

**TÂNIA MARIA DE ANDRADE RODRIGUES**

**CARACTERIZAÇÃO DAS FUNÇÕES DO GENE RING FINGER 4  
NA EMBRIOGÊNESE CARDÍACA**

**Tese apresentada à Faculdade de CIÊNCIAS DA SAÚDE da  
Universidade de Brasília para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências da Saúde**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis da Rocha Neves**

**Brasília  
2006**

**Trabalho realizado no Laboratório de Anatomia da Faculdade de Medicina da Universidade de Wisconsin / Madison / Estados Unidos, como parte do doutorado, em colaboração com o Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis da Rocha Neves**

**TÂNIA MARIA DE ANDRADE RODRIGUES**

**CARACTERIZAÇÃO DAS FUNÇÕES DO GENE RING FINGER 4 NA  
EMBRIOGÊNESE CARDÍACA**

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências da Saúde**

A Deus, em sua benevolência.

Aos meus pais, Seu Osvaldo Andrade (*in memorium*) e Dona Luzanira, pelo ensino do valor do trabalho honesto.

Ao meu marido e cúmplice Sandro.

Aos meus filhos adorados, Vitor e Enrico, razões de meu viver.

Aos meus queridos Alice e Chico, Paulo, Mayra e Taynara, Luzanira Maria, Solange, Manuella, Mônica, Livia e Alicinha, Sandra, Ricardo, Camile, Tiago e Cecília, Célia e Mateus, Osvaldo, Vilani, Marcelo e Emir e Osmar, Bruno e Bruna.

Aos meus pacientes. Por vocês, fui atrás do conhecimento.



## **AGRADECIMENTOS**

À CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências de Saúde da Universidade de Brasília.

À Universidade Federal de Sergipe, pelo apoio à minha liberação.

Ao professor Francisco de Assis da Rocha Neves, meu orientador, a minha reverência e gratidão.

Ao Dr. Gary Edwards Lyons e ao Departamento de Anatomia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Winconsin/Madison/WI/Estados Unidos, pelo acolhimento durante a condução deste trabalho no Laboratório de Anatomia Molecular.

Aos amigos do Departamento de Morfologia, pelo amigável convívio e pela solidariedade nas horas difíceis.

À Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na figura das funcionárias Sílvia, Grace e Lillian, meu apreço.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular, Guilherme, Lara, Angélica, Rutnéia, Alice, Mari e Rilva que estiveram comigo em algum momento nessa jornada, minha amizade.

Às amigas Rosa Amélia Dantas, Virgínia F. B. Passos, Roberta Miranda Fernandes e Maria Augusta Mundim Vargas, meu afeto.

A Hugo Carvalho Pimentel, pela ajuda na reta final.

## RESUMO

Doenças cardíacas tanto congênitas quanto adquiridas apresentam alta morbi-mortalidade, constituindo no Brasil a primeira causa de óbito (29,9%). O impacto sócio-econômico dessas patologias repercute no sistema de saúde e em uma realidade de escassez de recursos e necessidade de priorização em sua alocação, direcionando para a primacia de investimentos em ciências básicas. Este estudo de cardiogênese experimental é de extrema importância para a compreensão dos mecanismos envolvidos na formação do coração, e o modelo de camundongos geneticamente modificados constitui valiosa ferramenta investigativa. Camundongos com deleção do gene Ringer finger 4 (*rnf4*) foram gerados com o objetivo de avaliar a repercussão nos embriões recessivos negativos das alterações anátomo-patológicas, visando entender a função deste gene na formação do coração. RNF4 é um fator de transcrição que é expresso no coração durante a embriogênese. Foram utilizados camundongos das linhagens BALBc e C57Bl6. Foram dissecados 825 embriões, sendo 423 BALBc e 402 C57Bl6, distribuídos entre as seguintes faixas etárias: de 11 a 17 dias de desenvolvimento embrionário, animais com menos de um dia de vida e animais com 21 dias pós-natal. Os resultados demonstraram que 34.6% dos camundongos com deleção total do *rnf4*, a partir do décimo terceiro dia de desenvolvimento embrionário, apresentaram defeito do septo ventricular, paredes ventriculares finas e desorganização das camadas ventriculares, ocasionando repercussão hemodinâmica e clínica sugestiva de insuficiência

cardíaca congestiva. Além disso, nenhum animal foi viável. Conclui-se que a deleção do gene *rnf4* é letal para os embriões de camundongos por ser essencial na formação do coração. Esses resultados contribuem para entendermos os mecanismos moleculares envolvidos na embriogênese. Ademais, serão úteis no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para as doenças cardíacas.

**Palavras-chave:** embriogênese cardíaca; defeito septo interventricular; fatores transcricionais; *rnf4*; camundongos com deleção de gene.

## ABSTRACT

Cardiac diseases, whether congenital or acquired, show a high mortality rate worldwide and in Brazil, they represent the major cause in natural deaths with 29.9% of the cases. The social and economical impact of those pathologies on the Brazilian Public Health System is particularly worsened due to the lack of resources and the need to optimize the scarce resource allocation, leading to the prioritization of investments towards the basic sciences. For all the above reasons, research in experimental cardiogenesis is of vital importance to the understanding of the mechanisms involved in the heart formation, where models using genetically altered mice constitute an invaluable tool in the investigation for cures. Our study was conducted by deleting the Ring Finger 4 (Rnf4) mouse genes and observing the effects the absence of such gene has in the formation of their hearts. RNF4 is a transcription factor which is expressed in the heart during embryogenesis. In that sense, mice of lineage BALBc and C57B6 which presented the Rnf4 deletion were selected for our experiments. A total of 825 embryos were dissected, where 423 were of the BALBc lineage and 402 of the C57B16 lineage. In either case, the embryos were separated into age groups: 1) 11 to 17 days of embryony development; 2) less than 1 day old; and 3) 21-day old specimens. The results show that 34.6% of the mice with deletion of the Rnf4 gene presented ventricular septal defect (VSD), thin ventricular walls, and disorder of the ventricular layers, leading to hemodynamic and clinical pathologies that suggest congestive heart failure (CHF). Moreover, animals which lack of functional Rnf4 gene die due to cardiac defect. We concluded that deletion of the rnf4 gene is lethal for mice embryos, since such gene is apparently essential in the heart formation. These results will contribute to understand the molecular mechanisms involved in the heart embryogenesis. In addition, it will be helpful to development new therapeutical strategies to heart diseases.

**Key words:** cardiac embryogenesis; transcription factors; rnf4; gene trap mice; ventricle septal defect

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Embriogênese cardíaca .....	14
1.2. Mecanismo molecular envolvido na cardiogênese.....	20
1.3. Caracterização das funções do gene <i>rnf4</i> .....	24
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. Geral.....	31
2.2. Específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Materiais.....	32
3.2. Animais <i>rnf4</i> deletados.....	33
3.3. Genotipagem.....	38
3.4. Dissecção dos embriões.....	42
4. RESULTADOS.....	46
4.1. Genotipagem.....	46
4.2. Análise dos embriões <i>rnf4</i> deletados.....	48
4.3. Análise dos corações <i>rnf4</i> deletados.....	51
5. DISCUSSÃO.....	54
6. CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS .....	65

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da indução de miócitos.....	16
Figura 2	Organogênese do coração.....	19
Figura 3	Estrutura e localização do gene <i>rnf4</i> no cromossomo humano.....	25
Figura 4	Esquema estrutural do RNF4.....	26
Figura 5	Configuração terciária da estrutura "RING finger".....	27
Figura 6	Esquema representando a região 3' do <i>rnf4 locus</i> .....	34
Figura 7	Heredograma característico de herança autossômica recessiva.....	37
Figura 8	PCR de amplificação do <i>rnf4</i> .....	46
Figura 9	Embriões de camundongos .....	49
Figura 10	Embriões <i>rnf4</i> deletados.....	51
Figura 11	Corações <i>rnf4</i> deletados.....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Genotipagem de progenes C57Bl6.....	41
Tabela 2 Genotipagem de progenes BALBc.....	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>5'RACE</b>	- Rápida amplificação do cDNA do terminal 5'
<b>β-gal</b>	- β-galactosidase
<b>AR</b>	- Receptor de androgênio
<b>BMP2</b>	- Proteína morfogenética óssea
<b>DBD</b>	- Domínio de ligação ao DNA
<b>E</b>	- Dia de desenvolvimento embrionário
<b>EDTA</b>	- Ácido etilenodiaminotetracético (0,5 M)
<b>FGF- 1A</b>	- Fator de crescimento de fibroblastos
<b>GATA4</b>	- Fator transcricional com a seqüência GATA
<b>Gsc1</b>	- Gene <i>Goodsecóide</i>
<b>K</b>	- Quinase
<b>LacZ</b>	- Gene da enzima galactosidade
<b>MADS</b>	- MCM1, Agamous, Deficiente, fator responsivo Sérico
<b>MEF2</b>	- Fator amplificador de miócitos
<b>MLC2v</b>	- Miosina de cadeia leve
<b>NLS</b>	- Seqüência nuclear de localização
<b>NTP<sub>s</sub></b>	- Ácidos nucléicos trifosfatos
<b>ORF</b>	- "Open Read Frame"
<b>PAGE</b>	- Eletroforese com gel de poliacrilamida
<b>PATZ</b>	- Proteína zinc finger com gancho ("hook") AT
<b>PBS</b>	- soro albuminoso bovino
<b>pH</b>	- Pontes de hidrogênio
<b>POZ</b>	- "Poxvirus and zinc finger

<b>QCE-6</b>	- Cultura de células QCE-6
<b>RING</b>	- Genes novos realmente interessantes
<b>RTR</b>	- Receptor do Hormônio Tireoidiano
<b>SDS</b>	- Dodecil sulfato de sódio
<b>Sp1</b>	- Proteína especial
<b>SPBP</b>	- Proteína expressada pelo gene <i>Stromelin</i>
<b>TAE</b>	- Tampão 1 M Tris-HCl pH 8-acetato-EDTA
<b>TAF</b>	- Fator associado TATA
<b>TE</b>	- Tampão 1 M Tris-HCl pH 8 + EDTA
<b>TaqDNA</b>	- Enzima polimerase <i>Thermus aquaticus</i> DNA
<b>TATA</b>	- Seqüência repetida de Timina, Adenina
<b>Tbx</b>	- Fator de transcrição T box
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	- Fator de crescimento transformante
<b>TrisCl</b>	- "Tris(choroethyl)phosphite" – Fosfato tris cloroetil
<b>U3D</b>	- "Upstream 3' terminal type D"

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças cardíacas tanto congênitas quanto adquiridas constituem um conjunto de patologias com alta morbi-mortalidade, sendo no Brasil a primeira causa de óbito, com 29,9% de incidência [1, 2]. Tendo como base dados do Ministério da Saúde que é responsável por mais de 75% das internações hospitalares feitas no País, pelo Sistema Único de Saúde, no ano de 2002, foram realizadas 11.714.184 internações, sendo as doenças do aparelho cardiovascular a terceira causa (1.216.771) a um custo hospitalar e domiciliar de cerca de 5 milhões de reais nesse ano. E dentre as causas de internações, também nesse mesmo ano, segundo o Código Internacional de Doenças, a Insuficiência Cardíaca foi também a terceira colocada, com 372.604 hospitalizações [2]. Assim, esses dados epidemiológicos em nosso meio são similares aos dos países desenvolvidos.

A melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos e moleculares que levam ao desenvolvimento das cardiopatias poderá permitir a intervenção clínica e/ou cirúrgica mais precoce e reduzir os altos índices de morbi-mortalidade associados a essas doenças. Por conseguinte, o entendimento dessas doenças do coração mostra a importância do estudo experimental básico em cardiogênese, pois, com o melhor conhecimento desse processo de formação do coração pode-se diagnosticar e intervir precocemente em patologias tanto congênitas, a exemplo de Persistência de Canal Arterial, Comunicação Interatrial, Comunicação Interventricular e Tetralogia de Fallot, quanto adquiridas, como Doença Arterial Coronariana, Hipertensão Arterial, Febre Reumática, dentre outras presentes nesse órgão, com repercussão social e econômica pela possível redução do impacto dessas doenças no sistema de saúde. Além disso, as pesquisas básicas em embriogênese produzem informações para o conhecimento dos diferentes processos de diferenciação das várias linhagens celular que

compõem um órgão e, em especial, o coração com suas peculiaridades e alto impacto na população em geral.

A síndrome de falência cardíaca é complexa devido à incapacidade do coração em oferecer adequada oferta de oxigênio aos tecidos, ou seja, inadequado débito cardíaco para atender às necessidades metabólicas dos tecidos [3]. Essa falência do coração pode estar associada à disfunção sistólica ou a uma função sistólica preservada. A disfunção ventricular deflagra mecanismos adaptativos associados à ativação neuro-humoral, gerando alterações na forma e na eficiência mecânica do coração (remodelamento ventricular), além de alterações periféricas circulatórias. Acrescenta-se também que as propostas de terapêuticas atuais não estão mudando esse cenário de redução no número de internações por descompensação ou na efetiva elevação das expectativas de sobrevida, especialmente dos classificados como graves [4]. Em uma perspectiva biomolecular, a análise da fisiopatogenia da insuficiência cardíaca demonstra níveis baixos de proteínas musculares nos componentes do disco Z das células musculares que fazem parte da unidade morfo-funcional dos músculos, o sarcômero, e na matriz extracelular [5]. Esse fato corrobora para a interpretação sobre o possível papel da anormalidade do citoesqueleto na dilatação progressiva do coração com insuficiência em bater nos seres humanos.

De forma genérica, tem sido observado que, na maioria das cardiomiopatias, mutações nos genes sarcoméricos provocam o surgimento do fenótipo hipertrófico, enquanto as mutações do citoesqueleto estão mais relacionadas à cardiomiopatia dilatada. Esses achados fornecem alguns indícios de que mutações genéticas do citoesqueleto ou do sarcômero podem causar cardiomiopatia dilatada ou hipertrófica nos seres humanos, possivelmente devido a duas diferentes séries de eventos de remodelação cardíaca, ou seja, a dilatação e a hipertrofia podem compartilhar sua origem molecular [6]. Bruneau, 2002 [7], ressaltou que compreender a fisiologia molecular do coração é

relevante, e uma boa ferramenta para a pesquisa do desenvolvimento desse órgão foi a utilização de modelos experimentais. Dentre eles, um excelente modelo para estudo dos mecanismos que controlam a embriogênese e que se tem destacado é a utilização de animais modificados transgenicamente, seja pela ablação seja pela inserção de novos genes alvos [8].

### **1.1 Embriogênese cardíaca**

O processo de formação do embrião inicia-se com as primeiras divisões celulares, sendo formado um disco achatado que consiste no blastoderma, com aproximadamente 10.000 células, dividindo-se em duas: uma área opaca, que formará o embrião e também contribuirá para a formação de membranas extraembrionárias, e uma área central translúcida, que forma duas camadas, o epiblasto (externo) e o hipoblasto (interno). Neste estágio, ocorre a implantação do saco embrionário. Nos mamíferos, envolve o contato íntimo com o tecido uterino, com extensiva proliferação do trofoblasto e invasão dessas células no estroma uterino, estabelecendo-se a conexão materno-fetal nessa fase designada como blastula [9]. Na fase seguinte de gastrulação, o embrião em formação apresenta a definição do eixo rostro-caudal e do mesoderma pré-cardíaco, assim como têm início os movimentos de diferentes populações celulares, reforçando o conceito de padrão local-específico que consiste no fato de uma linhagem celular iniciar seu processo de diferenciação somente quando chega ao seu local de destino [10]. Na gastrulação, são detectadas as três camadas germinativas (ectoderma, mesoderma, endoderma).

O estágio imediato à gastrulação é o estabelecimento da geração de diversas linhagens de tecidos, a partir de uma população de células progenitoras pluripotentes e da coloração dos diferentes tipos celulares em seus locais apropriados no embrião. Nessa fase, pode-se acompanhar o

processo de regionalização de progenitores da linhagem de células cardíacas e sua especificação na formação deste órgão [11].

As células cardíacas são recrutadas do epiblasto superficial para a área pré-cardíaca, ingressam e migram para dentro do embrião, formando um par de tubos que se fusionam em um único tubo, na posição ventral e média. Este coração primitivo contém múltiplas camadas, exhibe regionalização rostro-caudal e rotação, sendo possível de ser detectado com dois dias de cultura de embriões [12].

A camada mesodérmica também contribui com linhagens celulares tanto da região extra-embrionária quanto da embrionária, como fonte de células precursoras cardíacas, encontrando-se localizada posterior à placa neural. A análise dos descendentes desta população contribui, predominantemente, com a formação do miocárdio [13]. A camada endodérmica que irá também compor o coração emerge recrutada para a formação do coração. Chega-se, então, ao formato de coração tubular que migra anterior e lateralmente ao tubo neural. Há evidências de que o endoderma age como um indutor de sinalização, sendo necessário para que a especificação celular ocorra, levando a diferenciação terminal cardiogênica [14]. Essa atividade cardíaca indutiva é derivada mais especificamente do endoderma anterior, que sinaliza para a diferenciação do coração, sendo primordial no estabelecimento da diversidade dos cardiomiócitos. Em uma etapa mais tardia, também a camada ectodérmica é indutora cardíaca [15]. Resumidamente, as três camadas germinativas demonstram possuir um sistema de sinalização indutora entre si para a formação do coração, e essa sinalização só se mostra específica quando as células atingem a área cardiogênica.

Quando os miócitos diferenciam-se nos tipos celulares principais, miócitos atriais e ventriculares e no sistema de condução, dados apontam para um determinismo independente dos progenitores iniciais. Os fatos seguintes consistem: os miócitos primordiais sofrem ação inicial indutiva

dos vasos próximos, para a diferenciação em cardiócitos e células condutoras. Esses dois processos progridem em paralelo até os estágios finais pelo fato de os cardiócitos diferenciarem-se nos dois tipos terminais que são os músculos atriais e ventriculares e na outra via, na formação da linhagem celular do sistema condutor, até o ponto terminal de células de Purkinje. Porém, acredita-se que, nesta etapa final, a influência do vaso do epicárdio não seja preponderante para que há etapa a pouco descrita ocorra, mas a presença do vaso na fase inicial é fundamental para dar início ao processo [16]. A sumarização do processo indutivo está ilustrada na Figura 1. [17].

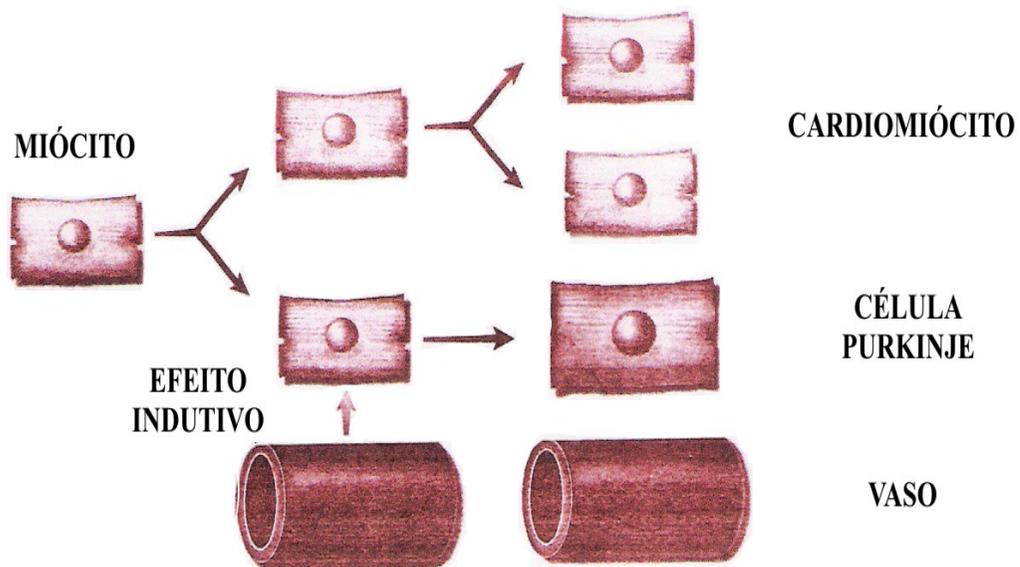


Figura 1 - Representação esquemática da indução de miócitos. Efeito combinatório indutivo da cito-diferenciação de miócitos e dos vasos coronarianos na camada epicárdica, na determinação do aparecimento das células de Purkinje, como componente terminal do sistema de condução do coração.

Fonte: HARVEY; ROSENTHAL, 1999, p. 51.

Neste estágio da organogênese, o coração possui duas camadas. Uma interna, formada de endocárdio, e uma externa, o miocárdio. Essas duas camadas formam o coração tubular que inicia suas dobraduras sobre si e, mais tarde, as contrações sincrônicas. Nessa etapa, não se detectam

células coronarianas, células do tecido conectivo ou neurônios autônomos. Os constituintes desse coração tubular são três tipos celulares: o endotélio e os miócitos ventriculares e atriais. Com esses constituintes, o coração começa a bater [18].

A morfogênese das dobras do coração acontece no estágio tubular para adquirir o fenótipo das quatro câmaras. Ocorre importante efeito na determinação dextral da curvatura do órgão, refletindo uma regulação temporal durante o processo de formação do coração [19]. Os passos seguintes são trabeculação, modulação da espessura das paredes das câmaras e das camadas musculares.

O coração é avascular até que a hiperplasia e a trabeculação levem à sinalização para a formação de plexos capilares e sinusóides venosos. No entanto, não se sabe de onde vêm as células para formar essa rede vascular, se da crista neural, se do mesênquima ou, ainda, de ambos os tecidos. O fato é que a idéia mais aceita é a de que ocorre grau variado de heterogênese em resposta a várias citocinas que induzem à formação dos vasos coronarianos e, quando esta rede vascular estiver estabelecida e ancorada na aorta, células progenitoras da camada muscular lisa migram, de forma intracardiaca, através dos canais endoteliais, e passam a se diferenciar em vasos espiralados [20].

Na formação do sistema de condução cardíaco, são necessários quatro subcomponentes: o nodo sinoatrial, o nodo atrioventricular, o feixe atrioventricular e as fibras de Purkinje. O local inicial de formação desse sistema de condução é a área conhecida como anel primitivo, na junção atrioventricular que contém os precursores celulares, que são oriundos da crista neural e de miócitos especializados, os quais exibem diferenças anatômicas, tais como reduzidas miofibrilas e grande acúmulo de glicogênio [21]. Além disso, tem-se uma expressão gênica única, com achado de genes só descritos no sistema nervoso, ou seja, como genes restritos a neurônios que expressam proteínas neurofilamentosas e

glicoproteínas associadas ao cérebro. Portanto, ocorre uma co-expressão de genes musculares e neuronais nesta etapa de formação do coração [22].

As células de condução têm um sistema único de canais iônicos para a atividade de marcapasso e conexinas únicas nas junções do tipo “gap” que retransmitem o potencial elétrico entre as células do sistema de condução [23]. Os componentes proximais desse sistema de condução são constituídos de nó sinoatrial, nó e feixe atrioventricular, provenientes da crista neural. Mas uma pergunta ainda fica para ser respondida: o mecanismo molecular envolvido na diferenciação de células contráteis (iniciais) para condutoras (finais), como ocorre com as fibras de Purkinje, que passam de células contráteis para condutoras. Esse fato ainda necessita de investigação. Por outro lado, acredita-se que um fator *in situ* faria essa ligação entre a rede central e a periférica, integrando todo o sistema condutor [24]. Todas as etapas de formação do coração dos mamíferos encontram-se representadas na ilustração da Figura 2, a seguir [25].

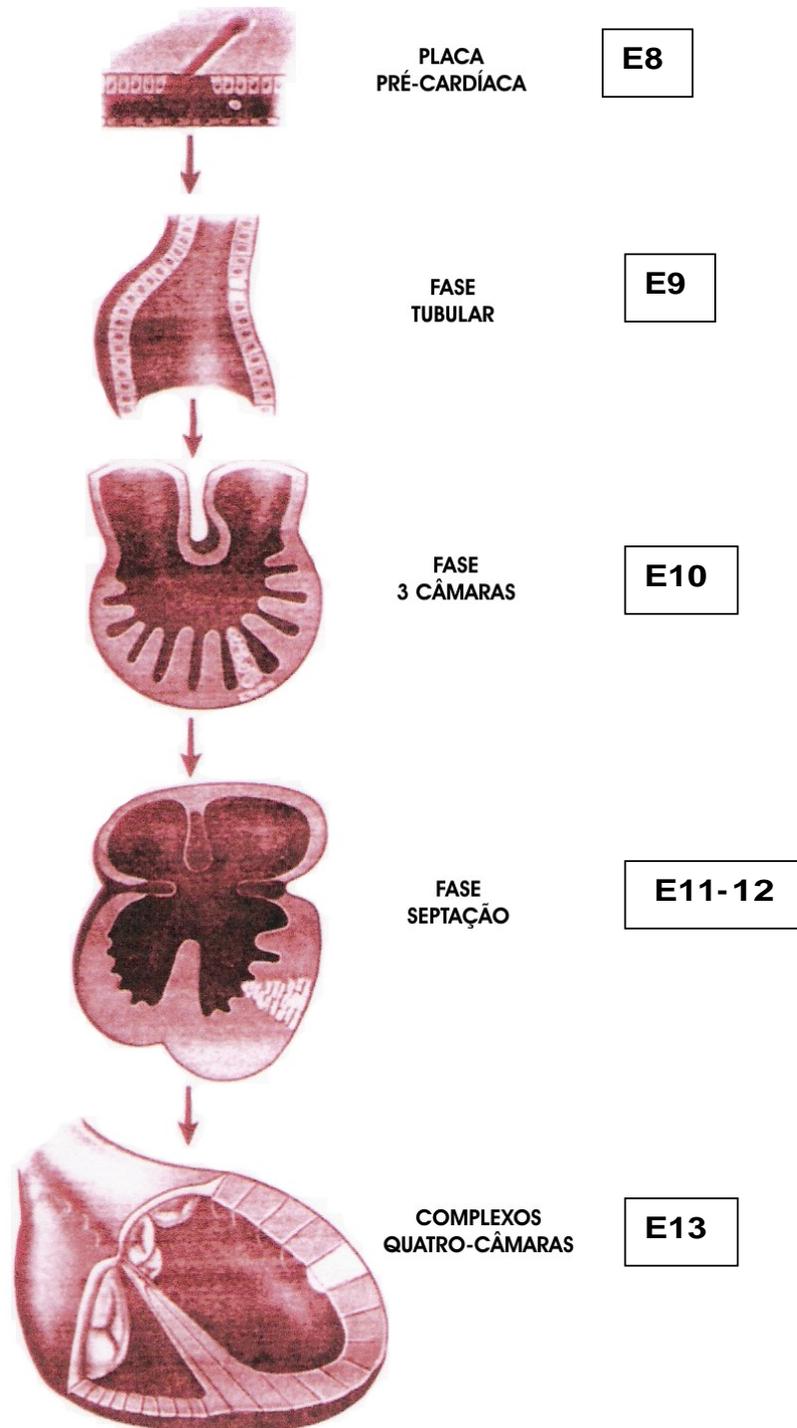


Figura 2 - Organogênese do coração, com os correspondentes períodos embrionários (E).

Fonte: HARVEY; ROSENTHAL, 1999, p. 111.

## 1.2 Mecanismo molecular envolvido na cardiogênese

O processo molecular envolvido na cardiogênese é complexo e envolve diferentes vias sinalizadoras. Decifrar a complexidade das relações de seqüência-estrutura-função na cardiogênese é objeto de estudo que exigirá avanços na biologia estrutural, proteômica e na tecnologia computacional. Simões-Costa *et al.* 2005 [26] afirmaram que a organização morfológica do coração é direcionada pela função fisiológica das vias de entrada e saída, sendo esse processo de cardiogênese determinado pela ação de genes que codificam o eixo ântero-posterior do coração.

Nesse processo morfogenético, existem genes que expressam fatores transcricionais, tais como: Proteína Morfogética Óssea (BMP), Fator Amplificador de Miócitos (Mef2c), Receptor de Ácido Retinóico (RAR) e os fatores transcricionais GATA-4, 5, 6 que são importantes para o coração, estando envolvidos na diferenciação e na diversificação celular [27]. Também os genes ditos seletores, como eHAND [28] e Hox [29], controlam os genes subordinados a eles, chamados de realizadores como por exemplo, Nkx2-5 [30] e Tbx2 [31] que possuem o código direto da função relativa à diferenciação celular nas várias linhagens que compõem, por exemplo, os órgãos, inclusive o coração que se inicia como um vaso muscular e vai se sofisticando com múltiplas câmaras, válvulas, septos, endocárdio, trabeculações, sistema de condução, circulação coronariana e uma interface crítica de lateralidade, requerendo uma complexa interação entre os tecidos.

O gene BMP 2, 4 está envolvido diretamente na morfogênese cardíaca, em especial nas fases primordiais, agindo como um sinalizador presente na camada mesodérmica na distribuição das diversas linhagens celulares que irão compor o coração [32]. Assim, em camundongos deletados para o gene *bmp*, seus embriões não formaram coração [33].

Este fato coloca em evidência que a ação do BMP ocorre em uma fase prévia à gastrulação e esses dados colocam-no como um gene fetal mestre que age no início do processo de formação do coração.

Os genes, como o *mef2B* e *mef2C* (fator amplificador de miócitos 2), são expressos nas células pré-cardíacas [34]. Esses genes expressam fatores de transcrição que promovem a indução miogênica, ou seja, a formação dos mioblastos que compreenderá as três linhagens celulares: cardíaca, somática e visceral. No coração de vertebrados, o *mef2B* e o *mef2C* são detectados já na fase de vaso tubular. Durante o processo de formação do coração a partir do mesoderma, diferentes amplificadores agem de forma independente, interagindo com o gene *D-mef-2* que é constituído de 12 kilobases de DNA. Esses diferentes fatores são comparáveis entre si, têm em comum uma origem mesodermal e estão envolvidos em especificação ou diferenciação do coração [35, 36].

Quando o gene *mef* é ativado, age amplificando clones de quatro a seis cardioblastos de forma segmentar. Embriões deletados para *mef2* apresentam retardo do crescimento, efusão pericárdica, paredes ventriculares finas, desorganizadas e dilatadas, com ausência de ventrículo direito e sinais de insuficiência cardíaca [37]. Nos vertebrados, *mef2* também produz proteínas contráteis, porém esta não é a única via de produzi-las. Esse gene apresenta-se de maneira evolutiva conservadora na cito-diferenciação cardíaca.

Estudos com genes que expressam as seguintes proteínas C-RZF [38], hFOG-2 [39], receptor de hormônio tireóideo [40] e FGF-1 e FGF-1A [41] que utilizaram a estratégia de cultura de célula-tronco diferenciada para cardiócitos apresentaram baixa expressão ao longo do processo de desenvolvimento embrionário e, em especial, na formação do coração. Porém, demonstraram serem importantes em algum momento da formação do coração. Acrescenta-se que outros estudos [42, 43] descrevem genes que se mostraram importantes num determinado

momento da citodiferenciação cardíaca como, por exemplo, no período médio do desenvolvimento embrionário desse órgão, em torno do E10, que corresponde ao período de diferenciação entre as câmaras atriais e ventriculares e ao início do processo de septação longitudinal, ou seja, da montagem do septo interatrial, mostraram maior expressão de suas proteínas, tais como miosina de cadeia leve (MLC-2) [42] e o fator transformante de crescimento (TGF) [43]. Esses achados reforçam a idéia de marcador fetal ao longo do processo de cardiogênese e os candidatam (MLC-2 e TGF) como marcadores dessa etapa específica da formação do coração.

Na cardiogênese, um fator de transcrição envolvido é o receptor de ácido retinóico. Foi demonstrado que a privação do ácido retinóico no início da embriogênese, levou ao aparecimento de alterações do dobramento do coração com conseqüente má-formação dos septos átrio-ventricular e interventricular, assim como da parede dos ventrículos [44]. Além disso, embriões expostos ao ácido retinóico apresentam também anomalias cardíacas envolvendo as vias de saída e entrada, tendo ação no momento do dobramento do coração para a formação das câmaras cardíacas, das valvas atrioventriculares e do septo interventricular [44]. Evidências acumuladas, apontam para que o ácido retinóico exerça um papel de sinalizador da citodiferenciação das diversas linhagens celulares que compõem a arquimorfologia cardíaca [46, 47]

É interessante comentar sobre outra proteína envolvida na transcrição, a da família GATA. Os genes que expressam GATA são detectados durante todo o processo de maturação do endoderma cardíaco, porém não se mostram ser específicos como precursores cardíacos e foram descritos estar presentes na organogênese de outros órgãos. Acredita-se que na formação do coração ocorre de forma segmentar, com populações distintas de progenitores para as diferentes câmaras cardíacas, envolvendo especificação para cada câmara [48]. Os fatores transcricionais de ligação à seqüência GATA agem como moduladores

dessa especificidade, como elementos regulatórios diretos, por exemplo, da morfologia de ventrículo direito [49] e em associação com outros fatores transcricionais que agem como co-reguladores no acabamento final do coração, dando a arquitetura única de cada região.

Um outro grupo de genes, como os da família Sp (proteína específica) [50], estaria envolvido na especificação, sobrevivência e crescimento das linhagens celulares no processo de organogênese, o qual segue um padrão inicial segmentar para mais tarde surgir como estrutura única.

Utilizando uma técnica de seleção de genes que aumentam sua expressão durante a diferenciação de células-tronco em células cardíacas, o grupo do Dr. Gary E. Lyons do Departamento de Anatomia da Universidade de Wisconsin-Madison-USA identificou quatro genes que poderiam estar envolvidos na diferenciação do coração, os genes *6AC6*, *6BD4*, *8AB2* e *17BC4*. Desses, somente o gene *6BD4* já havia sido identificado, sendo, até então, conhecido como *Jumonji (jnj)* [51].

Para investigar a importância do gene *6BD4*, este grupo estudou camundongos com deleção do gene *jnj* [52] e observou que esses animais apresentavam defeito na formação do septo ventricular e dupla via de saída. O defeito de septo ventricular constitui uma comunicação entre os ventrículos direito e esquerdo, com repercussão hemodinâmica sugestiva de retenção de líquido no terceiro espaço e alteração da morfologia dos ventrículos, por exemplo, paredes finas. Quanto a dupla via de saída é uma anomalia grave, caracterizada pela saída dos dois vasos, aorta e pulmonar, do ventrículo direito. Nesse estudo, as alterações cardíacas descritas foram dilatação importante de átrio direito e edema presente na caixa torácica, sugerindo que esses animais evoluíram com disfunção hemodinâmica grave e quadro de insuficiência cardíaca congestiva. Entretanto, essas alterações não foram suficientes para levar ao óbito fetal em todos os exemplares, tendo sido registrado o nascimento

de animais portadores dessa deleção. Esses resultados confirmaram que o gene *jmj* tem papel importante na formação do coração [52].

Dois grupos europeus, um italiano [53] e outro finlandês [54], publicaram posteriormente sobre um novo gene designado como *rnf4*, RING finger 4 que coincidiu com o gene *6AC6*, o qual tinha sido um dos três isolados pelo grupo americano do Dr. Gary E. Lyons que ainda não tinham, até aquele momento, sido identificados. Esse resultado sugere que o *rnf4* poderia ser um gene também importante na embriogênese cardíaca.

### **1.3 Caracterização das funções do gene *rnf4***

O gene *rnf4*, no mapa cromossômico, encontra-se na posição do gene humano no cromossomo 4 posição 16.3, encontrando-se entre o *locus* da doença de Huntington e o gene do receptor 3 do fator de crescimento de fibroblastos (*fgf3*). O gene tem, aproximadamente, 47 Kb e apresenta 8 exons, tendo sido depositado no Gene Bank Data Library, com números de acesso: U95/40 para ratos RNF4cDNA, e U95/41 para humanos RNF4cDNA [55]. A Figura 3 apresenta detalhes da estrutura do gene *rnf4* [53].

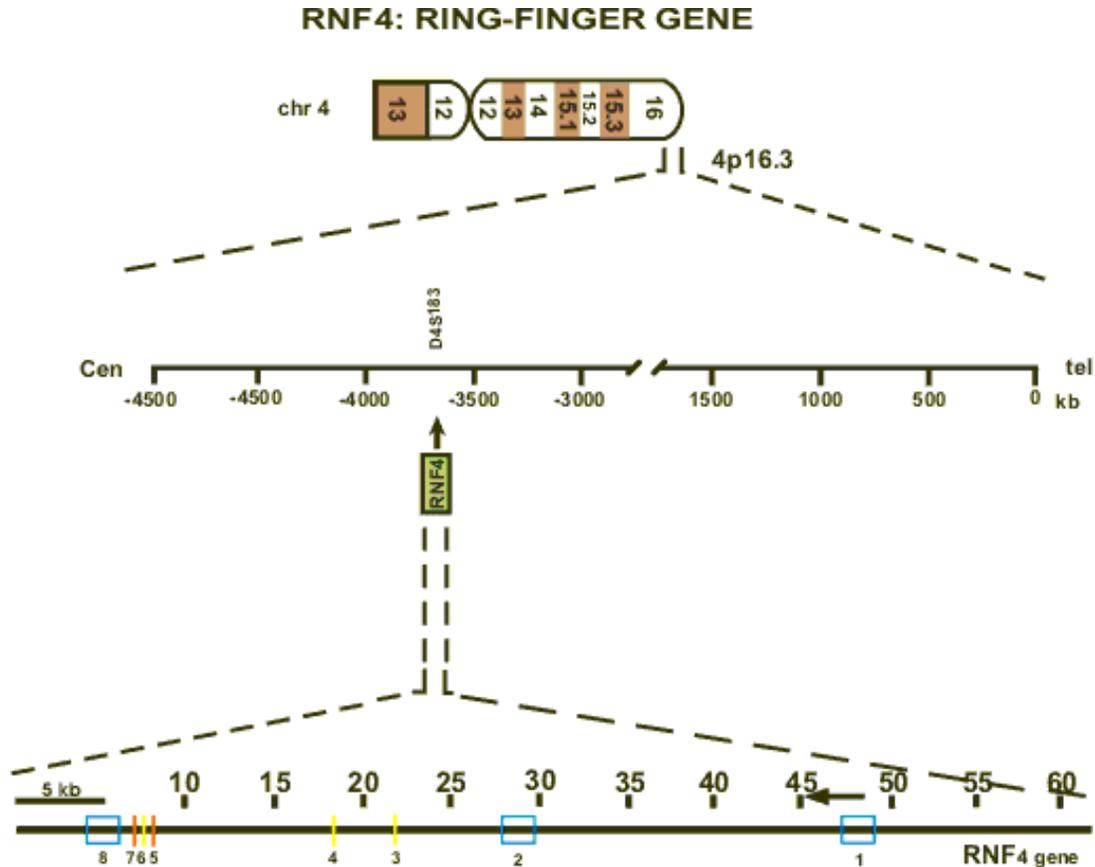


Figura 3 – Estrutura e localização do gene *rnf4* no cromossomo humano. Mapa físico do cromossomo 4, na região 4p16.3 que contém o gene *rnf4*. A posição do *loci* D4S é indicada e o tamanho em kilobases (kb) entre o centrômero (cen) e o telômero (tel). A posição do gene *rnf4* é apresentada. A organização dos exon-intron é apresentada na parte baixa da figura, 1, 2 e 8 são exons codificados, 3, 4 e 6 são exons não-codificados, e 5 e 7 são introns. A seta acima do exon 1 indica o sentido da transcrição. Não se encontra em escala.

Fonte: CHIARIOTTI *et al.*, GENOMICS, 47:258-265, 1998.

O *rnf4* já foi localizado no cromossomo de camundongos e em outras espécies, como *Gallus gallus* e *Xenopus tropicalis* [56]. Portanto, esse gene demonstra ser bem conservado filogenicamente.

O gene humano *rnf4* codifica uma proteína de 190 aminoácidos. Essa proteína é constituída por uma seqüência conservada "RING finger" na porção terminal carboxila e região que orienta o direcionamento da proteína para o núcleo, que na Figura 4, a seguir, é representada pelo box amarelo. É expresso em baixos níveis na maioria dos tecidos humanos,

tais como cérebro, fígado, pulmão, rim, mandíbula e no coração [51], também é expresso e exibe maior expressão nas células germinativas testiculares [57].

Essa proteína é pertencente à família "RING-zinc finger" que significa "Really Interesting New Gene", cuja expressão varia durante a organogênese, sendo reconhecido como fator de transcrição RING finger 4 e também denominado SNURF que significa "small nuclear C(3)H(4) finger". A Figura 4 mostra a conformação espacial prevista, da região RING, para a proteína RNF4 pelos grupos de Chiarotti *et al.* (1998) [53] e Moilanen *et al.* (1998) [54].

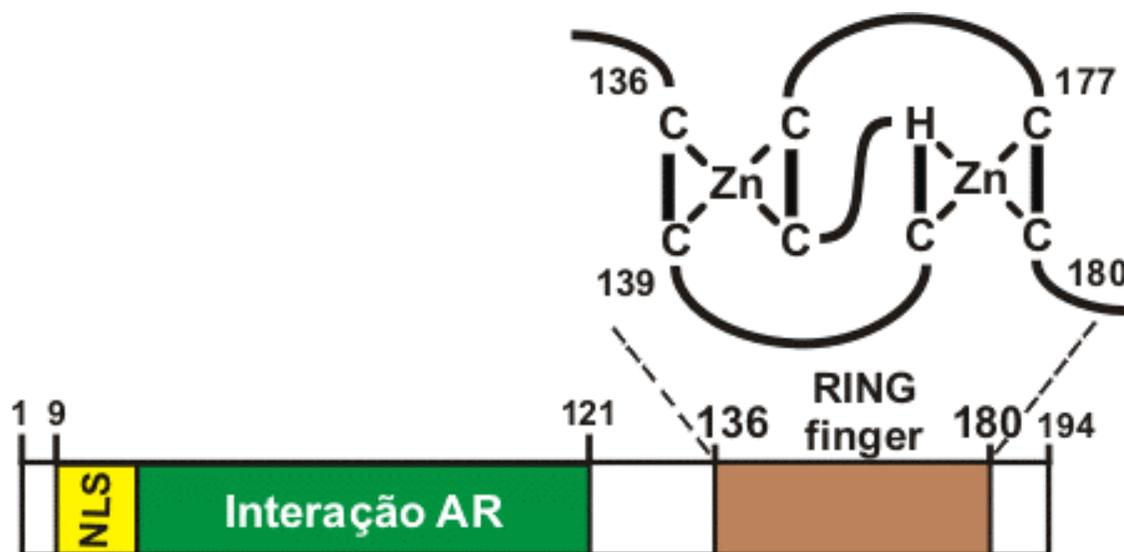


Figura 4 – Esquema estrutural do RNF4. A região NLS (Seqüência Localizadora Nuclear) em amarelo, a região de interação com o receptor do hormônio androgênio (AR) em verde e a seqüência C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> que identifica a região "RING zinc finger", aqui representada pela área cor rósea que compreende do resíduo 136 ao 180.

Fonte: MOILANEN *et al.*, MOLECULAR AND CELL BIOLOGY, 18: 5128-5139, 1998.

As proteínas "Ring-zinc finger", tais como MEF2C, BMP, RAR e GATA4 também estão envolvidas no desenvolvimento cardiovascular embrionário. A família de proteínas "RING-finger" contém um segmento comum que é caracterizado pela presença de uma seqüência específica rica em cisteína, contendo a seqüência de três cisteínas, uma histidina, seguida de mais quatro cisteínas (C3HC4). Com essas características, esta

família de proteínas liga-se diretamente ao DNA e funciona como fatores reguladores transcricionais, tanto positivo quanto negativo [58]. A Figura 5 mostra a configuração estrutural terciária da região RING finger que constitui uma região especializada do tipo dedo de zinco, composta por 40 a 60 resíduos que se ligam a dois átomos de zinco. Essa região parece envolvida em mediar interações proteína-proteína, sendo identificada como sinalizadora de transdução e desenvolvimento [59].

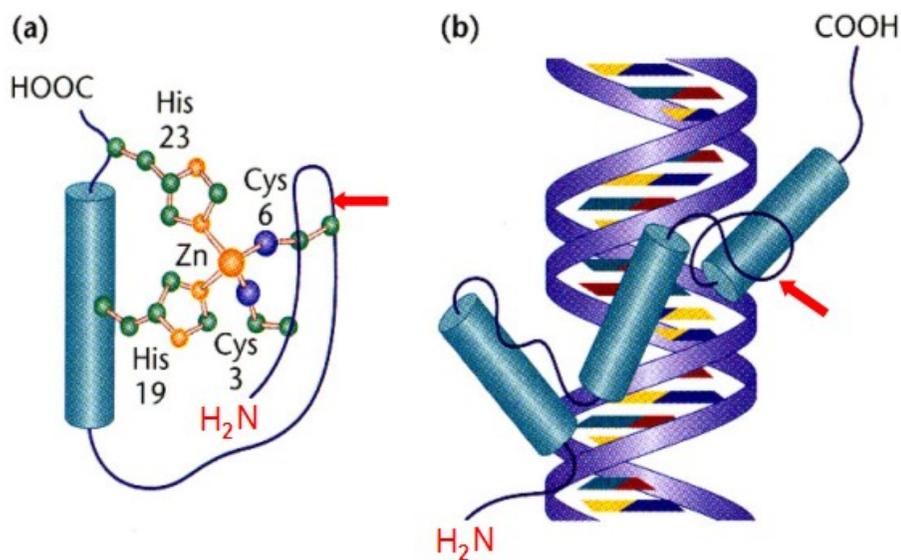


Figura 5 – Configuração terciária da estrutura “RING finger”. Em vermelho, observa-se o grupo amino ( $-H_2N$ ) e, ligada ao grupo carboxila ( $-COOH$ ) identifica-se a região dedo de zinco (setas vermelhas). (a) Região onde se encontram as cisteínas nas posições 6 e 3 da cadeia e as histidinas nas posições 19 e 23 da cadeia, ligadas ao átomo de zinco (bola laranja maior); (b) Dupla fita do gene *ring* e sua correspondente proteína expressa RING.

Fonte: KLUG; CUMMMINGS, 2000, p. 440.

A presença da proteína RNF4, tanto no núcleo quanto no citoplasma, foi documentada por cromatografia por afinidade e imuno-histoquímica. Esse achado sugere um envolvimento do RNF4 em carrear informações entre o núcleo e o citoplasma [60]. A interação RNF4-DNA, *in vitro*, demonstra que essa ligação é linear à dupla fita de DNA, sem aparente especificidade de seqüência, de maneira cooperativa, dependente do tamanho de segmento de DNA utilizado. RNF4 interage eficazmente tanto

com fragmentos condensados circulares quanto com junções DNA do tipo quatro vias. A habilidade de ligação RNF4-DNA é associada à sua capacidade de amplificar o processo de transcrição a partir de promotores contendo elementos do tipo boxe GC [61]. Portanto, RNF4 pode ligar-se tanto a proteínas (fatores transcrpcionais) quanto direto com o DNA.

Uma das funções do RNF4 é a de agir como um co-ativador transcricional esteróide, ligando-se ao DNA pela região promotora, através de elementos responsivos ou boxes ricos em GC, tanto do receptor de androgênio quanto de estrogênio [62]. Entretanto, RNF4 não possui a função intrínseca de ativação transcricional e seu mecanismo molecular como co-ativador ainda necessita ser elucidado.

É importante ressaltar que RNF4 também se liga a outras proteínas como a SP1 (specific protein 1). As famílias SP (1,2,3,4 e 5) são fatores de transcrição protéicos que exibem na região terminal carboxila a seqüência domínio do tipo dedo de zinco C(2)H(2) e participam da ligação ao DNA, através das seqüências de repetições diretas de GC [63]. Esse boxe GC [64] é uma seqüência domínio de ligação ao DNA presente na região promotora de vários genes, inclusive o *rnf4* [61]. Estudos com a família SP revelam que eles têm papel importante em numerosos eventos nos mais diversos tecidos embrionários, incluindo as fases de gastrulação e de alongamento do eixo do embrião; na diferenciação do tubo neural, da região faríngea e dos somitos; e na formação dos músculos esqueléticos do corpo. Acredita-se que essas proteínas exerçam um papel de coordenadoras dessas alterações na maquinaria transcricional que são requeridas para gerar as diferentes linhagens de tecidos ao longo do desenvolvimento do embrião [65].

Como um regulador de transcrição, RNF4 também interage com outras proteínas, entre elas a Goosecoid-like (Gsc1) [66]. Gsc1 é um fator de transcrição com atividade supressiva, o qual é expresso durante a embriogênese do cérebro e das gônadas em embriões de camundongos,

sendo expresso em tecidos derivados da fenda neural nos estágios primordiais do desenvolvimento embrionário. Acredita-se que o mesmo esteja envolvido na expressão da síndrome de DiGeorge e nas síndromes denominadas de velocardiofacial, ou seja, o portador tem anormalidades que incluem defeitos cardíacos na via de saída dos ventrículos, hipoplasia ou aplasia de timo e glândula paratireóide, hipocalcemia e fenótipo facial característico. Todas essas desordens têm origem comum na embriogênese, sendo derivadas das bolsas faríngeas [67]. Essas síndromes velocardiofaciais envolvem o segmento anterior do embrião, e mutações nos genes implicados como causadores dessas disgenesias têm sua ação temporal e espacial no processo de desenvolvimento do embrião humano.

O gene *stromelisin 1* expressa o fator de transcrição SPBP que também interage com a proteína "RING finger" RNF4 e ambas estão localizadas no núcleo. A proteína RNF4 promove, inicialmente, o acúmulo específico de SPBP ligado ao DNA, agindo como um co-fator positivo mediando a transativação [68].

O gene que causa a Síndrome tricho-rino-falangeal, a qual se caracteriza por alterações esqueléticas, escassa distribuição de cabelo no couro cabeludo e dismorfismo facial em humanos expressa a proteína TRPS1 que é um repressor do fator de transcrição GATA-mediado. Quando TRPS1 e RNF4 interagem, ocorre regulação negativa da ação do TRPS1. Acredita-se que RNF4 iniba a função repressional de TRPS1, reafirmando sua vocação de modulador, ora positiva ora negativamente agindo na transcrição e na função dos produtos gênicos, não sendo capaz de ativar diretamente o processo de transcrição. Este estudo demonstrou que RNF4 e GATA atuam sinergicamente, podendo este achado demonstrar o elo entre GATA que regula a cardiogênese e RNF4 como modulador no processo de embriogênese cardíaca [69].

Por outro lado, RNF4 interage negativamente com PATZ, a qual

também possui em seu domínio de ligação ao DNA o átomo de zinco como um dos componentes, porém com região de DBD denominada de gancho ("hook") AT e não do tipo dedo de zinco [70]. Toda essa diversidade de ação reforça que o mecanismo de ação do RNF4 envolve multi-complexos, podendo agir de forma sinérgica ou antagônica, a depender de com quem esteja interagindo em um determinado momento espacial. Assim, foi demonstrado que o RNF4, apesar de um conhecido ativador transcricional, pode mudar seu comportamento quando se interage com PATZ, que é um repressor transcricional. Nesta situação, a hiperexpressão de RNF4 com PATZ potencializa a repressão da transcrição induzida por PATZ [70]. Com esse achado, inicialmente, RNF4 havia sido cogitado como repressor transcricional [70]. Mas, na publicação de Pero *et al.* 2002 [71] foi demonstrado a ação atenuante de RNF4 sobre PATZ, quando ocorria a ligação PATZ-RNF4.

Os mecanismos envolvidos na modulação da diferenciação cardíaca são pouco conhecidos. É possível que o mRnf4 atue como um co-ativador [72] ou regulador atenuante transcricional [73] essencial na regulação de genes, provavelmente a nível nuclear [74].

Considerando a importância da interação da proteína RNF4 com proteínas implicadas na morfogênese cardíaca, e que o gene que codifica foi isolado, junto com o gene *jmj*, como genes que estariam envolvidos na diferenciação das células-tronco em células cardíacas [51], o Laboratório de Anatomia do Prof. Dr. Gary E. Lyons da Universidade de Wisconsin, Madison, USA optou por desenvolver camundongos com deleção do gene *rnf4*, e o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito deleção do *rnf4* na cardiogênese e na mortalidade desses animais.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a função do gene *rnf4* no desenvolvimento do coração, através do uso de camundongos com deleção desse gene, objetivando descrever as alterações morfológicas dos corações, clínicas desses embriões, e a mortalidade, em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário, peri- e pós-natal.

### 2.2. Específicos

#### **Em embriões com deleção do *rnf4***

- Caracterizar as alterações morfológicas de desenvolvimento dos embriões homozigóticos deletados para *rnf4* e seus fenótipos;
- Descrever achados anatômicos macroscópicos dos embriões homozigóticos deletados para *rnf4*;
- Descrever os achados histológicos dos corações desses embriões homozigóticos deletados para *rnf4*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Anatomia da Escola de Medicina em Madison, Wisconsin, Estados Unidos da América, sob a orientação do Dr. Gary E. Lyons. O protocolo de manuseio dos animais utilizado foi analisado e aprovado pelo comitê de ética da referida Instituição.

#### 3.1 Materiais

Os primers foram feitos pela *Integrated DNA Technologies, Inc.*, Coralville, IA, USA, componentes utilizados no termo-ciclador: tampão, dNTPs, Taq DNA polymerase em tampão de estoque tipo B, marcador molecular de 100 pares de bases, todos esses produtos fornecidos por *Promega*, Madison, WI, USA. Proteinase k, agarose, TAE, tampão de correr, brometo de etídio, marcador molecular de DNA, todos adquiridos da *Sigma-Aldrich Corporation*, St Louis, MO, USA. Solução de precipitação de proteína adquirida da *Genra System*, Research Triangle Park, NC, USA. Solução de lise genômica foi adquirida da *BD Biosciences Clontech*, Palo Alto, CA, USA. EDTA, eosina, formaldeído, isopropanol, adquiridos de *Ricca Chemical Company*, Arlington, TX, USA. Suportes, tubos cônicos, ultra tubos, ponteiras foram utilizados da *Nalgene*, Rochester, NY, USA. Parafina, etanol e TE adquiridos da *BioLabs*, Beverly, MA, USA. Detergente de laboratório DRI-CLEAN adquiridos de *Decon Labs, Inc.*, King of Prussia, PA, USA. Sulfato de potásio crômio e gelatina G7-500, adquiridos da *Fischer Scientific Co*, Pittsburgh, PA, USA. Ração standart fornecido por *Charles River Laboratories*, Wilmington, MA, USA.

### 3.2 Animais *rnf4* deletados

A deleção do gene *rnf4* foi realizada a partir da inserção de seqüência denominada de ROSA  $\beta$ -geo, expressando a enzima galactosidade, pela técnica de retrovírus. Essa inserção foi no segmento ajuzante do sítio de iniciação que resultou na reposição de toda a seqüência *rnf4*, exceto pelos 23 primeiros aminoácidos. A técnica foi baseada no descrito por Baker *et al.*, 1997 [51], e realizada no Serviço de Animais Transgênicos da Faculdade de Veterinária da UW-Madison onde foram gerados os animais quiméricos a partir do cultivo em células primordiais, de mutante alelo de *rnf4* associado a um gene repórter da enzima  $\beta$ -galactosidase que gerou uma cultura quimérica, sendo selecionados só os clones que mantinham a atividade *lacZ*. Essas culturas de células-tronco mutantes alelo do *rnf4* foram inseridas na fase de blastocistos em camundongas grávidas, tanto da linhagem BALBc, com pelagem branca, quanto da linhagem C57Bl6, de pelagem preta. Essas duas linhagens foram trabalhadas em paralelo. As proles de camundongos portadores nasceram, cresceram e, quando adultas, foram aptas a cruzar com camundongos BALBc e C57Bl6 selvagens, a fim de aumentar o número de portadores, conforme esquema simplificado da construção das sondas A com o sinalizador (*lacZ*) e B com o selecionador (gene da resistência ao antibiótico ampicilina) na Figura 6.

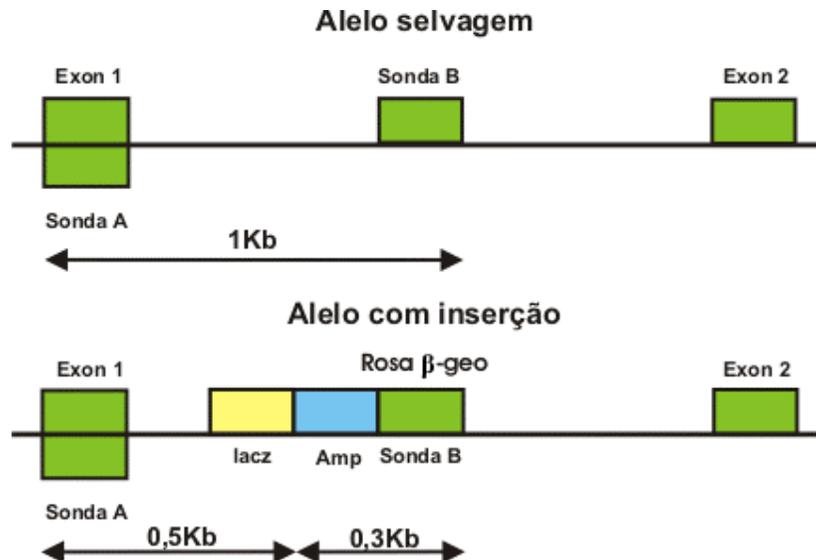


Figura 6 - Esquema representando a região 3' do *rnf4 lucus*. O vetor construído (*lacZ* + sonda B + Amp) foi inserido entre o primeiro e o segundo exon. Amp - gene de resistência ao antibiótico ampicilina; *lacZ* - gene repórter da enzima galactosidase.

Fonte: LEE *et al.* 2000. Adaptado.

Os animais portadores da deleção do *rnf4* ao longo da condução do experimento, tanto BALBc quanto C57Bl6, foram mantidos em separado e conduzidos em paralelo em todos os procedimentos a seguir. Eles ficaram em caixas estéreis, com serragem forrando o fundo da caixa, alimentados com ração standart, fornecimento de água destilada em recipiente estéril, regime de luz artificial dia e noite, sistema de controle da temperatura ambiente, para que a mesma fosse mantida a 25°C e sistema de filtração de ar. As caixas de acondicionamento dos animais seguiam um protocolo do próprio serviço do Centro de Animais com trocas semanais completas, vigilância sanitária por veterinários do próprio serviço. Colocação em cada estante de acondicionamento dos animais, de uma caixa teste com animais do próprio serviço do Centro de Animais para rastreamento de vírus, bactérias e fungos patógenos próprios dos camundongos. Esses camundongos tinham identificação própria e manuseio só por pessoas autorizadas do Centro de Animais da UW/Madison.

Em cada caixa, foram acondicionados até quatro animais do mesmo

sexo. Quando adultos, os animais foram separados em casais para cruzamento e antes do nascimento da ninhada, o macho era retirado da caixa. A genitora foi alojada com os filhotes até o vigéssimo primeiro dia de vida deles, quando foi realizada a coleta da ponta da cauda para a extração do DNA, para a classificação do camundongo como portador (+/- da deleção do *rnf4* ou controle (+/+).

Os filhotes foram também marcados com furos na orelha para facilitar a identificação dos mesmos. Na seguinte ordem: uma perfuração na orelha direita e este camundongo foi identificado como o número um da prole. O camundongo seguinte fazia duas punções à direita e recebia a designação de segundo até fazer três punções na orelha direita, correspondendo ao terceiro camundongo da prole. Depois, iniciava-se com a marcação dos filhotes da mesma prole correspondente à perfuração da orelha esquerda. Com isso, sabia-se identificar naquela prole quais eram os portadores e separá-los. Quando muitos foram classificados como selvagens, procedia-se à repetição das amostras para recertificação, assim como dos genitores. Quando ocorriam animais em excesso, procedia-se ao processo de eutanásia com exposição em caixa fechada ao monóxido de carbono.

Baseado em genética experimental animal, nas primeiras gerações descendentes F1 foram desenhadas linhas de endocruzamentos entre os camundongos das duas linhagens trabalhadas. No primeiro cruzamento, animais portadores (+/-) C57Bl6 foram cruzados com os da linhagem 8AB2/mRNF4, pertencentes ao Laboratório de Pesquisa Animal da Universidade de Wisconsin, onde foram gerados portadores (+/-) e selvagens (+/+). Esses portadores C57Bl6 foram cruzados com (+/+) C57Bl6, por cruzamentos mãe-filho da primeira até a nona geração, para aumento da prole heterozigótica. Foi feito o mesmo procedimento com os animais portadores (+/-) BALBc. Foram cruzados também pela primeira vez com a linhagem 8AB2/mRNF4, sendo gerados portadores e selvagens. Esses portadores foram cruzados com controle (+/+) da linhagem C57Bl6,

por cruzamentos mãe-filho da primeira até a quarta geração, para aumento da prole heterozigótica. Todos os animais portadores foram repicados em caixas com quatro animais cada, obtendo-se um grande número de heterozigotos das duas linhagens. O excesso de homozigotos fêmeas e os animais não-viáveis foram submetidos à eutanásia.

Nessa fase do projeto, foram iniciados os acasalamentos entre heterozigotos das duas linhagens. Antes, porém, os dados da genotipagem foram novamente revistos e os cruzamentos +/- com +/- iniciados da décima (C57 x LBB) até a décima quarta (LHH x LGG) geração para os animais C57Bl6 e da quinta (BALBc x BVII.8) à oitava (BXIV.13 x BXIII.19) geração dos BALBc. Com esses cruzamentos dos portadores, foram obtidos os homozigotos recessivos (-/-). As siglas LBB, LHH, LGG, BVII.8, BXIV.13 e BXIII.19 são usadas pelo Dr. Lyons para acompanhar os endocruzamentos das duas linhagens de camundongos.

Nessa segunda fase, foram gerados os descendentes F2 pelos cruzamentos das duas linhagens de camundongos heterozigotos, em paralelo, tendo como finalidade a obtenção de embriões homozigotos deletados para o gene *rnf4*. Nesse processo, foi marcada a data do acasalamento e as fêmeas foram seguidas, diariamente, em busca de sinais de gestação, desde hipersecreção estrogênica em vagina até aumento do volume abdominal. O acompanhamento da gestação foi feito por monitoramento com exame clínico diário. Com essa estratégia, foram definidas as datas dos sacrifícios das gestantes para a coleta dos embriões com tempo de desenvolvimento embrionário pré-estabelecido de E11 a E17 porque dissecações precoces, como E9, E9.5 e E10, não exibiam alterações e os embriões mostravam-se adequados para a idade gestacional. Durante a condução do trabalho, por ter ocorrido nascimento de exemplares homozigotos deletados *rnf4* (C57Bl6), foi decidido que seriam conduzidos ao longo de toda a gestação, sendo deixados nascer as proles e genotipados com menos de um dia de vida, e até completarem 21 dias de vida, para ambas as linhagens estudadas, visando avaliar a

viabilidade. Com essa estratégia, objetivava-se avaliar a viabilidade desse conceito deletado para o gene *rnf4*.

O heredograma da Figura 7 ilustra a produção de homocigotos recessivos pelo efeito dos endocruzamentos para averiguação dos mutantes *rnf4* e sua repercussão no coração, investigado neste estudo [75].

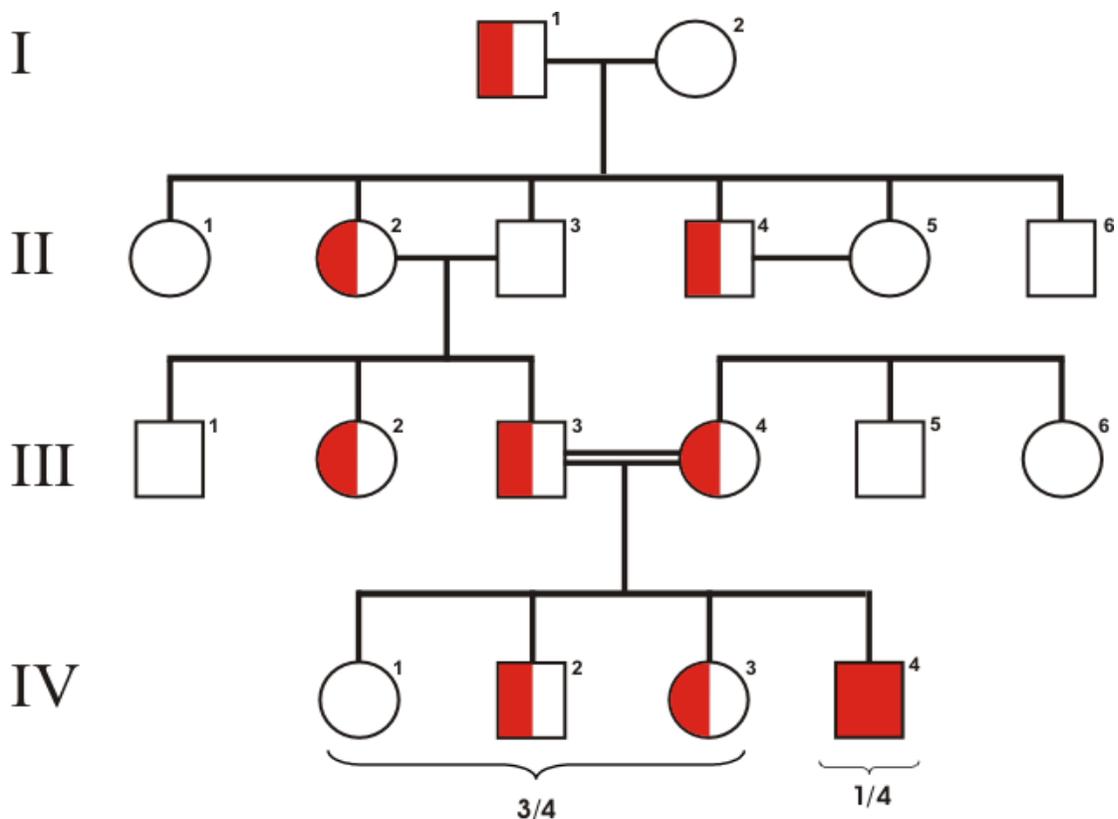


Figura 7 - Heredograma característico de herança autossômica recessiva. Fase I cruzamento de portador com selvagem. Fase II geração de portadores por endocruzamento com selvagens. Fase III cruzamento entre portadores por endocruzamentos. Fase IV geração de recessivo negativo.

Fonte: THOMPSON; THOMPSON, 1993. Adaptado.

### 3.3 Genotipagem

No procedimento de genotipagem das ninhadas, foi necessária a obtenção de seqüência intrônica do vetor inserido, a partir de seqüência previamente conhecida do pedaço do gene *lac-Z*, desde que essa inserção tenha mais um caráter randômico do que de um evento-alvo. Portanto, o programa de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)-inversa foi utilizado, obtendo-se uma seqüência da região 3' sítio do vetor de inserção, ou seja, que continha o sítio codante iniciador e o sítio  $\beta$ -geo. A partir de DNA genômico proveniente de tecido de animal heterozigoto, o qual foi digerido com a enzima Eco R1, ligação e amplificação com seqüências iniciadoras provenientes de cassete de ampicilina e do gene inserido. Com esses componentes, foi rodado um programa de PCR. O produto resultante foi um fragmento único de 367 pares de bases, designado de sonda B. A sonda A foi conseguida através do uso da técnica de 5' RACE, com obtenção de fragmento de 512 pares de bases.

Todo o protocolo de extração de DNA foi conduzido segundo Gentra Systems Isolation Kits, modificado por Lee *et al.* 2000 [52]. Inicialmente, amostras seja do tecido da ponta da cauda para identificar portadores seja da membrana amniótica para identificar recessivos negativos foram coletadas, colocadas em tubos Eppendorff (1.5 ml) em 600  $\mu$ l de Solução de Lise Genômica (TRIS- HCl pH 8.0 (200  $\mu$ l) + 4 M NaCl (375  $\mu$ l) + 0.5 M EDTA (2 ml) + 10% SDS (1 ml) + completa com milliQH<sub>2</sub>O (6.42 ml)), mais 3  $\mu$ l Proteinase K (20mg/ml), seguido de vortex por 30 segundos. Esta solução foi incubada por uma noite em banho-maria a 55°C.

No dia seguinte, procedeu-se à precipitação do DNA. Para isso, as amostras foram retiradas do banho-maria, vortexadas por 30 segundos e em seguida, foram adicionados 300  $\mu$ l de Solução de Precipitação de Proteína em cada amostra, seguido de vortex por 30 segundos. Logo após, as amostras foram centrifugadas (14 g/3 min) para obtenção do "pellet"

de precipitado de restos celulares no tubo. O DNA a ser analisado, presente no sobrenadante, foi transferido para um novo conjunto de tubos Eppendorf 1.5. Em seguida, a fase de desidratação foi iniciada com o uso do protocolo de gradiente álcool. Primeiro, foi usado isopropanol a 100% (600  $\mu$ l), inversão gentil de cada tubo por 20 vezes, seguida de centrifugação (14 g/5 min). O sobrenadante foi descartado em um Beaker e no tubo ficava o DNA condensado. Segundo, etanol a 70% (600  $\mu$ l) foi acrescentado, inversão gentil de cada tubo por 20 vezes, seguida de centrifugação (14 g/5 min). Novamente, o sobrenadante foi desprezado no Beaker e as amostras foram colocadas para secar na capela de fluxo laminar por 15 minutos. A fase de reidratação iniciava-se com a ressuspensão das amostras com o uso de tampão TE pH 8.0 (200  $\mu$ l) e, por fim, elas foram deixadas à temperatura ambiente (25°C) por mais uma noite na bancada do laboratório.

No terceiro dia, a amplificação do DNA foi feita através da técnica utilizando aparelho termociclador. A solução foi preparada em tubo Eppendorff 0.5 ml adequadamente para uso em termociclador e tinha os constituintes a seguir: Tampão com  $MgCl_2$  (2.5  $\mu$ l) + 2nM dNTPs (2.5  $\mu$ l) + Primer 5' em aliquotas de 20nM {CCAGTCGAAAGTGGTCACTATTC} (1  $\mu$ l) + Primer 3' em aliquotas de 20nM {AATGGCACCCATAGCTTTAGTAC} (1  $\mu$ l), acrescido do gene inserido (U3D 5') em aliquotas de 20nM {TTCGCTTCTCGCTTCTGTTC-3'} (1  $\mu$ l), mais 13.8  $\mu$ l de água milliQ, em um sub-total de 21.8  $\mu$ l. Seguido de vortex por 30 segundos de cada tubo. Adicionavam-se 3  $\mu$ l de DNA coletado + 30  $\mu$ l de óleo para Reação em Cadeia de Polimerase. Os mixes foram submetidos ao seguinte programa de PCR (reação em cadeia de polymerase). Fase I: cinco minutos a 94°C. Nesse intervalo de tempo, (0.2  $\mu$ l) da enzima (*Termus aquaticus*) Taq DNA polymerase estocada em tampão B (Promega, Madison,WI,USA) foi adicionada para dar continuidade com à segunda fase do programa no termociclador: 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 90 segundos a 62°C e 90 segundos a 72°C e, finalmente, de oito minutos a 72°C. Todo esse

processo durava cerca de 2 horas e meia.

Nesse mesmo dia, o gel de agarose a 1.5% foi preparado com 1.2 grama de agarose, diluído em 80 ml de 1 X TAE, levando-se ao microondas por 2 minutos, seguido de imersão do recipiente em banho-maria a 37°C para resfriamento por 2 a 3 minutos. Essa solução foi derramada em um aparato do tipo submarino com um pente na borda. Quando a polimerização do gel foi concluída, o pente foi retirado e o aparelho era preenchido com solução 1 X TAE até todo o gel encontrar-se submerso. A cada amostra, foram acrescentados 2.5 µl de marcador de correr bromofenol azul e, com pipeta, foram preenchidas as covas com as amostras. Assim como 3 µl de marcador molecular de DNA de 100 pares de bases foram aplicados e colocados para correr o gel imerso em 1 X TAE, com voltagem constante de 109 volts por uma hora, tempo este em que as amostras corriam 2/3 do tamanho do gel e o sistema foi desligado. O gel de agarose foi retirado desse aparato e colocado em recipiente com solução de brometo de etídeo na concentração de 1µg/ml, em bandeja móvel com rotação lenta por cinco minutos, seguidos de mais cinco minutos de rinse do gel em água milliQ. O gel foi fotografado em câmera escura, com raio ultravioleta, para visualização das bandas de DNA, com proteção pessoal através de artefatos de barreira.

Com as fotos, a classificação das amostras foi feita, produzindo as Tabelas 1, para a linhagem C57Bl6, e 2, para a linhagem BALBc de camundongos com suas respectivas fases do desenvolvimento embrionário de E11 até 21 dias da data de nascimento, número total de embriões por fase, genotipagens de seus respectivos sacos amnióticos e as anotações das observações do fenômeno de reabsorção em cada ninhada.

**Tabela 1.** Genotipagem de progenes C57Bl6.

Estágio	Total embriões	Nº de embriões genotipagem Rnf4			Nº de embriões reabsorvidos=
		+/+	+/-	-/-	
E11	29	17	11	0	1
E12	85	17	50	15	3
E13	39	16	18	2	3
E14	28	6	17	3	2
E15	41	7	23	6	5
E16	54	17	31	2	4
E17	47	20	21	3	3
P0.5	29	14	12	3	0
P21	50	36	14	0	0
<b>F2</b>	<b>402</b>	<b>150</b>	<b>197</b>	<b>34</b>	<b>21</b>

E Dias de desenvolvimento embrionário.

P indica dias pós-natal.

= Necrose

FONTE: Dados coletados pela autora.

**Tabela 2.** Genotipagem de progenes BALBc.

Estágio	Total embriões	Nº de embriões Genotipagem Rnf4			Nº de embriões reabsorvidos=
		+/+	+/-	-/-	
E11	151	39	81	7	24
E12	66	15	32	5	14
E13	38	13	20	2	3
E14	41	12	17	2	10
E15	21	6	8	0	7
E16	29	9	10	2	8
E17	24	5	11	0	8
P0.5	19	8	11	0	0
P21	34	21	13	0	0
<b>F2</b>	<b>423</b>	<b>128</b>	<b>203</b>	<b>18</b>	<b>74</b>

E Dias de desenvolvimento embrionário.

P indica dias pós-natal.

= Necrose

FONTE: Dados coletados pela autora.

### 3.4 Dissecação dos embriões

Os embriões de camundongos fêmeas em gestação F2 foram dissecados e a amostra do saco amniótico do lado contrário à inserção da placenta no tecido uterino materno foi coletada para genotipagem, como descrito anteriormente. Com essa estratégia, procurou-se evitar o contato da amostra com o tecido materno na determinação da genotipagem. O sacrifício das camundongas grávidas foi realizado por deslocamento cervical, procedimento este aceitável pelo comitê de defesa dos animais de laboratório, seguido da abertura por incisão transversal de abdômen. O útero foi retirado sob microscópio óptico, seguido da cirurgia de abertura do útero e extração dos embriões. Um a um foi dissecado, descritos os achados macroscópicos, mantidos em recipientes (placa de petri), com 1X PBS gelado. Cada embrião foi colocado em tubos cônicos de 10 ml, com paraformaldeído a 4%, preparado no dia, imerso em container com gelo até o término de toda a cirurgia. Nesse momento, foi preenchida uma ficha individual para cada embrião e anotadas observações morfológicas dos mesmos, baseadas em Rugh, 1990 [76]. Finalmente, os embriões ficavam por doze a dezesseis horas na câmara a 4 °C, nos tubos cônicos, com paraformaldeído a 4% em bandejas rotatórias. No dia seguinte, os embriões foram lavados por três vezes com 1X PBS por cinco minutos em bandeja rotatória em ar ambiente e os exemplares foram estocados em geladeira a 4 °C, aguardando os resultados da genotipagem.

Com a resposta da genotipagem, foram descartados os embriões heterozigotos. Os homozigotos deletados para *rnf4* em uma ninhada foram preservados a 4°C, assim como os embriões selvagens daquela mesma ninhada, sendo designados de controle para comparação com os embriões homozigotos deletados para *rnf4*. Anotações de achados de anatomia macroscópica foram feitas e dos números de reabsorvidos por ninhada.

Os embriões homozigóticos deletados para *rnf4* e seu respectivo controle selvagem em cada estágio do desenvolvimento embrionário foram incluídos em parafina e seguiam o seguinte protocolo: os embriões nos tubos cônicos foram lavados com 50 ml por 30 minutos em bandeja rotatória, com cada uma das seguintes soluções e nesta seqüência: 1X PBS, 1X solução salina, 1:1 solução salina: 95% de etanol, 95% de etanol, 70% de etanol por 2 vezes, 85% de etanol, 95% de etanol e, finalmente, 100% de etanol por duas vezes. Essa etapa foi conduzida em fluxo laminar e os resíduos, desprezados na pia. A lavagem dos exemplares foi continuada com 50 ml de xileno por duas vezes, em bandeja rotatória, desprezando em recipiente próprio de descarte de material inflamável, observando todas as normas de precaução que regiam o laboratório. Nesta fase, um forno a vácuo a 60°C foi utilizado para as lavagens do embrião, sendo transferidos para forma de plástico. A primeira lavagem com 50ml total da solução 1:1 de xileno (25ml): parafina (25ml) por 45 minutos, seguida de duas lavagens de 20 minutos cada, com 30 ml de parafina. Na parafinação, foi utilizada a Panplast plus purified paraffin que contém parafina purificada e dimetil sulfosídeo (DMSO), sendo este último um polímero plástico de peso molecular regular que tem como finalidade facilitar a rápida infiltração no tecido. Neste momento, o embrião foi posicionado no recipiente com o corpo em posição longitudinal, estando o crânio tocando o fundo do recipiente do molde plástico, com a finalidade de obter cortes do tórax em posição transversal.

Neste ponto do processo, as amostras foram para o corte e obtenção das lâminas histológicas. Os moldes de parafina foram cortados por micrótomo, com corte de espessura de 0,7 micron. Os cortes histológicos determinados para serem corados e lidos foram os que se encontravam desde o início da base do coração até seu ápice e foram aqueles designados como os obrigatórios, ou seja, as lâminas do plano transversal das quatro câmaras cardíacas.

Essas lâminas foram submetidas a um preparo especial antes de

serem utilizadas. O rack de metal com conjunto de 50 lâminas foi mergulhado em água quente com detergente DRI-CLEAN por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água quente corrente por uma hora. Depois, por três vezes, foram lavadas com água destilada e colocadas para secar no forno a 60°C. Nesta etapa do procedimento, 200 ml da solução 4% paraformaldeído-PBS foram preparados (10 g de paraformaldeído + 25 ml de 10 X PBS + 15 µl de 10N de NaOH, e o restante completava-se com água destilada), seguido de elevação da temperatura até 65°C. Depois, com papel Whatman (#1, 24 cm) para remover material não-dissolvido foi a solução filtrada. Novamente, o volume final da solução foi completado com 200 ml de água destilada. A esta solução, foram acrescentados 2 g de gelatina G7-500 e 0.1 g de sulfato de potásio cromo. Essa solução foi resfriada para 35°C, e o rack com as lâminas foram submergidas nesta solução por cinco minutos/2X. Depois disso, o rack foi para a estufa (37°C) para secagem por uma noite.

As lâminas selecionadas no microscópio óptico pelo critério citado foram submetidas ao processo de coloração pelos corantes hematoxilina e eosina. A coloração constituía a passagem do rack com o set das lâminas de tecido pelas seguintes fases: desparafinação com xilol, hidratação com um gradiente de álcool desde absoluto, 90%, 80%, 70%, até água destilada, seguida da coloração pela hematoxilina, água destilada, eosina, água acética, passando para a fase de desidratação com o gradiente de álcool inverso, e finalizando com a fase de clarificação com xilol. O set de lâminas permanecia no fluxo laminar para secagem. A análise histológica foi conduzida no microscópio óptico no próprio Departamento de Anatomia da Escola de Medicina em Madison, Wisconsin, Estados Unidos. Para isso, foram realizadas fotos e anotações histológicas detalhadas das estruturas morfológicas cardiovasculares desses embriões.

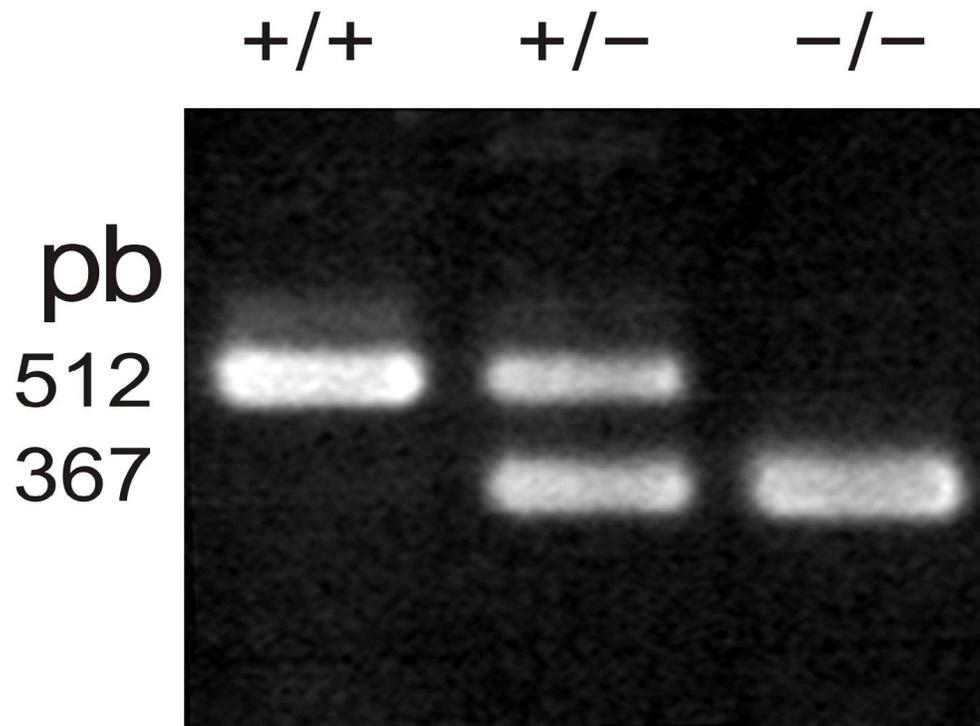
Durante a condução desse experimento, foi estabelecido o mínimo de três repetições para cada idade gestacional, em paralelo, nas duas linhagens estudadas. Esses casos foram rotulados como genotipagem

indeterminada, mesmo depois de proceder, no mínimo, a quatro tentativas por amostra, inclusive com diluições do DNA da amostra em questão, com várias quantidades (1µl, 3µl, 6µl, 9µl). Procedeu-se também à repetição das amostras que, na foto do gel de agarose, levantasse dúvida ou que o resultado da genotipagem não foi o esperado, repetindo-se as amostras de DNA dos genitores das fêmeas portadoras do membro da ninhada em questão. Todos esses cuidados foram tomados para que os dados obtidos fossem confiáveis.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Genotipagem

As reações de cadeia de polimerase conduzidas nos segmentos de DNA, extraídos para amplificação do gene do *rnf4*, confirmaram o que se esperava dos animais com deleção, heterozigotos e do tipo selvagem. Como se observa na Figura 8, nos animais selvagens (+/+), a amplificação do gene *rnf4* gerou um produto de 512 pares de bases. Já os camundongos com deleção do *rnf4* apresentaram um produto do PCR menor, equivalente a 367 pares de bases, e os animais heterozigotos apresentavam os dois produtos, frutos do alelo normal e do deletado.



**Figura 8** – PCR de amplificação do *rnf4*. Os animais selvagens (+/+) apresentam uma banda de 512 pares de bases. Os animais com deleção do *rnf4* apresentam uma banda equivalente de 367 pares de bases e os animais heterozigotos apresentam duas bandas correspondentes aos alelos normal e deletado. Foi utilizado gel de agarose 1.5%.

FONTE: 318 SMI, 2002. [77].

Essa análise genotípica foi utilizada para compor os dados das Tabelas 1 (C57Bl6) e 2 (BALBc) que foram coletadas a partir da fase do desenvolvimento de onze dias de vida porque nos estágios precoces desse processo de desenvolvimento, chamado de gastrulação, que corresponde ao período de oito a dez dias de desenvolvimento embrionário, os embriões tanto C57Bl6 quanto BALBc não exibiam sinais de mutação, e os fetos tinham desenvolvimento compatível com os heterozigotos e os selvagens, sendo essas faixas etárias excluídas da análise. Os primeiros animais com deleção do *rnf4* apareceram somente a partir do 11º dia de desenvolvimento embrionário.

Os dados da Tabela 1 apresentam os camundongos da linhagem C57Bl6 com número elevado de 39% (150/381) de embriões selvagens (+/+ ) e menor valor de 8,35% (34/381) de embriões com deleção (-/-). Esses números não correspondem às proporções do conceito de herança mendeliana de 1, 2, 1 para os respectivos homozigotos dominantes e homozigotos recessivos. A distribuição que mais se aproximou da mendeliana foi o valor total observado nos animais heterozigotos que foi de 52% (197/381). Quando se analisa por fases, pode-se afirmar que não foi observada herança mendeliana no P21. Observou-se também que nos E12, E14 e E15 foram dados que se aproximaram das proporções da herança mendeliana, e as fases E16, E17 e P0.5 encontram-se mais discordantes da probabilidade de ocorrência desse padrão hereditário. O número de reabsorvidos detectados em todos os estágios foi de 21.

Além disso, na análise da Tabela 1, foi observado que, dos 34 embriões que apresentavam deleção do gene *rnf4*, 17 deles encontravam-se nas fases E12 e E13, período correspondente ao fechamento do septo interventricular. Com o objetivo de investigar os efeitos da deleção do *rnf4* na viabilidade dos animais, um grupo de camundongos foi acompanhado até o final da gestação, logo após o nascimento, com menos de um dia de vida e com 21 dias de vida. Como foi observado, somente 3/34 camundongos C57Bl6 com deleção do gene *rnf4* nasceram. No entanto, os

mesmos foram encontrados mortos com a genitora na caixa que continha somente os restos dos corpos dos embriões. Mesmo assim, foi feita a genotipagem desse material e obteve-se o resultado (-/-), o qual foi recheado por três vezes para confirmação, sendo seus genitores confirmados como heterozigotos. Por outro lado, nenhum animal com 21 dias de vida foi classificado de (-/-) dos 50 analisados.

A análise dos embriões BALBc, na Tabela 2, também obedeceu à mesma regra de estágios, de onze até dezessete dias embrionários, menos de um dia de vida e com vinte e um dias de vida, todos de segunda geração (F2). Entretanto, no estudo da viabilidade P0.5 e P21, não foi observado nenhum exemplar classificado como (-/-). Foram coletados 423 embriões, sendo que 74 deles foram identificados como reabsorvidos, ou seja, em processo de necrose. Do restante (349 embriões), observou-se que 128 embriões (37%) foram classificados como selvagens (+/+), 203 (58%) como heterozigotos (+/-) e 18 deles (5%) com deleção total (-/-). Os dados dos estágios de E15 a E17 foram significativamente próximos dos números da herança mendeliana de 1:2:1. Porém, com os animais deixados nascer (P0.5) e com os de até 21 dias de vidas, os resultados de suas genotipagens foram divergentes, confrontados com a herança mendeliana.

#### **4.2 Análise dos embriões *rnf4* deletados**

Os mRnf4 heterozigotos apresentaram-se normais e reproduziram-se, sendo compatíveis com o desenvolvimento das outras linhagens de camundongos. Tanto heterozigotos quanto selvagens foram mantidos no mesmo regime de protocolo descrito anteriormente. A Figura 9 mostra exemplos da evolução embriológica normal de camundongos selvagens (+/+) e portadores (+/-) BALBc. Com relação aos C57Bl6, também foram encontrados o mesmo alinhamento do desenvolvimento embriológico e seus respectivos fenótipos em cada estágio.



Figura 9 – Fotos de embriões de camundongos controle e portadores. Plano lateral, vista longitudinal. BALBc (+/+) e (+/-) com 11, 14 e 17 dias de desenvolvimento embrionário, com desenvolvimento adequado linear para cada estágio e viáveis. Magnitudes 20, 10 e 6,5 respectivamente. Sem escala.

Fonte: Material fotografado pela autora.

Como foi observado anteriormente, os embriões com deleção total do *rnf4* morreram durante a embriogênese e no período neonatal, e a análise anátomo-patológica mostrou que tanto os animais C57Bl6 quanto os BALBc apresentaram um retardo acentuado do crescimento (Figura 10). Os embriões -/- apresentaram sinais de congestão e retenção de líquidos no terceiro espaço, ou seja, com quadro compatível de falência cardíaca.

Também foram descritos exemplares com distúrbios hematológicos, tais como sufusões hemorrágicas reportadas em ambas as linhagens e retenção de sangue na periferia. O número de reabsorções nos animais BALBc foi acima da média para gestações de camundongos não-transgênicos que é de dois de acordo com a literatura [76]. Foram reportados, em média, três reabsorções por ninhada, tendo ocorrido em 17 das 55 ninhadas analisadas. Para os C57Bl6, a ocorrência foi abaixo do esperado, sendo observada uma reabsorção por ninhada em 14 ninhadas das também 55 ninhadas estudadas, ressaltando-se que não foi observada nenhuma ninhada com 3 ou mais reabsorções/ninhada entre os C57Bl6. No total, nas duas linhagens (BALBc e C57Bl6), foram coletados 825 embriões, provenientes de 110 ninhadas, com média de sete embriões/ninhada. A média para camundongos não-modificados geneticamente é de oito conceptos por ninhada, acrescidos das duas reabsorções, em um total de dez [76]. Alterações macroscópicas anatômicas, como palidez, edema, pequeno para idade gestacional, alterações hemorrágicas, como já descritas, e mutações aberrantes, como anencefalia, foram registradas em metade das ninhadas, sendo descritas essas alterações. Alguns exemplos dessas peças e alterações patológicas, como as citadas acima, estão ilustrados na Figura 10.

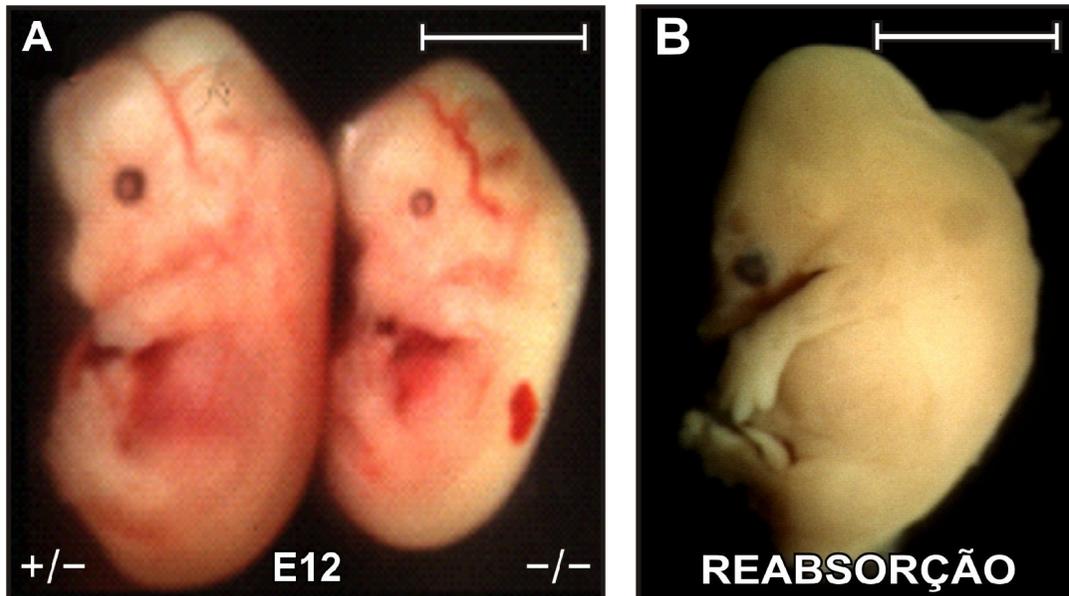


Figura 10 - Embriões *rnf4* deletados. A. Embriões C57Bl6 de 12 dias de embriogênese (E) classificado como heterozigoto (+/-) e homozigoto com deleção total para *rnf4* (-/-), observa-se um retardo acentuado do desenvolvimento no embrião homozigoto (-/-), quando comparado ao embrião heterozigoto da mesma ninhada. B. Embrião BALBc em processo de reabsorção, com necrose avançada, pertencente à ninhada com 14 dias de desenvolvimento embrionário. Escala da barra: 1mm.

Fonte: Material fotografado pela autora.

#### 4.3 Análise dos corações *rnf4* deletados

A análise histológica do coração dos embriões C57Bl6 e BALBc mostrou que os homozigotos com deleção do *rnf4* (-/-) apresentaram defeito do septo ventricular, pois não ocorreu o fechamento do septo membranoso, após o estágio do desenvolvimento de E13. Quando foram obtidas evidências dessa persistência de comunicação esquerda-direita, com resultante alteração morfológica em resposta a uma hemodinâmica alterada, foram descritos os achados de paredes ventriculares finas, em especial à direita, associados à desorganização das camadas celulares e ao conseqüente aumento das câmaras cardíacas, assim como paredes atriais finas e dilatadas. Depois do estágio de E13, essas alterações histológicas foram evoluindo e impedindo o bom funcionamento cardíaco. Finalmente, nos estágios de E16 e E17, todos os embriões (-/-) apresentaram necrose em estágios avançados, o que, inclusive, prejudicou o processo de

coloração e a qualidade das lâminas. O foco deste estudo foi o coração. Portanto, não foram anotadas as alterações ou não foram encontradas nos outros órgãos do corpo, como, por exemplo, pulmão, rim, entre outros. Todos esses cortejos morfológicos foram descritos nos cortes histológicos analisados de embriões deletados para *rnf4* e mostrados na série da Figura 11, a seguir.

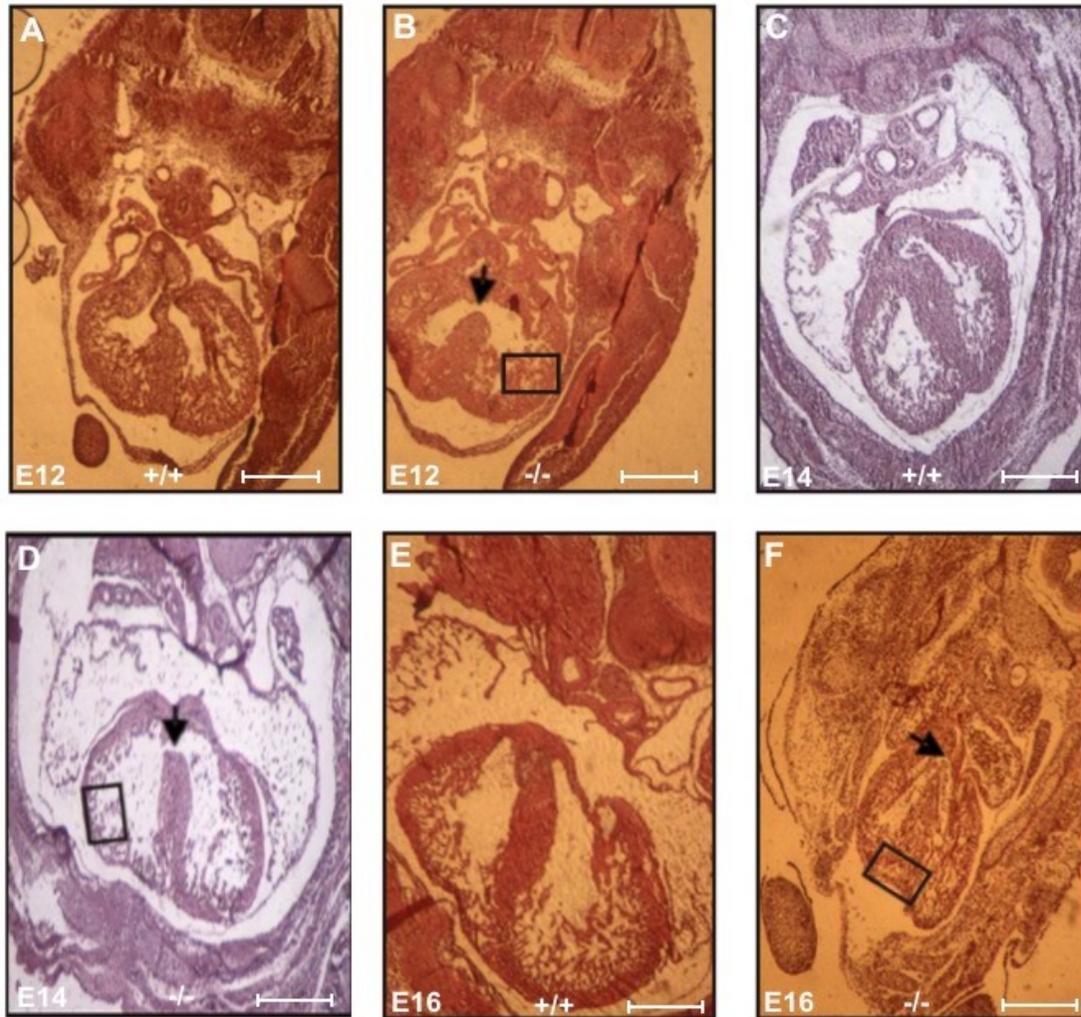


Figura 11: Corações *rnf4* deletados. Seccionados em corte transverso torácico, visualizando as quatro câmaras cardíacas, coradas com hematoxilina e eosina. A. BALBc E12 controle. B. BALBc E12 deletado do gene *rnf4* exibindo defeito de septo ventricular. C. C57Bl6 E14 controle. D. C57Bl6 E14 deletado do gene *rnf4* exibindo persistência de defeito de septo ventricular, efusão pericárdica, desorganização das camadas ventriculares e paredes cardíacas finas. E. BALBc E16 controle. F. BALBc E16 deletado do gene *rnf4* exibindo defeito de septo ventricular e necrose avançada, com perda da arquitetura morfológica. Escala da barra: 1mm. □ local da lesão identificada.

Fonte: Material fotografado pela autora.

## 5 DISCUSSÃO

A estratégia da modificação do patrimônio genético de um animal, seja através da inserção ou por meio da deleção de um gene de interesse, tem-se mostrado uma importante ferramenta para a compreensão de várias patologias, incluindo as relacionadas à embriogênese e, mais particularmente, à cardiogênese. Genes candidatos a terem papel importante na cardiomiogênese já foram isolados usando este tipo de experimento [78]. Como resultado desses experimentos vários genes ao longo dos últimos anos vêm sendo implicados na cardiogênese. Esses genes estão envolvidos em processos tais como a determinação local-específica de um número considerável de elementos, designação dos eixos direito-esquerda e anterior-posterior, dobramento sobre si e a rotação sobre o eixo na formação do coração. Em todas as etapas da embriogênese, ocorre a expressão de grupos de genes que se acredita serem comandados por genes-mestres, sinalizadores e organizadores desse processo de montagem de um órgão específico, inclusive, o coração [79].

Estudos com deleção gênica de camundongos, como *Jumonji* [52], *mdm4* (oncogene da via p53) [80] e *trap100* [81] (proteína associada do receptor de hormônio tireoidiano), este último também conhecido como um complexo mediador, demonstraram que quando deletados, os animais apresentaram defeitos na formação do coração, apesar de, como no caso de *Jumonji*, o mesmo ser detectado ao longo de todo o processo de embriogênese. Acrescenta-se que os genes *rnf4* e *Jumonji* foram isolados do mesmo ensaio [51] e os dados de *Jumonji* mostraram que ele tinha um papel na cardiogênese [52]. Este fato constituiu um dos motivos de ter sido desenhada esta pesquisa para investigar se também o *rnf4* revelaria-se importante na formação do coração.

Embriões deletados do gene *rnf4* apresentaram algumas anormalidade fenotípicas, quando comparados com os animais selvagens ou heterozigotos, como por exemplo, tamanho menor e edema generalizado, que foi sugestivo de retenção de líquido no terceiro espaço (Figura 10). Esse resultado confirmou as expectativas de que o gene *rnf4* desempenha um papel importante na formação do coração. Comparado com os embriões *jmj* (-/-) [52], as alterações dos embriões deletados do *rnf4* foram ainda mais relevantes, pois alguns animais *rnf4* (-/-) apresentaram além de edema generalizado, quadros de hemorragia, palidez e grande número de reabsorções, Figura 9. B.

O fenômeno de rebsorção foi observado, em especial, entre os camundongos da linhagem BALBc, com 74/423 (17,49%). Ito *et al.*, 2002 [81], em análise de 308 embriões deletados para *trap100*, outro gene também envolvido na cardiomiogênese, encontraram 62 decíduas vazias (20,12%), um valor duas vezes maior que o observado para a gestação normal de camundongos que é em torno de 10% [76]. No entanto, o percentual encontrado para embriões *trap100* -/- ficou próximo do valor encontrado nesse estudo. Na linhagem, C57Bl6, a taxa de reabsorções ficou bem abaixo do esperado, somente 5,22% (21/402) e analisando esse resultado especula-se uma explicação que poderia ser atribuída ao efeito da suscetibilidade intrínseca dessa linhagem para a deleção do gene *rnf4*. Uma outra razão seria atribuir esse efeito a erro na manipulação gênica dessa linhagem de animais. Entretanto, esse resultado não pode ser atribuído à não-deleção no *locus* correto, pois essa possibilidade foi afastada pela re-verificação gênica realizada pelo serviço de pesquisa animal da Universidade de Wisconsin, confirmando que a deleção realmente ocorreu no cromossomo correto de ambas as linhagens, conforme o protocolo, e este procedimento afastou também a possibilidade de erro pesquisador-dependente.

No que se refere à morfologia do coração dos camundongos, no décimo terceiro dia de gestação, as quatro câmaras já se apresentam

consolidadas [76]. Nos animais portadores da deleção *rnf4* *-/-*, a partir desse estágio, foram descritas persistência de comunicação interventricular e repercussão dessa sobrecarga hemodinâmica, especulando-se que essa deleção foi responsável pelo obituário. Chama-se a atenção para o fato de embriões com E16 em diante só serem encontrados necrosados (Figura 16.F) e, em especial, os da linhagem BALBc. A deleção do *rnf4* levou à persistência da comunicação interventricular, com a repercussão hemodinâmica intrínseca a esse defeito de septo ventricular, caracterizada pela dilatação das câmaras cardíacas, paredes finas ventriculares e desorganização de suas camadas, levando à insuficiência cardíaca, tendo como repercussão o acúmulo de líquido no terceiro espaço, por esse funcionamento inadequado de propulsão cardíaca, levando a óbito fetal e a não-sobreviventes para os camundongos da linhagem C57Bl6 de 8% (34/402). Resultados semelhantes aos do presente trabalho foram encontrados em embriões *jmj* *-/-* [52], que embora sejam capazes de sobreviver e nascer também apresentam as mesmas alterações nos estágios finais de E16. Acrescenta-se que nos estágios de E13 a E15 foram descritos também defeito do septo interventricular e resultados semelhantes ao encontrado no presente trabalho, no entanto com outros genes envolvidos na cardiomiogênese, já foram reportados na literatura [37-39, 41-43, 45]. No trabalho de Migliorini *et al.* 2002 [80], a mesma estratégia de deleção gênica usando o gene *mdm4* também resultou em teratogênias em diversos órgãos, inclusive o coração.

Os dados anatômicos e histológicos demonstraram que os corações coletados de embriões selvagens e os deletados do gene *rnf4* obedeceram à seqüência de montagem desde placa pré-cardíaca até as complexas quatro câmaras (E12). Os animais *+/+* e *+/-* apresentaram um desenvolvimento embrionário linear, foram saudáveis ao nascer, cresceram e reproduziram-se (Figura 9). Os recessivos (*-/-*) mostrados na Figura 11 apresentavam a histo-arquitetura de quatro-câmaras cardíacas e concordantes com os achados de Lee *et al.*, 2000 [52], de defeito de

septo ventricular, mas discordantes com o achado de dupla via de saída dos corações *jmj* *-/-*.

Esses fatos ressaltam a importância do *rnf4* ao longo do processo de formação do coração e o coloca como candidato a gene-mestre fetal primordial na formação do coração. Gene fetal consiste em genes presentes desde o início do desenvolvimento e que, durante todas as fases, age direcionando as linhagens celulares para se diferenciarem em diversos tecidos que compõem um órgão [41]. Acredita-se que esses genes possam voltar a ser expressos quando o órgão encontra-se em uma situação de sobrecarga. Portanto, esses genes poderiam ser importantes marcadores de doença, por exemplo, no quadro de insuficiência cardíaca.

Acrescenta-se que o conjunto dos dados provenientes da genotipagem de ambos os grupos (BALBc e C57Bl6) mostrou que, em várias etapas do desenvolvimento embriológico, não ocorreu herança autossômica recessiva e, no período de E15 a E17, essa condição não foi satisfeita para os camundongos BALBc, assim como não houve relato de sobreviventes nesse grupo, o que corrobora para o fato da maior susceptibilidade desta linhagem à deleção do *rnf4*, ou seja, as duas linhagens tiveram respostas diferentes em relação ao dogma da lei de  $\frac{1}{4}$  de *(-/-)*. Todavia, não se pode menosprezar os fatores genéticos, além dos epigênicos e hemodinâmicos que, certamente, interferem na condução desse processo de citodiferenciação, sejam eles locais ou à distância. Esse conceito defendido, anteriormente, por Simões-Costa *et al.* 2005 [26] e esse presente estudo de manipulação gênica são concordantes.

Neste estudo, os embriões com deleção do gene *rnf4* exibiram mal formações cardíacas significativas, com letalidade fetal ou no período neonatal imediato (P0.5), como mostrado na Tabela 1. Adiciona-se o fato de que, ao se deletar o *rnf4*, obteve-se morte fetal em sua quase totalidade e somente foi observada a ocorrência de três casos de nativos (P0.5) entre os 825 animais trabalhados, e todos esses animais

pertenciam à linhagem C57Bl6, sendo encontradas apenas partes em decomposição dos corpos na caixa com menos de um dia de vida, mas que, mesmo assim, foram genotipados e revelaram-se (-/-). Ressalta-se que entre os BALBc não ocorreu nascimento de animais com deleção total (-/-) e nenhum vivo com 21 dias de vida em ambas as linhagens. No entanto, Lee *et al.* 2000 [52], em estudo com deleção do gene *jmj*, que foi obtido no mesmo experimento de pré-seleção que *rnf4*, reportaram 38 embriões vivos *jmj* (-/-) e, desses, mais de 12 morreram no período (P0.5), sendo que esses embriões, provavelmente, foram natimortos, já que nos pulmões não foi evidenciado ar. Por outro lado, os embriões *-/-rnf4* apresentaram lesões cardíacas importantes que impossibilitaram o relato de sobreviventes entre os da linhagem BALBc.

Quanto a letalidade embriônica dos camundongos da linhagem C57Bl6, nesse trabalho, foi em torno de 8% (17/211) até o décimo segundo dia (E12) de desenvolvimento embrionário podendo especular-se que essa mortalidade deve-se provavelmente a insuficiência de proliferação celular. Semelhante mortalidade, (7%- 23/308) também foi reportada no estudo de Ito *et al.* 2002 [81] que observaram mal formações complexas, inclusive cardíacas, até o E10.5 de desenvolvimento do embrião. Lee *et al.* 2000 [52] obtiveram 8% (27/326) de *jmj* (-/-) e reportaram também anormalidade interventricular. Por outro lado, na linhagem BALBc, foi achada a metade da incidência entre os classificados como *rnf4* homozigotos recessivos que foi de 4% (18/423), englobando as faixas de desenvolvimento embrionário até E16.

Na cardiogênese, uma das classes de proteínas muito importante, constitui os fatores de transcrição da classe RING finger que mostram evidências de exercerem função ao longo do processo de formação do coração, tendo alguns representantes dessa classe de proteínas já bem documentados como relacionadas no envolvimento desse processo, tais como: BMP [32-33], MEF [34-37], GATA [48-49]. A proteína RNF4 é também um fator transcricional RING finger (Figura 6) e aparece como

mais um candidato a ter função na cardiogênese. Essa classe de proteína age em associação e esse fato pode ser essencial na determinação da alta complexidade das estruturas do coração. As etapas de formação do coração ocorrem de forma escalonada e regionalizante para, no final, ter-se o órgão único e funcionante, ou seja, durante a formação do coração, ocorre a regionalização das estruturas e uma ação determinística que direciona determinado grupo celular oriundo de um lugar sabidamente conhecido, a migrar para um outro local específico e, só quando esta colônia de células encontra-se nesse local pré-determinado, o fenótipo e a função passam, de fato, a ocorrer. Por isso, essa expressão é determinística e específica [82]. Esse processo inicia-se a partir dos primórdios da placa pré-cardíaca, seguido pela formação do tubo, do dobramento desse tubo, da septação e rotação, finalizando com a montagem das quatro câmaras, pelo posicionamento das valvas átrio-ventriculares. Os dois últimos eventos para completar a formação do coração, em conjunto mostram o grau de sofisticação desse órgão, são a circulação vascular fechada própria e o sistema condutor, com uma complexidade integradora admirável, chegando ao décimo terceiro dia de desenvolvimento ao modelo de quatro câmaras [25]. Neste trabalho, tanto os embriões BALBc e C57Bl6 não completaram a septação ventricular, assim como reportado anteriormente [41-44].

A proteína RNF4 [56], assim como, proteína BMP [13, 32, 33] também se mostra bem conservada evolutivamente em anfíbios, aves e mamíferos. BMP é um forte candidato como marcador precoce do desenvolvimento, pois se mostra como marcador genético da atividade transcricional dorsal e ventral do mesoderma na fase inicial de blastocisto, ou seja, na determinação do eixo ântero-posterior e, quando deletado, os embriões não formam nem a placa pré-cardíaca [33]. Este caráter temporal e espacial de BMP pode representar um bom marcador de fase precoce do desenvolvimento embrionário. RNF4 poderia ser um marcador de fase média de desenvolvimento já que nesse experimento com embriões de camundongos *rnf4* *-/-*, a anomalia descrita foi detectada na

fase média do desenvolvimento a partir do décimo terceiro dia de embriogênese, quando o septo interventricular deveria ter sido completado, e esse fato não ocorreu *vide* Figura 11 B, D e F.

É interessante observar que outros fatores de transcrição regulam a formação do septo interventricular. Assim, a deleção do gene *mef2* de camundongos codifica as proteínas MEF2A, B, C e D. Essas quatro sub-linhagens somente MEF2C mostraram-se ser responsáveis por má formação do septo interventricular e das valvas átrio-ventriculares do coração no décimo primeiro dia de desenvolvimento embrionário que, acredita-se, lideraram a causa do óbito fetal até o décimo quinto dia embrionário. No entanto, quanto à deleção de MEF2B, não houve relato de alteração cardiológica. Acredita-se que MEF2C seria uma sub-população de células cardiogênicas presentes no tubo cardíaco e relacionadas com o controle da formação do ventrículo direito [34-37]. No atual trabalho com RNF4, também foi documentado defeito do septo ventricular (DSV) e, em especial, do septo membranoso que é formado a partir do anel fibroso átrio-ventricular, e não do septo muscular, apesar do relato de alteração das camadas das paredes ventriculares tais como paredes finas e desorganizadas.

Um outro fator transcricional com função na cardiogênese que tem também sua ação relacionada na diferenciação do ventrículo direito é o GATA [49] e estudos [39, 48] de deleção gênica em camundongos, dessa proteína, demonstram que um fator restrito de uma determinada câmara atua de forma cooperativa com outros fatores transcripcionais, o que leva a supor a existência de co-reguladores que, em cooperação com GATA 4, controlariam a expressão gênica da formação do ventrículo direito, ou seja, ação pontual e específica no processo de formação do coração, pontuando-se, ainda, que essa co-regulação tanto pode ser positiva quanto negativa a depender de quem são os parceiros e do momento espacial ao longo desse processo. RNF4 e GATA4 [69] demonstraram que *in vitro* e em cultura de células interagiram, e essa

interação resulta em amplificação da atividade transcricional por provável ligação direta ao DNA, através da região promotora rica em GC [61, 64]. Essas evidências colocam o RNF4 como tendo uma ação regulatória e a deleção do gene que o expressa, ao longo do processo de formação do coração, como essencial na morfo-arquitetura do septo interventricular.

Além disso, os fatores de transcrição foram reportados como ligantes de receptores nucleares (Figura 4). Estudos utilizando animais transgênicos demonstraram que o receptor de ácido retinóico (RAR), um receptor nuclear que é ativado por fatores de transcrição, é também importante no estabelecimento da segmentação ântero-posterior, assim como na formação das câmaras posteriores do coração e vias de saída (aorta e artéria pulmonar) [44]. Em experimento com embriões de camundongos RAR deletados, foi descrita a ocorrência de canal átrio-ventricular (canal A-V), ou seja, sem a formação do septo interventricular muscular e membranoso de forma adequada [45]. O ácido retinóico é um metabólito ativo da vitamina A e um sinalizador molecular embrionário de vertebrados, pois excesso de ácido retinóico leva a efeito teratogênico sobre o coração, em embriões na faixa de 9-15 dias de desenvolvimento embrionário, e a via de ocorrência é através do RAR e não através do RXR (receptor de ácido retinóico X) [46]. Além disso, os embriões de camundongos *jmj* *-/-* [52] apresentaram canal A-V associado a DSV e, no estudo de Habets *et al.* 2002 [31], foi descrito só canal A-V. Nos embriões *rnf4* *-/-* como dito anteriormente, foi descrito DSV de maneira isolada.

A proteína RNF4 é um fator transcricional de localização nuclear [60], agindo em complexos, a depender de com que parceiro está interagindo, estimulando diretamente como com esteróide [54, 63], andrôgeno [57, 71, 74], estrógeno [72, 73], GATA [69] ou co-ativando Sp1 [63], SPBP [68], TRPS [69]) através de multi-complexos, atuando no núcleo. Por outro lado, co-reprimindo como quando se liga à PATZ [70, 71], sendo reconhecido como co-regulador transcricional ou, mais precisamente, como uma ponte de ligação entre fatores de transcrição,

atuando como um fator transcricional multifuncional envolvido na regulação do crescimento celular. Apesar de o estudo atual ser morfo-funcional, concorda-se com esses dados publicados anteriormente e especula-se que, em decorrência de ser um regulador transcricional, a ausência de RNF4 pode estar envolvida no achado do número reduzido de camadas celulares dos ventrículos, configurando uma parada no ciclo celular (Figura 11. D).

Evidências sobre o *rnf4* e sua proteína expressa RNF4 foram compiladas como estando envolvidos na embriogênese. Como proteína é reconhecida como fator de transcrição da família "RING finger" e por ter seqüência de ligação direta ao DNA, acumulam-se indícios de agir como co-ativadora ou co-repressora, a depender de com quem esteja se ligando e formando complexos [54, 61, 62, 64, 66, 68-71]. Em decorrência de todos esses dados, até o momento, sugere-se que a proteína RNF4 pode ter ação no ciclo celular, por sua localização nuclear [60], tendo os dados preliminares norteado o desenho deste estudo e as informações obtidas, reforçando o fato da ocorrência de alteração no processo de divisão celular, com desorganização das camadas celulares em parede de ventrículos, como visto nas lâminas histológicas até o extremo quadro de alteração morfológica de anarquia total da arquitetura tecidual que, no final do desenvolvimento fetal, apresenta-se como necrose difusa e avançada. Como ressaltaram Kentsis e Borden 2004 [83], muito ainda tem a se desvendar a respeito dessas assembléias supra-moleculares de proteínas, seus mecanismos e significado biológico.

As anormalidades encontradas nos camundongos deletados para o gene *rnf4* foram compatíveis com o quadro clínico patológico em humanos de insuficiência cardíaca, associado a doenças congênitas cardíacas. Como os genes *rnf4* humano e de camundongo apresentam 98% de compatibilidade, pode-se extrapolar os achados deste trabalho para melhor entender as patologias do coração tanto adquiridas quanto congênitas, no que diz respeito ao papel desses genes fetais na

morfologia e na fisiologia do coração. Por fim, os achados anatômicos e histológicos do presente estudo são compatíveis com as alterações fisiopatológicas de insuficiência cardíaca congestiva, e evolução com prognóstico fechado para morte. Sabe-se que essa síndrome clínica em humanos, os pacientes, expressa genes fetais, como já demonstrado para o receptor do hormônio tireoidiano por Kinugawa *et al.* 2001 [40]. Sendo assim, o *rnf4* poderia também candidatar-se a gene fetal mestre, podendo ser esse fator transcricional (RNF4) o elo entre os genes construtores do coração e o retorno de sua expressão, em decorrência do estado patológico da falência cardíaca, tanto em decorrência de morbididades congênitas quanto cianóticas (Tetralogia de Fallot) ou acianóticas (Persistência do Canal Arterial), bem como adquiridas (Síndromes Coronárias). O desafio para os próximos anos consiste em entender como, através de indução, o músculo cardíaco é formado durante a embriogênese e qual o impacto dessas informações como recurso na terapia de regeneração cardíaca e de substituição de células do coração, assim como essas informações sobre cardiogênese podem ajudar na utilização de terapia gênica com células-tronco tanto embriônicas quanto adultas na restauração da função miocárdica.

## 6 CONCLUSÕES

- O gene *rnf4* é essencial na formação do coração de camundongos;
- Camundongos homozigóticos com deleção do gene *rnf4* apresentam persistência da comunicação entre ventrículos direito e esquerdo devido à má formação do septo ventricular, com repercussão hemodinâmica e morfologia clínica de insuficiência cardíaca congestiva;
- Essa má formação cardíaca está associada à elevada taxa de óbito fetal nos primeiros momentos de vida intra-uterina, sem registros de sobreviventes com deleção do gene *rnf4*.

## REFERÊNCIAS

1. BOCCHI, E. A. (2005). I Diretriz Latino-Americana para avaliação e conduta na insuficiência cardíaca descompensada. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, **85**(SIII): 6-48.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde/estatística; vital/mortalidade geral. Disponível em: [www.datasus.gov.br/informações](http://www.datasus.gov.br/informações). Acesso em: jan., 2006.
3. ALBANESI FILHO, F. M. (2005). O que vem ocorrendo com a insuficiência cardíaca no Brasil?. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, **85**(3): 155-156.
4. BASISIO, I. B. J.; CAPPELLARI, M. M. (1996). Insuficiência cardíaca na infância, in: Souza, A. G. M. R., Mansur, A. J. Editores. *SOCESP Cardiologia*. Editora Atheneu, São Paulo, p. 756-760.
5. WEINTRAUB, W. S.; COLE, J.; TOOLEY, J. F. (2002) Cost and cost-effectiveness studies in heart failure research. *American Heart Journal*, **143**: 565-576.
6. HUNTER, J. J.; CHIEN, K. R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *The New England Journal of Medicine*, **341**(17): 1276-1283.
7. BRUNEAU, B. G. (2002). Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circulation Research*, **90**: 509-519.
8. JAMES, J.; ZHANG, Y.; WRIGHT, K.; WITT, S.; GLASCOCK, E.; OSINSKA, H.; KLEVITSKY, R.; MARTIN, L.; YAGER, K.; SANBE, A.; ROBBINS, J. (2002). Transgenic rabbits expressing mutant essential light chain do not develop hypertrophic cardiomyopathy. *Journal Molecular and Cell Cardiology*, **34**(7): 873-882.
9. LAWSON K. A.; MENESES, J. J.; PERDERSEN, R. A. (1991). Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development*, **113**(3): 891-911.

10. CHEN, J. N.; FISHMAN, M. C. (1996). Zebrafish tinman homolog demarcates the heart fields and initiates myocardial differentiation. *Development*, **122**(12): 3809-3816.
11. TRAINOR, P. A.; ZHOU, S. X.; PARAMESWARAN, M.; QUINLAN, G. A.; GORDON, M.; STRURM, K.; TAM, P. P. L. (1999). Application of lacZ transgenic mice to cell lineage studies. *Molecular Embryology*, **97**: 183-200.
12. YAMAMOTO, M.; SAIJOH, Y.; PEREA-GOMEZ, A.; SHAWLOT, W.; BEHRINGER, R. R.; ANG, S. L.; HAMADA, H.; MENO, C. (2004). Nodal antagonists regulate formation of the anteroposterior axis of the mouse embryo. *Nature*, **428**(6981): 387-392.
13. YUTZEY, K.; GANNON, M.; BADER, D. (1995). Diversification of cardiomyogenic cell lineages in vitro. *Developmental Biology*, **170**(2): 531-541.
14. XAVIER NETO, J.; ROSENTHAL, N.; SILVA, F. A.; MATOS, T. G.; HOCHGREB, T.; LINHARES, V. L. (2001). Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation. *Genesis*, **31**: 97-104.
15. SEARCY, R. D.; YUTZEY, K. E. (1998). Analysis of Hox gene expression during early avian heart development. *Developmental Dynamics*, **213**(1): 82-91.
16. SUCOV, H. M. (1998). Molecular insights into cardiac development. *Annual Review Physiology*, **60**: 287-308.
17. SCHULTHEISS, T. M.; LASSAR, A. B. (1999). Vertebrate heart induction. In: HARVEY, R. P., ROSENTHAL, N. *Heart Development*, Academic Press, San Diego, p. 51.
18. DU, A.; SANGER, J. M.; LINASK, K. K.; SANGER, J. W. (2003). Myofibrillogenesis in the first cardiomyocytes formed from isolated quail precardiac mesoderm. *Developmental Biology*, **257**(2): 382-394.
19. LINASK, K. K.; HAN, M. D.; LINASK, K. L.; SCHLANGE, T.; BRAND, T. (2003). Effects of antisense misexpression of CFC on downstream flexion

protein expression during heart looping. *Developmental Dynamics*, **228**(2): 217-230.

20. LINASK, K. K. (2003). Regulation of heart morphology: current molecular and cellular perspectives on the coordinated emergence of cardiac form and function. *Birth Defects Research Part C Embryo Today*, **69**(1): 14-24.

21. DELORME, B.; DAHL, E.; JARRY-GUICHARD, T.; MARICS, I.; BRIAND, J. P.; WILLECKE, K.; GROS, D.; THEVENIAU-RUISSY, M. (1995). Development regulation of connexin 40 gene expression in mouse heart correlates with the differentiation of conduction system. *American Journal of Anatomy*, **204**(4): 358-371.

22. WALDO, K. L.; LO, C. W.; KIRBY, M. L. (1999). Connexin 43 expression reflects neural crest patterns during cardiovascular development. *Developmental Biology*, **208**(2): 307-323.

23. LI, W. E.; WALDO, K.; LINASK, K. L.; CHEN, T.; WESSELS, A.; PARMACEK, M. S.; KIRBY, M. L.; LO, C. W. (2002). An essential role for connexin43 gap junctions in mouse coronary artery. *Development*, **129**(8): 2031-2042.

24. RENTSCHLER, S.; VAIDYA, D. M.; TAMADDON, H.; DEGENHARDT, K.; SASSOON, D.; MAORLEY, G. E. (2001). Visualization and functional characterization of the developing murine cardiac conduction system. *Development*, **128**: 1785-1792.

25. HARVEY, R. P.; BIBEN, C.; ELLIOTT, D. A. (1999). Transcriptional control and pattern formation in the developing vertebrate heart: studies on NK-2 class homeodomain factors. In: HARVEY, R. P.; ROSENTHAL, N. *Heart Development*, Academic Press, San Diego p. 111.

26. SIMÕES-COSTA, M. S.; VASCONCELOS, M.; SAMPAIO, A. C.; CRAVO, R. M.; LINHARES, V. L.; HOCHGREB, T.; YAN, C. Y. I.; DAVIDSON, B.; XAVIER-NETO, J. (2005). The evolutionary origin of cardiac chambers. *Developmental Biology*, **277**(1): 1-15.

27. FIRULLI, A. B.; THATTALIYATH, B. D. (2002). Transcription factors in cardiogenesis: the combinations that unlock the mysteries of the heart. *International Review of Cytology*, **214**: 1-62.
28. CSERJESI, P.; BROWN, D.; LYONS, G. E.; OLSON, E. N. (1995). Expression of the novel basic helix-loop-helix gene eHAND in neural crest derivatives and extraembryonic membranes during mouse development. *Developmental Biology*, **170**: 664-678.
29. CHEN, C. Y.; SCHWARTZ, R. J. (1995). Identification of novel DNA binding targets and regulatory domains of a murine tinman homeodomain factor, nkx-2.5. *Journal Biological Chemistry*, **270**(26): 15628-15633.
30. LO, P. C.; FRASCH, M. (2003). Establishing A-P polarity in the embryonic heart tube: a conserve function of Hox genes in Drosophila and vertebrates? *Trends Cardiovascular Medicine*, **13**(5): 182-187.
31. HABETS, P. E.; MOORMAN, A. F.; CLOUT, D. E.; van ROON, M. A.; LINGBEEK, M.; van LOHUIZEN, M.; CAMPIONE, M.; CHRISTOFFELS, V. M. (2002). Cooperative action of Tbx2 and Nkx2.5 inhibits ANF expression in the atrioventricular canal: implication for cardiac chamber formation. *Genes & Development*, **16**(10): 1234-1246.
32. CLEMENT, J. H.; FETTES, S.; KNOCHEL, P.; LEF, J.; KNOCHEL, W. (1995). Bone morphogenetic protein 2 in the early development of *Xenopus laevis*. *Mechanics Developmental*, **52**: 357-370.
33. KISHIGAMI, S.; YOSHIKAWA, S.; CASTRANIO, T.; OKAZAKI, K.; FURUTA, Y.; MISHINA, Y. (2004). BMP signaling through ACVRI is required for left-right patterning in the early mouse embryo. *Developmental Biology*, **276**(1): 185-193.
34. ROSS, R. S.; NAVANKASATTUSAS, S.; HARVEY, R. P.; CHIEN, K. R. (1996). An HF-1a/HF-1b/MEF-2 combinatorial element confers cardiac ventricular specificity and established an anterior-posterior gradient of expression. *Development*, **122**(6): 1799-1809.
35. EDMONDSON, D. G.; LYONS, G. E.; MARTIN, J. F.; OLSON, E. N. (1994). Mef2 gene expression marks the cardiac and skeletal muscle lineages during embryogenesis. *Development*, **120**: 1251-1263.

36. LIN, Q.; LU, J.; YANAGISAWA, H.; WEBB, R.; LYONS, G. E.; RICHARDSON, J. A.; OLSON, E. N. (1998). Requirement of the MADS-box transcription factor MEF2C for vascular development. *Development*, **125**: 4565-4574.
37. BUCHBERGER, A.; ARNOLD, H. H. (1999). The MADS domain containing transcription factor cMef2a is expressed in heart and skeletal muscle during embryonic chick development. *Development Genes and Evolution*, **209**(6): 376-381.
38. TRANQUE, P.; CROSSIN, K. L.; CIRELLI, C.; EDELMAN, G. M.; MAURO, V. P. (1996). Identification and characterization of a RING zinc finger gene (C-RZF) expressed in chicken embryos cells. *Proceeding National Academy of Sciences of the U.S.A.*, **93**(7): 3105-3109.
39. HOLMES, M.; TURNER, J.; FOX, A.; CHISHOLM, M. C.; CHONG, B. (1999). hFOG-2, a novel zinc finger protein, binds the Co-repressor mctBP2 and modulates GATA-mediated activation. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(274): 23491-23498.
40. KINUGAWA, K.; MINOBE, W.-A.; WOOD, W. M.; RIDWAY, C.; BAXTER, J. D.; RIBEIRO, R. C. J.; TAWADRON, M. F.; LOWES, B. A.; LOMG, C. S.; BRISTOW, M. R. (2001). Signaling pathways for fetal gene induction in the failing human heart: evidence for altered thyroid hormone receptor gene expression. *Circulation*, **103**(8): 1089-1094.
41. MADIAT, F.; HACKSHAW, K. (2002). Expression of the mouse FGF-1 and FGF-1.A mRNAs during embryonic development and in aging heart. *Research Communication in Molecular Pathology and Pharmacology*, **112**(1-4): 139-44.
42. KUBALAK, S. W.; MILLER-HANCER, W. C.; O'BRIEN, T. X.; DYSON, E.; CHIEN, K. R. Chamber specification of atrial myosin light chain-2 expression precedes septation during murine cardiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, **269**(24): 16961-16970.
43. AKHURST, R. J.; LEHNERT, S. A.; FAISSNER, A.; DUFFIE, E. (1990). TGF beta in murine morphogenetic process: the early embryo and cardiogenesis. *Development*, **108**(4): 645-656.

44. NIEDERREITHER, K.; VERMONT, J.; MESSADDEO, N.; SCHUHBAUR, B.; CHAMBON, P.; DOLLÉ, P. (2001). Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development*, **128**: 1019-1031.
45. YASUI, H.; MORISHIMA, M.; NAKAZAWA, M.; AIKAWA, E. (1998). Anomalous looping, atrioventricular cushion dysplasia, and unilateral ventricular hypoplasia in the mouse embryos with right isomerism induced by retinoic acid. *Anatomy Records*, **250**(2): 210-219.
46. MOSS, J. B.; XAVIER-NETO, J.; SHAPIRO, M. D.; NAYEEM, S. M.; McCAFFERY, P.; DRAGER, U. C.; ROSENTHAL, N. (1998). Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Development Biology*, **199**(1): 55-71.
47. BOHNSACK, B. L.; LAI, L.; DOLLE, P.; HIRSCHI, K. K. (2004). Signaling hierarchy downstream of retinoic acid that independently regulates vascular remodeling and endothelial cell proliferation. *Genes & Development*, **18**(11): 1345-1358.
48. WANG, G. F.; NIKOVITS Jr., W.; SCHLEINITZ, M.; STOCKDALE, F. E. A positive GATA element and a negative vitamin D receptor-like element control atrial chamber-specific expression of a slow myosin heavy-chain gene during cardiac morphogenesis. (1998). *Molecular and Cellular Biology*, **18**: 6023-6034.
49. McFADDEN, D. G.; CHARITE, J.; RICHARDSON, J. A.; SRIVASTAVA, D.; FIRULLI, A. B.; OLSON, E. N. (2000). A GATA-dependent right ventricular enhancer controls dHAND transcription in the developing heart. *Development*, **127**(24): 5331-5341.
50. HARRISON, S. M.; HOUZELSTEIN, D.; DUNWOODIE, S. L.; BEDDINGTON, R. S. (2000). Sp5, a new member of the Sp1 family, is dynamically expressed during development and genetically interacts with Brachyury. *Developmental Biology*, **227**(2): 358-372.
51. BAKER, R. K.; HAENDEL, M. A.; SWANSON, B. J.; SHAMBAUGH, J. C.; MICALES, B. K.; LYONS, G. E. (1997). Developmentally in vitro preselection of gene-trapped embryonic stem cell clones for characterizing novel regulated genes in the mouse. *Developmental Biology*, **185**(2): 201-214.

52. LEE, Y.; SONG, A. J.; BAKER, R.; MICALES, B.; CONWAY, S. J.; LYONS, G. E. (2000). Jumonji, a nuclear protein that is necessary for normal heart development. *Circulation Research*, **86**(9): 932-938.
53. CHIARIOTTI, L.; BENVENUTO, G.; FEDELE, M.; SANTORO, M.; SIMEONE, A.; FUSCO, A.; BRUNI, C. B. (1998). Identification and characterization of a novel RING-finger gene (RNF4) mapping at 4p16.3. *Genomics*, **47**: 258-265.
54. MOILANEN, A. M.; POUKKA, H.; KARVONEN, U.; HÄKLI, M.; JÄNNE, O. A.; PALVIMO, J. J. (1998). Identification of a novel RING finger protein as a coregulator in steroid receptor-mediated gene transcription. *Molecular Cell Biology*, **18**(9): 5128-5139.
55. HADANO, S.; ISHIDA, Y.; IKEDA, J. E. (1998). The primary structure and genomic organization of five novel transcripts located close to the Huntington's disease gene on human chromosome 4p16.3. *DNA Research*, **5**(3): 177-186.
56. PROTEIN STRUCTURE. Disponível em: [www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/protein/structure/Cn3D/downloadcn3d-4.1/RNF4](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/protein/structure/Cn3D/downloadcn3d-4.1/RNF4). Acesso em: 29 jan. 2006.
57. YAN, W.; HIRVONEN-SANTTI, S. J.; PALVIMO, J. J.; TOPPARI, J.; JÄNNE, O. A. (2002). Expression of the nuclear RING finger protein SNURF/RNF4 during rat testis development suggests a role in spermatid maturation. *Mechanisms of Development*, **118**(1-2): 247-253.
58. KENTSIS, A.; BORDEN, K. L. (2000). Construction of macromolecular assemblages in eukaryotic processes and their role in human disease: linking RINGs together. *Current Protein & Peptid Science*, **1**(1): 49-73.
59. KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R. (2000). Concepts of GENETICS. 6. ed. Prentice Hall, Inc., New Jersey, p. 440.
60. HÄKLIN, M.; KARVONEN, U.; JÄNNE, O. A.; PALVIMO, J. J. (2005). SAMU-1 promotes association of SNURF (RNF4) with PML nuclear bodies. *Experimental Cell Research*, **304**(1):224-233.

61. HIRVONEN, S. J.; SANTTI, H.; JÄNNE, O. A.; PALVIMO, J. J. (2002). GC-Rich elements flanking the transcription start site govern strong activation on the SNURF gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **291**(40): 897-902.
62. HÄKLI, M.; KARVONEN, U.; JÄNNE, O. A.; PALVIMO, J. J. (2001). The RING protein SNURF is a bifunctional protein possessing DNA binding activity. *Journal Biological Chemistry*, **276**: 23653-23660.
63. POUKKA, H.; AARNISALO, P.; SANTTI, H.; JÄNNE, O. A.; PALVIMO, J. (2000a). Coregulator Small Nuclear RING Finger Protein (SNURF) Enhances Sp1- and Steroid Receptor-mediated Transcription by Different Mechanisms. *Journal Biological Chemistry*, Washington DC, **275**(1): 571-579.
64. VINOGRADOV, A. E. (2003). DNA helix: the importance of being GC-rich. *Nucleic Acids Research*, **31**(7): 1838-1844.
65. BONTEMPS, Y.; VUILLERMOZ, B.; ANTONICELLI, F.; PERREAU, C.; DANAN, J.-L.; MAQUART, F.-X.; WEGROWSKI, Y. (2003). Specific protein-1 is a universal regulator of UDP-glucose dehydrogenase expression: its positive involvement in transforming growth factor- $\beta$  signaling and inhibition in hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(24): 21566-21575.
66. GALILI, N.; NAYAK, S.; EPSTEIN, J. A.; BUCK, C. A. (2000). Rnf4, a RING protein expressed in the developing nervous and reproductive systems, interacts with Gscl, a gene within the DiGeorge critical region. *Developmental Dynamics*, **218**: 102-111.
67. GOTTLIEB S.; EMANUEL, B. S.; DRISCOLL, D. A.; SELLINGER, B.; WANG, B.; ROE, B.; BUDARF, M. L. (1997). The DiGeorge syndrome minimal critical region contains a Goosecoid-like (GSCL) homeobox gene that is expressed early in human development. *American Journal Reumatology Genetic*, **60**: 1194-1201.
68. LYNDSØ, C.; BOUTEILLER, G.; DAMGAARD, C. K.; RYOM, D.; SANCHEZ-MUÑOZ, S.; NØRBY, P. L.; BONVEN, B. J.; JØRGENSEN, P. (2000). Interaction between the transcription factor SPBP and the positive cofactor RNF4. *Journal Biological Chemistry*, **275**: 26144-26149.

69. KAISER, F. J.; MOROY, T.; CHANG, G. T.; HORSTHEMKE, B.; LUDECKE, H. J. (2003). The RING finger protein RNF4, a co-regulator of transcription, interacts with the TRPS1 transcription factor. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(40): 38780-38785.
70. FEDELE, M.; BENVENUTO, G.; PERO, R.; MAJELLO, B.; BATTISTA, S.; LEMBO, F.; VOLLONO, E.; DAY, P. M.; SANTORO, M.; LANIA, L.; BRUNI, C. B.; FUSCO, A.; CHIARIOTTI, L. (2000). A novel member of the BTB/POZ family, PATZ, associates with the RNF4 RING finger protein and acts as a transcriptional repressor. *Journal Biology Chemistry*, **275**(11): 7894-7901.
71. PERO, R.; LEMBO, F.; PALMIERI, E. A.; VITIELLO, C.; FEDELE, M.; FUSCO, A.; BRUNI, C. B.; CHIARIOTTI, L. (2002). PATZ attenuates the RNF4 mediated enhancement of androgen receptor-dependent transcription. *Journal Biology Chemistry*, **277**(5): 3280-3285.
72. SAVILLE, B.; POUKKA, H.; WORMKE, M.; JÄNNE, O. A.; PALVIMO, J. J.; STONER, M.; SAMUDIO, I.; SAFE, S. (2002). Cooperative coactivation of estrogen receptor  $\alpha$  in ZR-75 human breast cancer cells by SNURF and TATA-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, **277**(25): 2485-2497.
73. HIRVONEN, S. J.; RANNIKKO, A.; SANTTI, H.; SAVOLAINEN, S.; NYBERG, M.; JÄNNE, O. A.; PALVIMO, J. J. (2003). Down-regulation of estrogen receptor  $\beta$  and transcriptional coregulator SNURF/RNF4 in testicular germ cell cancer. *European Urology*, **44**(6): 742-747.
74. POUKKA, H.; KARVONEN, U.; YOSHIKAWA, N.; TANAKA, H.; PALVIMO, J. J.; JÄNNE, O. A. (2000b). The RING finger protein SNURF modulates nuclear trafficking of the androgen receptor. *Journal Cell Science*, **113**: 2991-3001.
75. THOMPSON, J. S.; THOMPSON, M. W. (1993). *Genética Médica*. 5ª Edição. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 60p.
76. RUGH, R. (1990). *The mouse its reproduction and development*. Oxford University Press, New York, p. 210.

77. 318, SMI, (2002). University of Wisconsin, Medical School, Madison, WI, USA.
78. FISHMAN, M. C.; CHIEN, K. R. (1997). Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development*, **124**(11): 2099-2117.
79. BRAND, T. (2003). Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Developmental Biology*, **258**(1): 1-19.
80. MIGLIORINE, D.; DENCHI, E. L.; DANОВI, D.; JOCHEMSEM, A.; CAPILLO, M.; GOBBI, A.; HELIN, K.; PELICCI, P. G.; MARINE, J. C. (2002). Mdm4 (Mdmx) regulates p53-induced growth arrest and neuronal cell death during early embryonic mouse development. *Molecular and Cellular Biology*, **22**(15): 5527-5538.
81. ITO, M.; OKANO, H. J.; DARNELL, R. B.; ROEDER, R. G. (2002). The TRAP100 component of the TRAP/Mediator complex is essential in broad transcriptional events and development. *EMBO Journal*, **1**(13): 3464-3475.
82. MOORMAN, A. F.; CHRISTOFFELS, V. M. (2003). Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiology Review*, **83**: 1223-1267.
83. KENTISIS, A.; BORDEN, K. L. (2004). Physical mechanisms and biological significance of supramolecular protein self-assembly. *Current Protein Peptid Science*, **5**: 125-134.