteriores que não receberem a sinalização do AR originarão estruturas de efluxo, como o ventrículo, enquanto que os tecidos cardíacos posteriores, que receberam primeiro tal sinalização, originarão estruturas de influxo, como o átrio. O aumento médio do domínio atrial observado nos tratamentos com o inibidor da CYP possivelmente está associado ao aumento da disponibilidade de AR no meio que faz com que ele alcance regiões que normalmente, não a receberiam, aumentando, dessa forma área de tecido cardíaco que recebe a sinalização AR.

Os resultados sugerem, também, que a onda caudo-rostral de RALDH2 é a responsável pela a padronização das câmaras cardíacas em peixes, já que a ação do DEAB, durante a formação da onda afeta o desenvolvimento do campo atrial. Inversamente, a ação de AR exógeno fortalece a comunicação da onda, aumentando a área atrial. A ação da onda, como o principal fator envolvido com a padronização das câmaras cardíacas em peixes, pode ser mais evidenciada nos experimentos que



envolveram a manipulação da via fora da janela crítica de resposta ao AR e com o aumento do tempo de exposição ao inibidor, DEAB. Os animais tratados com AR e DEAB por duas horas, durante o estágio de 26 somitos (21hpf), não apresentaram nenhuma alteração significativa dos domínios ventriculares e atriais. Os animais expostos por quatro e oito horas em baixas concentrações de DEAB apresentaram o domínio atrial significativamente reduzido. Esse experimento acompanha todo o período de desenvolvimento da onda de RALDH2, sugerindo que o prolongamento temporal da inibição, mesmo em pequenas concentrações do inibidor, é o suficiente para perturbar a sinalização da onda de RALDH2.

Em resumo, os nossos resultados indicam que o padrão AP do coração do peixe zebra é determinado pela presença ou ausência de AR, determinada pelo mecanismo dinâmico da onda caudo-rostral de RALDH2. Portanto, este mecanismo parece ser conservado em todos os principais modelos experimentais de desenvolvimento de vertebrados.

## REFERÊNCIAS\*

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 Jan; 15;15(2):226-40.

Auman HJ, Coleman H, Riley HE, Olale F, Tsai HJ, Yelon D. Functional modulation of cardiac form through regionally confined cell shape changes. *PLoS Biol.* 2007 Mar;5(3):e53.

Begemann G, Marx M, Mebus K, Meyer A, Bastmeyer M. Beyond the neckless phenotype: influence of reduced retinoic acid signaling on motor neuron development in the zebrafish hindbrain. *Dev Biol.* 2004 Jul; 1;271(1):119-29.

Berdougo E, Coleman H, Lee DH, Stainier DY, Yelon D. Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish. *Development.* 2003 Dec; 130(24):6121-9. Epub, 2003 Oct 22.

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

Chambers D, Wilson L, Maden M, Lumsden A. RALDH-independent generation of retinoic acid during vertebrate embryogenesis by CYP1B1. *Development.* 2007 Apr; 134(7):1369-83. Epub, 2007 Feb 28.

Calléja C, Messaddeq N, Chapellier B, Yang H, Krezel W, Li M, Metzger D, Mascrez B, Ohta K, Kagechika H, Endo Y, Mark M, Ghyselinck NB, Chambon P. Genetic and pharmacological evidence that a retinoic acid cannot be the RXR-activating ligand in mouse epidermis keratinocytes. *Genes Dev.* 2006 Jun 1;20(11):1525-38.

Cañestro C, Postlethwait JH. Development of a chordate anterior-posterior axis without classical retinoic acid signaling. *Dev Biol.* 2007 May 15; 305(2):522-38. Epub 2007 Mar 2.

Duester G. Involvement of Alcohol Dehydrogenase, Short-Chain Dehydrogenase/Reductase, Aldehyde Dehydrogenase, and Cytochrome P450 in the Control of Retinoid Signaling by Activation of Retinoic Acid Synthesis. *Biochemistry.* 1996; 35 (38): 12221 -12227.

---

\* 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].

Duester G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function. Production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem.* 2000; 267: 4315-4324.

Driever W, Fishman MC, The zebrafish: heritable disorders in transparent embryos. *J Clin Invest.* 1996; 97:1788-1794.

Engeszer RE, Patterson LB, Rao AA, Parichy DM. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish.* 2007; 4(1):21-40.

Grunwald DJ, Eisen JS. Headwater of the zebrafish - emergence of a new model vertebrate. *Nat Rev Gene.* 2002; 3(9): 717-724.

Hernandez RE, Putzke AP, Myers JP, Margaretha L, Moens CB. Cyp26 enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development. *Development.* 2007 Jan;134 (1):177-87.

Honkakoski P, Masahiko N. Regulation of cytochrome P450 (*CYP*) genes by nuclear receptors *Biochem J.* 2000; 347: 321-337.

Hochgreb T, Linhares VL, Menezes DC, Sampaio AC, Yan CY, Cardoso WV, Rosenthal N, Xavier-Neto J. A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. *Development.* 2003 Nov; 130(22):5363-74. Epub 2003 Sep 16.

Hove JR, Koster RW, Forouhar AS, Acevedo-Bolton G, Fraser SE, Gharib M. Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis. *Nature.* 2003; 421: 172-177.

Labrecque J, Dumas F, Lacroix A, Bhat PV. A novel isoenzyme of aldehyde dehydrogenase specifically involved in the biosynthesis of 9-*cis* and all-*trans* retinoic acid. *Biochem J.* 1995; 305: 681-684.

Keegan BR, Meyer D, Yelon D. Organization of cardiac chamber progenitors in the zebrafish blastula. *Development.* 2004;131(13):3081-91. Epub 2004 Jun 2.

Keegan BR, Feldman JL, Begemann G, Ingham PW, Yelon D. Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool. *Science.* 2005 Jan 14;307(5707):247-9.

Kopinke D, Sasine J, Swift J, Stephens WZ, Piotrowski T. Retinoic acid is required for endodermal pouch morphogenesis and not for pharyngeal endoderm specification. *Dev Dyn.* 2006 Oct; 235 (10):2695-709.

Lamb AL, Newcomer ME. The structure of retinal dehydrogenase type II at 2.7 Å, resolution: implications for retinal specificity. *Biochemistry.* 1999; (38) 6003-11.

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

Maves L, Kimmel CB. Dynamic and sequential patterning of the zebrafish posterior hindbrain by retinoic acid. *Dev Biol.* 2005 Sep 15; 285(2):593-605.

Mic FA, Molotkov A, Benbrook DM, Duester G. Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 10;100(12):7135-40. Epub 2003 Jun 2.

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, Nayeem SM, Mccaffery P, Drager UC, Rosenthal N. Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* 1998; 199: 55-71.

Napoli JL. Retinoic acid: its biosynthesis and metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1999; 63:139-188.

North TE, Zon LI. Modeling Human Hematopoietic and Cardiovascular Diseases in Zebrafish. *Dev Dyn.* 2003; 228:568–583.

Niederreither K, Fraulob V, Garnier JM, Chambon P, Dollé P. Differential expression of retinoic acid-synthesizing (RALDH) enzymes during fetal development and organ differentiation in the mouse. *Mech Dev.* 2002 Jan; 110(1-2):165-71.

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

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.

Otto DM, Henderson CJ, Carrie D, Davey M, Gundersen TE, Blomhoff R, Adams RH, Tickle C, Wolf CR. Identification of novel roles of the cytochrome p450 system in early embryogenesis: effects on vasculogenesis and retinoic Acid homeostasis. *Mol Cell Biol.* 2003 Sep;23(17):6103-16.

Pelster B, Burggren WW. Disruption of hemoglobin oxygen transport does not impact oxygen-dependent physiological processes in developing embryos of zebrafish (*Danio rerio*). *Circ Res.* 1996; 79:358–362.

Pourquie O. Vertebrate somitogenesis: a novel paradigm for animal segmentation? *Int J Dev Biol.* 2003; 47:597–603.

Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, Huang H, Hill-Force A, Talbot WS. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res.* 2000; Dec; 10 (12):1890-902.

Raner GM, Vaz AD, Coon MJ. Metabolism of all-trans, 9-*cis*, and 13-*cis* isomers of retinal by purified isozymes of microsomal cytochrome P450 and mechanism-based inhibition of retinoid oxidation by citral. *Mol Pharmacol.* 1996; 49:515-522.

Reijntjes S, Gale E, Maden M. Generating gradients of retinoic acid in the chick embryo: Cyp26C1 expression and a comparative analysis of the Cyp26 enzymes. *Dev Dyn.* 2004 Jul; 230 (3):509-17.

Roberts ES, Vaz AD, Coon MJ. Role of isozymes of rabbit microsomal cytochrome P-450 in the metabolism of retinoic acid, retinol, and retinal. *Mol Pharmacol.* 1991; 41:427-433.

Russo J, Barnes A, Berger K, Desgrosellier J, Henderson J, Kanters A, Merkov L. 4-(N,N-dipropylamino) benzaldehyde inhibits the oxidation of all-trans retinal to all-trans retinoic acid by ALDH1A1, but not the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells exposed to all-trans retinal. *BMC Pharmacol.* 2002; 2:4. Epub 2002 Feb 12.

Schoenebeck JJ, Yelon D. Illuminating cardiac development: Advances in imaging add new dimensions to the utility of zebrafish genetics. *Semin Cell Dev Biol.* 2007 Feb;18(1):27-35.

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; 1;21(9):1113-24.

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; 310:54-72.

Sirbu IO, Zhao X, Duester G. Retinoic acid controls heart anteroposterior patterning by down-regulating *Isl1* through the *Fgf8* pathway. *Dev Dyn.* 2008; 237(6):1627-35.

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

Stainier DYR, Lee RK, Fishman MC. Cardiovascular development in the zebrafish. *Development.* 1993; 119:31–40.

Swindell EC, Thaller C, Sockanathan S, Petkovich M, Jessell TM, Eichele G. Complementary domains of retinoic acid production and degradation in the early chick embryo. *Dev Biol.* 1999; 216(1):282-96.

White RJ, Nie Q, Lander AD, Schilling TF. Complex regulation of *cyp26a1* creates a robust retinoic acid gradient in the zebrafish embryo. *PLoS Biol.* 2007 Nov; 5(11):e304.

Vasiliou V, Bairoch A, Tipton KF, Nebert DW. Eukaryotic aldehyde dehydrogenase (ALDH) genes: human polymorphisms, and recommended nomenclature based upon divergent evolution and chromosomal mapping. *Pharmacogenetics.* 1999; 9:421-34.

Vogel AM, Weinstein BM. Studying vascular development in the zebrafish. *Trends Cardiovasc Med.* 2000 Nov; 10(8):352-60.

Vivat V, Zechel C, Wurtz JM, Bourguet W, Kagechika H, Umemiya H, Shudo K, Moras D, Gronemeyer H, Chambon P. A mutation mimicking ligand-induced conformational change yields a constitutive RXR that senses allosteric effects in heterodimers. *EMBO J.* 1997 Sep 15; 16(18):5697-709.

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; 219:129-41.

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

Xavier-Neto J, Neville CM, Shapiro MD, Houghton L, Wang GF, Nikovits Junior W, Stockdale FE, Rosenthal N. A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart. *Development.* 1999; 126: 2677-87.

Zhang QY, Raner G, Ding X, Dunbar D, Coon MJ, Kaminsky LS. Characterization of the cytochrome P450 CYP2J4: expression in rat small intestine and role in retinoic acid biotransformation from retinal. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 353: 257-64.

Zhang XK, Lehmann J, Hoffmann B, Dawson MI, Cameron J, Graupner G, Hermann T, Tran P, Pfahl M. Homodimer formation of retinoid X receptor induced by 9-cis retinoic acid. *Nature.* 1992; 358, 587-91.

Keegan BR, Feldman JL, Begemann G, Ingham PW, Yelon D. Retinoic acid signaling restricts the cardiac progenitor pool. *Science.* 2005; 307(5707):247-9.

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

Yost RW, Harrison EH, Ross AC. Esterification by rat liver microsomes of retinol bound to cellular retinol-binding protein. *J Biol Chem.* 1988; 263:18693-701.

Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem.* 1998; (251): 549–57.