

Laser Antônio Machado Oliveira

**Análise Morfológica e Funcional da Integrina Beta 2
(CD18) durante o Desenvolvimento Cardíaco**

Orientador: Prof. Dr. Gregory Thomas Kitten

Co-orientador: Prof. Dr. Scott E. Klewer

**Belo Horizonte – MG
2009**

Laser Antônio Machado Oliveira

**Análise Morfológica e Funcional da Integrina Beta 2
(CD18) durante o Desenvolvimento Cardíaco**

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

Orientador: Dr. Gregory Thomas Kitten
Co-orientador: Dr. Scott E. Klewer

Belo Horizonte – MG
2009

AGRADECIMENTOS

A Deus,

Aos meus pais, Antônio e Maria, e às minhas irmãs, Lislely e Luciana, pelo companheirismo, amor e pela cumplicidade durante essa etapa da minha vida.

Ao professor Gregory Thomas Kitten, pelo auxílio e pela orientação durante minha caminhada na Pós-graduação.

À Jussara, pelo amor, incentivo e pela paciência nos momentos difíceis.

Ao Dr. Scott E. Klewer, por ter me aceitado em seu laboratório e possibilitado a realização de grande parte deste trabalho.

Aos colegas de laboratório que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização desse projeto.

Aos alunos, funcionários e professores de todos os laboratórios, especialmente a Robert Baker, Kristen Nelson, Justin Berkompas, Ian N. Jongewaard (*in memoriam*), que permitiram que esse trabalho fosse realizado.

Ao curso de Pós-graduação, por toda ajuda para a realização deste projeto.

Aos funcionários do CEBIO (Centro de Bioterismo), pela atenção e rapidez no fornecimento dos camundongos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	4
LISTA DE GRÁFICOS.....	5
LISTA DE TABELAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURA.....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3 HIPÓTESE.....	28
4 OBJETIVO GERAL.....	28
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
6 METODOLOGIA.....	29
6.1 EMBRIÕES.....	29
6.2 PCR EM TRANSCRIPTASE REVERSA (PCR SEMI-QUANTITATIVO – PCRSQ) E EM TEMPO REAL (PCR QUANTITATIVO – PCRQ).....	29
6.3 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> EM EMBRIÕES DE GALINHA.....	32
6.4 IMUNOLocalização DE INTEGRINA BETA 2 EM EMBRIÕES DE GALINHA.....	38
6.5 PRODUÇÃO DO VÍRUS DE REPLICAÇÃO DEFEITUOSA - BBAN.....	39
6.6 WESTERN BLOT.....	43
6.7 CULTURA DE EMBRIÕES E MICROINJEÇÃO.....	44
6.8 CULTURA DE CANAL ÁTRIO-VENTRICULAR EM GEL DE COLÁGENO.....	47
6.9 ANÁLISE DO EFEITO DAS CONSTRUÇÕES VIRAIS NA EMT.....	48
6.10 ANÁLISE DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	49
6.11 ANÁLISE DO ÍNDICE DE APOPTOSE <i>IN VITRO</i>	50
6.12 ESTUDOS <i>IN VIVO</i> DO EFEITO DAS CONSTRUÇÕES VIRAIS.....	51
6.13 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA EM TECIDOS EMBRIONÁRIOS DE CAMUNDONGO E GALINHA.....	53
7 RESULTADOS.....	55
7.1 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE INTEGRINA BETA 2 DURANTE A CARDIOGÊNESE EM EMBRIÕES DE GALINHA.....	55
7.2 ESTUDOS FUNCIONAIS <i>IN VITRO</i> DA FUNÇÃO DA INTEGRINA BETA 2.....	73
7.3 INTEGRINA BETA 2 AFETA A MIGRAÇÃO CELULAR DURANTE A EMT.....	73
7.4 ANÁLISE FUNCIONAL <i>IN VIVO</i> DAS CONSTRUÇÕES VIRAIS DE INTEGRINA BETA 2.....	82
7.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA PARA DETECÇÃO DE SUBUNIDADES ALFA E BETA EM TECIDO EMBRIONÁRIO DE CAMUNDONGO.....	82
8 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	91
9 REFERÊNCIA.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema da família de receptores integrina.....	15
Figura 2 – Figura esquemática de estágios sucessivos de formação e migração das células do coxim endocárdico em embriões de galinha (kitten, 2004).....	21
Figura 3 – Coleta, microinjeção e cultura de embriões <i>in vitro</i>	45
Figura 4 – Metodologia de ensaio de migração celular.....	48
Figura 5 – Cultura de embriões e microinjeção <i>in vivo</i>	51
Figura 6 - PCRsq para integrina beta 2, subunidade ribossomal 18S e VE-Caderina.....	57
Figura 7 – Hibridização <i>in situ</i> em embriões inteiros.....	66
Figura 8 – Hibridização <i>in situ</i> em embriões inteiros e em secções.....	67
Figura 9 – Hibridização <i>in situ</i> em secções.....	68
Figura 10 – Detecção de integrinas beta em coração embrionário de galinha.....	70
Figura 11 – Imunofluorescência indireta para detecção de integrina beta 2 e beta 1 em coração embrionário de galinha.....	71
Figura 12 – Detecção de componentes virais em células DF-1 transfectadas.....	75
Figura 13 – Análise qualitativa das células mesequimias em culturas de canal AV.....	77
Figura 14 – Análise dos tratamentos virais em embriões de galinha <i>in vivo</i> ...	83
Figura 15 – PCRsq em amostras de coração de camundongo E13,5.....	84
Figura 16 – Western blot em tecido de camundongo.....	85
Figura 17 – Imunofluorescência indireta em tecido embrionário de camundongo.....	87
Figura 18 – Imunofluorescência indireta para detecção das subunidades alfa L, M e X em coração embrionário de camundongo.....	89

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Quantificação Relativa de Integrina Beta 2 em coração através de PCRq.....	59
Gráfico 2 – Quantificação Relativa de Integrina Beta 2 em canal AV através de PCRq.....	59
Gráfico 3 – Quantificação Relativa de RNA em amostras de coração através de PCRq.....	62
Gráfico 4 – Quantificação Relativa de RNA em amostras de Canal AV através de PCRq.....	62
Gráfico 5 – Quantificação Relativa de RNA em amostras de ventrículo através de PCRq.....	62
Gráfico 6 – Quantificação Relativa de RNA em amostras de canal AV em cultura através de PCRq e infectadas com construções virais...	76
Gráfico 7 – Análise quantitativa das células mesenquimais em culturas de canal AV.....	78
Gráfico 8 – Ensaio de migração celular em cultura de canal AV.....	80
Gráfico 9 – Ensaio de proliferação celular em cultura de canal AV.....	80
Gráfico 10 – Ensaio de apoptose celular em cultura de canal AV.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação das subunidades alfa que formam heterodímero com integrina beta 2.....	23
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

18S – subunidade ribossomal 18S	EMT - transformação epitélio-mesênquimal
AMV-3C2 - avian myoblastosis virus	ENV – envelope viral
ASLV - vírus de sarcoma-leukosis de galinha	Has2 – Hyaluronan synthase 2
AVSD – atrium ventricular septum defects	HH – Hamburger and Hamilton
BamHI – endonuclease de restrição BAMHI	HSC – células tronco hematopoiéticas
BBAN – vírus de replicação defeituosa originado de Rous sarcoma virus	HUVEC – células endoteliais da veia umbilical humana
BrdU - bromodeoxiuridina	ICAM - molécula de adesão intercelular
BSA - bovine serum albumim	ITGAL – integrina alfa L
Canal AV – Canal átrio-ventricular	ITGAM – integrina alfa M
CCN1 — proteína da matriz extracelular (CYR61)	ITGAX – integrina alfa X
CCN2 - Connective Tissue Growth Factor – CTGF	ITGB2 – integrina beta 2
CD11a – subunidade alfa L de integrina	ItgB2DN – integrina beta 2 dominante negativo
CD11b – subunidade alfa M de integrina	ItgB2FL – integrina beta 2 full length
CD11c – subunidade alfa X de integrina	Kda – KiloDalton
CD11d - subunidade alfa D de integrina	LAD - deficiência de adesão leucocitária
CD18 – subunidade beta 2 de integrina	LFA-1 - Lymphocyte function-associated antigen 1
cDNA – DNA complementar	MAB – tampão de ácido maleico
CEBIO - Centro de Estudos de Bioterismo	MAC-1 - Macrophage-1 antigen
Clal - endonuclease de restrição ClaI	MEC – matriz extracelular
CR4 – Complement Receptor 4	MIDAS - metal ion-dependent adhesion site
CT – cushion tissue cells	NcoI - endonuclease de restrição NcoI
DAB - diaminobenzidine tetrahydrochloride	NotI - endonuclease de restrição NotI
Dapi – 4',6-diamidino-2-phenylindole	O/N – overnight
DF-1 – linhagem de células fibroblásticas de galinha	OT - outflow tract – tronco arterioso
DMSO - dimetilsufóxido	Pb - pares de base
DNA – deoxyribonucleic acid	PB – phosphate buffer
DSCAM - Down Syndrome Cell Adhesion Molecule	PBS – Phosphate Buffered Saline
EB – elution buffer	PCRq – PCR quantitativo ou PCR em Tempo Real
EC – Easy culture ou Early Chick	PCRsq – PCR semi-quantitativo
E – embryonic Day	PFA – Paraformaldeído
EDTA - ácido etilenodiamino tetraacético	RCAS - Replication-Competent ASLV long terminal repeat com Splice acceptor
	RNA – ribonucleic acid
	RNA _m – RNA mensageiro
	RNA _r – RNA ribossômico
	RPM – rotações por minuto
	RSV - vírus de sarcoma de Rous

RT-PCR – *Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction*
Runx1 – *Runt domain factor-1*
SD – *Síndrome de Down*
SSC - *Saline Sodium Citrate buffer*
ssDNA - *single-stranded DNA*
TA - *temperatura ambiente*
TBS – *Tris buffered saline*
TUNEL - *TdT-mediated dUDT Nick-End Labeling*

UTHSCSA - *The University of Texas Health Science Center at San Antonio*
VCAM – *vascular cell adhesion molecule*
VE-caderina – *vascular endothelial caderin*
VEGF - *vascular endothelial growth factor*
Yap - *Yes-associated protein*

RESUMO

Os receptores de adesão celular exercem uma variedade de funções durante o desenvolvimento embrionário e após o nascimento. Dentre essas funções, estão processos que envolvem morfogênese, adesão, migração e diferenciação celular. Dentre os vários tipos de receptores de adesão estão as integrinas, que representam a maior família de receptores de superfície que intermediam a ligação das células às proteínas da matriz extracelular. As integrinas são proteínas transmembrana que se ligam a proteínas contidas em complexos intracelulares que se ligam ao citoesqueleto. As integrinas formam heterodímeros compostos por uma subunidade alfa e uma beta e, até o momento, são conhecidos 24 heterodímeros diferentes. Entre as integrinas, existe uma subfamília representada pela integrina beta 2 (CD18) em associação com vários tipos diferentes de subunidades alfa. Essa subfamília tem sido reportada por ser expressa principalmente na superfície de leucócitos, onde medeia a adesão às células endoteliais durante a transmigração leucocitária. O gene que codifica a integrina beta 2 se localiza no cromossomo 21. Pacientes com Síndrome de Down, nos quais há uma cópia extra do cromossomo 21, apresentam uma redução do número de linfócitos maduros e também uma expressão aumentada de integrina beta 2, sendo que 40% dos indivíduos com esta Síndrome possuem defeitos cardíacos congênitos, mais comumente malformações no septo e nas válvulas átrio-ventriculares. Durante a morfogênese das válvulas átrio-ventriculares, uma subpopulação de células endoteliais dentro do coração embrionário transforma-se em células mesenquimais (transformação epitélio-mesenquimal), migra para o interior da geléia cardíaca e é responsável pela síntese do tecido conjuntivo das válvulas cardíacas e da porção membranosa do septo interventricular. É interessante apontar que os resultados obtidos na pesquisa do projeto de mestrado, utilizando métodos imunohistoquímicos, indicam que a integrina beta 2 não está presente somente nos leucócitos, mas também nas válvulas em formação, no miocárdio e epicárdio durante a cardiogênese. Portanto, o objetivo deste trabalho é pesquisar mais e desenvolver uma melhor caracterização da expressão da integrina beta 2 e, posteriormente, estudar sua função durante a cardiogênese. Dados obtidos utilizando técnicas de hibridização *in situ* e análises de PCR confirmam que a integrina beta 2 está presente durante a cardiogênese. Estudos funcionais mostram que a integrina beta 2 desempenha um papel, durante a transformação epitélio-mesenquimal, afetando a migração celular. Essas observações sustentam nossa hipótese de que a integrina beta 2 seja importante para a formação das válvulas cardíacas durante a cardiogênese.

ABSTRACT

Adhesion receptors play a key role in a variety of functions during embryonic development and after birth. Among such functions are processes involving morphogenesis, cellular adhesion, migration and differentiation. Among the several types of adhesion receptors are the integrins, which are the major family of surface receptors that mediate attachment of cells to the extracellular matrix. Integrins are transmembrane proteins that bind to proteins contained in intracellular complexes which are linked to the cytoskeleton. Integrins form heterodimers composed of one alpha and one beta subunit and, presently, 24 different heterodimers are known. Within the integrin family there is a subfamily which contains beta 2 integrin (CD18) in conjunction with one of several different types of alpha subunits. This subfamily has been reported to be primarily expressed on the surface of leukocytes, where it mediates adhesion to endothelial cells during leukocyte transmigration. The gene that encodes beta 2 integrin is localized on chromosome 21. Down syndrome patients, who have an extra copy of chromosome 21, display a reduction of mature lymphocytes and also an increased expression of beta 2 integrin. In addition, approximately 40% of Down syndrome patients have congenital heart defects, most commonly atrioventricular valve and septal malformations. During atrioventricular valve morphogenesis, a subset of endothelial cells within embryonic heart transforms into mesenchyme (epithelial-mesenchymal transformation), migrates into the cardiac jelly, and is responsible for the synthesis of connective tissue of the cardiac valves and the membranous portion of interventricular septum. Interestingly, research results obtained during my M.A. project using immunohistochemical methods indicated that beta 2 integrin is present not only in leukocytes, but also in the forming valves as well as in the myocardium and epicardium during cardiogenesis. Therefore, the objective of this work is to further characterize and verify the expression of beta 2 integrin, and then study its function during cardiogenesis. Data obtained using *in situ* hybridization techniques and PCR analysis confirmed that beta 2 integrin is present during cardiogenesis. Functional studies showed that beta 2 integrin plays a role during epithelial-mesenchymal transformation, affecting cellular migration. These observations support our hypothesis that beta 2 integrin is important for cardiac valve formation during cardiogenesis.

1 INTRODUÇÃO

O interesse do homem por entender o desenvolvimento humano e os processos que o coordenam vem sendo demonstrado há anos. Continuamente, os pesquisadores têm examinado minuciosamente os processos que regem a morfogênese humana. Dentre estes processos, podemos citar a divisão, migração e diferenciação celular. Muito se tem estudado a respeito desses fenômenos e descobre-se, cada vez mais, a importância do empenho despendido com o objetivo de se obter o conhecimento que controla esse campo da ciência.

Vários laboratórios e grupos de pesquisa têm investigado a relação de várias proteínas com o desenvolvimento embrionário. O laboratório de Matriz Extracelular e Desenvolvimento tem dirigido sua atenção às proteínas da matriz extracelular, aos receptores de adesão celular e às proteínas de sinalização intracelular que constituem componentes fundamentais, durante o processo da morfogênese cardíaca (CARVALHAES *et al.*, 2006; TAVARES *et al.*, 2006).

Dentre os receptores estudados, temos interesse específico pelas integrinas, que são heterodímeros protéicos transmembrana constituídos por uma subunidade alfa e uma subunidade beta, cuja função primordial é ligar a célula ao meio que a circunda; mas atuam também na transdução de sinais de dentro para fora e de fora para dentro, participando de outros processos celulares mais complexos (LEGATE, WICKSTRÖM e FÄSSLERREF, 2009; STREULI, 2009).

Dentre as várias integrinas, a beta 2 despertou nosso interesse e vem merecendo inúmeras investigações. Uma de suas características é formar quatro heterodímeros distintos, unindo-se à subunidade alfa L, alfa M, alfa D e alfa X. Inicialmente, as pesquisas relacionavam sua expressão às células leucocitárias (SPRINGER, 1994). Entretanto, estudos recentes demonstraram sua expressão também em células tumorais (KARMAKAR e MUKHERJEE, 2003), em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) (LANGEGGEN *et al.*, 2002) e também durante o desenvolvimento cardíaco, através do emprego de técnicas imuno-histoquímicas (OLIVEIRA e KITTEN, 2004).

Nossos estudos demonstraram a presença da integrina beta 2 durante a formação cardíaca. Técnicas direcionadas à detecção e localização de RNAm de

integrina beta 2 se fazem necessárias para o fortalecimento dos dados obtidos através do emprego de imunofluorescência indireta. Desta forma, poderemos relacionar se a localização do RNAm coincide com a localização final da proteína de integrina beta 2 em tecido e, por fim, relacionar essa localização com o papel que ela desempenha durante a formação das válvulas cardíacas embrionárias pelo emprego de estudos funcionais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A migração celular possui papel fundamental em vários processos biológicos e patológicos, tais como embriogênese, resposta inflamatória, reparo e regeneração tecidual, câncer e defeitos congênitos. Devido à sua grande importância, essa área tem despertado interesse dos pesquisadores há algum tempo; por isso, é necessário obterem-se conhecimentos mais profundos das bases moleculares que regem a migração celular. A migração pode ser entendida como um ciclo de vários passos, que são: extensão de uma protusão, formação de adesão estável na borda mais avançada da protusão - realizada por receptores de adesão -, translocação do corpo celular para frente, soltura da adesão e retração da parte posterior da célula (WEBB, PARSONS e HORWITZ, 2002; ROSE, ALON e GINSBERG, 2007).

Podemos observar que, para ocorrer migração, é necessária a atuação de receptores de adesão que forneçam ancoragem suficiente para a célula. Esta interação adesiva possui papel fundamental no direcionamento da migração, proliferação e diferenciação celular. Qualquer distúrbio nessa interação pode levar a alterações patológicas (CLARK e BRUGGE, 1995). O papel dos receptores de adesão vai além do fato de eles manterem as células unidas umas as outras, pois realizam conexões transmembrana ligando a matriz extracelular (MEC) e células adjacentes ao citoesqueleto intracelular, além de atuarem como transdutores de sinal (HYNES, 1999; TANG *et al.*, 2008; PIWKO-CZUCHRA *et al.*, 2009).

A quantidade de receptores de adesão celular é vasta, entretanto, podemos reuni-los em um grupo relativamente pequeno de famílias de receptores, dentre os quais podemos destacar quatro famílias mais importantes: as caderinas, a superfamília das imunoglobulinas, as selectinas e por fim, a maior família de receptores de adesão, a das integrinas que, diferentemente das outras, é formada por um heterodímero, compreendendo uma subunidade alfa e uma subunidade beta (HYNES, 1999).

De acordo com os vários trabalhos realizados nos últimos anos, os receptores de adesão para as proteínas da matriz (MEC; por exemplo, colágeno, laminina e fibronectina) mais importantes parecem ser as integrinas que, da mesma forma que

outros receptores de adesão, desempenham papel fundamental em determinadas adesões célula-célula (MILER e CAMPBELL, 2002). Desde sua descoberta, as integrinas se tornaram a mais bem entendida família de receptores de adesão. As integrinas e seus ligantes exercem funções no desenvolvimento, na resposta imune, nas migrações leucocitárias, na hemostasia, no câncer e estão no centro de muitas doenças humanas (HYNES, 1992; HYNES, 1999). As subunidades alfa (α) e beta (β), que formam o heterodímero glicoprotéico transmembrana, são unidas não-covalentemente. Até a presente data, são conhecidos 18 tipos de subunidade alfa e 8 tipos de subunidade beta (ALBERTS *et al.*, 2002, HYNES, 2002, HUMPHRIES *et al.*, 2006). Esse número de subunidades poderia, teoricamente, dar origem a mais de 100 heterodímeros; entretanto, são conhecidas apenas 24 associações (Figura 1).

Em sua porção extracelular, as integrinas apresentam domínios de ligação para cátions divalentes (Ca^{2+} ou Mg^{2+} , dependendo da integrina). Sabe-se que a união da integrina ao seu ligante depende em muito da presença de cátions, pois este influencia na afinidade e na especificidade da união (ALBERTS *et al.*, 2002). Algumas pesquisas demonstraram que mutações em regiões específicas do *metal ion-dependent adhesion site* (MIDAS) abolem a ligação das integrinas com seu ligante (CHEN, *et al.*, 2006; PESHU, *et al.*, 2009)

Uma característica apresentada pelas integrinas é o fato de elas mediar a transdução de sinais, através da membrana plasmática em ambas as direções: a união de um ligante à integrina transmite sinais para o interior da célula, o que resulta em reorganização do citoesqueleto, da expressão gênica e diferenciação celular, fato conhecido como *outside-in signaling*. Por outro lado, sinais originados no interior da célula podem propagar pela integrina e regular a afinidade de união da integrina ao seu ligante e, também, a adesão celular, *inside-out signaling*. Os domínios intracitoplasmáticos possuem papel fundamental nesta transmissão de sinais bi-direcionalmente (LIU, CALDERWOOD e GINSBERG, 2000, HARBURGER e CALDERWOOD, 2009). As células normalmente expressam mais de um tipo de heterodímero, sendo que esses complexos podem estar sob a forma ativa ou inativa. O fator que determina em qual dessas formas, a integrina se encontra é seu estado conformacional (LUO, CARMAN e SPRINGER, 2007; ARNAOUT, GOODMAN e XIONG, 2007). Dependendo do repertório de integrinas expressas na

superfície da célula, a integrina pode responder a um tipo específico de proteína da matriz localizada no micro-ambiente que a circunda (MEIGHAN e SCHWARZBAUER, 2008).

Os domínios intracitoplasmáticos, geralmente possuindo menos de 50 aminoácidos, atuam acoplando-se a proteínas intracelulares que formam grandes complexos protéicos que contêm tanto componentes do citoesqueleto quanto proteínas de sinalização (CLARK e BRUGGE, 1995). Pelo menos 21 proteínas possuem ligação a uma ou mais subunidades de integrina beta, dentre elas podemos citar: proteínas de ligação à actina, enzimas, proteínas adaptadoras e co-ativadoras transcricionais (LIU, CALDERWOOD e GINSBERG, 2000).

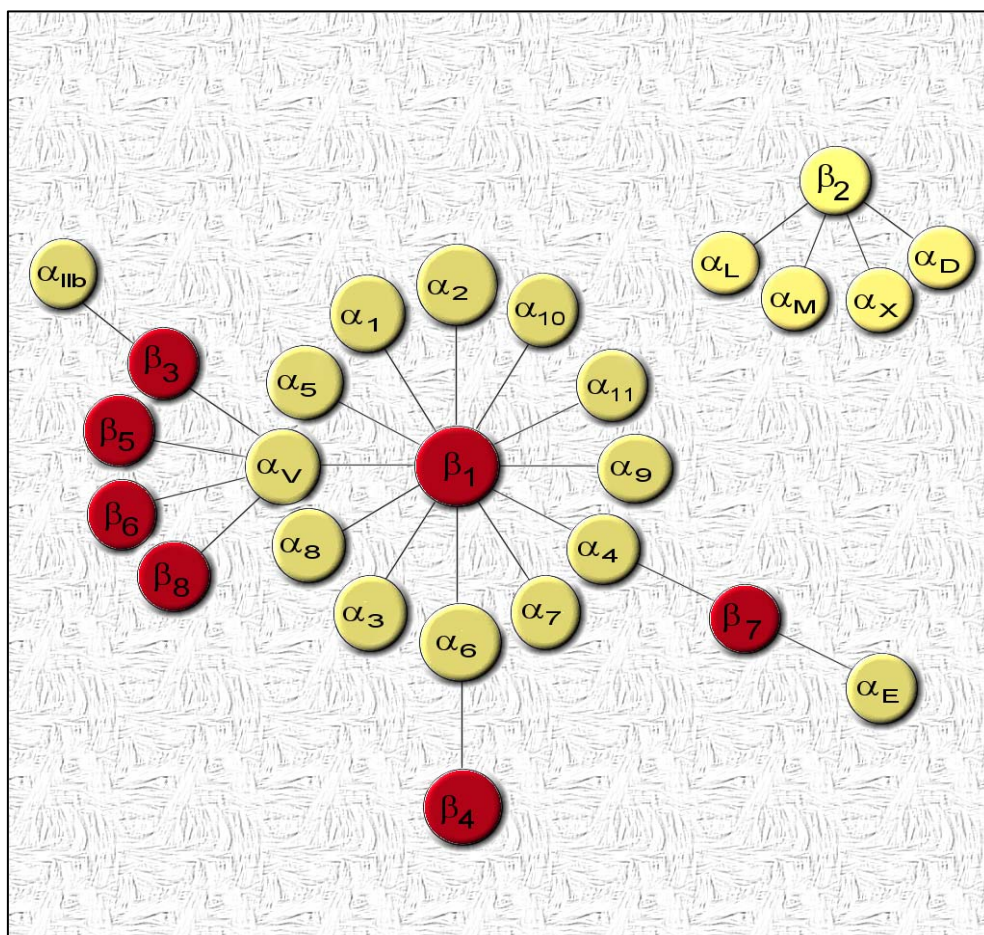


Figura 1 – Esquema da família de receptores integrina

A figura mostra as subunidades e suas associações. 8 subunidades beta arranjam-se com 18 subunidades alfa, gerando um total de 24 heterodímeros distintos, até então conhecidos. (Adaptado de HYNES, 2002)

As integrinas também atuam em cooperação com outros tipos de receptores de membrana celular. Como exemplo, podemos citar a cooperação que ocorre entre as integrinas e receptores de fator de crescimento (LLIC e DAMSKY, 2002). Estudos têm demonstrado que as integrinas recrutam os receptores de fatores de crescimento da mesma forma que o fazem com os componentes do citoesqueleto e as proteínas adaptadoras nos locais onde ocorrem adesões focais. Desta forma, essa interação integrina-receptores de fator de crescimento influenciam a progressão do ciclo e a migração celular (ELICEIRI, 2001). Alguns estudos demonstraram que a ativação da integrina alfa v/beta3 em células cancerígenas cerebrais aumentam a expressão de *vascular endothelial growth factor (VEGF)*¹, promovendo a angiogênese (LORGER, *et al.*, 2009). Segundo Vallejo-Illarramendi, Zang e Reichardt (2009), integrinas e fatores de crescimento trabalham juntos para promover fenômenos celulares tais como: organização do citoesqueleto, formação de complexos de adesão focal, diferenciação e morfogênese cardíaca.

Durante o fenômeno da migração celular, existe uma dinâmica notável em relação à formação e ao desligamento de pontos de ancoragem da célula. Esse fato gera a necessidade de uma movimentação das integrinas na membrana plasmática. Além de poderem deslocar-se lateralmente para os locais onde se exige sua ação, as integrinas também podem ser internalizadas em vesículas e transportadas para outras regiões da célula onde vão atuar (GREEN, MOULD e HUMPHRIES, 1998; PELLINEN e IVASKA, 2006; CASWELL *et al.*, 2007). Em estudo posterior, marcando-se integrina alfa M em neutrófilos, esse fenômeno também pôde ser observado. Os autores relatam que a integrina é internalizada e re-expressa na borda principal de adesão do neutrófilo (ROCHON, KAVANAGH e HARLAN, 2000). Esse mesmo achado foi também observado em estudos no nosso laboratório. Durante o projeto de mestrado, utilizando-nos de técnicas imuno-histoquímicas e microscopia confocal, observamos que o padrão de expressão da integrina beta 2, na superfície das células endoteliais dos coxins cardíacos, apresentou-se sob a forma de partículas distribuídas pela superfície da célula, além de exibirem marcações no citoplasma. Acreditamos que as marcações observadas no citoplasma correspondam às reservas de integrina que a célula possui e que, no devido momento, seriam expressas em sua superfície (OLIVEIRA e KITTEN, 2004).

¹ Fator de crescimento do endotélio vascular.

O papel das integrinas é muito abrangente, indo desde processos fisiológicos como a migração de células inflamatórias para os sítios de atuação, até fenômenos muito iniciais durante a formação de um organismo. Ransom e outros (1993) concluíram em seu trabalho que pelo menos três tipos de subunidades beta de integrina (beta 1, beta 3 e beta 6) são expressos durante períodos embrionários, quando as células mudam seus comportamentos de adesão. Estas várias integrinas possuem sítios de ligação para fibronectina (um componente abundante da MEC em tecidos embrionários), além de possuírem papel importante no controle da síntese dos componentes da própria MEC. No embrião, as integrinas atuam na migração das células do mesoderma para sítios específicos e também auxiliam na manutenção da integridade do embrião, por ligar as células às proteínas da matriz (ROOTE e ZUSMAN, 1995, SKALSKI, ALFANDARI e DARRIBERE, 1998, LIU *et al.*, 2009). Também desempenham papel importante no endereçamento celular e na posterior manutenção dessas células nos locais onde vão atuar (MILNER e CAMPBELL, 2002).

Durante o desenvolvimento embrionário, surge um grupo de células indiferenciadas denominadas células tronco-hematopoiéticas (*hematopoietic stem cells*, HSC), que darão origem, praticamente, a todas as células sanguíneas. Estas células apresentam alta expressão de integrinas, que estão relacionadas à migração e sua retenção em um ambiente específico (CORBEL e SALAÜN, 2002). Tsuji e outros (1998), em seu trabalho, citam a importância da família de integrina na hematopoiese, sendo expressa nas células tronco hematopoiéticas, células progenitoras e células hematopoiéticas diferenciadas já funcionantes.

A discussão a respeito da existência de um precursor comum das células endoteliais e HSC, ou seja, o hemangioblasto bipotente, já havia sido relatada por North e outros (2002). Os autores sugeriram que a expressão de Runx1 (fator de transcrição) pelas células endoteliais levaria à sua diferenciação em agregados de células hematopoiéticas na aorta embrionária e que esses tipos celulares possuiriam, em estágios iniciais do desenvolvimento, um precursor comum, o hemangioblasto bi-potente. Os autores observaram que as células endoteliais da região ventral da aorta passavam a expressar Runx1 e perdiam seu fenótipo endotelial estágios antes da formação de agregados de células hematopoiéticas. Os autores, naquele momento, concluíram que a origem das HSC ainda necessitaria ser

bem estudada, mas que existia uma tendência em se achar que grupos específicos de células endoteliais ativadas dariam origem a células hematopoiéticas. Estudos posteriores realizados por Bruijn e outros (2005) concluíram que as duas linhagens celulares, tanto a endotelial quanto a hematopoiética, originam-se do hemangioblasto.

A interação celular mediada por integrinas é essencial durante ambas a embriogênese e a formação cardíaca (CLARK *et al.*, 1995; MAITRA *et al.*, 2000). Durante o desenvolvimento embrionário, células mesenquimais se agrupam e formam as ilhotas sanguíneas. Essas ilhotas cavitam-se e unem-se para formar a primeira rede vascular do embrião. As células endoteliais que revestem esses vasos originam as primeiras células sanguíneas que, nesta fase ainda são nucleadas. Fato semelhante ocorre na placa cardiogênica, região mais cranial do embrião na qual as células mesenquimais se agrupam e dão origem a dois tubos paralelos, os tubos cardíacos primitivos. Com o decorrer do desenvolvimento, os dois tubos se fundem e originam o coração tubular embrionário que contém três camadas: uma mais externa de células miocárdicas, uma interna de células endoteliais, e entre elas o espaço acelular contendo proteínas da matriz também denominada geléia cardíaca (MARKWALD *et al.*, 1984, KITTEN *et al.*, 1987; LITTLE e RONGISH, 1995). No decorrer do desenvolvimento, a geléia cardíaca aumenta em espessura em determinadas regiões como no canal atrioventricular e no *outflow tract* (OT – tronco arterioso) para formar os coxins endocárdicos. A formação dos coxins é um processo regulado pelas células do miocárdio que ocorre concomitantemente à secreção de proteínas da matriz extracelular rica em ácido hialurônico e sulfato de condroitina. Alguns fatores parecem ser importantes nesse processo, tais como a secreção de BMP-2 (*bone morphogenetic protein-2*) e Wnt-6 (*wingless type MMTV integration site-6*) (PERSON, KLEWER e RUNYAN, 2005b)

Subsequentemente, algumas células endoteliais que revestem os coxins sofrem transformação epitélio-mesenquimal (EMT) e passam a ser denominadas células mesenquimais, ou células dos tecidos dos coxins (células CT – *cushion tissue cells*). Após essa etapa, elas migram em direção à geléia cardíaca (RUNYAN e MARKWALD, 1983; PERSON, 2005b). Nessa etapa, a geléia cardíaca é constituída por vários tipos de proteínas extracelulares, mas algumas apresentam real interesse no processo de EMT, tais como a fibronectina, fibulina, fibrilina e

proteoglicanos. Essas proteínas da matriz favorecem o processo de EMT, pois formam uma base de apoio para as células durante sua migração e diferenciação que ocorrem nos coxins endocárdicos (EISENBERG e MARKWALD, 1995). Várias outras proteínas da matriz também são expressas nos coxins cardíacos durante a EMT, tais como os colágenos VI e XVIII que, de alguma forma, ajudam nesse processo de formação das válvulas cardíacas (KLEWER *et al.*, 1998, CARVALHAES *et al.*, 2006). Essas células proliferam e exercem papel importante na formação das válvulas cardíacas e na porção membranosa do septo interventricular (LITTLE e RONGISH, 1995). Além disso, os coxins endocárdicos, ao se fundirem, são parcialmente responsáveis pela divisão do coração em quatro câmaras (SADLER, 1995; MOORE, 1998) (Figura 2).

Figura 2: Figura esquemática de estágios sucessivos de formação e migração das células do coxim endocárdico em embriões de galinha (Kitten, 2004).

Estágio 9-10 (33 horas): o coração é uma estrutura tubular formado por células derivadas do mesoderma e que já começa a pulsar. O órgão nesta fase consiste de duas camadas epiteliais, a interna (endotelial, E) e a externa (miocárdica, M), separadas por uma camada de matriz extracelular denominada geléia cardíaca (CJ).

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

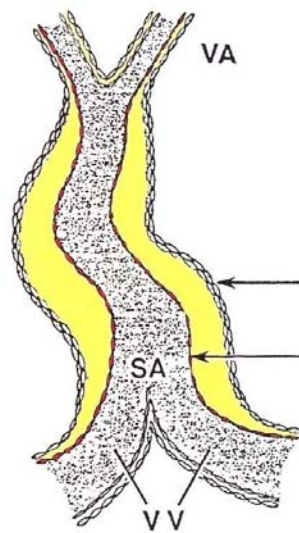
Estágio 17 (64 horas): a camada endotelial acima dos coxins endocárdicos se torna “ativada”. Estas células sofrerão a transformação epitélio-mesenquimal, dando origem às células do tecido dos coxins endocárdicos (CT). Utilizando sinais diversos, tais como fatores de crescimento produzidos pelo miocárdio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

Estágio 19 (3-3.5 dias): as células dos tecidos dos coxins, que migraram em direção ao miocárdio, entram em proliferação, produzindo uma população de células nesta região da geléia cardíaca que se diferencia em fibroblastos, que vão constituir as valvas e o tecido conectivo do septo membranoso do coração adulto.

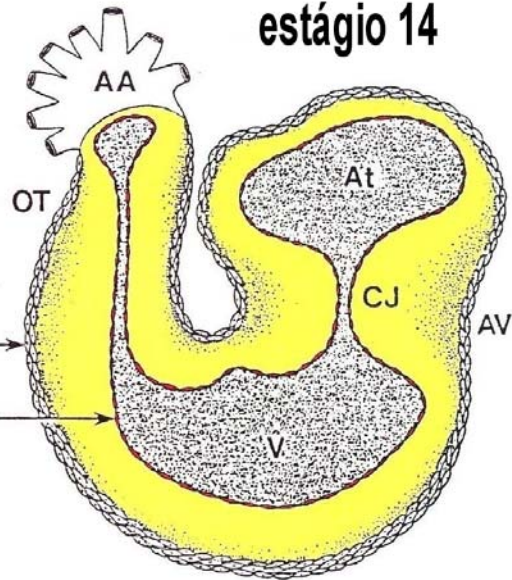
AA = arco aórtico, At = átrio, AV = canal atrioventricular, CJ = geléia cardíaca, CT = células mesenquimais dos coxins cardíacos, E = endotélio, IVS = septo interventricular, M = miocárdio, SA = região sinoatrial, OT = outflow tract/Tronco arterioso, V = ventrículo, VA = aorta ventral, VV = veia vitelínea.

Correspondência entre modelos de estudo galinha versus camundongo – Estágio 9-10 (E8), Estágio 14 (E9), Estágio 17 (E10) e Estágio 19 (E11).

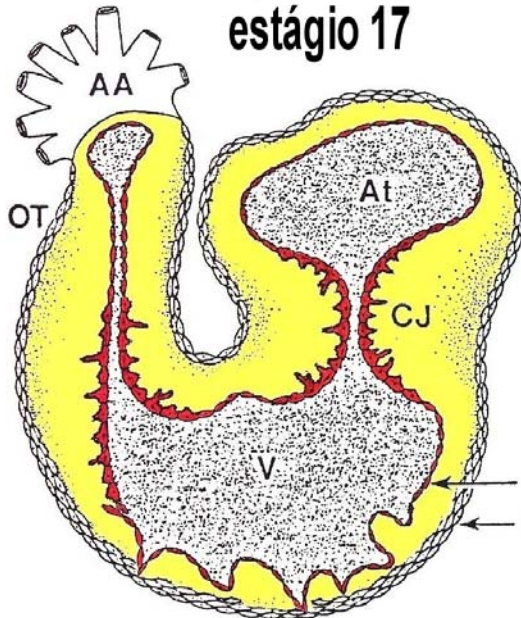
estágio 9-10



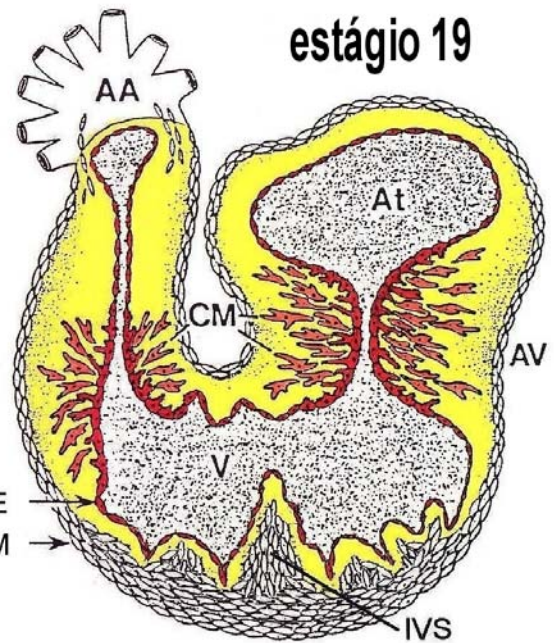
estágio 14



estágio 17



estágio 19



Como nos demais órgãos, a interação celular com componentes da MEC é essencial para a formação normal do coração. Infelizmente, o papel específico das integrinas durante o desenvolvimento cardíaco ainda é pouco entendido. Estudos iniciais com cardiogênese indicaram que a integrina beta 1 é expressa em regiões de desenvolvimento trabecular do coração e no coxim cardíaco. A subunidade alfa 1 aparece também em estágios iniciais do desenvolvimento das células endoteliais do coração embrionário tubular e permanece durante o desenvolvimento (CLARK *et al.*, 1995). Os resultados obtidos durante a pesquisa de mestrado demonstraram a expressão de integrina beta 2 no início da formação do coração e durante a morfogênese das válvulas cardíacas. A marcação foi observada nas células endoteliais que revestem os coxins, nas células mesenquimais que migraram no interior dos coxins e também nas trabéculas do miocárdio em formação.

As integrinas, como relatado, além de atuarem durante o desenvolvimento normal dos órgãos, e de uma forma geral no desenvolvimento do embrião, também participam de processos patológicos. Estudos realizados em animais *knockout* que não expressavam integrina beta 2 demonstraram que, ao se induzir forte isquemia no miocárdio, obtinha-se menor grau de necrose, pois menor quantidade de células inflamatórias chegava ao local de isquemia. Sem a integrina beta 2, as células inflamatórias não conseguiam aderir firmemente ao endotélio e, na sequência, transmigrar (PALAZZO *et al.*, 1998). A integrina beta 2 tem papel tão importante que, ao ocorrer uma mutação no gene responsável pela sua codificação, desenvolve-se o que denominamos deficiência de adesão leucocitária (LAD). Essa deficiência ocorre, primariamente, pela falha de função de neutrófilos que não conseguem chegar aos locais de infecção (HOGG e BATES 2000). Outros estudos relatam que mutações ou deleções em sítios específicos, tanto no domínio extracelular, quanto no intracitoplasmático, geram níveis reduzidos de expressão e função da integrina beta 2 (REY-LADINO *et al.*, 1998, TAN *et al.*, 2000, HIXSON *et al.*, 2004).

A integrina beta 2, também designada como CD18, pode se associar a mais de uma subunidade alfa, sendo elas alfa L (CD11a), alfa M (CD11b), alfa X (CD11c) e alfa D (CD11d) (Tabela 1). As funções leucocitárias na literatura são relatadas como diretamente relacionadas à interação entre a integrina beta 2 e seus ligantes, tais como moléculas de adesão intercelular (ICAMs). A integrina beta 2 é essencial para a ligação dos leucócitos e posterior transmigração pela camada de células

endoteliais (D'AMICO *et al.*, 1998, HOGG e BATES, 2000, ROCHON *et al.*, 2000). Estudos realizados com a integrina alfaM/beta2 (CD11b/CD18 ou MAC-1), investigaram seu papel na adesão entre células de defesa (neutrófilos) e células endoteliais. Os resultados mostraram que a MAC-1 é necessária para o processo de adesão entre essas células e o rápido espalhamento do neutrófilo sobre o endotélio, fato que antecede a transmigração que ocorre na inflamação (ROCHON *et al.*, 2000). Esse mesmo heterodímero parece também ter função após a passagem do neutrófilo pelo endotélio. Estudos utilizando anticorpos os quais bloqueavam a ação de MAC-1 observaram que a taxa de migração era prontamente aumentada, quando neutrófilos e outros tipos celulares eram colocados para migrar em uma matriz de fibronectina (HARLER *et al.*, 1999 e LISHKO *et al.*, 2002).

Antígeno	Expressão Celular	Função	Outros nomes *
CD11a	Linfócitos, granulócitos, monócitos e macrófagos.	Subunidade α_L de integrina LFA-1 liga-se a CD54 (ICAM-1), CD102 (ICAM-2) e CD50 (ICAM-3)	LFA-1
CD11b	Células mielóides e Natural killer	Subunidade α_m de integrina CR3, liga-se a CD54, iC3b, proteínas da matriz extracelular	MAC-1
CD11c	Células mielóides	Subunidade α_x de integrina CR4, liga-se a fibrinogênio	CR4, p150,95
CD11d	Leucócitos	Subunidade α_d de integrina, liga-se a CD50	----
CD18	Leucócitos	Subunidade α_2 de integrina, forma heterodímero com CD11A, B, C e D.	----

Tabela 1: Relação das subunidades alfa que formam heterodímero com integrina beta 2.

Nessa tabela estão relacionados os outros nomes de cada subunidade, seus ligantes e algumas das células que as expressam. * - empregado quando relacionado ao heterodímero alfa/beta.

Disponível em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/books/bv.fcgi?tool=bookshelf&call=bv.View..ShowSection&searchterm=lfa&rid=imm.table.d1e82861>

Quando se diz que a integrina beta 2 é expressa em leucócitos, isso não quer dizer que ela seja encontrada apenas nesse tipo celular. Estudos comprovaram que outros tipos de células também a expressam, como os realizados por Langeggen e outros (2002) que provaram, através de citometria de fluxo, RT-PCR e Western blot, que células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) expressam constitutivamente CR4 (CD11c/CD18), e que essas células poderiam estar atuando na fagocitose de partículas opsonizadas por iC3b (componente do sistema de complemento).

Um outro estudo mostrou células tumorais de adenocarcinoma expressando LFA-1 (CD11a/CD18) e ICAM-1 (ligante de LFA-1). Essa integrina estaria atuando na ligação homotípica (entre as próprias células tumorais) e facilitando a passagem dessas células pelo endotélio, podendo causar metástases (KARMAKAR e MUKHERJEE, 2003). As integrinas possuem papel na progressão de tumores, como relatado por Janes e Watt (2006). Os dados publicados por Ransom e outros (1993) sugerem que a integrina beta 2 está presente em tecidos embrionários que coincidem com o período de formação inicial do coração. Em outro estudo, é relatada a expressão da subunidade beta 2 de integrina em células cromafins, durante o desenvolvimento da glândula supra-renal. Os autores relatam que a integrina beta 2 pode estar desempenhando um papel durante a migração dos feocromoblastos que se inicia na crista neural, atravessa o córtex da glândula e termina na medula da supra-renal, onde elas se alojam e dão origem às células cromafins da medula (CHAMOIX *et al.*, 2001).

Entretanto, pouco se sabe a respeito da função e expressão da integrina beta 2 fora da linhagem leucocitária, ao passo que vários estudos têm pesquisado a relação de outras integrinas, tais como as betas 1 e 3, além das subunidades alfa relacionadas, durante o desenvolvimento dos tecidos (BROWN e YAMADA, 1995; BOKEL e BROWN, 2002; MEIGHAN e SCHWARZBAUER, 2008). Durante a pesquisa realizada no mestrado, determinamos que a integrina beta 2 está presente durante a cardiogênese, sendo expressa pelas células do endocárdio, miocárdio e mesenquimais dos coxins cardíacos que formarão as válvulas átrio-ventriculares.

O gene para integrina beta 2 é encontrado no cromossomo 21, na região q22.3, mesma região onde se encontram os genes para as cadeias alfa 1 e 2 do colágeno VI, cadeia alfa 1 do colágeno 18 e DSCAM (*Down Syndrome Cell Adhesion*

Molecule) (CAPONE, 2001). Pesquisas realizadas em timo de pacientes com Síndrome de Down detectaram que os timócitos apresentavam uma expressão aumentada da subunidade beta 2, como parte de CD11a/CD18 ou LFA-1, em comparação com os timócitos de pacientes-controle. Esta expressão aumentada pode estar relacionada à deficiência de linfócitos T maduros, fato que ocorre em indivíduos com SD. Os pesquisadores sugerem que isso talvez ocorra, devido a uma interação alterada dos timócitos com a matriz extracelular do órgão (MURPHY *et al.*, 1993).

Em indivíduos que possuem a SD/trissomia 21, que atinge um em cada 800 a 1000 nascimentos (CAPONE, 2001), é relatado que 40% destes indivíduos nascem com defeitos cardíacos congênitos, principalmente defeitos nas válvulas atrioventriculares e na porção membranosa do septo interventricular (KORENBERG *et al.*, 1992). Estudos realizados em laboratório utilizando camundongos com uma cópia extra do cromossomo humano 21 (camundongos quiméricos) também apresentaram defeitos cardíacos semelhantes àqueles apresentados por indivíduos com SD (SHINOHARA *et al.*, 2001; NISHIGAKI, *et al.*, 2002). Os pesquisadores sugeriram que esta cópia extra do cromossomo 21 pode estar afetando a cardiomiogênese normal nos embriões, fato que pode ser correlacionado aos defeitos cardíacos apresentados por indivíduos com SD.

Estudos realizados anteriormente em nosso laboratório demonstraram que os colágenos VI e XVIII, cujos genes estão localizados no cromossomo 21, são expressos em maior quantidade em tecidos gengivais de indivíduos com SD, quando comparados aos indivíduos controle e que esses mesmos colágenos são expressos durante a formação das válvulas cardíacas (KLEWER *et al.*, 1998, GERVÁSIO, 2000; SOUZA, 2001). Todos esses dados nos levaram a pensar sobre a importância dos genes do cromossomo 21 no desenvolvimento das válvulas cardíacas. Estudos realizados por Capone (2001) mapearam o gene da integrina beta 2 no cromossomo 21, em um local ligado a genes relacionados a defeitos cardíacos congênitos (KORENBERG *et al.*, 1992), descoberta que trás a possibilidade de que esse receptor de adesão celular possa estar desempenhando um papel durante a morfogênese das válvulas átrio-ventriculares.

Pouco se sabe a respeito da função que a integrina beta 2, em associação com suas subunidades alfa, desempenha durante a formação do coração e, mais

especificamente, na morfogênese das válvulas cardíacas. Apesar de nosso estudo ter demonstrado que as células endoteliais que formam os coxins e as mesenquimais que se localizam na geléia cardíaca expressam integrina beta 2, não se sabe nem qual é a sua função (OLIVEIRA KITTEN, 2004), nem qual parceiro alfa da integrina beta 2 está sendo co-expresso durante a cardiogênese. Seria a integrina beta 2 necessária para a formação das células mesenquimais durante a transformação epitélio-mesenquimal? Desempenharia ela papel importante na migração e diferenciação celular dentro do coração em desenvolvimento? Faz-se necessário um melhor entendimento de todo o processo no qual estão inseridos a integrina beta 2 e seus parceiros alfa, durante o processo de formação do coração.

3 HIPÓTESE

O RNAm de integrina beta 2 está presente durante a formação cardíaca e coincide com a expressão tecidual da proteína. Além disso, a integrina beta 2 pode estar desempenhando papel importante durante a transformação epitélio-mesenquimal (EMT), processo necessário para a formação das válvulas cardíacas.

4 OBJETIVO GERAL

Determinar através do emprego de técnicas em biologia celular e molecular que a integrina beta 2 está presente durante a formação cardíaca em embriões de galinha e camundongo e que ela desempenha uma função durante esse fenômeno. Determinar a presença de parceiros alfa da integrina beta 2, durante a formação cardíaca.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a distribuição temporal e espacial da integrina beta 2, durante o desenvolvimento cardíaco em embriões de galinha, especialmente durante os períodos em que ocorre a transformação epitélio-mesenquimal (EMT);
2. Avaliar a função da integrina beta 2 durante a cardiogênese, especialmente durante a transformação epitélio-mesenquimal;
3. Avaliar a expressão de subunidades alfa que formam heterodímero com a integrina beta 2, durante a cardiogênese.

6 METODOLOGIA

6.1 Embriões

Ovos de galinha Leghorn Branca fertilizados foram obtidos da Texas A&M University, Department of Poultry Science, incubados a 38°C e os embriões coletados entre os estágios HH14 e HH28. Embriões de camundongos foram obtidos a partir de camundongos adultos adquiridos no Centro de Estudos de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO). Após atingirem idade fértil, os camundongos adultos foram colocados para acasalar e, após a detecção do tampão vaginal, foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia até a data de sacrifício. Os estágios coletados foram E11,5 e E13,5 (E – *embryonic day*).

6.2 PCR em Transcriptase Reversa (PCR semi-quantitativo – PCRsq) e em Tempo Real (PCR quantitativo – PCRq)

Amostras de RNA total foram extraídas de coração e de canal átrio-ventricular de embriões de galinha nos estágios HH14, HH17, HH20, HH25 e HH28 (HAMBURGER e HAMILTON, 1951). Amostras de RNA total também foram extraídas de ventrículos de embriões de galinha nos estágios HH14, HH17 e HH20. Essas amostras foram utilizadas para detecção da presença e níveis de integrina beta 2 nos vários estágios, ao mesmo tempo em que experimentos relativos à VE-caderina e subunidade ribossomal 18S foram realizados.

Nas amostras de coração embrionário de camundongo, o RNA total foi extraído do estágio E13.5 e, posteriormente, submetidos à detecção da integrina beta 2 e das subunidades alfa que se associam com a integrina beta 2 (alfa L, alfa M e alfa X). A extração foi realizada utilizando-se Trizol LS Reagent (Invitrogen cat # 10296-028) de acordo com o seguinte protocolo:

- Homogeneizamos dos tecidos em Trizol;
- Adicionamos 0,2 ml de clorofórmio seguidos de agitação leve do conteúdo por 15 segundos;
- Incubamos por 3 minutos à temperatura ambiente (TA);
- Centrifugamos a 12.000 g por 15 minutos;
- Transferimos a fase aquosa para novo tubo, com posterior precipitação do RNA com isopropanol;

- Incubamos as amostras de RNA por 10 minutos à TA;
- Centrifugamos a 12.000 g por 15 minutos a 4⁰C;
- Removemos o sobrenadante e procedemos à lavagem dupla do *pellet* de RNA com etanol 75%;
- Centrifugamos a 10.000 g por 10 minutos a 4⁰C;
- Removemos o sobrenadante e fizemos a secagem do *pellet* de RNA por 15 minutos;
- Re-suspendemos o RNA em água livre de DNase e RNase.

Todas as amostras de RNA total foram tratadas com Turbo DNA-free kit (Ambion, cat # 1907). Para tal processo, as amostras foram misturadas ao tampão 10X turbo DNase (0,1V) e 1 µl de DNase, posterior incubação a 37⁰C, por 30 minutos. A reação foi inativada pela adição de DNase Inactivation Reagent (0,1V). Incubação por 2 minutos à temperatura ambiente com mistura ocasional. Centrifugação a 10.000 g por 1,5 minutos e transferência do sobrenadante para um novo tubo. O RNA foi então precipitado pela mistura de etanol 100% (2,5V) + NH₄ACO 5M (0,1V). Incubação *overnight* a -80⁰C e posteriormente centrifugada a 14.000 g por 15 minutos. Descarte do sobrenadante e lavagem do *pellet* de RNA com etanol 75%, seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos cada. O *pellet* de RNA foi secado à temperatura ambiente por 15 minutos e posteriormente re-suspendido em água livre de DNase e RNase.

A concentração de cada amostra de RNA total foi determinada pelo *Nanodrop (ND-100 Spectrophotometer)*. O cDNA foi transcrito utilizando-se *iScript cDNA synthesis Kit (Bio-rad, 170-8890)*. Para uma reação de 20 µl, adicionamos 4 µl de IScript Reaction Mix + 1 µl de IScript Reverse Transcriptase juntamente com a amostra de RNA total (1 µg por reação). A reação de transcriptase reversa foi realizada em termociclador para PCR de acordo com os seguintes passos: 5 minutos a 25⁰C; 45 minutos a 42⁰C; 5 minutos a 85⁰C, de acordo com as recomendações do fabricante.

A reação de PCRsq foi realizada utilizando AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems, cat # 4311816), de acordo com os seguintes passos: 10 minutos a 95⁰C; 35 ciclos dos seguintes passos: 30 segundos a 95⁰C, 30 segundos a 60⁰C, 45 segundos a 72⁰C²; como último passo, 7 minutos a 72⁰C. Como controle

² - O tempo de extensão foi ajustado de acordo com o tamanho do produto de PCR na proporção de 1Kb por minuto.

do conteúdo de RNA originado de células endoteliais em nossas amostras, realizamos PCRsq, utilizando *primers* para VE-caderina. A VE-caderina é relatada na literatura como sendo expressa por células endoteliais (CAVALLARO *et al.*, 2006). Controles experimentais, tais como não adição, nem de cDNA, enzima e nem de *primers* foram utilizados sistematicamente.

Nos experimentos de PCRq, realizamos a padronização pela medida de concentração de cDNA total. A medida foi realizada com o uso de *Quanti-iT Oligreen ssDNA reagent and Kit (Molecular Probes, cat # O11492)* em fluorômetro (*Tuner Biosystems*), seguindo o mesmo método empregado por Tavares e outros (2006). A reação de PCRq foi realizada com o uso de *Platinum SYBR Green qPCR supermix UDG (Invitrogen, cat # 11733-038)*. Para cada reação de PCRq, 100ng de cDNA total foram diluídos em 10 μ l de água livre de DNase e RNase e posteriormente misturados a 15 μ l de *Master Mix (12,5 μ l de SYBR Green qPCR supermix + 0,25 μ l de primer forward + 0,25 μ l de primer reverse + 2 μ l de água)*. Para evitar eventuais problemas de pipetamento, a média de três reações por experimento (tréplica) foi calculada para cada gene. O mínimo de 3 amostras diferentes por estágio estudado foi utilizado. Como controle interno da reação de PCRq, realizamos em nossos experimentos a amplificação de RNAr (subunidade ribossomal 18S). A reação de PCRq foi realizada seguindo os seguintes passos: 2 minutos a 50 $^{\circ}$ C; 2 minutos a 95 $^{\circ}$ C; 40 ciclos de: 15 segundos a 94 $^{\circ}$ C, 30 segundos a 58 $^{\circ}$ C, 45 segundos a 72 $^{\circ}$ C; seguido do último passo de curva de dissociação de 65 $^{\circ}$ C a 99 $^{\circ}$ C. As reações de PCRq foram realizadas em *Rotor Gene 3000 (Corbett Research)*, sendo que o produto final de PCR era entre 100 a 150 pares de base (pb). Em todos os experimentos realizados, amostras sem adição de cDNA foram empregadas. A análise estatística dos dados obtidos foi realizada através do teste *t de Student*.

Abaixo estão relacionados os pares de primers utilizados, tanto nos experimentos de PCR e em Transcriptase Reversa, quanto em Tempo Real com embriões de galinha:

Gene	Forward	Reverse
ITGB2 ¹	5'-AATGAAGCAAGAGGGCAATGCGAC-3'	5'-ACAGTCGCAGAAGGTGCCATAGAT-3'
18S ²	5'- ACTCAACACGGGAAACCTCA -3'	5'- ATGCCAGAGTCTCGTTTCGTT -3'
ITGB2 ³	5'- CAATGATGAGGTCACCTTCAA -3'	5'- CAGTCACAGTCACAGATGCTGT -3'
VE-	5'- AAAGTGCAAGGGTACGATGG -3'	5'- CACACCGAGTCATCAACTG -3'

Caderina⁴

¹ – utilizado em PCRsq. – 426pb.
² – utilizado em PCRsq e PCRq – 152pb.
³ – utilizado em PCRq. – 132pb.
⁴ – utilizado em PCRsq – 322pb. ITGB2 – integrina beta 2. 18S – subunidade ribossomal 18S.

A sequência dos primers utilizados nos experimentos de PCRsq nas amostras coletadas de embriões de camundongos estão relacionados abaixo:

Gene	Forward	Reverse
ITGB2 ¹	5'- GGGCTGGATGCCATAATGCAAGTT -3'	5'- TTCTTTGTCACCGCAAAGATGGGC -3'
ITGB2 ²	5'- TGTTCTTCTGGGATCTGCTGTGT -3'	5'- CCGGACATGCAGCAACTTGCATTA -3'
ITGAL	5'- TTCAGCCATCTGCCTATGACCACA -3'	5'- TGAGTGTGGAGGAGGCCTTGATTT -3'
ITGAM	5'- AGACAAAGAACAACACACGCAGGC -3'	5'- TGAGATCGTCTTGGCAGATGCTGT -3'
ITGAX	5'- AGACGAGTTGCAGAAGGCCAAGTA -3'	5'- AGACCATCACTGTCCACACAGCTT -3'

ITGB2 – integrina beta 2
¹ e ² – dois pares de primers para integrina beta 2 – 269 e 702pb, respectivamente
ITGAL – integrina alfa L (CD11a) – 282pb.
ITGAM – integrina alfa M (CD11b) – 264pb
ITGAX – integrina alfa X (CD11c) – 508pb.

6.3 Hibridização *in situ* em embriões de galinha

A técnica de hibridização *in situ* nos permite detectar a distribuição tecidual do RNA mensageiro (RNAm) do gene de nosso interesse. Em nosso estudo, realizamos a detecção do RNAm da integrina beta 2 em vários estágios de desenvolvimento embrionário de galinha. Para tal, utilizamos duas variantes da técnica de hibridização *in situ*, sendo a primeira realizada em embriões inteiros (*whole embryo*) e a segunda em secções.

A técnica de embrião inteiro foi utilizada em amostras iniciais de desenvolvimento embrionário, estágios HH10 a HH20 (HAMBURGER e HAMILTON, 1951), sendo essa mais fácil de ser realizada nesses estágios, pois os embriões são delicados e podem perder sua morfologia durante o processamento e inclusão realizados na técnica de secção. A segunda variante da técnica foi utilizada, pois, em estágios mais avançados de desenvolvimento, a sonda não atinge seu alvo com

tanta facilidade, efeito gerado pela dificuldade da sonda em se difundir pelo tecido embrionário que durante o desenvolvimento fica espesso. Isso pode gerar, ao final do experimento, uma possível marcação inespecífica (*background*). Essa dificuldade pode ser evitada com a realização da hibridização *in situ* em secções, pois a sonda tem acesso direto ao tecido. Nessa etapa, além de utilizarmos embriões no estágio HH20, utilizamos também HH25 e HH28 (HAMBURGER e HAMILTON, 1951).

Para a realização da técnica de hibridização *in situ* é a produção de sonda antisense que irá se hibridizar com o RNAm alvo, e também é a produção da sonda senso que funciona como controle experimental. Para esse fim, foi extraído RNA total de canal AV de galinha HH20, como descrito anteriormente. Após reação de Transcriptase Reversa e PCR, o produto de PCR foi purificado e utilizado nas etapas de clonagem.

A seguir, estão relacionados os pares de *primers* empregados. Os produtos de PCR gerados foram purificados utilizando *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen, EUA) e utilizados para a síntese das sondas antisense e senso para hibridização *in situ* em embrião inteiro e em secções:

	Forward	Reverse
Embrião inteiro e secção (~755pares de base)	5'-CACAG GGATCC CAATAAGATACAGCT GACT-3'	5'-CACAG GCGGCCGC TTGGGATCATATCACT GAGT-3'
Secção (~2300 pares de base)	5'-CACAG GGATCC ATGGGACCCCGTGA CTGCTGC -3'	5'-CACAGGATCC GCGGCCGC TCATTGCCCA TCAAATCTGG -3'
	Sequência GGATCC - sítio de restrição para a enzima <i>BamHI</i>	
	Sequência GCGGCCGC - sítio de restrição para a enzima <i>NotI</i>	

Os produtos de PCR foram purificados seguindo os passos abaixo:

- Adicionamos tampão PB (5 vezes o volume de PB para 1 volume de produto de PCR);
- Centrifugamos em coluna de rotação – 1 minuto – 10,000 rpm;
- Lavamos a coluna de rotação em tampão PE (750µl) e centrifugação – 1 minuto – 10,000 rpm;
- Transferimos a coluna de rotação para um novo tubo e adição de 50µl tampão EB;
- Centrifugamos a amostra – 1 minuto – 10,000 rpm.

Após a purificação do PCR, procedemos à etapa de digestão. O quadro abaixo descreve a preparação da reação:

Componente	Volume
Produto de PCR purificado	50 μ l
Água RNase, DNase free	38 μ l
Tampão de reação 3 (10X)	10 μ l
BamHI	1 μ l
NotI	1 μ l
Volume final	100 μ l

Após obtermos a solução para digestão (100 μ l), incubamos as amostras por 4 horas a 37⁰C. Após essa etapa, repetimos o protocolo de purificação de produto de PCR listado anteriormente. O produto de PCR foi posteriormente inserido em um vetor plasmídeo *pBluescript II KS⁺* (*PBS-KS* - *Stratagene*, #212207), previamente tratado pelas enzimas de *NotI* e *BamHI*.

De posse do inserto e vetor, ambos enzimaticamente preparados, procedemos à etapa de ligação. Em um tubo, adicionamos o vetor (1 μ g/ μ l), o produto de PCR (1 μ g/ μ l), tampão de ligação (10X), enzima de ligação (T4 DNA ligase – Promega) e água DNase e *RNase free*. Essa solução foi incubada *overnight* a 4⁰C.

Após a etapa de ligação, realizamos o passo da transformação. Para tal etapa, utilizamos *NovaBlue Single Competent Cells* (*Novagen*, #70181-1PKG):

- Pegamos o tubo contendo suas células competentes e deixamos descongelar em um balde de gelo;
- Adicionamos o produto da reação de ligação (até 50 μ g);
- Incubamos em balde de gelo - 20 minutos;
- Submetemos a choque de calor - 45 segundos a 42⁰C;
- Retornamos as células imediatamente ao balde de gelo – por 2 minutos;
- Adicionamos SOC às células competentes;
- Transferimos as células competentes para o incubador de agitação (*shake incubator*) – 1 hora - a 37⁰C;
- Adicionamos 150 ml das células transformadas para placas de Agar (*LB Amp Agar plates*);
- Incubamos as placas – *overnight* a 37⁰C.

No dia seguinte, selecionamos as colônias bacterianas e transferimos para um tubo Falcon de 15 ml contendo meio LB. Os tubos foram mantidos em incubador de agitação *overnight* a 37⁰C. O passo que se seguiu foi a extração do plasmídeo de

nosso interesse, o que foi realizado utilizando *Qiagen Miniprep Kit*, de acordo com os seguintes passos:

- Centrifugamos a cultura de bactérias em suspensão – 3 minutos - a 8,000 rpm;
- Descartamos o sobrenadante e procedemos à re-suspensão do pellet de bactérias em 250µl de tampão P1 com o uso de uma pipeta;
- Adicionamos 250µl de tampão P2 e misturamos, invertendo o tubo;
- Adicionamos 350 µl de tampão N3 e misturamos, invertendo o tubo;
- Centrifugamos – 10 minutos - a 13,000 rpm;
- Transferimos o sobrenadante para colunas de rotação (*spin column*), seguido de centrifugação – 1 minuto - a 13,000 rpm. Descartamos o líquido que atravessou a coluna;
- Lavamos a coluna em tampão PB (500 µl), seguida de centrifugação – 1 minuto - a 13,000 rpm. Descartamos o líquido que atravessou a coluna;
- Lavamos a coluna em tampão PE (750 µl), seguindo-se a centrifugação – 1 minuto - a 13,000 rpm. Descartamos o líquido que atravessou a coluna; Centrifugamos novamente por mais 1 minuto e descartamos o líquido que atravessou a coluna;
- Transferimos a coluna de rotação para um novo tubo e procedemos à adição de 50 µl de tampão EB (10 mM Tris·Cl, pH 8.5), deixando descansar por 1 minuto;
- Centrifugamos - 1 minuto - a 13,000 rpm.

O plasmídeo (vetor contendo o inserto) purificado através dessa metodologia foi enviado a *Genomic Analysis and Technology Core Facility* localizado na Universidade do Arizona. Os resultados do sequenciamento foram comparados à sequência da integrina beta 2 de galinha (*GeneBank* NM_205251), com o objetivo de verificar a presença de nosso inserto de interesse no vetor. A produção das sondas antisenso e senso para integrina beta 2 foi realizada da seguinte maneira:

- Submetemos o plasmídeo a tratamento com a enzima de restrição BamHI para a produção da sonda antisenso, sendo que para a produção da sonda senso, submetemos o plasmídeo a tratamento com *NotI*.
- Utilizamos a enzima de RNA polimerase para a produção da sonda antisenso foi a T7 e para a produção da sonda senso foi a T3.

No quadro abaixo descrevemos a montagem da solução para a produção das sondas:

Componente	Volume
Plasmídeo (até 1 µg)	24µl
Água DNase e RNase free	
0,1 M DTT	2 µl
Tampão da RNA polimerase (5X)	8 µl
DIG RNA Labeling Mix (Roche)	4 µl
RNase out	1 µl
RNA polimerase	1 µl
Volume Final	40 µl

- Após obter a solução de reação, incubamos por 4 horas a 37⁰C;
- Precipitamos o RNA adicionando 5 µl de LiCl (4N);
- Adicionamos 113 µl de etanol 100% e misturamos;
- Incubamos *overnight* a -20⁰C;
- Centrifugamos a sonda de RNA em câmara fria – 30 minutos - a 14,000 rpm;
- Descartamos o sobrenadante e procedemos à lavagem do pellet com etanol 70% resfriado;
- Centrifugamos em câmara fria – 5 minutos - a 14,000 rpm;
- Descartamos o sobrenadante e deixamos o pellet secar – 5 minutos – temperatura ambiente;
- Re-suspendemos o pellet em 49 µl de água DNase e RNase free mais 1 µl de RNase out;
- Incubamos – 10 minutos – 37⁰C;

Podemos verificar a produção da sonda em gel de agarose 1%, se tivermos o cuidado de obter uma banda sólida em gel, a fim de que a sonda possa ser utilizada em experimentos de hibridização *in situ*. A sonda pode ser armazenada em freezer a -80⁰C, ou adicionada em solução de hibridização da técnica de hibridização *in situ*.

Como mencionado anteriormente, as técnicas de hibridização *in situ* empregadas foram duas: em embrião inteiro e em secções. Em cada uma das técnicas, um número mínimo de 6 embriões foi utilizado. A seguir, descrevemos os passos da técnica de embrião inteiro, seguindo protocolo formulado por Nieto e outros (1996). Ao final do experimento, as imagens foram obtidas em microscópio de dissecação (*Lieca model MZ125*).

Para realizarmos a hibridização *in situ* em embriões inteiros, adquirimos ovos fertilizados que foram incubados conforme como descrito anteriormente. Após o estadiamento, os embriões foram fixados em solução de paraformaldeído 4%, a 4⁰C *overnight* (O/N). Após a fixação, seguimos os seguintes passos:

- Lavamos com PBT (PBS + 0,1% Triton X-100) – 2X de 5 minutos – temperatura ambiente (TA);
- Desidratamos com uma série crescente de metanol em PBT, por último em metanol - TA;
- Re-hidratamos com uma série decrescente de metanol em PBT, por último em PBT – 10 minutos – TA;
- Tratamos com Proteinase K (20µg/ml) em PBT – 10 minutos – TA, seguido de lavagem em PBT – 10 minutos – TA;
- Pós-fixamos em 0.2% glutaraldeído/4% paraformaldeído em PBT – 20 minutos – TA, seguido de lavagem em PBT – 10 minutos – TA;

- Lavamos com solução contendo: 50% de solução de pré-hibridização + 50% PBT – 5 minutos – TA.
- Lavamos com solução pré-hibridizadora – esperar os embriões decantarem – TA;
- Substituímos por nova solução de pré-hibridização e nova incubação – 3 horas – 65°C;
- Incubamos em solução de hibridização (solução de pré-hibridização contendo a sonda) – *overnight* – 65°C;
- Lavamos com SSC 2x (*Saline Sodium Citrate buffer*), 0.1% CHAPS – 3X de 20 minutos - 65°C;
- Lavamos com SSC 0.2x, 0.1% CHAPS – 3X de 20 minutos - 65°C;
- Lavamos com KTBT (Tris-HCl 50mM, pH 7,5; NaCl 150mM; KCl 10mM; 1% de Triton X-100) – 2X de 10 minutos – TA;
- Bloqueamos com 20% soro de ovelha em KTBT – 3 horas – 4°C;
- Incubamos com anticorpo anti-DIG (1/2000 diluição) em 20% soro de ovelha em KTBT – *overnight* – 4°C;
- Lavamos com KTBT – 5X de 1 hora – TA;
- Lavamos com KTBT – *overnight* – 4°C;
- Lavamos com NTMT (Tris-HCl 100mM, pH 9,5; MgCl₂ 50mM, NaCl 100mM, 0,1% de Triton X-100) – 2X de 15 minutos – TA;
- Incubamos em ambiente escuro com NTMT contendo 3µg/ml de NBT e 3,5 µl/ml BCIP. Monitoramos periodicamente a reação de coloração e quando um sinal forte for observado e/ou qualquer background aparecer, paramos a reação lavando várias vezes em KTBT. Armazenamos os embriões em PBS. Para visualizar a cor característica da hibridização *in situ* (violeta), desidratamos os embriões em uma série crescente de 25%, 50%, 75%, 100% de metanol.

A hibridização *in situ* em secções de estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário de galinha foi realizada de acordo com o protocolo que se segue:

- Coletamos os embriões de galinha estagiados em PBS e fixação na seguinte solução: 6:3:1 de etanol/formalina/ácido acético glacial – *overnight*;
- Preparamos e incluímos os embriões coletados em blocos de paraplast para posterior secção;
- Desparafinizamos as secções em lâminas com xilol – 3X de 15 minutos;
- Hidratamos em uma série decrescente de etanol, seguido de lavagem em PBS – TA;
- Tratamos com proteinase K (20µg/ml) – 7 minutos – 37°C, seguido de lavagem em PBS – 5 minutos – TA;
- Pós-fixamos com paraformaldeído 4% – 20 minutos – TA, seguido de lavagem em PBS – 5 minutos – TA;
- Lavamos com SSC 2x – 5 minutos – TA;
- Incubamos com solução de pré-hibridização (solução de hibridização sem a adição da sonda) – 3 horas – 65°C;
- Incubamos com solução de hibridização (contendo a sonda) – *overnight* – 65°C;
- Lavamos com solução 50% de formamida/ 1x SSC/ 0.1% Tween 20 – 4X de 30 minutos – 65°C;

- Lavamos com MABT – solução estoque de MAB 5X (para 1 litro de água destilada, adicionar 58g de ácido maléico e 41g de NaCl. Acertamos o pH em 7,5 com NaOH. Diluímos para 1X MAB antes de ser utilizado e adicionamos Tween 20 a 1%) – 4X de 30 minutos – TA;
- Bloqueamos em 20% de soro de ovelha, 2% de BSA (*bovine serum albumin*) em MABT – 1 hora – TA;
- Incubamos com anticorpo anti-digoxigenina (1/2000) na mesma solução de bloqueio – *overnight* – 4^oC;
- Lavamos com MABT – 6X de 1 hora – TA;
- Lavamos com NTMT – 5 minutos – TA;
- Incubamos, em ambiente escuro, com NTMT contendo 3µg/ml de NBT e 3,5 µl/ml BCIP – 37^oC – Monitoramos a reação de coloração e quando um sinal forte foi observado e/ou qualquer background apareceu, paramos a reação, seguido de lavagem em PBS – 5 minutos – TA;
- Desidratamos em série crescente de etanol (25%, 50%, 70%, 100%) – 5 minutos cada – TA;
- Passamos em xilol – 2X de 5 minutos – TA.
- Montamos as lâminas em Permount.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz e as imagens capturadas em microscópio invertido Leica, equipado com conjunto óptico Normarski.

6.4 Imunolocalização de Integrina beta 2 em embriões de galinha

De acordo com os resultados apresentados na dissertação de mestrado, observamos que a integrina beta 2 é expressa durante várias etapas da formação da válvula cardíaca em embriões de camundongos (E10,5 – E17,5), sendo que sua marcação se torna fraca em estágio anterior ao nascimento (E19,5). Com o objetivo de detectar a expressão de integrina beta 2 em outro modelo, utilizamos embriões de galinha nos quais empregamos a técnica de imunohistoquímica por peroxidase. Para tal experimento, embriões de galinha em diversos estágios de desenvolvimento, relacionados a períodos anteriores a EMT, durante a EMT e, por fim, em estágios mais avançados da EMT foram coletados e preparados para a realização dos experimentos.

Desta forma, embriões de galinha estagiados foram dissecados em PBS, fixados em metanol/ *dimethyl sulfoxide-DMSO* (80%/20%, respectivamente), mantidos a -80^oC por 7 dias para posterior inclusão em paraplast. Os blocos foram seccionados, utilizando procedimentos padrão, abaixo relacionados:

- Desparafinizamos em xilol e hidratação em série decrescente de etanol; posteriormente lavamos em água destilada e em PBS;
- Realizamos recuperação antigênica com tampão citrato (pH 5.5, 0.1 M) por 15 minutos em microondas;
- Bloqueamos da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio 3% em metanol;
- Bloqueamos em solução de BSA 2% (BSA)/0.1% Tween 20/PBS – 1 hora – TA;
- Incubamos com anticorpo primário *polyclonal anti-integrina beta 2* (Santa Cruz Biotechnology, INC., sc-6623) diluído em 0.2% BSA/0.01% Tween 20/PBS – *overnight* à 4^oC;
- Lavamos em PBS 1X - 4X de 5 minutos – TA;
- Incubamos com anticorpo secundário conjugado com HRP (Santa Cruz Biotechnology, INC. sc-2020) – 1 hora - TA;
- Lavamos em PBS 1X – 4X de 5 minutos – TA;
- Realizamos reação de coloração em câmara escura com 0.01% *diaminobenzidine tetrahydrochloride* (DAB) e 0.03% H₂O₂ em PBS. Para controle da técnica, em algumas lâminas foi adicionado somente anticorpo secundário;
- Lavamos em PBS 1X;
- Desidratamos em série crescente de etanol e posteriormente passamos por banhos de Xilol;
- Montamos das lâminas em Permount.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz e as imagens capturadas em microscópio invertido Leica, equipado com conjunto óptico Normarski.

6.5 Produção do vírus de replicação defeituosa - BBAN

Construções pró-virais têm sido empregadas na manipulação da expressão gênica e podem ser utilizadas para transferir um gene específico para as células de seu interesse. A técnica, portanto, permite ao pesquisador estudar o efeito da expressão de uma proteína em sua forma normal ou modificada nas células expostas às construções (MORGAN e FEKETE, 1996).

Um tipo de construção viral que vem sendo utilizado é o RCAS (*Replication-Competent ASLV long terminal repeat with a Splice acceptor*), retrovírus pertencente a uma família de vetores retrovirais derivados de um tipo de vírus de sarcoma de Rous (RSV), membro da família dos vírus de sarcoma-leukosis de galinha (ASLV). Na natureza, os retrovírus podem adquirir oncogene dos seus hospedeiros, aquisição que, em alguns casos, resulta em perda de um ou mais genes virais. A maioria dos retrovírus que adquiriu oncogenes celulares é de replicação defeituosa.

BBAN é uma versão de replicação defeituosa do RCAS. Ele contém a cópia completa dos genes para GAG (Capsídeo, nucleoproteína, protease) e POL (*Reverse transcriptase* e integrase), mas falta o gene que codifica ENV (sequência que codifica o envelope viral – receptor de ligação). Por não possuir o gene para o envelope (ENV), ele pode acomodar um inserto (gene externo) maior, de aproximadamente 4Kb, em comparação ao RCAS. Para a produção de partículas virais infecciosas, o BBAN pode ser co-transfectado no interior da célula com outro pró-vírus que contenha a sequência do envelope³. No nosso estudo, utilizamos o pró-vírus pENVA para a co-transfecção da sequência do envelope viral. Após obtermos a solução para digestão (100 µl), incubamos as amostras por 4 horas a 37^oC. Após essa etapa, repetimos o protocolo de purificação de produto de PCR listado anteriormente. Posteriormente, inserimos, o produto de PCR em um vetor plasmídeo *pBluescript II KS⁺* (*PBS-KS - Stratagene, #212207*), previamente tratado pelas enzimas de *NotI* e *BamHI*.

Nos nossos experimentos, o pró-vírus de replicação defeituosa BBAN contendo a integrina beta 2 dominante negativo (ItgB2DN) e a sequência completa (ItgB2FL) foram produzidos através de PCR, utilizando *Expand High Fidelity DNA Polimerase* (ROCHE). O cDNA utilizado foi sintetizado a partir de RNA total, extraído de canal AV de embriões de galinha HH20. Para a geração do dominante negativo, utilizamos *primers* que amplificam a porção extracelular e a transmembrana da integrina beta 2 (100-2286, NM_205251), porém sem a porção citoplasmática. A proteína sintetizada pela célula será expressa na sua superfície, entretanto não conseguirá realizar sua função, pois sem sua porção citoplasmática, ficaria impedida de realizar a sinalização bi-direcional. Para a construção da sequência completa da integrina beta 2, utilizamos *primers* que amplificam toda a sequência codificadora (100-2418, NM_205251).

³ <http://home.ncifcrf.gov/hivdrp/RCAS/overview.html>

	Foward	Reverse
ItgB2DN (~2186 pares de base)	5'-CACAGGATCCATGGGACCCCGTGACTGCTGC -3'	5'-CACAG GATCC GCGGCCGCTCACAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTCTGTCAAGAGCCGCCAGGTCAG -3'
ItgB2FL (~2318 pares de base)	5'-CATGCCATGGCCCGTGACTGCTGCCTCTGG -3'	5'-CGC GATCC TCATTGCCCATCAAACTGGGATT -3

Sequência **GGATCC** - sítio de restrição para a enzima *BamHI*
 Sequência CCATGG - sítio de restrição para a enzima *NcoI*

Em ambos os casos, os primers foram desenhados de forma a possibilitar a inserção de nossos produtos de PCR (insertos), em um vetor intermediário, ou plasmídeo adaptador, SaCla12Nco. Esse plasmídeo fornece para a sequência inserida o códon de inicialização (ATG), além de uma sequência aceptora de *Splice*, favorecendo a síntese de proteína. Tanto os insertos de integrina beta 2, quanto o plasmídeo adaptador – SaCla12Nco - foram tratados com enzimas de restrição (*NcoI* e *BamHI*, simultaneamente) e posteriormente purificados, seguindo os passos descritos anteriormente. Realizamos a reação de ligação ItgB2DN+SaCla12Nco e ItgB2FL+SaCla12Nco e procedemos à transformação das seguintes células: *One Shot® INV110 Competent Cells (Invitrogen)*. Realizamos os mesmos passos para a clonagem das sondas de hibridização *in situ* e posterior extração dos plasmídeos de nosso interesse da cultura bacteriana, utilizando *Qiagen Miniprep Kit*.

Após a clonagem das sequências de integrina beta 2 (ItgB2DN e ItgB2FL) no SaCla12Nco, enviamos nossas amostras para sequenciamento no *Genomic Analysis and Technology Core Facility* localizado no *Life Science* da Universidade do Arizona. O resultado obtido foi analisado e pareado com a sequência da integrina beta 2 (*GeneBank NM_205251*), a fim de se verificar a correta sequência dos nosso insertos. A partir do plasmídeo adaptador, e após tratamento com enzima de restrição *Clal*, as sequências foram ligadas ao pró-vírus de replicação defeituosa BBAN (previamente tratado com enzima de restrição *Clal*). Células foram transformadas e minipreps foram realizados, seguindo a metodologia descrita anteriormente. De posse do pró-vírus, realizamos a transfecção utilizando lipofectamina (*Invitrogen*) em uma linhagem de fibroblastos embrionários de galinha - DF-1. De acordo com o

protocolo de coleta utilizado (LEBER, YAMAGATA e SANES, 1996), o concentrado de vírus (5×10^8 – 8×10^8 IU/ml) pode ser coletado a partir do meio de cultura. Abaixo estão resumidamente descritos os passos do protocolo:

- Transfectamos de células DF-1 com BBAN somente, BBAN/ItgB2DN e BBAN/ItgB2FL;
- Posteriormente, realizamos co-transfecção com pENVA (contendo o gene para o envelope viral).
- Após confluência das células, substituímos o meio de cultura suplementado (meio 199 completo) por meio de cultura sem suplementos (soro e antibióticos) 24 horas antes da coleção viral;
- Após as 24 horas com meio de cultura sem suplementos, coletamos o meio e centrifugamos à 500g por 10 minutos para retirar debris celulares;
- Coletamos o sobrenadante e o transferimos para o tubo específico de ultracentrifuga;
- Centrifugamos suas amostras a 24.000 RPM por 4 h a 4°C ;
- Retiramos a maior parte do meio de cultura, deixando no fundo do tubo 200 μl . Utilizamos esse volume deixado no tubo para re-suspender o pellet de vírus com uma pipeta.
- Fizemos alíquotas do concentrado de vírus de 20 μl cada e congelamos imediatamente em freezer -80°C para experimentos futuros.

As células DF-1 produtoras de partículas virais podem ser mantidas em cultura e posteriormente congeladas como fonte de células produtoras de vírus.

Um passo importante para se ter idéia sobre a positividade da transfecção das células DF-1 é a realização de experimentos de RT-PCR e Western Blot, com o objetivo de detectar a síntese de RNAm e a produção de proteína viral por essas células. Utilizamos experimentos de RT-PCR para detectar a presença de RNAm para GAG (sequência codificadora do capsídeo e nucleoproteína) e ENV (sequência codificadora do envelope viral). Os pares de primers utilizados estão listados no quadro abaixo:

Gene	Foward	Reverse
GAG (465 bp)	5'-GTGATTTTCGTCCGCGTGTA-3'	5'-CCGCAATGATAGCAGGATGTG-3'
ENV (452 bp)	5'-AGATATTCTCAAGGTGCTT-3'	5'-GCCAACTTCCAATTAGGTCGC-3'

6.6 Western Blot

Para verificar se as células DF-1 em cultura e transfectadas com as construções virais (BBAN, dominante negativo, e sequência completa de integrina beta 2) estavam produzindo proteína viral, realizamos extração de proteína em cada amostra e posterior Western blot, seguindo o seguinte protocolo:

- Tratamos as células DF-1 em cultura com tripsina, centrifugamos e posteriormente adicionamos tampão RIPA contendo inibidores de proteinases. (Tris-HCl 50mM, pH 7,4; NP-40 1%; desoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150mM; EDTA 1mM; *Phenylmethylsulfonyl fluoride* 1mM; Na₃VO₄ 1mM; NaF mM; Aproptinina e Leupeptina a 1µg/ml) *overnight* a 4°C;
- Centrifugamos as amostras e coletamos o sobrenadante para a realização do experimento;
- Adicionamos Tampão de Amostra 2X (Tris 125mM pH 6,8; SDS 4%; Glicerol 10%; *Bromophenol Blue* 0,006%) em cada amostra experimental;
- Fervemos as amostras por 10 minutos e posteriormente as colocamos em gelo;
- Aplicamos as amostras em gel de poliacrilamida 10% imerso em tampão de corrida. O padrão de peso molecular (Biorad, 161-0324 *Kaleidoscope Prestained Standards*) foi adicionado em uma das colunas (configuração de corrida 175V, 300mA);
- Transferimos para a membrana de nitrocelulose em tampão de transferência a 100V, 300mA por 1 hora;
- Bloqueamos a membrana de nitrocelulose em solução de 5% de leite em pó em TBS-T (*Tris buffered saline* + Tween 20 0,1%) a 4°C *overnight*;
- Incubamos com anticorpo primário por 2h à temperatura ambiente (anticorpo primário AMV-3C2, *Hybridoma Bank*);
- Lavamos em TBS-T – 3 lavagens de 10 minutos cada;
- Incubamos com anticorpo secundário por 1 hora à temperatura ambiente (Chemicon - *Sheep anti-Mouse Ig, HRP Conjugated AP300P*);
- Lavamos em TBS-T – 3 lavagens de 10 minutos;
- Lavamos em TBS – 2 lavagens de 10 minutos e posterior revelação por Quimioluminescência.

Como controle da técnica e da transfecção, realizamos os mesmos passos em amostras de DF-1 que não foram submetidas à transfecção. O anticorpo monoclonal utilizado para detecção da proteína viral foi o camundongo anti-GAG de galinha (AMV-3C2, *Developmental Studies Hybridoma Bank*, diluição 1:1).

Realizamos também procedimentos de Western Blot em amostras de proteína extraídas de embriões de camundongo e galinha. As amostras de camundongo foram as seguintes: canal AV, ventrículo e *tronco arterioso* do estágio E11,5. Como

controle positivo, coletamos amostra de timo em camundongos adultos. As amostras de embrião de galinha foram as seguintes: canal AV, ventrículo e *tronco arterioso* do estágio HH20 (EMT ativa). O controle positivo utilizado foi o extrato protéico de sangue embrionário do mesmo estágio.

Durante o processamento do material para a extração protéica, os embriões foram dissecados em PBS resfriado mantido em gelo e, durante a dissecação, tanto o canal AV, quanto o ventrículo e o *tronco arterioso* foram abertos e lavados com PBS, a fim de se retirarem as células sanguíneas que estariam aprisionadas no interior do tubo cardíaco. Após a coleta do material, os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo descrito acima. Nas amostras coletadas, utilizamos anticorpos policlonais para detecção da integrina beta 2 (sc-6623 e sc-6625, *Santa Cruz Biotechnology, INC*) e integrina beta 1 (sc-8978, *Santa Cruz Biotechnology, INC*).

6.7 Cultura de embriões e microinjeção

Para a realização da cultura de embrião inteiro utilizamos o método descrito por Chapman e outros, (2001), também conhecido como *Early Chick* (EC) ou *Easy culture*. Através desse método, os embriões de galinha, as quais se encontravam em estágios bem iniciais do desenvolvimento, puderam ser mantidos em cultura para experimentos posteriores. Os embriões foram coletados com o uso de um papel filtro, contendo um orifício central que manteve sob tensão os embriões que, posteriormente, foram transferidos para placas de cultura contendo ágar/albumina. A seguir, os passos utilizados para a realização da cultura de EC:

- Quebramos o ovo em uma placa de petri não menor que 10 centímetros e localizamos o embrião;
- Posicionamos um pedaço de papel filtro contendo a abertura central sobre o embrião, de forma que o embrião se situasse no furo central. O papel filtro absorveria imediatamente o líquido da membrana vitelínea, fazendo com que o embrião ficasse preso ao papel;
- Recortamos o diâmetro das bordas do papel filtro e, utilizando uma pinça, transferimos o papel filtro contendo o embrião para a placa de ágar/albumina. O embrião foi posicionado ventralmente para que se tivesse acesso ao coração;

Para os experimentos *in vitro* e posterior análise da função da integrina beta 2 na transformação epitélio-mesenquimal (EMT), embriões em estágio de desenvolvimento HH10 e HH11 foram coletados. Nesses estágios, encontramos o coração em sua forma tubular, situado ventralmente ao embrião (MARTINSEN, 2005).

Para realizar a microinjeção, utilizamos uma lupa estereoscópica juntamente com um micromanipulador (Leica) ligado a um controle. O concentrado de vírus (BBAN, BBAN/ItgB2DN e BBAN/ItgB2FL) foi injetado diretamente no interior do coração tubular com o uso de um microinjetor. Após a microinjeção, os embriões foram mantidos em cultura por 24 horas à temperatura de 37⁰C, até que atingissem estágio de desenvolvimento HH15. A figura 3 mostra os passos principais da coleta e microinjecção dos embriões para a realização dos experimentos *in vitro*.

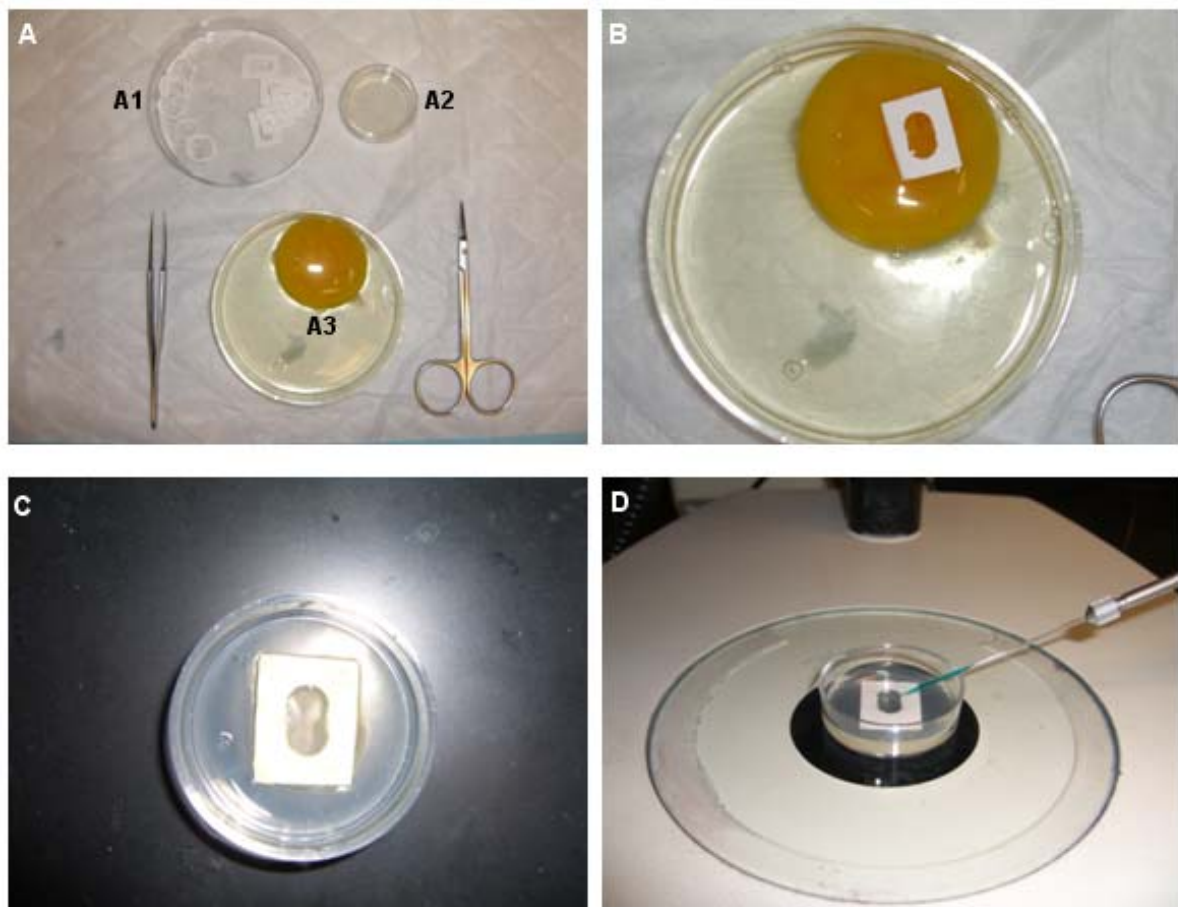


Figura 3 – Coleta, microinjeção e cultura de embriões in vitro

A – Material básico utilizado para a coleta de embrião – Papel filtro com orifício central (A1), placa de ágar/albumina (A2), pinça, tesoura e embrião no estágio desejado (A3).

B – Posicionamento do papel filtro contendo embrião no orifício central.

C – Transferência do embrião para a placa de ágar/albumina.

D – Microinjeção do tubo cardíaco

6.8 Cultura de Canal Átrio-ventricular em Gel de Colágeno

A fim de pesquisarmos qual o efeito das construções virais sobre a EMT, realizamos a cultura de canal AV em gel de colágeno tridimensional. Para uma placa de cultura com 4 poços preparamos:

Tubo A	Tubo B
500 μ l de colágeno de cauda de rato	150 μ l de NaHCO ₃ 2,2%
500 μ l de água estéril	150 μ l de Meio 199 10X

- Misturamos o conteúdo do tubo A no tubo B com o auxílio da pipeta, até conseguirmos uma cor homogênea;
- Pipetamos 300 μ l em cada um dos poços;
- Colocamos a placa de cultura na incubadora à 37^oC, até que o gel polimerizasse;
- Após a polimerização, adicionamos meio 199 completo (ITS 1% - 5 μ g/ml de insulina, 5 μ g/ml de transferrina e 5ng/ml de selênio), estreptomicina/penicilina 1%, soro de galinha 1%) em cada poço e deixamos equilibrar por 30-60 minutos, antes de colocar os explantes de canal AV.

Com o gel de colágeno preparado, realizamos a dissecação dos embriões que haviam sido injetados com as construções virais no dia anterior (24 horas após a microinjeção – estágio atual HH15). Os embriões foram dissecados com o uso de pinças de dissecação em solução Tyrode e os canais AV posicionados em gel de colágeno. Os explantes em cultura foram mantidos em incubadora por 24 horas a 37^oC. Durante esse período, as células endoteliais ativadas do explante migraram sobre o gel, mantendo seu fenótipo endotelial e algumas células penetraram no interior do gel, adquirindo fenótipo mesenquimal. Essa metodologia mimetiza, *in vitro*, a EMT que ocorre nos coxins cardíacos do coração em desenvolvimento (RUNYAN e MARKWALD, 1983; MARKWALD *et al.*, 1984).

Para cada tratamento, BBAN, BBAN/ItgB2DN e BBAN/ItgB2FL, foi coletado material para a realização de PCRq, análise qualitativa e quantitativa da migração celular que ocorre durante a EMT nas culturas de canal AV, contagem de células mesenquimais em cultura, análise de proliferação e apoptose celular.

6.9 Análise do efeito das construções virais na EMT

Posteriormente às microinjecções e após coleta do canal AV e cultura dos mesmos em gel de colágeno, realizamos lavagem em PBS 1X e fixação em PFA 4% por 25 minutos à temperatura ambiente.

O efeito das construções virais microinjetadas sobre o crescimento endotelial que ocorre na superfície do gel de colágeno em culturas de canal AV foi analisado qualitativamente e quantitativamente. Para proceder a esta análise, medimos a área total do crescimento endotelial dividido pela área total do explante, utilizando o programa *UTHSCSA Image Tool 3.0*. A razão da utilização desta medida é que ela nos dá informações a respeito do efeito dos diferentes tipos de tratamentos sobre a migração celular que ocorre na superfície do gel de colágeno em culturas de canal AV. Um número mínimo de 6 explantes por tratamento foi analisado. A figura 4 abaixo demonstra como foi realizada essa medida.

Procedemos a uma análise quantitativa para detectar o efeito dos tratamentos virais sobre a EMT em cultura de coxins cardíacos em gel de colágeno. Foram contadas células ativadas, definidas como células isoladas encontradas na superfície do gel, e mesenquimais, definidas como células inteiramente no interior da matriz do gel. Um número mínimo de 18 explantes por tratamento foi analisado utilizando *Hoffman Modulation Contrast Optics*.

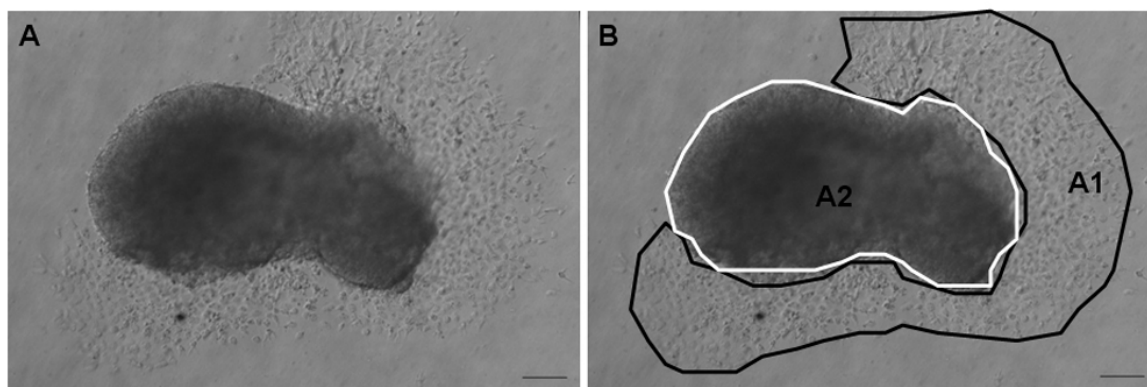


Figura 4 – Metodologia de ensaio de migração celular

A e B – mesma imagem – A1- área medida do crescimento endotelial – A2 área medida do explante. Razão = $A1/A2$. Barra – $100\mu\text{M}$.

6.10 Análise do Índice de Proliferação *in vitro*

A análise dos índices de proliferação celular, em culturas de explantes de canal AV dissecados de embriões de galinha, previamente submetidos aos tratamentos virais (BBAN, BBAN/ItgB2DN e BBAN/ItgB2FL), foi realizada com o uso de BrdU (bromodeoxiuridina). O BrdU incorpora-se ao DNA da célula em mitose, substituindo a timidina. Desta forma, é possível detectar a proliferação de células em tecidos vivos. Como descrito em seções anteriores, embriões de galinha no estágio HH10 e HH11 foram previamente microinjetados com as construções virais. Vinte e quatro (24) horas após a microinjeção, os embriões em cultura atingiram o estágio HH15 e, desses embriões, dissecamos o canal AV e colocamos em cultura de gel de colágeno.

O objetivo desse experimento em nosso trabalho foi avaliar se os diferentes tipos de tratamentos virais estariam afetando os níveis de proliferação celular e, por consequência, a transformação epitélio-mesenquimal (EMT) que ocorre nos explantes de canal AV, em cultura de gel de colágeno. Os géis contendo os explantes tratados foram incubados com BrdU ($100\mu\text{M}$ em meio completo) (BD Biosciences), por 4 horas (37°C , $5\% \text{CO}_2$). Os géis foram posteriormente lavados em PBS 1X e fixados em PFA 4% por 25 minutos, à temperatura ambiente.

A detecção da incorporação de BrdU foi realizada de acordo com o seguinte protocolo de imunofluorescência indireta:

- Lavamos em PBS 1X – 6X de 5 minutos - TA;
- Realizamos permeabilização com Triton X-100 a 0,1% em PBS - 15 minutos - TA;
- Adicionamos de DNase (0,1 U/ μ l) em tampão - 30 minutos - 37⁰C;
- Lavamos em PBS 1X – 4X de 5 minutos - TA;
- Incubamos em solução de bloqueio (BSA 1%/ Triton X-100 0,1% em PBS) – 1 hora – TA;
- Incubamos as amostras com anticorpo primário de camundongo contra BRDU - 2 horas – TA;
- Realizamos controle do primário – incubação com solução de bloqueio diluída 10X;
- Lavamos em Triton X-100 0,1% em PBS 1X – 5X de 10 minutos – TA
- Incubamos com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com Cy3 - 2 horas - TA;
- Lavamos em Triton X-100 0,1% em PBS 1X – 5X de 10 minutos;
- Lavamos em PBS 1X – 3X de 5 minutos;
- Adicionamos Dapi (0,1 μ g/ml) em PBS 1X - 20 minutos - TA;
- Lavamos em PBS – 3X de 5 minutos;
- Montamos com lamínulas: os géis foram transferidos para lâminas de microscopia e a solução *Prolong Gold (Molecular Probes)* foi usada para a montagem.

Os géis foram analisados em *DeltaVision Deconvolution Microscope* e a razão entre células positivas para BrdU/células positivas para Dapi foi obtida em no mínimo 6 explantes por tratamento. Os resultados foram analisados pelo *test t de Student*.

6.11 Análise do Índice de Apoptose *in vitro*

A análise de apoptose celular em culturas de canais AV, submetidos aos tratamentos virais, foi realizada pela coloração por TUNEL (*TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling*), utilizando o kit *DeadEnd Fluorometric TUNEL System* (Promega). Esse kit é capaz de detectar o número de células apoptóticas com DNA fragmentado pela incorporação catalítica de 12-dUTP(a) conjugado com fluoresceína.

Seguindo os mesmos passos descritos para a realização da Análise do Índice de Proliferação *in vitro*, os géis foram fixados em PFA 4% por 25 minutos à temperatura ambiente e sob o protocolo a seguir:

- Lavamos em PBS 1X – 4X de 5 minutos;
- Realizamos permeabilização com Triton X-100 0,2% em PBS - 15 minutos – TA

- Lavamos em PBS 1X – 2X de 5 minutos; TA;
- Incubamos com Tampão de Equilíbrio (cacodilato de potássio 200nM; Tris-HCl 25 mM; DTT 0,2mM; BSA 0,25mg/ml; cloreto de cobalto 2,5 mM) - 10 minutos – TA;
- Realizamos controle positivo: incubação com DNase I (10U/mL) em tampão – 10 minutos – TA;
- Incubamos com tampão de incubação rTdT (tampão de equilíbrio + mistura de nucleotídeos + enzima rTdT) – 1 hora – 37⁰C;
- Realizamos controle negativo: incubação com tampão de equilíbrio + mistura de nucleotídeos – sem enzima rTdT;
- Lavamos em SSC 2 lavagens para término da reação – 2 lavagens de 15 minutos – TA;
- Lavamos em PBS 1 lavagem – 4 lavagens de 5 minutos – TA;
- Incubamos com Dapi (0,1 µg/ml) - 20 minutos - TA;
- Lavamos em PBS 1 lavagem – 4 lavagens de 5 minutos – TA;
- Montamos com lamínulas, seguindo o método descrito anteriormente.

Os géis foram analisados em *DeltaVision Deconvolution Microscope*; a razão entre células positivas para TUNEL/células positivas para Dapi foi obtida em no mínimo 6 explantes por tratamento. Os resultados foram analisados pelo *test t de Student*.

6.12 Estudos *in vivo* do efeito das construções virais

Com o objetivo de estudar, em longo prazo, o efeito da expressão da integrina beta 2 (ItgB2DN e ItgB2FL), durante o desenvolvimento das válvulas cardíacas, foram realizadas microinjeções *in ovo* das construções virais (BBAN, BBAN/ItgB2DN e BBAN/ItgB2FL). Esta metodologia teve de ser aplicada, pois, de acordo com Darnell e Schoenwolf (2000), embriões de galinha não se desenvolvem em placas de ágar/albumina, após o estágio HH20. No nosso estudo, incubamos ovos de galinha da raça LegHorn branca, como descrito anteriormente, e os deixamos desenvolver até o estágio HH17. Abrimos uma janela de acesso no ovo e realizamos as microinjeções das construções virais no lúmen do tubo cardíaco (PERSON *et al.*, 2005a, KORN e CRAMER, 2007). Após as injeções, as janelas nos ovos foram fechadas com parafilme e os ovos incubados novamente a 38⁰C., até que eles atingissem os estágios HH25, HH28 e HH33. Após atingirem os estágios selecionados, os embriões foram fixados em mistura de metanol/DMSO (20%/80%,

respectivamente), incluídos em blocos de paraplast e seccionados para realização de coloração de tricrômico de Masson. A figura 5, a seguir, demonstra os passos para a realização das injeções das construções virais *in ovo*.

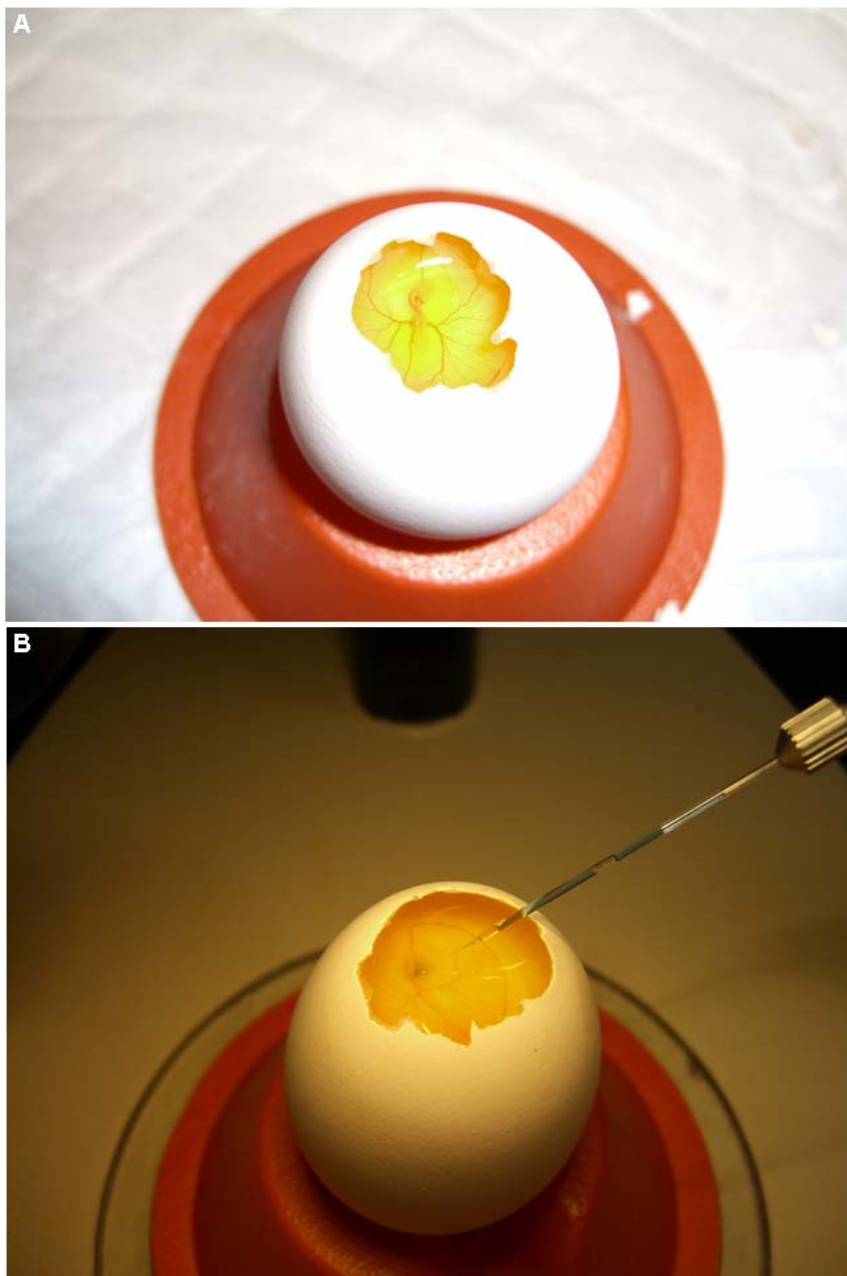


Figura 5 – Cultura de embriões e microinjeção *in vivo*

A – Abertura da janela para acesso ao embrião – Observe o embrião no interior do ovo.

B – Microinjeção do tubo cardíaco com o uso de micromanipulador e microinjetor. Observe a coloração azul no embrião – região de injeção das construções virais – tubo cardíaco.

6.13 Imunofluorescência Indireta em tecidos embrionários de camundongo e galinha

No mestrado, foram realizados experimentos que demonstraram que a integrina beta 2 é expressa pelas células dos coxins cardíacos durante a EMT. Durante o doutorado, os experimentos visaram a investigar quais subunidades alfa, que formam heterodímero com a integrina beta 2, também estariam expressas durante as fases iniciais da EMT.

Desta forma, coletamos embriões de camundongos em estágios específicos de desenvolvimento E11,5 e E13,5 que foram dissecados e fixados em metanol/DMSO (80%/20%, respectivamente), armazenados a -80°C , por 7 dias e processados para corte em criostato. Como controle positivo, o timo de camundongos adultos foi coletado e o tecido processado de forma idêntica ao embrionário. Os tecidos foram seccionados e posicionados em lâminas pré-tratadas com solução de silano 2% em acetona.

O protocolo utilizado para a realização da técnica da imunofluorescência indireta foi:

- Hidratação das secções em água destilada (10 minutos) e posteriormente em PBS (5 minutos);
- Bloqueio em solução de BSA 1% (BSA)/0.1% Tween 20/PBS – 1 hora – TA;
- Incubação com anticorpo primário em solução de BSA 0,1%/Tween 20 0,01% em PBS - *overnight* a 4°C em câmara úmida;
- Lavagem em PBS 1 vez – 4 vezes de 5 minutos – TA;
- Incubação com anticorpo secundário conjugado com o fluorocromo em solução 0,1%/Tween 20 0,01% em PBS – 1 hora – TA em câmara úmida;
- Lavagem em PBS 1 vez – 4 vezes de 5 minutos – TA;
- Montagem das lâminas em Solução de glicerina 90% / TRIS 1M 10% pH 9,0.

Para esse experimento, utilizamos anticorpos policlonais que reconhecem a integrina beta 2 (sc-6623 e sc-6625, *Santa Cruz Biotechnology, INC*, diluição 1:200) e integrina beta 1 (sc-8978, *Santa Cruz Biotechnology, INC*, diluição 1:200), que é reconhecidamente expressa durante a cardiogênese (CARVER *et al.*, 1994; HIERCK *et al.*, 1996; ROSS e BORG, 2001; SENGBUSCH *et al.*, 2002) Com relação às subunidades alfa, que formam heterodímero com a integrina beta 2, utilizamos anticorpos disponíveis comercialmente e que possuíam especificidade em tecido de camundongo. Portanto, das quatro integrinas alfa que se associam com a integrina

beta 2, utilizamos anticorpos policlonais anti-alfa L (sc-15327, diluição 1:200) e anti-alfa M (sc-6614, diluição 1:600) e anti-alfa X (sc-26692, diluição 1:400).

Tecidos embrionários de galinha também foram submetidos à técnica de imunofluorescência indireta, seguindo o protocolo descrito anteriormente. Os estágios coletados foram HH17 e HH20 (HAMBUGUER e HAMILTON, 1951), ou seja, estágio inicial da EMT e durante a EMT, respectivamente. Nesses tecidos, utilizamos anticorpos para a detecção de integrina beta 2 e de integrina beta 1 descritos anteriormente. Os cortes submetidos à técnica de imunofluorescência foram analisados em microscopia confocal (LSM Zeiss 510Meta). Anticorpos secundários Cy3 burro anti-cabra, Cy3 cabra anti-coelho e Cy5 burro anti-cabra (*Jackson Laboratory*) foram utilizados nos experimentos de imunofluorescência indireta.

7 RESULTADOS

7.1 Detecção e quantificação de integrina beta 2 durante a cardiogênese em embriões de galinha

Os resultados anteriores obtidos por imunofluorescência indireta e microscopia confocal indicaram claramente que a integrina beta 2 é expressa pelas células endoteliais, mesenquimais e pelas células do miocárdio, durante o desenvolvimento cardíaco em embriões de camundongo, especialmente durante as fases iniciais do desenvolvimento das válvulas cardíacas (OLIVEIRA e KITTEN, 2004). Embora a expressão da integrina beta 2 seja considerada restrita a leucócitos, estudos recentes têm demonstrado que ela também é expressa em outros tipos celulares (LANGEGGEN *et al.*, 20002, KARMAKAR e MUKHERJEE, 2003).

A questão sobre a real especificidade dos anticorpos sempre suscitou dúvidas. Por isso, neste trabalho, foi necessário o emprego de outras técnicas para se comprovar a expressão da integrina beta 2, durante a formação cardíaca.

Dados obtidos através de PCRsq confirmaram que, a partir das amostras de extrato total de RNA de coração embrionário de galinha, a integrina beta 2 podia ser detectada (figura 6). Os dados sugeriam ainda um provável aumento na quantidade de RNAm de integrina beta 2 durante os estágios de desenvolvimento cardíaco selecionados. A banda observada no gel de agarose apresentou-se fraca em estágio anterior a EMT (HH14) e aumentou de intensidade durante a EMT (HH17). A partir desse estágio embrionário, os níveis de intensidade das bandas no gel de agarose apresentaram-se semelhantes (HH20, HH25 e HH28). PCRsq para a subunidade ribossomal 18S revelaram bandas em gel com a mesma intensidade nos estágios pesquisados, indicando que a quantidade de RNA total adicionado no início da reação de PCRsq era equivalente entre as amostras. A detecção de VE-caderina pôde ser observada em todos os estágios analisados, o que demonstrou a presença de RNAm de origem endotelial em nossas amostras (figura 6A).

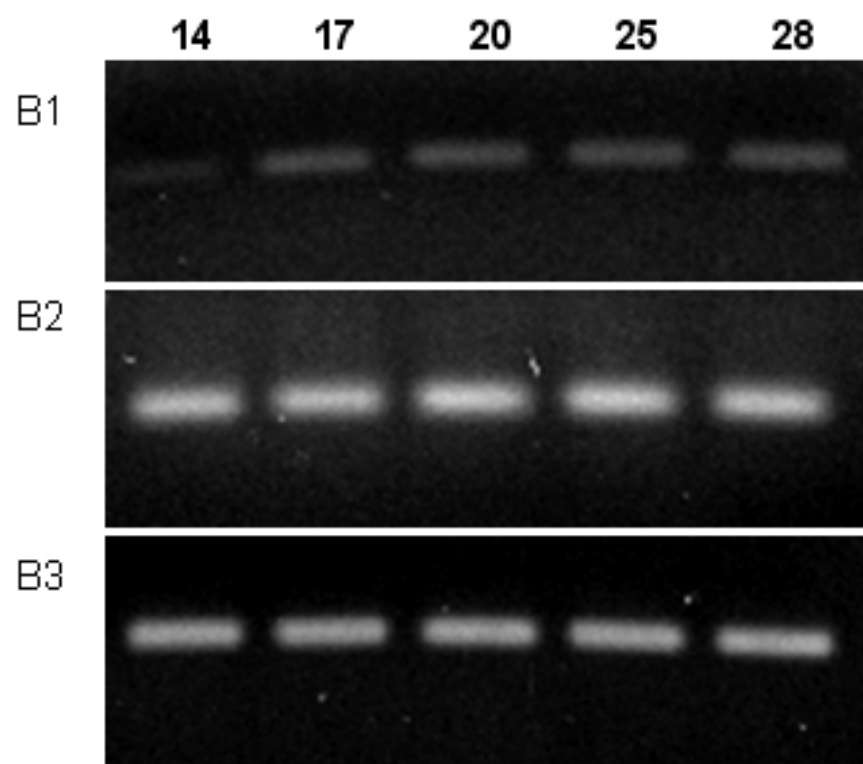
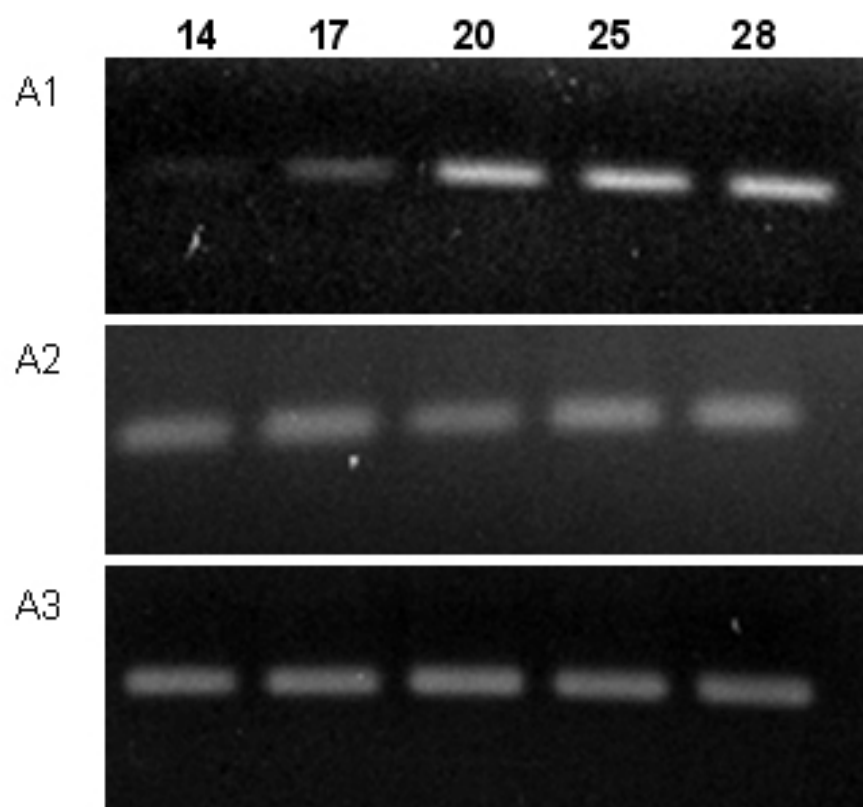
As amostras de RNA total extraído de canais AV de embriões de galinha apresentaram dados semelhantes às amostras de RNA total extraído de coração. No estágio anterior à EMT (AV HH14), a intensidade da banda em gel de agarose apresentou-se fraca, aumentando de intensidade durante os estágios iniciais da

EMT (AV HH17). Esse último estágio, entretanto, já não apresentou intensidade diferente dos estágios posteriores (AV HH20, HH25 e HH28), tornando-se difícil relatar se houve um aumento da quantidade de RNAm de integrina beta 2. Da mesma forma que nas amostras de RNA total de coração, a imagem do gel de agarose para a subunidade ribossomal 18S apresentou-se semelhante entre os estágios. Para o gene de VE-caderina, a imagem no gel de agarose demonstrou a detecção de conteúdo de RNAm originado em células endoteliais (figura 6B). As reações de PCRsq, às quais não foram adicionadas cDNA, ou enzima ou primers, não mostraram nenhuma banda em gel de agarose. (dados não mostrados).

Figura 6 - PCRsq para integrina beta 2, subunidade ribossomal 18S e VE-Caderina.

Os números acima de cada imagem (A e B) representam o estágio embrionário de galinha (HH14, HH17, HH20, HH25, HH28)

- A – PCRsq em amostras de RNA total extraído de coração embrionário de galinha.
 - A1 – PCRsq para integrina beta 2.
 - A2 – PCRsq para subunidade ribossomal 18S.
 - A3 – PCRsq para VE-Caderina.
- B – PCRsq em amostras de RNA total extraído de canal AV de embriões de galinha.
 - B1 – PCRsq para integrina beta 2.
 - B2 – PCRsq para subunidade ribossomal 18S.
 - B3 – PCRsq para VE-Caderina.



Diante dos dados observados no PCRsq e de um provável aumento de RNAm de integrina beta 2 nos estágios estudados durante o desenvolvimento embrionário de galinha, realizamos a técnica de PCRq. Após a etapa de transcriptase reversa, e seguindo o protocolo descrito na metodologia, realizamos a padronização das nossas reações, a partir quantificação de cDNA adicionada em cada reação de PCRq.

Os resultados obtidos demonstraram que, nas amostras de RNA total extraído de coração embrionário de galinha, os níveis RNAm de integrina beta 2 apresentaram discreto aumento entre os estágios HH14 e HH17. Após esses estágios iniciais, a quantidade de RNAm de integrina beta 2 sofreu um aumento de aproximadamente 9 vezes (HH20). Em estágios subsequentes, houve um aumento aproximado de 11 e 13 vezes na quantidade de RNAm de integrina beta 2 (HH25 e HH28 respectivamente). A quantificação dos níveis de RNAm de integrina beta 2 nos estágios HH17, HH20, HH25 e HH28 foram relativos aos níveis encontrados no estágio HH14 (gráfico 1).

Ao realizarmos os experimentos em amostras de canal AV, observamos que os níveis de RNAm da integrina beta 2 aumentaram significativamente nos estágios analisados (Gráfico 02). Os dados revelaram um aumento de aproximadamente 5.8 vezes nos níveis de integrina beta 2, logo no início da EMT, da amostra AV HH14 para a amostra AV HH17. Observamos, também, que esse aumento persistiu nos estágios subsequentes. Aumentos de aproximadamente 10, 12 e 13 vezes na quantidade de RNAm da integrina beta 2 (HH20, HH25 e HH28, respectivamente) foram observados, quando comparados ao estágio inicial (HH14). Estes dados, além de sustentarem a hipótese da presença da integrina beta 2 durante a cardiogênese, reforçavam os dados obtidos anteriormente pela técnica do PCRsq. É interessante lembrar que o aumento observado nos experimentos nos diversos estágios selecionados coincide com as etapas da EMT e do aumento do número de células mesenquimais nos coxins cardíacos.

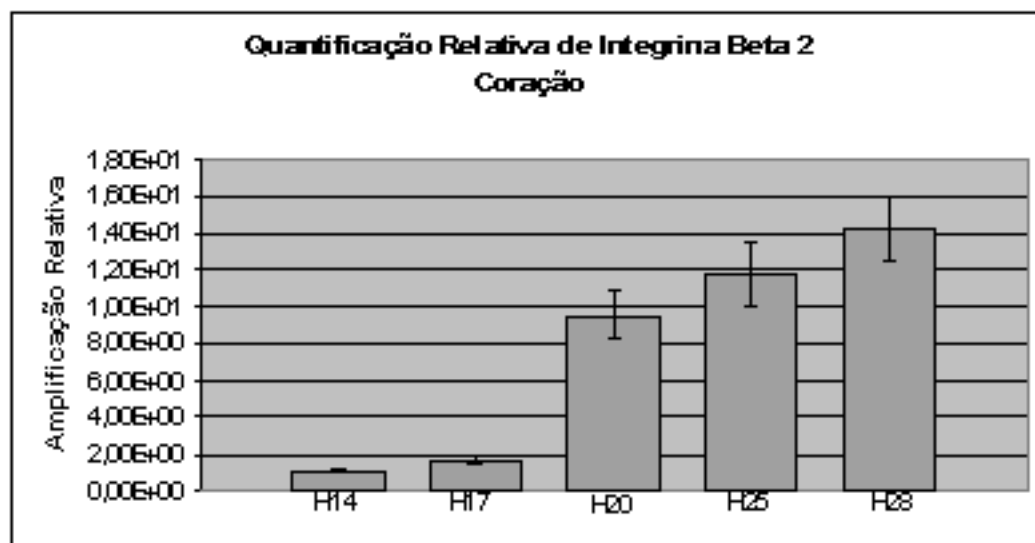


Gráfico 1 – Quantificação Relativa de Integrina Beta 2 em coração através de PCRq

Nível de RNAm de integrina beta 2 nos estágios selecionados (H14, H17, H20, H25 e H28). O eixo y representa a quantificação relativa em relação ao estágio H14. Análise estatística (teste *t* Student) mostram que os níveis de RNAm de integrina beta 2 dos estágios H17, H20, H25 e H28 são diferentes dos níveis encontrados no estágio H14 ($p \leq 0,05$). Barras – erro padrão.

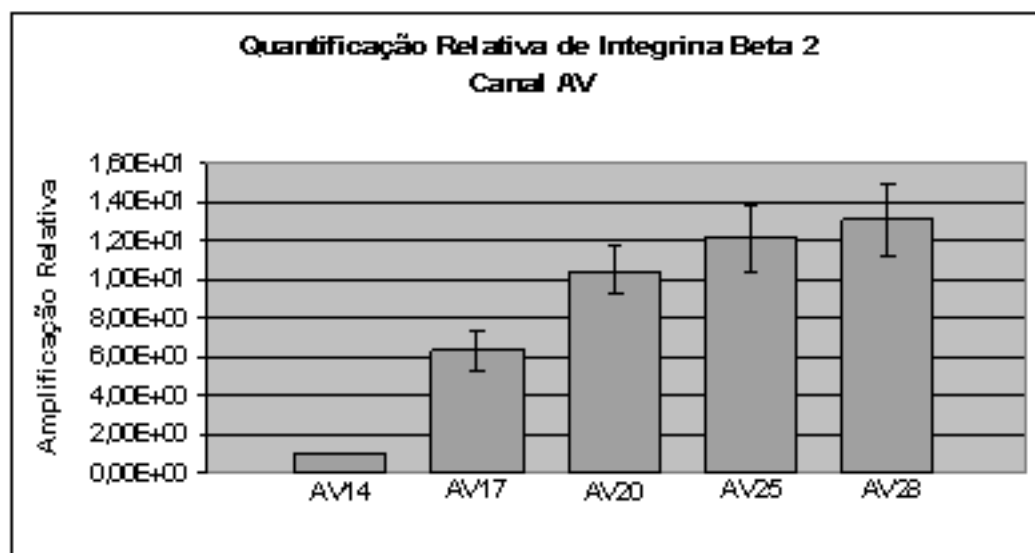


Gráfico 2 – Quantificação Relativa de Integrina Beta 2 em canal AV através de PCRq

Nível de RNAm de integrina beta 2 nos estágios selecionados (AV14, AV17, AV20, AV25 e AV28). O eixo y representa a quantificação relativa em relação ao estágio AV14. Análise estatística (teste *t* Student) mostram que os níveis de RNAm de integrina beta 2 dos estágios AV17, AV20, AV25 e AV28 são diferentes dos níveis encontrados no estágio AV14 ($p \leq 0,05$). Barras – erro padrão.

Repetimos os experimentos de PCRq para integrina beta 2 em três estágios de desenvolvimento embrionário, a partir de amostras coletadas de coração embrionário de galinha - HH14, HH17 e HH20. Paralelamente, realizamos experimentos de PCRq para a subunidade ribossomal 18S nos mesmos estágios de desenvolvimento. Os dados obtidos mostraram aumento da quantidade de RNAm da integrina beta 2 nas amostras de coração, seguindo o mesmo padrão obtido em experimentos anteriormente descritos. Pudemos observar que os níveis para a subunidade ribossomal 18S mostraram-se constantes entre as amostras (Gráfico 3).

Os dados obtidos nos experimentos realizados com o extrato total de RNA de canais AV também seguiram o mesmo padrão encontrado em experimentos anteriores. Observamos que durante a EMT, a quantidade de RNAm da integrina beta 2 aumentou na ordem de 6 vezes, no estágio AV17 e de 8.8 vezes no estágio AV20, quando comparados aos níveis de RNAm para integrina beta nos estágio AV14. A quantificação dos níveis da subunidade ribossomal 18S mostrou-se constante entre as amostras de canais AV (Gráfico 4). Esses dados reforçaram os dados anteriormente obtidos e demonstraram que a realização de PCRq, através da medida de cDNA, pode ser empregada quando pesquisamos genes durante as etapas de desenvolvimento embrionário.

Realizamos PCRq em amostras de RNA total extraído de ventrículos nos estágios V14, V17 e V20 (Gráfico 5). Os dados nos mostraram que existe um aumento de 1.8 e 8 vezes na quantidade de RNAm de integrina beta 2 (estágios V17 e V20, respectivamente), em comparação aos níveis encontrados no estágio V14. Os dados do PCRq para a subunidade ribossomal 18S sugeriram que a quantidade de cDNA adicionada por amostra foi equivalente.

Os dados até então mostrados confirmam a presença de RNAm de integrina beta 2, durante a cardiogênese nos estágios selecionados (HH14, HH17, HH20, HH25 e HH28). Mostram também que a quantidade de RNAm de integrina beta 2 aumenta durante o período da EMT. Este dado é mais bem observado nos experimentos realizados com amostras de canal AV. Após analisarmos o experimento de PCRq em ventrículos paralelamente aos de canal AV, podemos sugerir que parte do aumento de RNAm de integrina beta 2 está relacionada ao surgimento das células mesenquimais nos coxins cardíacos durante a EMT.

Gráfico 3 – Quantificação Relativa de RNA em amostras de coração através de PCRq

Nível de RNAm de integrina beta 2 e subunidade ribossomal 18S nos estágios selecionados (HH14, HH17 e HH20). O eixo y representa a quantificação relativa em relação ao estágio HH14, tanto para os níveis de integrina beta 2, quanto para os de subunidade ribossomal 18S.

O Gráfico mostra o aumento dos níveis de RNAm de integrina beta 2 (B2) entre os estágios selecionados. Com relação aos níveis de RNA da subunidade ribossomal 18S (18S), estes se apresentam constantes entre as amostras. Barras – erro padrão.

Gráfico 4 – Quantificação Relativa de RNA em amostras de canal AV através de PCRq

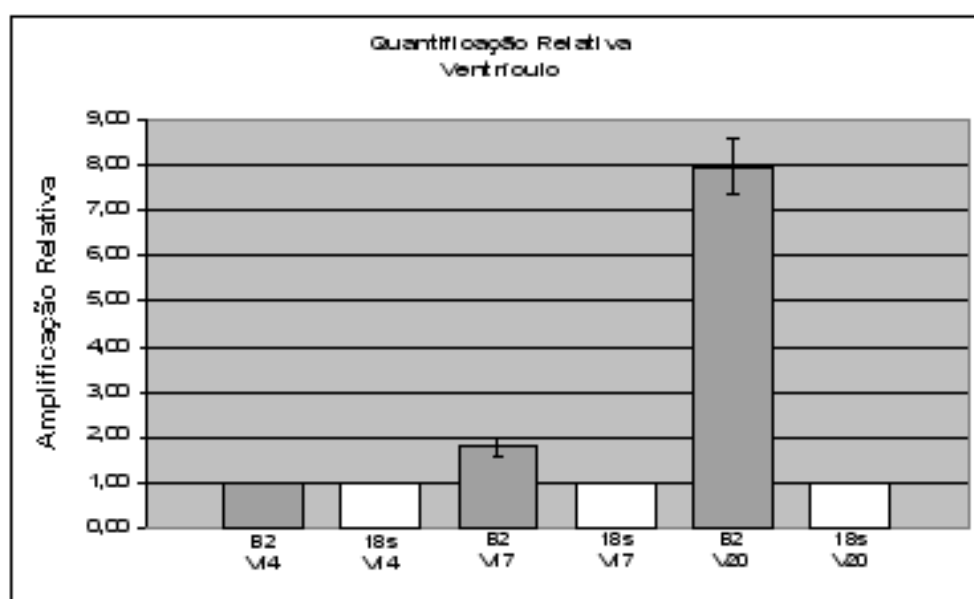
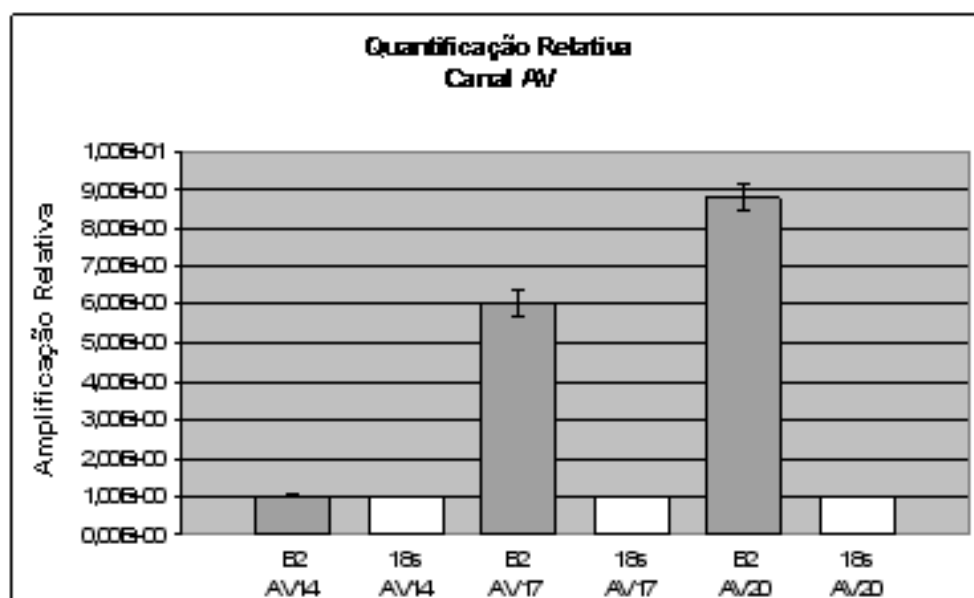
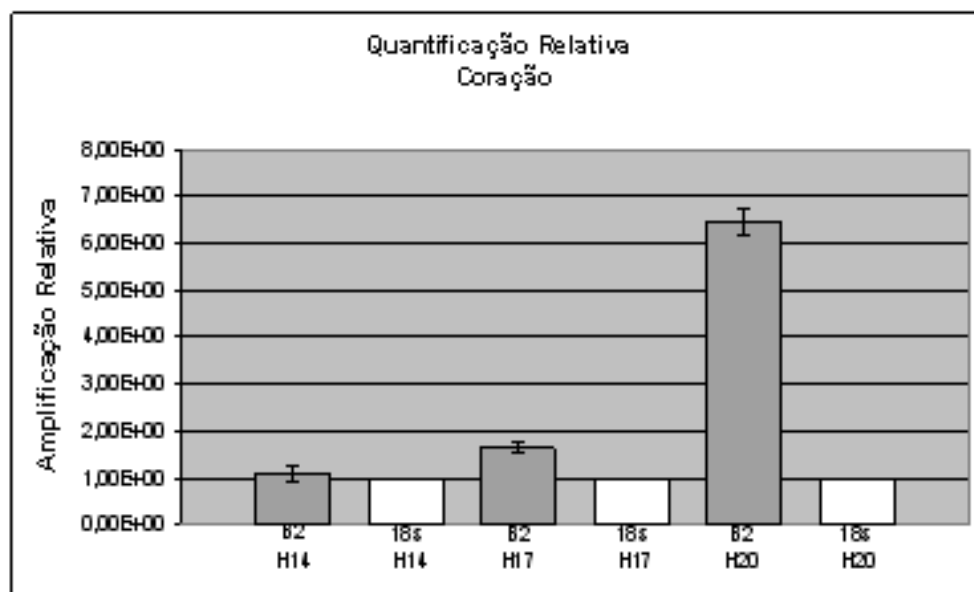
Nível de RNAm de integrina beta 2 e subunidade ribossomal 18S nas amostras selecionadas (AV14, AV17 e AV20). O eixo y representa a quantificação relativa em relação à amostra AV14, tanto para os níveis de integrina beta 2, quanto para os de subunidade ribossomal 18S.

Observam-se níveis aumentados de RNAm de integrina beta 2 (B2) nas amostras, em relação a AV14 e níveis constantes de RNA da subunidade ribossomal 18S (18S). Barras – erro padrão.

Gráfico 5 – Quantificação Relativa de RNA em amostras de ventrículo através de PCRq

Nível de RNAm de integrina beta 2 (B2) e subunidade ribossomal 18S (18S) nas amostras selecionadas (V14, V17 e V20). O eixo y representa a quantificação relativa em relação ao estágio HH14, tanto para os níveis de integrina beta 2, quanto para os de subunidade ribossomal 18S.

Observa-se aumento dos níveis de RNAm de integrina beta 2 nas amostras de ventrículo e constância nos níveis da subunidade ribossomal 18S. Barras – erro padrão.



Após a detecção da integrina beta 2 com o emprego de PCRs_q e posterior quantificação através de PCR_q, realizamos os experimentos que nos forneceriam dados relativos à distribuição tecidual do RNAm no embrião em desenvolvimento. Empregamos para isso a técnica da hibridização *in situ*, realizada tanto em embrião inteiro quanto em secções.

Como em toda técnica utilizada, os controles que empregamos nos ajudaram a interpretar os resultados obtidos. Como controle positivo dos experimentos de hibridização *in situ* em embrião inteiro, utilizamos sondas antisenso para Has2. Has2 é expressa em estágios iniciais de formação do tubo cardíaco, além de ser importante para o processo de EMT que ocorre nos coxins cardíacos do canal AV (CAMENISCH *et al.*, 2000). As imagens obtidas desse experimento nos mostraram que a técnica empregada fora realizada corretamente; também observamos marcação positiva para Has2 no coração em desenvolvimento HH10 (figura 7A). Paralelo ao experimento com Has2, e utilizando o mesmo estágio de desenvolvimento, realizamos a técnica da hibridização para integrina beta 2 e observamos marcação positiva com o emprego da sonda antisenso nas camadas externas e internas do tubo cardíaco, miocárdio e endocárdio respectivamente (figura 7B). Durante o estágio de desenvolvimento HH14, observamos uma marcação no miocárdio e no endocárdio do tubo cardíaco (figura 7C).

Como controle negativo da técnica de hibridização *in situ*, realizamos experimentos simultâneos com o uso de sondas senso. As imagens obtidas mostraram embriões sem coloração evidente, evidenciando, assim, a especificidade de nossas sondas (figura 7D). Em estágio mais avançado da EMT (estágio HH20), a coloração se tornou mais forte, podendo ser observada facilmente no ventrículo, nos coxins do *tronco arterioso* e do canal AV (figura 8A e B, respectivamente). Experimentos de hibridização *in situ* em secções realizadas no estágio HH20 confirmaram os achados dos experimentos realizados em embriões inteiros. Nesse estágio, pudemos observar a forte coloração no miocárdio, nas células endoteliais e nas células mesenquimais dos coxins cardíacos (figura 8C e D).

Experimentos de hibridização *in situ* em secções utilizando estágios mais avançados do desenvolvimento cardíaco (HH25 e HH28) mostraram dados semelhantes aos encontrados durante o estágio HH20. As imagens mostraram que o

RNA_m da integrina beta 2 foi produzido pelas células do miocárdio, pelas endoteliais e também pelas mesenquimais que povoam os coxins cardíacos, local de formação da futura válvula cardíaca (figura 9 A-D). Experimentos com a sonda senso foram realizados, simultaneamente, aos da sonda antisenso. As imagens obtidas não mostraram coloração, demonstrando mais uma vez a especificidade da reação (figura 9E).

Nos experimentos de hibridização *in situ* realizados em secções, utilizamos dois tipos de sonda antisenso. A primeira foi a de 755 pares de base, utilizada nos experimentos de hibridização em embriões inteiros e secções. A segunda sonda, que correspondia ao comprimento total da integrina beta 2, possuindo 2.300 pares de bases, também foi empregada, entretanto somente nos experimentos de hibridização em secções. As imagens obtidas mostraram-se semelhantes, tanto no emprego da sonda mais curta (755 pares de bases), quanto no da sonda longa (2.300 pares de bases). É importante lembrar que foram sintetizadas sondas senso para cada uma das sondas antisenso. As imagens obtidas com o uso das sondas senso não mostraram marcação.

De posse dos dados de detecção, quantificação e localização tecidual de RNA_m de integrina beta 2 nos estágios embrionários de galinha estudados, focamos nossos estudos na possibilidade desse RNA_m estar sendo traduzido em proteína. Experimentos de *Western blot* com o objetivo de detectar integrina beta 2 no coração embrionário de galinha foram realizados. Bandas foram detectadas nas amostras protéicas de canal AV, *tronco arterioso* e ventrículo do estágio HH20, correspondentes ao peso molecular de integrina beta 2 (95 Kda) (Figura 10A). Experimentos de *Western blot* foram realizados para a integrina beta 1, e bandas correspondentes ao seu peso molecular (130 Kda) também foram detectadas (Figura 10B).

A imunomarcação para integrina beta 2 confirmou a presença desta no coração embrionário de galinha. Os dados mostraram marcação positiva da integrina beta 2 em estágio anterior a EMT (HH14) como mostrado na figura 10C-D. Pudemos observar a marcação das células endoteliais e do miocárdio durante esse período. Em estágio posterior ao início da EMT (HH20), observamos marcação positiva nas células endoteliais, mesenquimais, do miocárdio e epicárdio (Figura 10E-F). Em algumas secções, realizamos o controle do anticorpo secundário, do qual foi omitido

o anticorpo primário (área delimitada em 10D), Na imagem de controle do anticorpo secundário, observamos o grau de *background* gerado pela técnica.

Experimentos adicionais para detecção da integrina beta 2 foram realizados através de imunofluorescência indireta. Os dados observados demonstraram, novamente, que a integrina beta 2 é expressa pelas células endoteliais dos coxins cardíacos, pelas células mesenquimais que realizaram a EMT, e pelas células do miocárdio. Esse padrão de expressão foi observado nos estágios HH17 (início da EMT) e HH20 (estágio mais avançado da EMT) (Figuras 11A e B, respectivamente).

Paralelamente aos experimentos de detecção de integrina beta 2, foram realizados experimentos para detecção de integrina beta 1. A figura 11C mostra que a integrina beta 1 é expressa por todos os tipos celulares, ou seja, pelas células endoteliais, mesenquimais e miocárdicas. Experimentos de imunofluorescência, de cujo protocolo omitiu-se o anticorpo primário, demonstraram que não houve ligação inespecífica do anticorpo secundário ao tecido (Figura 11D).

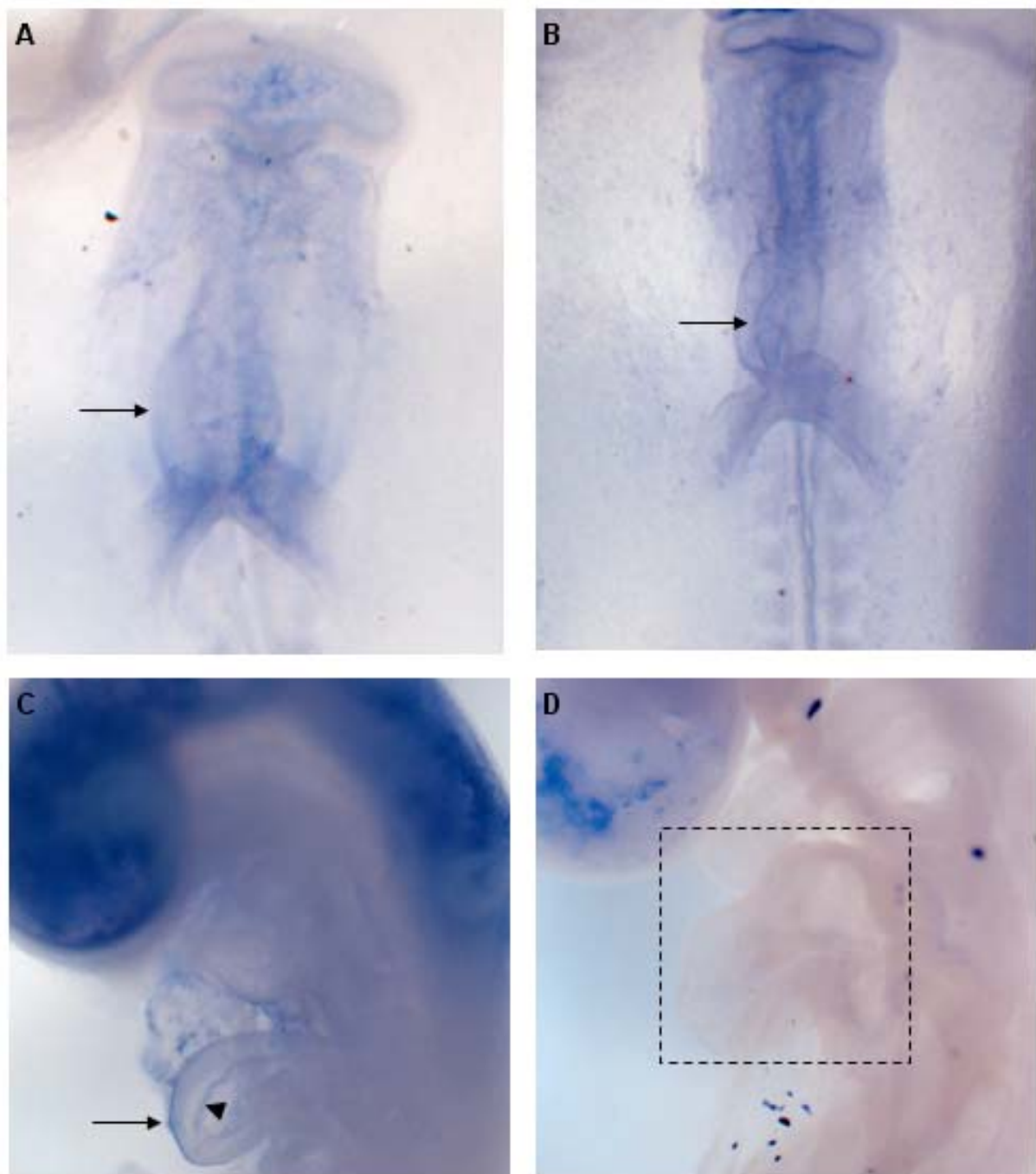


Figura 7 – Hibridização *in situ* em embriões inteiros

A – embrião de galinha no estágio HH10; marcação positiva para Has2. Seta – coração.

B – embrião de galinha no estágio HH10; marcação positiva para sonda antisense de integrina beta 2 no coração (seta).

C – embrião de galinha no estágio HH14; marcação positiva na camada externa do coração (seta) e no endotélio cardíaco (cabeça de seta).

D – embrião de galinha no estágio HH17 que foi hibridizado com sonda sense para integrina beta 2. A área delimitada nessa figura mostra o coração isento de marcação.

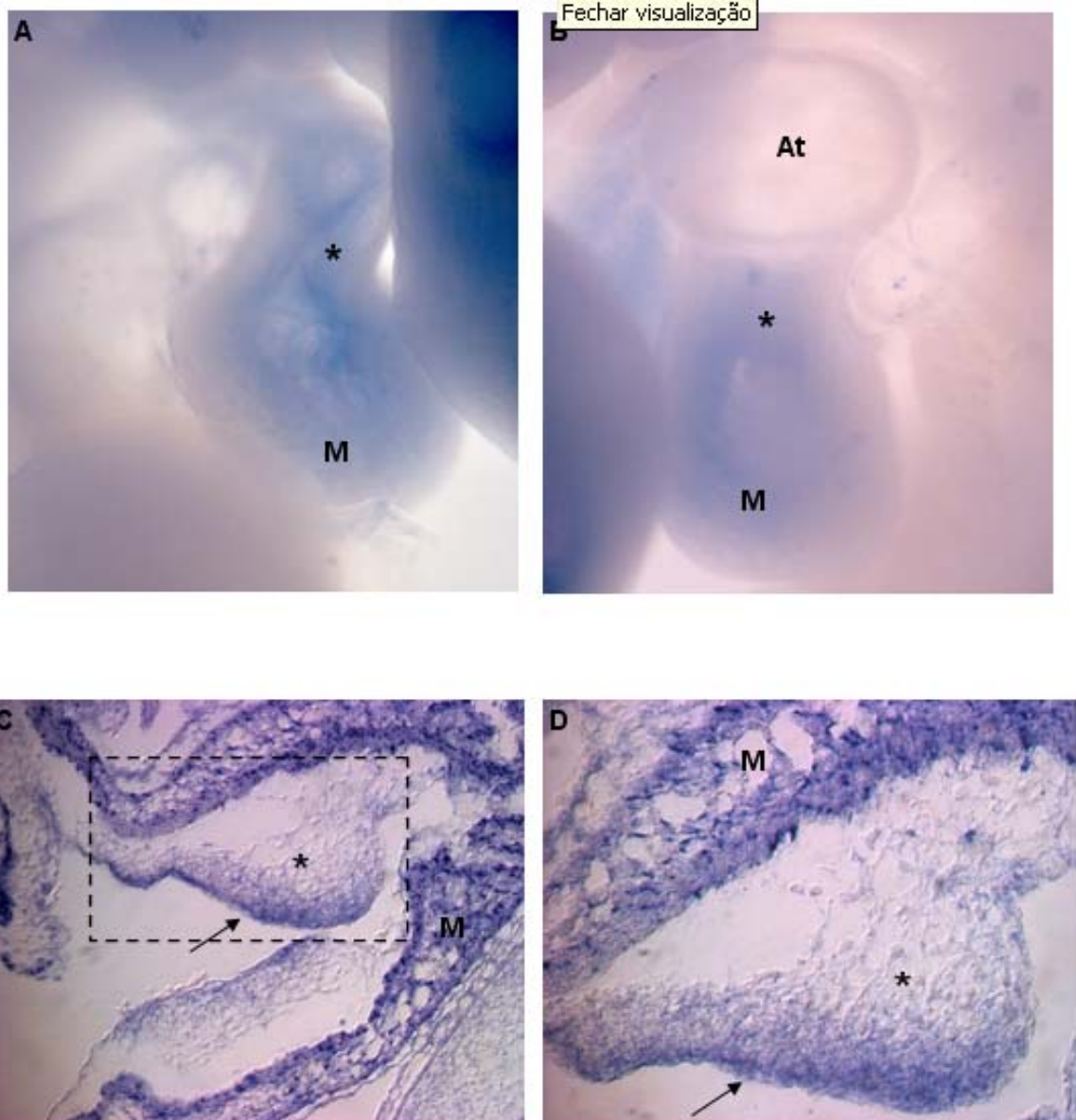


Figura 8 – Hibridização *in situ* em embriões inteiros e em secções

As imagens mostradas representam hibridização *in situ* de embriões de galinha inteiros (A e B) e secções (C e D) no estágio HH20.

A – coloração positiva no miocárdio (**M**) e no coxim do Tronco Arterioso (*).

B – coloração positiva no miocárdio (**M**) e no coxim do canal AV (*). **At** – átrio.

C – coloração positiva no miocárdio (**M**), nas células mesenquimais (*) e nas células endoteliais dos coxins cardíacos (seta).

D – aumento da área delimitada em C.

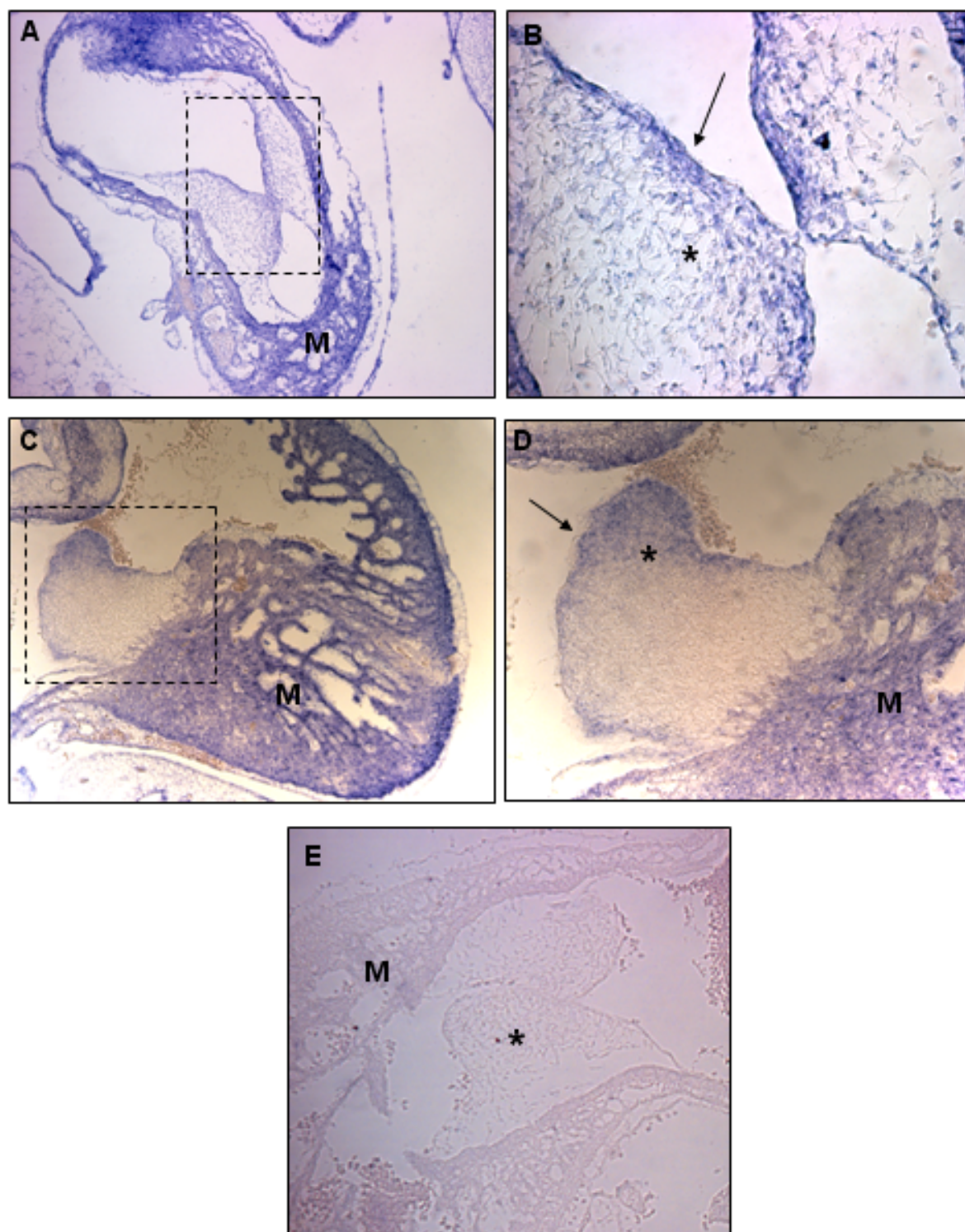


Figura 9 – Hibridização *in situ* em secções

A e B representam estágio HH25. C e D representam estágio HH28. Marcação positiva nas células endoteliais dos coxins cardíacos (setas), nas células mesenquimais (*) e no miocárdio (M) com o emprego da sonda antisense.

B – representa aumento da área delimitada em A (40X).

D – representa aumento da área delimitada em C (40X).

E – hibridização *in situ* com o emprego da sonda sense de integrina beta 2. A imagem não mostra nenhuma marcação evidente. Estágio HH25 (aumento 10X).

Figura 10 – Detecção de integrinas beta em coração embrionário de galinha

A – Western blot – Detecção de integrina beta 2 (95 Kda).

A1 – sangue – HH20.

A2 – canal AV – HH20.

A3 – *tronco arterioso* – HH20.

A4 – ventrículo – HH20

B – Western Blot – Detecção de integrina beta 1 (130 Kda)

B1 – sangue – HH20.

B2 – canal AV – HH20.

B3 – *tronco arterioso* – HH20.

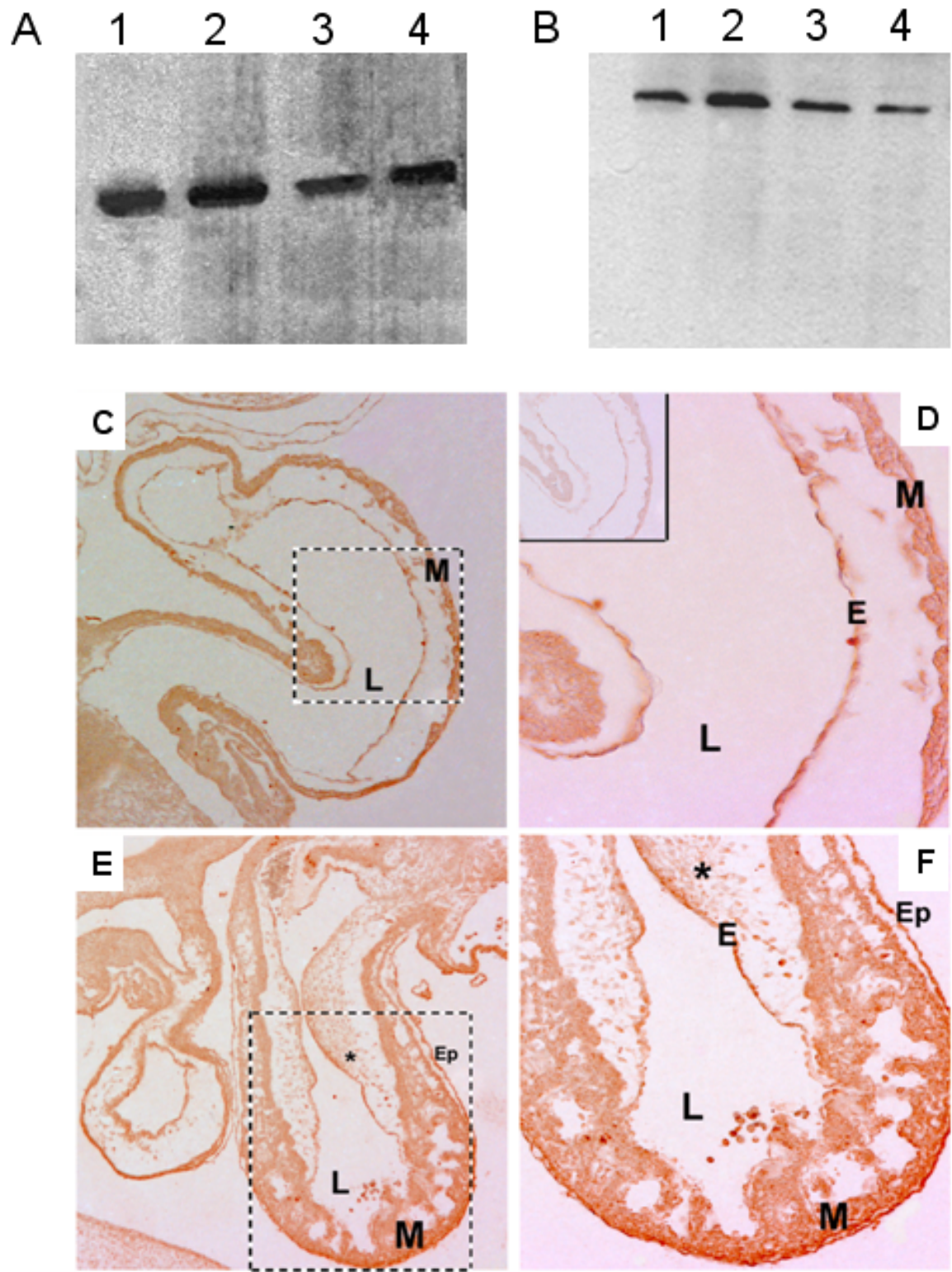
B4 – ventrículo – HH20

C – Imunomarcção de integrina beta 2 por peroxidase no estágio HH14.

D – aumento da área delimitada na figura 10C. Imagem adicionada em D representa experimento no qual foi omitido o anticorpo primário.

E – Imunomarcção de integrina beta 2 por peroxidase no estágio HH20.

F – aumento da área delimitada na figura 10E. **E** – endotélio, **M** – miocárdio, **Ep** – epicárdio, * - células mesenquimais, **L** – lúmen.



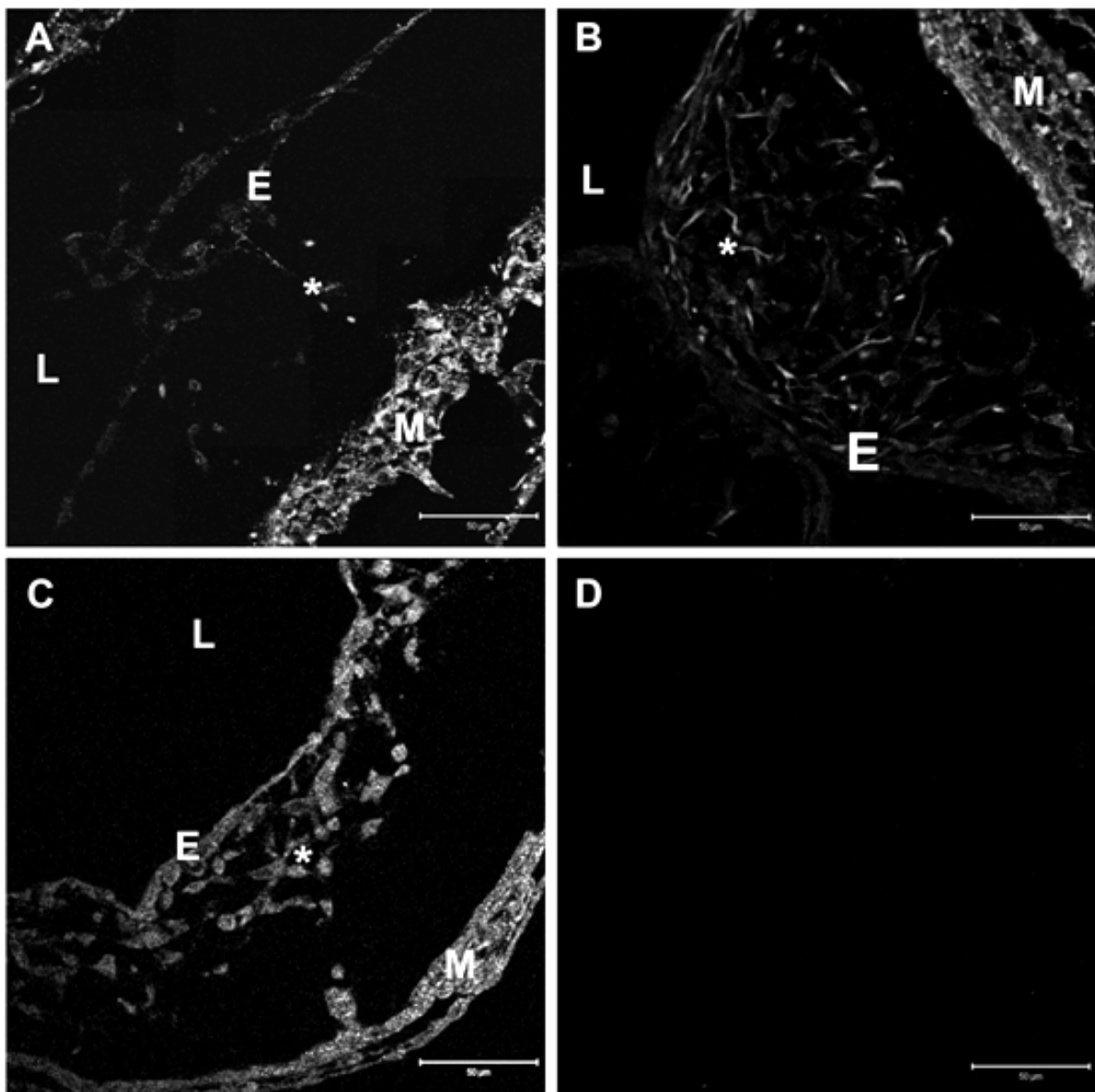


Figura 11 – Imunofluorescência indireta para detecção de integrina beta 2 e beta 1 em coração embrionário de galinha

Imunomarcacão utilizando anticorpo secundário conjugado com Cy3.

Secções de corações embrionários de galinha demonstraram marcação positiva para integrina beta 2 nos estágios HH17 (A) e HH20 (B). C – detecção positiva de integrina beta 1 no estágio HH20, outro nível de corte. D – nenhuma fluorescência foi observada em experimentos dos quais foi omitido o anticorpo primário. E – endotélio, L – Lúmen, M – miocárdio e * - células mesenquimais. Barras – 50 μ M.

7.2 Estudos Funcionais *in vitro* da função da integrina beta 2

Detecção Viral

Após a transfecção das células DF-1, realizamos experimentos de PCRsq e Western Blot para os genes de GAG e do envelope viral (ENV) para detectar a positividade do procedimento. Caso a transfecção tivesse ocorrido com sucesso, poderíamos amplificar os genes de GAG e ENV a partir do RNA total extraído das células DF-1. Após procedimentos de coleta viral a partir do meio de cultura, RNA total foi extraído de parte das células DF-1 que haviam sido transfectadas com as diferentes construções virais (BBAN, BBAN/ItgB2DN e BBAN/ItgB2FL). Experimentos de PCRsq realizados, detectaram a presença de GAG e ENV nas amostras coletadas (Figura 12 A/B).

Outra amostra das células DF-1 foi destinada aos experimentos de *Western Blot* com o objetivo de detectar a síntese de proteína viral. Extrato protéico de células DF-1, que passaram pelas diferentes transfecções (BBAN, BBAN/ItgB2DN e BBAN/ItgB2FL), foi submetido à *Western Blot* e os resultados indicaram que as células, além de produzirem RNAm para GAG, também sintetizavam a proteína (Figura 12C). Simultaneamente, extrato total de RNA e de proteína foi coletado de células DF-1 não-transfectadas e os resultados foram negativos, tanto nos procedimentos de PCRsq, quanto nos de *Western Blot*. Em conjunto, esses dados confirmaram a positividade de transfecção das células DF-1, o que favoreceria o sucesso da coleta viral a partir do meio de cultura.

7.3 Integrina beta 2 afeta a Migração Celular durante a EMT

Após a coleta e microinjecção da forma infectante do vírus, os canais AV foram dissecados e colocados em gel de colágeno. Após 24 horas, parte das amostras de canal AV foram utilizadas para a extração de RNA total e posterior realização PCRq. Os demais canais AV em cultura foram fixados em PFA 4% para posterior análise qualitativa e quantitativa do crescimento endotelial na superfície do gel de colágeno, bem como a migração das células mesenquimais que realizaram a EMT.

Os experimentos de PCRq mostraram um aumento da quantidade de RNAm para integrina beta 2, após a microinjeção dos embriões nos estágios HH10 com as seguintes construções virais: BBAN/ItgB2DN e BBAN/ItgB2FL, de 3,7 e 27,6 vezes respectivamente, quando comparados ao controle (BBAN) (Gráfico 6).

Após detectarmos que a infecção viral levou ao aumento da quantidade de RNAm da integrina beta 2 nas amostras microinjetadas com as formas BBAN/ItgB2DN e BBAN/ItgB2FL, realizamos a análise das amostras de canal AV em cultura de gel de colágeno e que haviam sido fixadas. Uma análise qualitativa das células mesenquimais demonstrou uma redução das células mesenquimais nos tratamentos com BBAN/ItgB2DN, quando comparadas às amostras tratadas com BBAN. Por outro lado, essa mesma análise demonstrou um aumento do número das células das amostras tratadas com BBAN/ItgB2FL, quando comparadas às amostras de BBAN (Figura 13 A/B/C).

Na análise quantitativa, realizamos a contagem do número de células mesenquimais. As amostras tratadas com BBAN/ItgB2DN apresentaram uma redução de 46,4% em relação às amostras tratadas com BBAN, ao passo que o número de células mesenquimais nas amostras tratadas com BBAN/ItgB2FL apresentou um aumento de 40%, quando comparado às amostras tratadas com BBAN (Gráfico 07).

Realizamos, também, nas culturas de canal AV submetidas aos tratamentos virais, a medida da área coberta pelas células endoteliais dividida pela área do explante (razão área endotelial/área do explante). Nossa intenção era quantificar os efeitos dos diferentes tratamentos sobre a migração celular que ocorre na superfície do gel de colágeno. Os dados nos mostraram que as amostras tratadas com BBAN/ItgB2DN apresentaram uma redução de 36,4% na área coberta pelas células endoteliais. Fenômeno oposto pôde ser observado, quando comparamos a área coberta por essas células nas amostras tratadas com BBAN/ItgB2FL, já que houve um aumento de 44,8%, em comparação à área das amostras tratadas com BBAN (Gráfico 8).

Com o objetivo de determinar se os diferentes tipos de tratamentos virais influenciaram a migração celular e a EMT, sem a interferência sobre a taxa de proliferação e apoptose celular, realizamos experimentos que pudessem detectar esses dados. Análises experimentais de proliferação celular não demonstraram

diferença significativa entre os grupos tratados (Gráfico 9). Experimentos de apoptose celular também não demonstraram diferenças significativas na taxa de morte celular nos diferentes grupos estudados (Gráfico 10).

A partir desses dados, observamos que as construções virais, seguindo a metodologia empregada, podem ser empregadas em estudos funcionais, e que a integrina beta 2 desempenha um papel importante na migração celular e na EMT que ocorre nos coxins cardíacos, durante a formação das válvulas cardíacas. A metodologia empregada permite sugerir que essa função desempenhada pela integrina beta 2 não afeta as taxas de proliferação e apoptose celular.

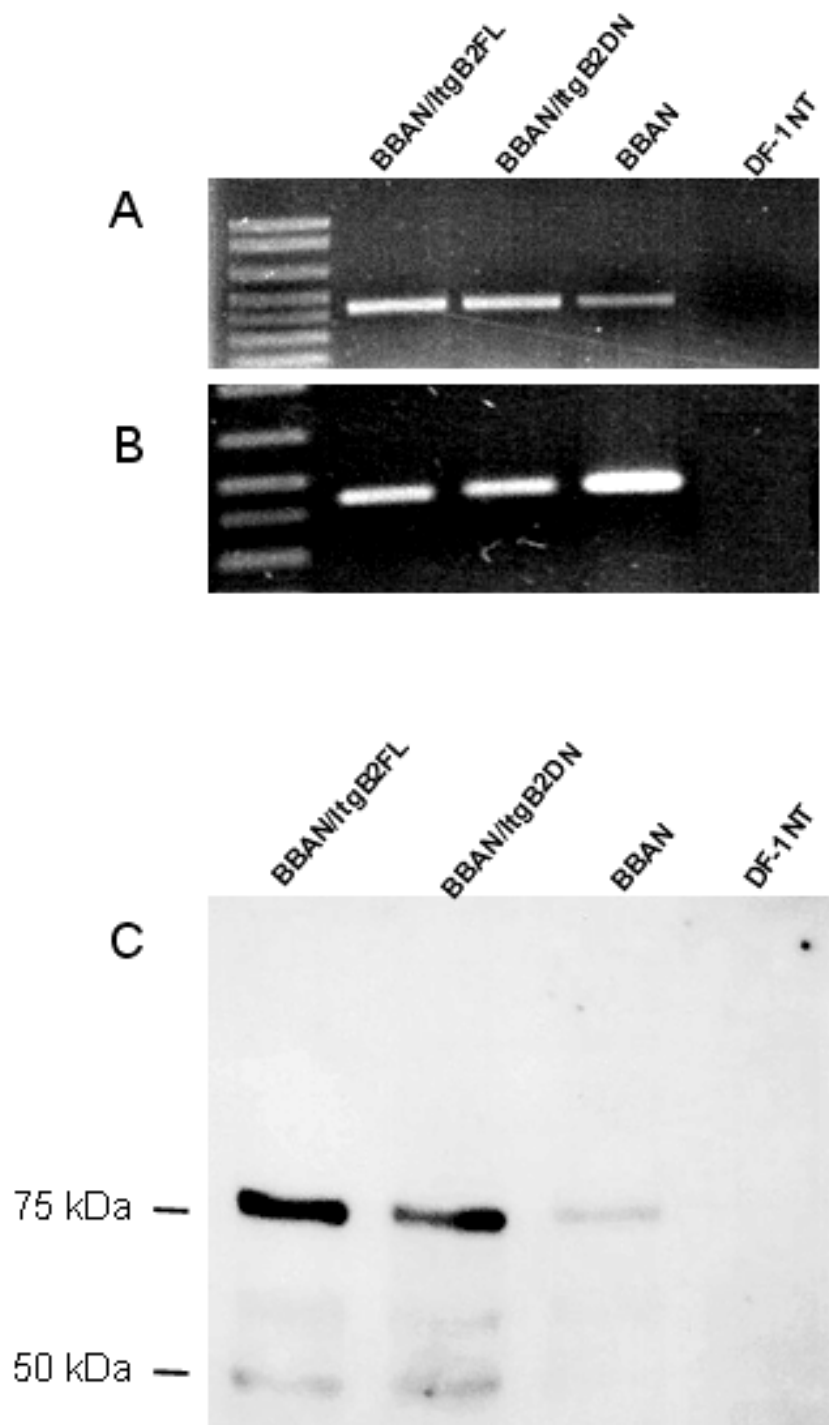


Figura 12 – Detecção de componentes virais em células DF-1 transfetadas

A – PCRsq para detecção de GAG;

B – PCRsq para detecção de ENV;

C – Western Blot para detecção de GAG;

BBAN/ItgB2FL – amostra a partir de DF-1 transfetada com BBAN/ItgB2FL;

BBAN/ItgB2DN – amostra a partir de DF-1 transfetada com BBAN/ItgB2DN;

BBAN – amostra a partir de DF-1 transfetada com BBAN;

DF-1 NT – amostra a partir de DF-1 não-transfetadas.

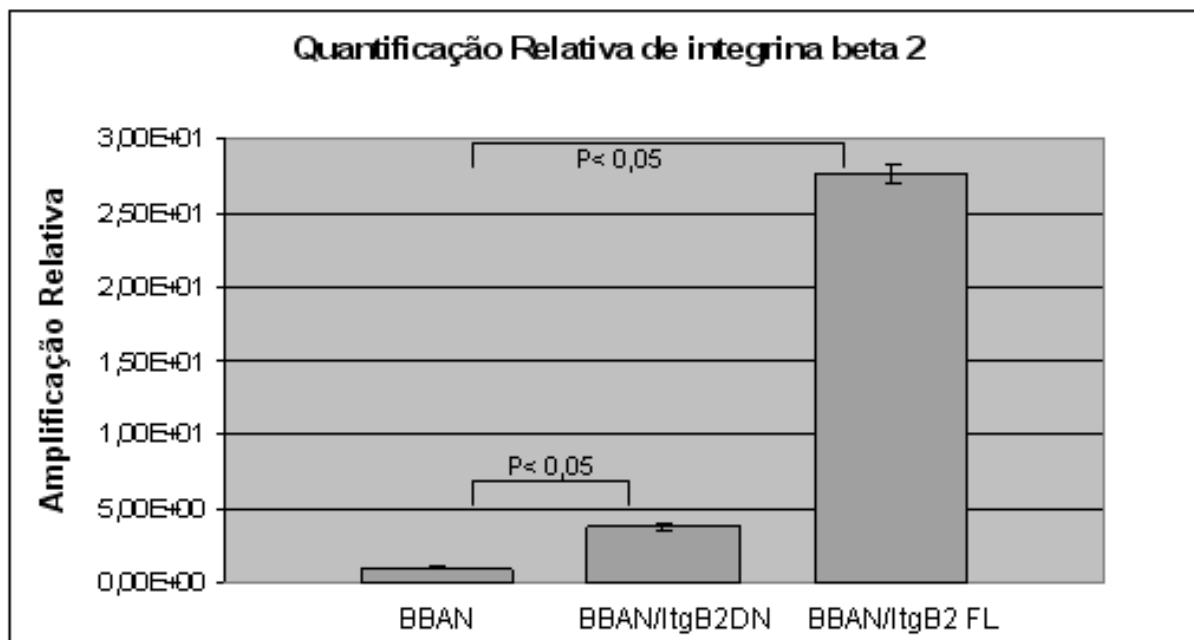


Gráfico 6 – Quantificação Relativa de RNA em amostras de canal AV em cultura através de PCRq e infectadas com construções virais

Aumento de aproximadamente 4 vezes no nível de RNAm de integrina beta 2 das amostras microinjetadas com a construção dominante negativo (BBAN/ItgB2DN) e de aproximadamente 27 vezes quando microinjetadas com a forma completa (BBAN/ItgB2FL) em relação aos níveis de RNAm de integrina beta 2 encontrados nas amostras tratadas com vírus somente (BBAN).

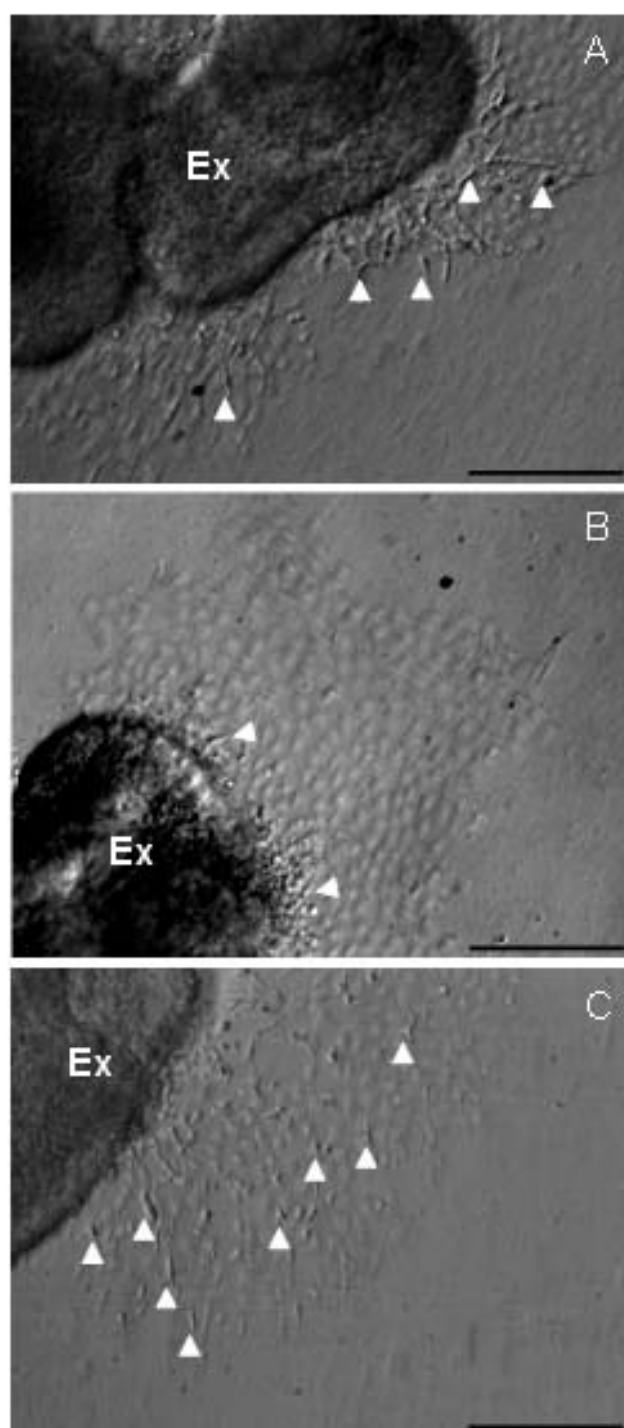


Figura 13 – Análise qualitativa das células mesenquimais em culturas de canal AV

A – explante em cultura de gel de colágeno submetido a tratamento com BBAN.

B – explante em cultura de gel de colágeno submetido a tratamento com BBAN/ItgB2DN.

C – explante em cultura de gel de colágeno submetido a tratamento com BBAN/ItgB2FL.

Cabeça de seta – células mesenquimais. **Ex** – explante.

Barra – 100 μ m

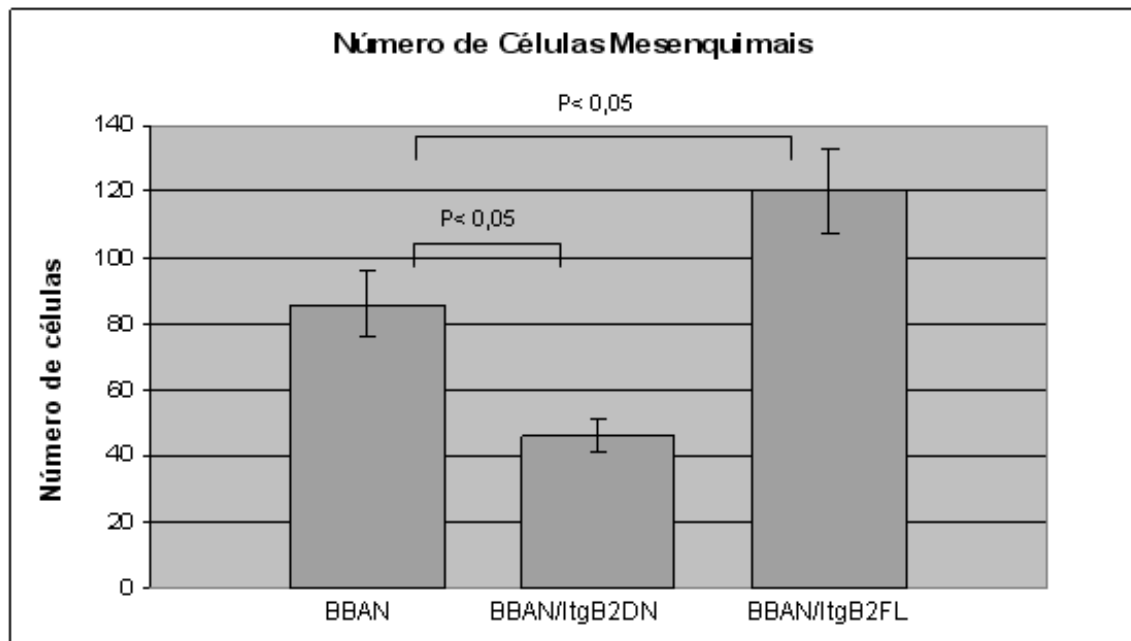


Gráfico 07 – Análise quantitativa das células mesenquimais em culturas de canal AV

- BBAN – amostras de canal AV tratadas com vírus somente. Média do número de células mesenquimais = 85,9 células;
 - BBAN/ItgB2DN - amostras de canal AV tratadas com a forma dominante negativo de integrina beta 2. Média do número de células mesenquimais = 46 células;
 - BBAN/ItgB2FL – amostras de canal AV tratadas com a forma completa de integrina beta 2. Média do número de células mesenquimais = 120,29 células;
- A análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre as amostras após cada tratamento ($n \geq 17$, sendo n o número de explantes analisados por experimento).

Gráfico 8 – Ensaio de migração celular em cultura de canal AV

BBAN – amostras de canal AV tratadas com vírus somente; Média da razão da área = 1,256354192

BBAN/ItgB2DN - amostras de canal AV tratadas com a forma dominante negativo de integrina beta 2. Média da razão da área = 0,798665332

BBAN/ItgB2FL - amostras de canal AV tratadas com a forma completa de integrina beta 2. Média da razão da área = 1,819504151

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa entre as amostras, após cada tratamento ($n \geq 6$, sendo n o número de explantes analisados por experimento) Barras – erro padrão.

Gráfico 9 – Ensaio de proliferação celular em cultura de canal AV

BBAN – amostras de canal AV tratadas com vírus somente. Média de células BRDU positivas = 16,7453.

BBAN/ItgB2DN - amostras de canal AV tratadas com a forma dominante negativo de integrina beta 2. Média de células BRDU positivas = 18,5026.

BBAN/ItgB2FL - amostras de canal AV tratadas com a forma completa de integrina beta 2. Média de células BRDU positivas = 16,7029

Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($n \geq 6$, sendo n o número de explantes analisados por experimento). Barras – erro padrão.

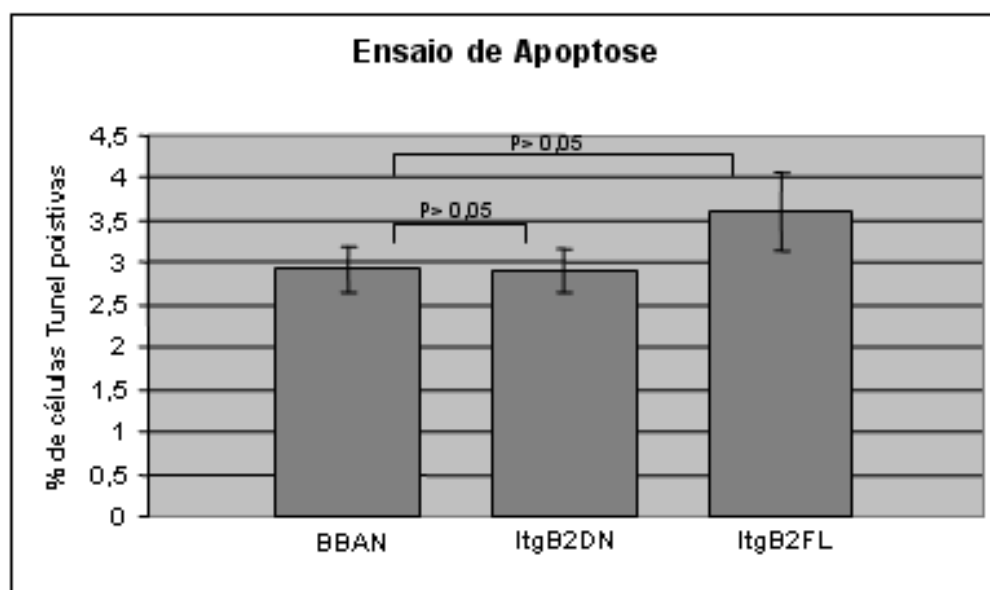
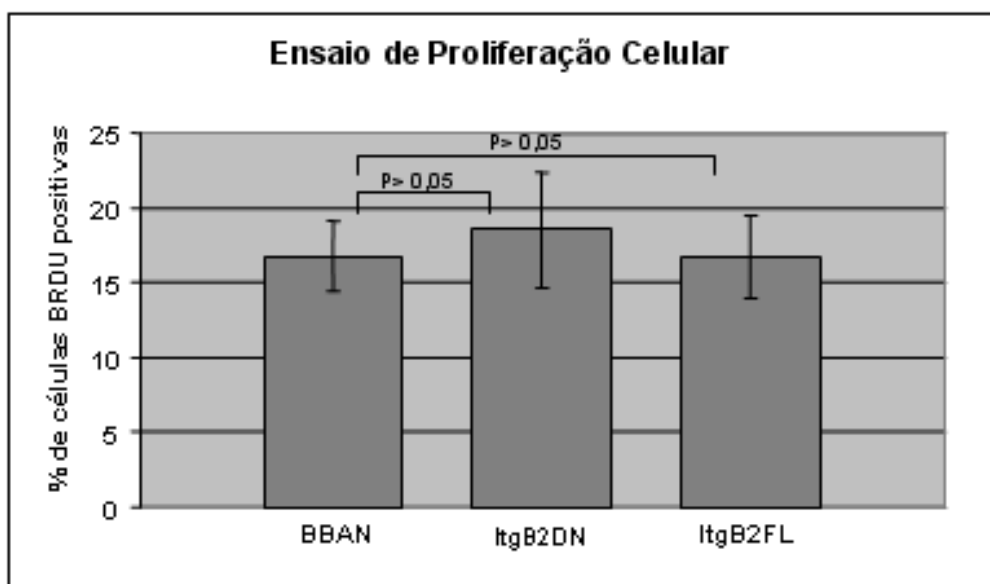
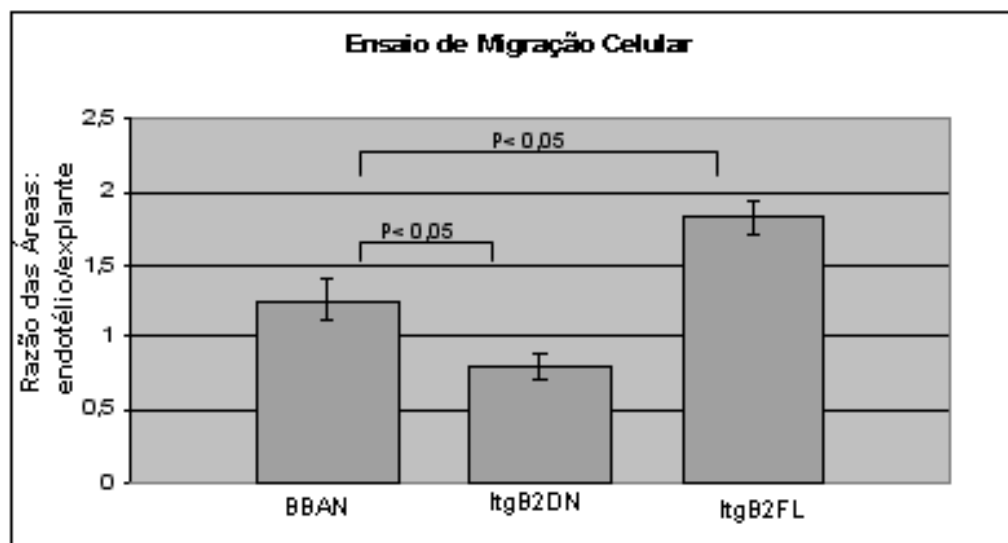
Gráfico 10 – Ensaio de apoptose celular em cultura de canal AV

BBAN – amostras de canal AV tratadas com vírus somente. Média de células Tunel positivas = 2,920564

BBAN/ItgB2DN - amostras de canal AV tratadas com a forma dominante negativo de integrina beta 2. Média de células Tunel positivas = 2,8996079

BBAN/ItgB2FL - amostras de canal AV tratadas com a forma completa de integrina beta 2. Média de células Tunel positivas = 3,5963541.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($n \geq 6$, sendo n o número de explantes analisados por experimento). Barras – erro padrão.



7.4 Análise funcional *in vivo* das construções virais de integrina beta 2

A técnica de microinjecção das construções virais (BBAN, BBAN/ItgB2DN e BBAN/ItgB2FL), em embriões de galinha *in vivo*, foi empregada com o objetivo de analisar, a longo prazo, as consequências, de cada tratamento sobre a formação cardíaca no embrião. Os embriões, depois de tratados, foram mantidos em incubadora e os estágios de desenvolvimento HH25, HH28 e HH33 foram coletados e fixados para análise em microscopia de luz, de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

Observando o estágio HH25 e analisando os diferentes tratamentos, não nos foi possível detectar modificação no desenvolvimento cardíaco entre as amostras. O miocárdio, o átrio, o ventrículo e os coxins cardíacos do canal AV não apresentaram nenhuma modificação evidente. A análise de estágio posterior, HH28, não apresentou alterações morfológicas evidentes, quando do emprego das diferentes construções virais sobre a cardiogênese. O mesmo ocorreu no estágio HH33, durante o qual o ventrículo, o átrio, as válvulas e o septo interventricular não apresentaram alterações morfológicas que pudessem nos dizer algo sobre o efeito das construções virais na morfogênese cardíaca (Figura 14).

7.5 Imunofluorescência indireta para detecção de subunidades alfa e beta em tecido embrionário de camundongo

Experimentos de PCRsq foram realizados, a fim de se confirmar a presença de integrina beta 2 em tecidos embrionários de camundongo. Experimentos realizados durante a pesquisa de mestrado mostraram, através de imunofluorescência indireta, a expressão de integrina beta 2 nos coxins cardíacos durante a formação das válvulas cardíacas. Experimentos de PCRsq também foram realizados para identificar a presença de RNAm das integrinas alfa que formam heterodímero com a integrina beta 2. Para esse experimento, foi utilizado extrato total de RNA de coração de camundongo em estágio de desenvolvimento embrionário E13.5 (E – *embryonic day*). Os dados obtidos revelaram a presença da integrina beta 2, da alfa L, alfa M e alfa X (figura 15). Experimentos aos quais não se adicionou cDNA também foram

realizados para cada um dos pares de primers, obtendo-se resultado negativo (dado não mostrado).

Experimentos de *Western blot* detectaram a presença da subunidade beta 1 de integrina em amostras de timo, de canal AV, *tronco arterioso* e ventrículo em embriões no estágio E11,5 (Figura 16A). Dados semelhantes foram observados, quando realizamos *Western blot* para a detecção da integrina beta 2. Em todas as amostras pesquisadas, ou seja, em timo, canal AV, *tronco arterioso* e ventrículo, foi detectada banda que condiz com o peso molecular da integrina beta 2 (Figura 16B).

Realizamos também imunolocalização da integrina beta 2 nos estágios E11,5 e E13,5. Como observado durante os trabalhos do mestrado, as células endoteliais dos coxins e as mesenquimais encontradas no interior da geléia cardíaca e as células do miocárdio apresentaram-se positivas para a detecção de integrina beta 2 (Figura 17A/B/D). Experimentos dos quais se omitiu o anticorpo secundário foram realizados e as imagens mostraram um baixo nível de *background* (Figura 17C). Imunofluorescência indireta para detecção da integrina beta 1 também foi realizada. A figura 17E mostra que a integrina beta 1 é expressa pelas células do endotélio dos coxins, pelas células mesenquimais que realizaram a EMT.

Procedimentos de imunolocalização, utilizando anticorpos específicos para as subunidades alfa, nos permitiram determinar o padrão de distribuição em seções de coração embrionário de camundongo. As células endoteliais dos coxins cardíacos, as mesenquimais e as do miocárdio expressaram integrina alfa L nos estágios E11,5 durante fase inicial da EMT (figura 18A), e essa expressão se mantém no estágio E13,5 (figura 18B). A imunomarcagem para integrina alfa M demonstrou o mesmo padrão de localização, sendo expresso pelas células endoteliais, mesenquimais e do miocárdio nos estágios E11,5 e E13,5 (figura 18C/D). Um anticorpo específico para integrina alfa X identificou que ela também é expressa no canal AV nos estágios E11,5 e E13,5 (figura 18E/F). Como pudemos observar dos dados coletados, não só a integrina beta 2 está presente durante a formação cardíaca, mas também alguns de seus parceiros alfa.

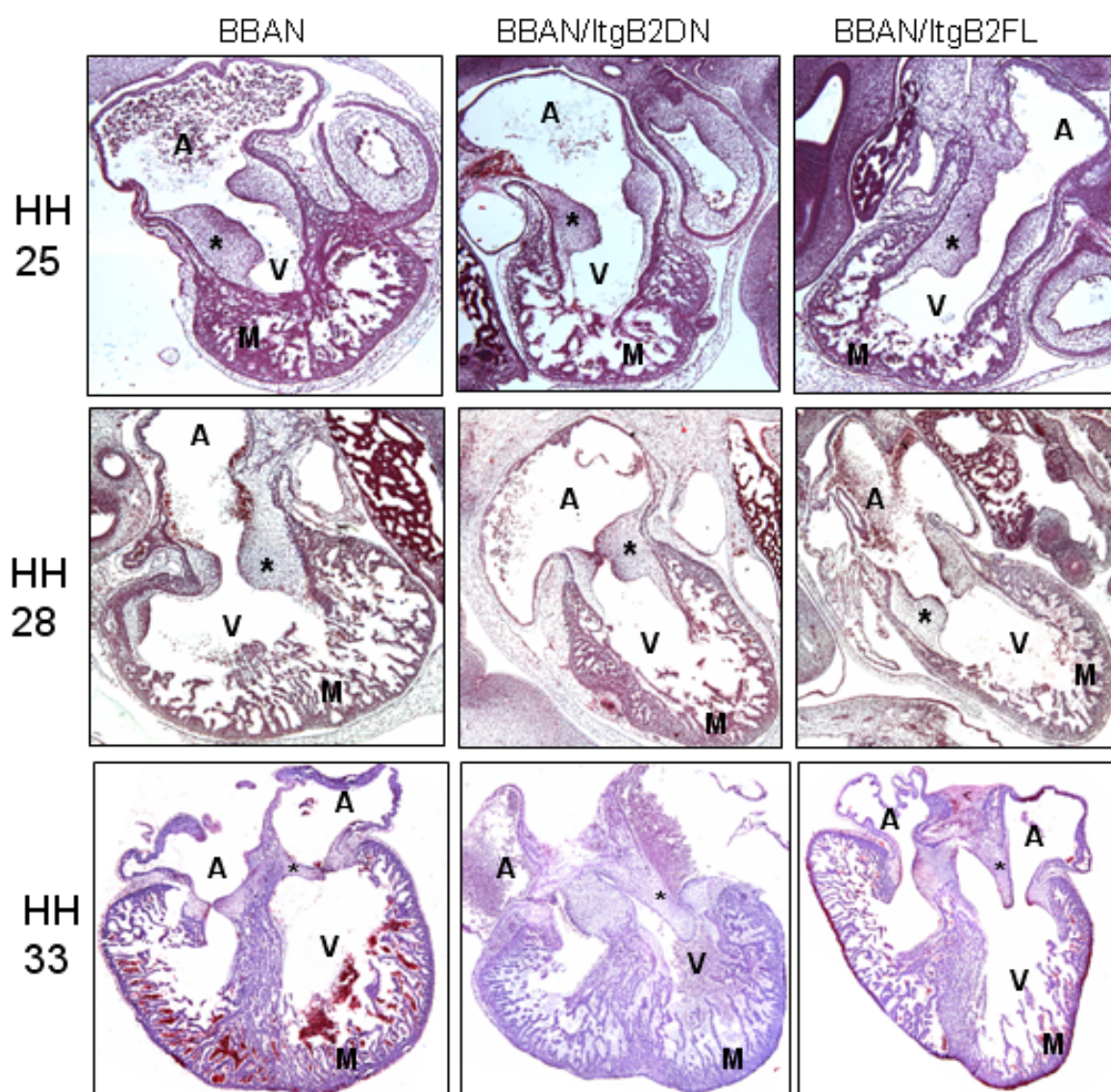


Figura 14 – Análise dos tratamentos virais em embriões de galinha *in vivo*

BBAN – embriões tratados somente com vírus;

BBAN/ItgB2DN – embriões tratados com a forma dominante negativo de integrina beta 2;

BBAN/ItgB2FL – embriões tratados com a forma completa de integrina beta 2.

A análise das amostras foi realizada após coloração por Tricrômico de Masson e analisadas em microscópio de luz de rotina. n = 2 por tratamento. **A**- átrio, **V** – ventrículo, **M** – miocárdio, e ***** - coxim cardíaco

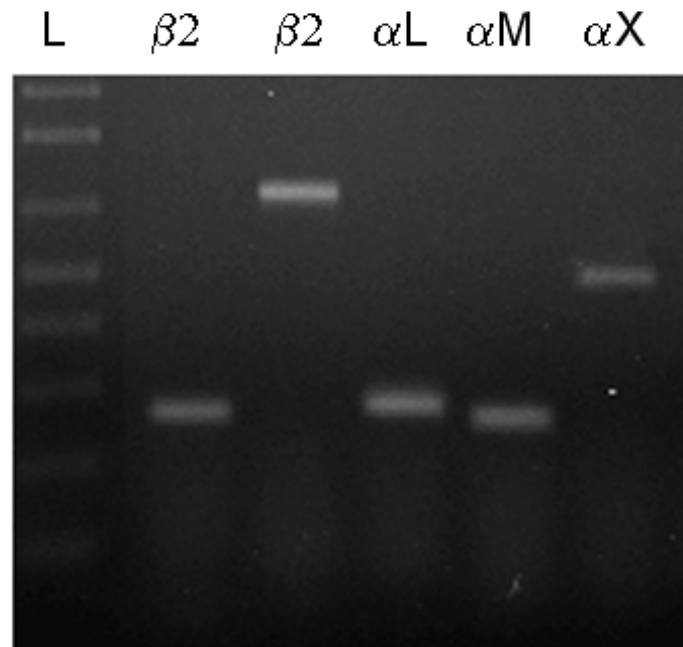


Figura 15 – PCRsq em amostras de coração de camundongo E13.5

L – 1 Kb DNA ladder plus

$\beta 2$ – Integrina beta 2 – Uso de dois diferentes pares de primers – 269 e 702 pares de base respectivamente

αL – Integrina alfa L – 282 pares de base

αM – Integrina alfa M – 264 pares de base

αX – Integrina alfa X – 508 pares de base

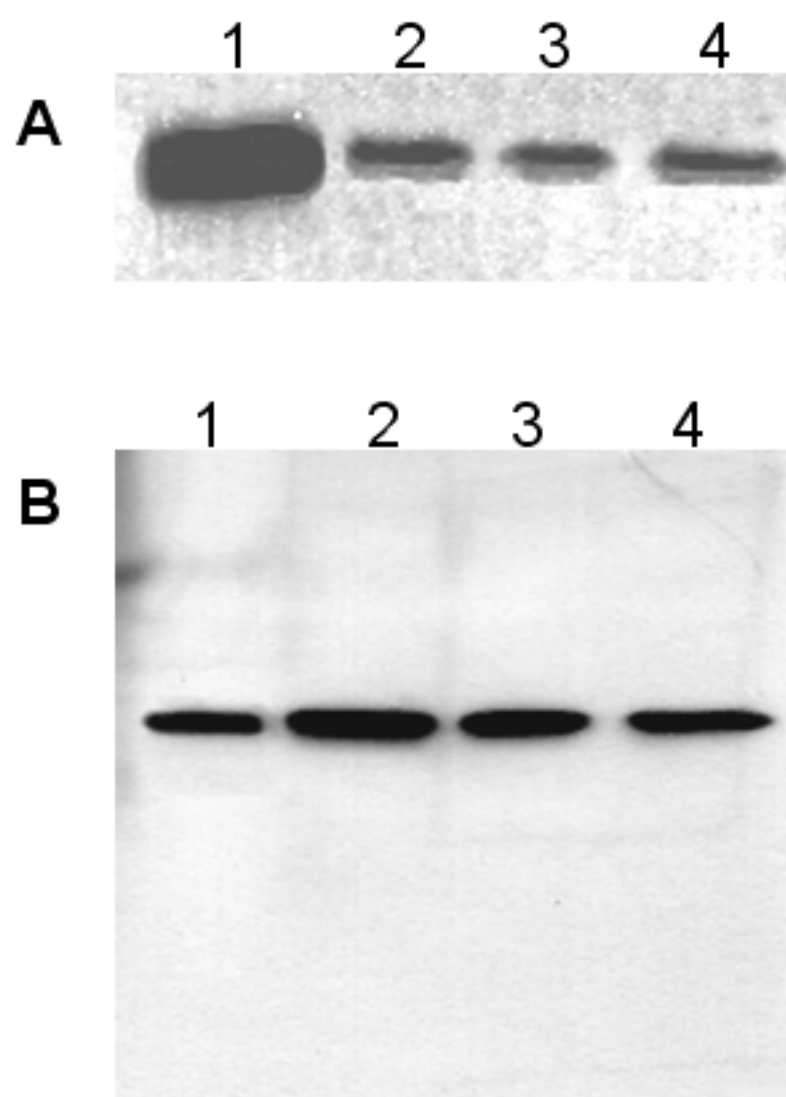


Figura 16 – Western blot em tecido de camundongo

A- Detecção de integrina beta 1 (130 Kda)

A1 – Timo de camundongo adulto;

A2 – Canal AV E11,5;

A3 – Tronco Arterioso E11,5;

A4 – Ventrículo E11,5

B – Detecção de integrina beta 2 (95 Kda)

B1 – Timo de camundongo adulto;

B2 – Canal AV E11,5;

B3 – Tronco Arterioso E11,5;

B4 – Ventrículo E11,5

Figura 17 – Imunofluorescência indireta em tecido embrionário de camundongo

A – Imunolocalização de integrina beta 2. E11,5

B – Representa área delimitada em A.

C – Controle do nível de background. Caixa – contraste de fase do controle

D – Imunolocalização de integrina beta 2. E13,5

E – Imunolocalização de integrina beta 1. E13,5

F – Contraste de fase de E.

L – Lúmen, **E** – Endotélio, ***** - células mesenquimais e **M** – miocárdio. Barra – 50 μ M.

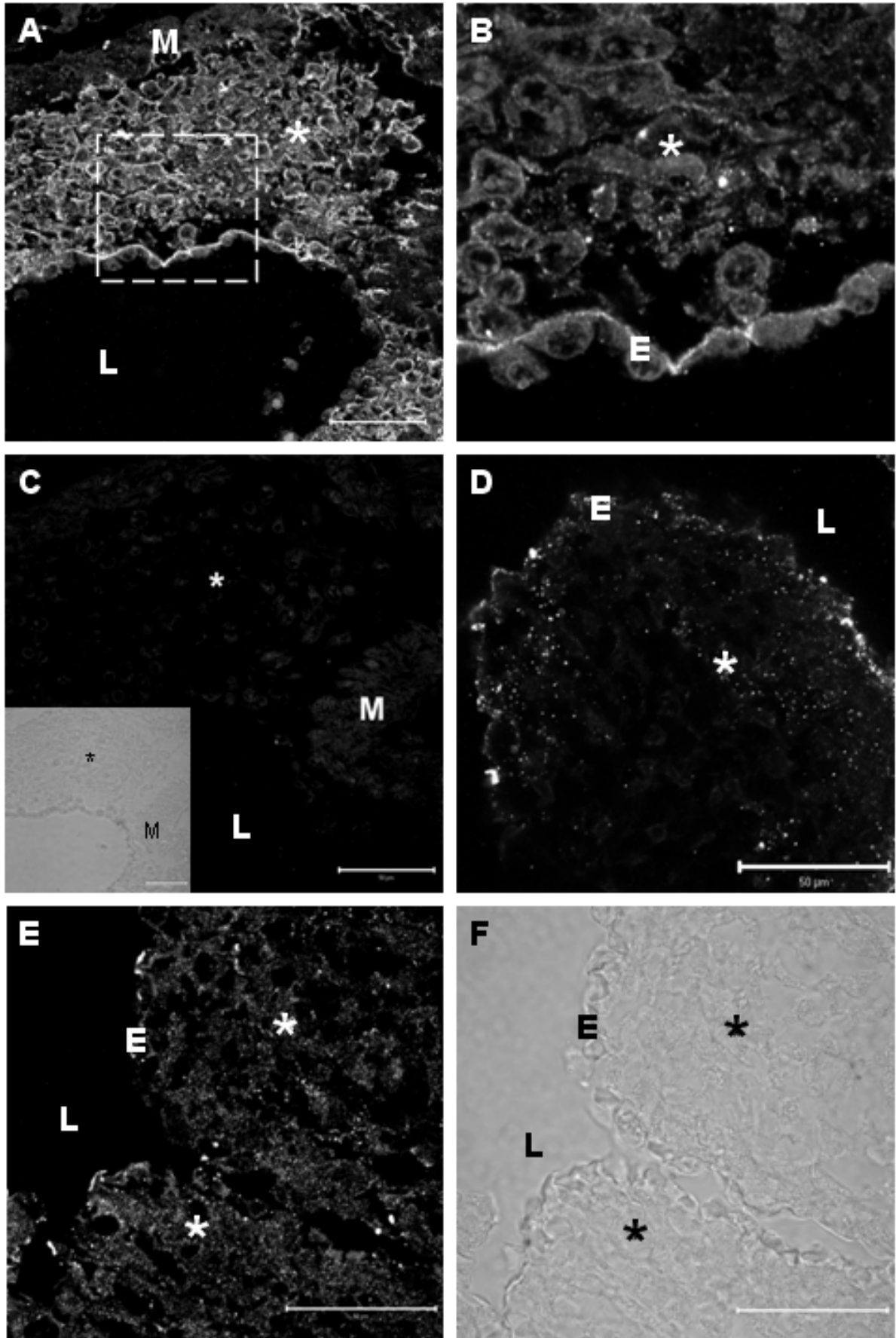


Figura 18 – Imunofluorescência indireta para detecção das subunidades alfa L, M e X em coração embrionário de camundongo

A – alfa L – E11,5

B – alfa L – E13,5

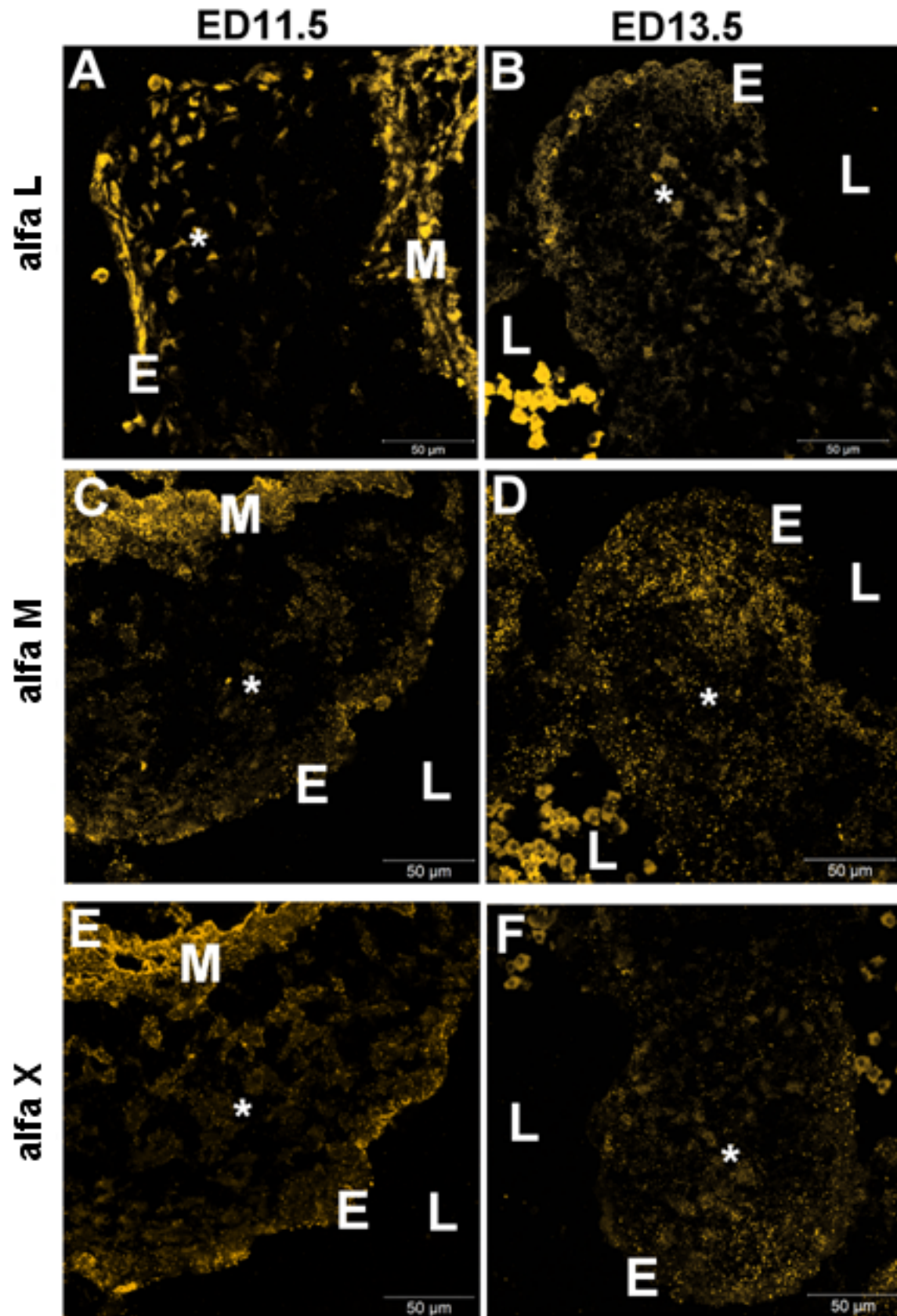
C – alfa M – E11,5

D – alfa M – E13,5

E – alfa X – E11,5

F – alfa X – E 13,5

E – endocárdio, **M** – Miocárdio e * - células mesenquimais. Barra – 50 μ M



8 DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O papel das integrinas vem sendo bastante estudado desde o seu primeiro relato na literatura pertinente (HYNES, 1987). Por atuarem em várias áreas tais como migração, adesão, transdução de sinais, elas têm sido alvo de constantes pesquisas, tanto em relação à sua atuação na evolução de processos patológicos, quanto na embriogênese (HYNES, 2002). Algumas integrinas (α_v , α_1 , α_4 , α_5 , β_1 , β_3 , β_5) têm sido investigadas, por exemplo, durante o desenvolvimento cardíaco (SIMPSON *et al.*, 1998; DANEN e SONNENBERG, 2003). Durante o desenvolvimento do sistema nervoso central, a integrina beta 1 regula a migração neuronal, através de interações adesivas com os componentes da matriz extracelular (MILNER e CAMPBELL, 2002). Em outros estudos, as subunidades alfa v e beta 8 têm sido relatadas como importantes para o desenvolvimento normal dos vasos sanguíneos do sistema nervoso central, já que sem elas o embrião morreria, em decorrência de hemorragia cerebral (MANCUSO, KUHNERT e KUO, 2008).

É notável, na literatura, o fato de a integrina beta 2 possuir íntima associação com os processos inflamatórios, tais como adesão firme do leucócito ao endotélio vascular e posterior transmigração para áreas do foco inflamatório (ROCHON *et al.*, 2000). Os dados de detecção e localização da integrina beta 2 encontrados no nosso trabalho confirmam, através de experimentos de PCR, hibridização *in situ*, *Western blot* e imunohistoquímica, que esta proteína, apesar de amplamente estudada nas células da linhagem leucocitária, também é encontrada em outros tipos celulares, como as células do miocárdio, epicárdio, endocárdio e células mesenquimais dos coxins cardíacos, durante a cardiogênese em embriões de camundongos e de galinha.

Vale ressaltar que três das quatro subunidades alfa (L, M e X), que formam heterodímero com a integrina beta 2, também foram identificadas durante a formação cardíaca. A presença da quarta integrina alfa (alfa D), que se associa com a integrina beta 2, ainda precisa ser pesquisada, portanto não excluimos a hipótese dela também estar presente e desempenhando alguma função durante o desenvolvimento cardíaco. Nossos dados, juntamente com outros trabalhos na literatura (CHAMOUX *et al.*, 2001; LANGECCEN *et al.*, 2002; KARMAKAR

eMUKHERJEE, 2003) comprovam a relação da integrina beta 2 com linhagens não-leucocitárias.

Apesar de a integrina beta 2 ser expressa em tipos celulares aparentemente distintos, atualmente, é evidente a ligação embriológica existente entre as linhagens hematopoiética e endotelial. O ponto comum de origem das duas linhagens celulares vem da existência do hemangioblasto que é capaz de se diferenciar em células endoteliais e do sangue (DRAKE *et al*, 1997; NORTH *et al*, 2002; JAFFREDO *et al.*, 2005a). Durante estágios iniciais de desenvolvimento embrionário, as células endoteliais das ilhotas sanguíneas, originadas da diferenciação de células do mesoderma embrionário, são responsáveis pela formação das primeiras células do sangue (FERKOWICZ e YODER, 2005). Essas células apresentam várias proteínas de superfície semelhantes e todas expressam integrina beta 2 (CHAVAKIS *et al.*, 2005).

Devemos nos lembrar de que o coração se forma, inicialmente, a partir de agregados de células mesenquimais que, na região cranial do embrião, formam dois tubos cardíacos primitivos que posteriormente se fundem e dão origem ao tubo cardíaco embrionário (SADLER, 1995; MOORE, 1998). Uma segunda onda de formação de células da linhagem hematopoiética ocorre a partir das células endoteliais da aorta embrionária (ZAMBIDIS *et al.*, 2006). Neste local, determinadas células endoteliais vão perdendo gradativamente seu fenótipo, ao mesmo tempo em que passam a expressar genes específicos da linhagem hematopoiética (JAFFREDO *et al.*, 2005b).

Diante dos relatos na literatura, não nos surpreende que as células endoteliais embrionárias do coração expressem integrina beta 2. Além disso, as células mesenquimais que se localizam nos coxins cardíacos se originam das células endoteliais do canal AV através da EMT. Talvez esse fato explique, porque essas células expressem integrina beta 2. É importante relatar ainda que as células hematopoiéticas contribuem para a formação de parte dos fibroblastos das válvulas cardíacas no adulto (VISCANTI *et al.*, 2006). Em um estudo, Gittenberger-de Groot e outros (1998) relataram que as células derivadas do epicárdio também contribuem para uma subpopulação de células mesenquimais dos coxins cardíacos, atuando desta forma, na formação das válvulas cardíacas.

Até o presente momento, poucos estudos demonstraram a presença de integrina beta 2 em tecidos em desenvolvimento. A presença de RNAm de integrina beta 2 foi detectada em embriões de *Xenopus*, em estágios anteriores ao início da formação do tubo cardíaco (RANSOM *et al.*, 1993). Um estudo de componentes da matriz extracelular e seus receptores de integrina durante estágios embrionários de formação da glândula supra-renal demonstraram que a integrina beta 2 é expressa pelas células cromafins derivadas de células da crista neural. Essas células migram através do córtex da glândula e povoam a região medular (CHAMOIX *et al.*, 2001).

Até o presente momento, não foram relatados outros locais de expressão de integrina beta 2 durante o desenvolvimento embrionário pelas células da crista neural. Outros estudos têm demonstrado que a integrina beta 2 é expressa em outros tipos celulares diferentes de leucócitos, tais como células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) e células de câncer (LANGEGGEN *et al.*, 2002; KARMAKAR e MUKHERJEE, 2003). À medida que os estudos avançam, tem-se mais conhecimento sobre um maior número de células não-hematopoiéticas que expressam integrina beta 2. Acresça-se a isso que pouco se sabe a respeito da função que a integrina beta 2 desempenha em atividades não associadas aos leucócitos.

Os ligantes que interagem com a integrina beta 2 e seus parceiros alfa no coração embrionário ainda não foram determinados. É provável que a integrina beta 2 possa estar interagindo com contra-receptores, tais como VCAM e ICAM (SADHU *et al.*, 2007; TANG, LI e TAN, 2008; ALCAIDE, AUERBACH e LUSCINSKAS, 2009), em células adjacentes. Entretanto, o fato das células endoteliais, mesenquimais e do miocárdio expressarem integrina beta 2, não nos permite afirmar se existe uma interação específica entre estas células. É mais provável que a integrina beta 2 esteja se ligando a proteínas da matriz extracelular. Heterodímeros contendo a subunidade beta 2 podem se ligar a várias proteínas da matriz, incluindo colágenos, fibronectina, plasminogênio e heparina (VAN DER FLIER e SONNENBERG, 2001; YAKUBENKO *et al.*, 2002; LISHKO *et al.*, 2002, HUMPHRIES *et al.*, 2006). Colágenos, fibronectina e várias outras proteínas da matriz estão presentes na maioria dos tecidos embrionários, incluindo a geléia cardíaca durante a migração das células mesenquimais nos coxins cardíacos (KITTEN *et al.*, 1987; LITTLE e RONGISH, 1995; PEACOCK *et al.*, 2008).

O interessante é que a integrina beta 2 se liga à CCN1 (CYR61), uma proteína secretada rica em cisteína - *secreted cysteine-rich protein* (SCHOBER *et al.*, 2003). A CCN1 se associa com a matriz extracelular e promove adesão, migração, proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular de uma maneira dependente do tipo celular (CHEN e LAU, 2009). CCN1 é expressa no endotélio, nas células mesenquimais e no miocárdio, sendo considerada essencial para o remodelamento tecidual durante o desenvolvimento cardíaco. Embriões desprovidos de CCN1 apresentam morfogênese cardíaca atípica na região válvuloseptal, o que resulta em defeito de septação atrioventricular – AVSD (MO e LAU, 2006). Deficiência em CCN1 não afeta a formação do coxim cardíaco ou a EMT, mas resulta num aumento na taxa de apoptose do coxim e reduz a atividade fibroblástica no septo ventricular e nas válvulas atrioventriculares.

Outro membro da família CCN é CCN2 (*Connective Tissue Growth Factor - CTGF*) que também é expresso durante o desenvolvimento cardíaco, particularmente no miocárdio e no coxim cardíaco, conforme Chuva de Sousa Lopes e outros (2004). O interessante é que neste mesmo estudo, camundongos deficientes para CCN2 não apresentaram defeitos cardíacos, apresentando desenvolvimento normal das válvulas cardíacas. Os autores relatam que o desenvolvimento normal observado nesses camundongos, provavelmente, fosse devido à redundância funcional entre os membros da família CCN.

Dados adicionais mostram que a produção de CCN2 é induzida pelo co-ativador transcripcional Yap (*Yes-associated protein*) (LEASK *et al.*, 2003). Outro estudo relata que Yap é um co-ativador transcripcional da integrina beta 2. Quando se inibe a ação de Yap, os níveis da integrina beta 2 são também reduzidos (HAO *et al.*, 2008). Talvez Yap esteja atuando na síntese de CCN2 durante a cardiogênese e que, ao mesmo tempo, induzindo a produção da integrina beta 2 durante as etapas de desenvolvimento cardíaco investigadas durante este trabalho.

Camundongos com mutação no gene da integrina beta 2 sobrevivem e não apresentam anormalidades notáveis no coração e em outros órgãos, entretanto desenvolvem um fenótipo relacionado à condição conhecida como Deficiência de Adesão leucocitária – LAD-1. Nessa patologia, os indivíduos apresentam leucocitose, disfunção na adesão e migração leucocitária e ocorrência de infecções muco cutâneas (SCHARFFETTER-KOCHANNEK *et al.*, 1998). No entanto, é

importante notar que os autores relataram uma frequência de mutantes homozigóticos abaixo do esperado, após o cruzamento de mutantes heterozigóticos, o que sugere que alguns embriões mutantes morreram antes do nascimento. Adicionalmente, relatos foram feitos de que entre 10 e 40% dos recém-nascidos mutantes para integrina beta 2 morrem períodos após o nascimento, devido à causas não reportadas. Outros estudos demonstraram que a integrina beta 1 e, possivelmente, outras subunidades beta, podem, ao menos em parte, compensar a falta da integrina beta 2 (HENDERSON *et al.*, 2001). Talvez esse fenômeno compensatório permita a alguns embriões mutantes para integrina beta 2 se desenvolverem até a fase adulta.

Outros estudos relataram que camundongos mutantes para integrina beta 2 geralmente apresentam outros defeitos, às vezes, difíceis de serem notados. Miura e outros (2005) reportaram que esses embriões apresentam algumas características de osteoporose, incluindo redução na densidade óssea e aumento do espaço trabecular. Com base nesses dados, faz-se necessária uma análise morfológica detalhada dos corações desses embriões.

Diante de todos esses fatos e em face da incerteza da atuação da integrina beta 2 durante a cardiogênese, os estudos funcionais realizados, através do emprego de construções virais, fundamentaram nossa hipótese de que a integrina beta 2 poderia estar atuando durante o desenvolvimento cardíaco. Estudos similares que se utilizaram do emprego de dominantes negativos de integrina já foram relatados na literatura. Lee e outros (2006) utilizaram embriões que expressavam dominante negativo da integrina beta 1. Em seus estudos, esse dominante negativo possuía a porção extracelular e transmembrana, entretanto desprovida da cauda intracitoplasmática. Os dados encontrados por esses autores demonstraram que esses embriões apresentavam hipomielinização dos axônios do sistema nervoso central. Estudos anteriores demonstraram a importância da porção intracitoplasmática da integrina beta 1 na adesão celular e o agrupamento desses receptores na superfície da célula (BERRIER *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Pyszniak, Carpenito e Takei (1997) demonstraram a função da cauda intracitoplasmática da integrina beta 2 no espalhamento celular (*spreading*) que ocorre após a adesão. O uso das construções de dominantes negativos de integrina que não possuem a cauda intracitoplasmática aparentemente

não afeta sua expressão na superfície celular como relatado por Lub e outros. (1997), ao passo que mutações na região extracelular, responsáveis pela interação da integrina beta 2 com as respectivas subunidades alfa, afetam sua função e expressão na superfície celular (MCDOWALL *et al.*, 2003).

Os dados obtidos em nossos experimentos, através do emprego do vírus contendo a forma dominante negativo (BBAN/ItgB2), mostraram uma redução qualitativa e quantitativa no número de células mesenquimais que realizaram a EMT a partir de explantes de canal AV em cultura de gel de colágeno. Além do fato de influenciar o número de células mesenquimais em cultura, essa construção viral afeta a migração das células. Esses dois dados devem ser analisados em conjunto, pois as células endoteliais que revestem os coxins endocárdicos perdem seu fenótipo endotelial, passando a apresentar características de células migratórias e, desta forma, realizam a EMT.

O uso de vetores virais com o objetivo de se estudar a função das integrinas vem sendo utilizado cada vez mais. Formas de expressão da sequência completa, mutadas ou truncadas são amplamente utilizadas (OGUEY, 2000; LEU *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2006). O efeito do aumento da expressão da integrina beta 2 durante a cardiogênese ainda não havia sido relatado.

Fato interessante é que ao ser expressa em baixa densidade em linhagem celular, a integrina beta 2 atua em conjunto com a integrina beta 1 na migração celular (LISHKO *et al.*, 2002; YAKUBENKO *et al.*, 2008). Fenômeno contrário foi observado quando uma expressão aumentada da integrina beta 2 (alta densidade) ocorreu, resultando em um aumento da adesividade e inibição da migração, fato que permite a retenção de uma determinada célula em um sítio específico. Aparentemente, nesse sistema, a integrina beta 2 atua como um freio: quanto maior a expressão, maior a adesão, até que a migração seja interrompida.

Utilizando a construção viral contendo a sequência completa da integrina beta 2 (BBAN/ItgB2FL), o que observamos foi um aumento do número de células mesenquimais em cultura, células estas que realizaram a EMT. Esse fato reflete também nos dados analisados da migração celular. Observamos que houve um aumento da área de cobertura das células endoteliais, relacionado a uma maior migração celular, quando comparado ao controle, vírus somente (BBAN). Nossos dados, quando comparados a outros estudos, mostraram-se aparentemente opostos

(LISHKO *et al.*, 2002; YAKUBENKO *et al.*, 2008). Outros estudos relativos aos níveis de expressão da integrina beta 1 mostraram que, quando ocorre uma redução dos seus níveis, a migração fica prejudicada (SEVERSON *et al.*, 2009). Entretanto, os dados quantitativos dos níveis de RNAm de integrina beta 2 através de PCRq nos mostraram um aumento dos seus níveis, especialmente nas fases iniciais da EMT. Supomos que os níveis de expressão da proteína também estavam aumentando e, desta forma, desempenhando uma função, a qual nesse estágio, talvez fosse o de auxílio à migração, não atingindo o nível de expressão que passasse a funcionar com um “freio”. Nesse caso, supomos que a integrina beta 2 estivesse atuando em conjunto com outras integrinas e favorecendo a migração celular que ocorreu durante o processo de EMT.

É importante ressaltar que as integrinas atuam na ligação de componentes do citoesqueleto a proteínas da matriz extracelular e a outros receptores de superfície celular. Entretanto, não podemos deixar de lembrar que as integrinas atuam também na migração, proliferação, apoptose e diferenciação celular, fenômenos realizados graças à sinalização *outside-in* (HYNES, 2002; STREULI, 2009). Não seria estranho supormos que diante do emprego das diferentes construções virais, as taxas de proliferação e apoptose celular pudessem sofrer alguma modificação. Os experimentos realizados para mensurar esses fenômenos foram realizados e os dados observados sugerem que, diante do emprego das construções virais BBAN/ItgB2DN e BBAN/ItgB2FL, não houve diferença nas taxas de proliferação celular e apoptose celular.

Analisando os dados funcionais *in vitro* de EMT, a migração, proliferação e a apoptose, podemos concluir que a integrina beta 2 desempenha papel na EMT, auxiliando exclusivamente migração celular, sem afetar as taxas de proliferação e apoptose.

Os dados sobre a expressão da integrina beta 2 durante a cardiogênese mostraram que as células endoteliais das futuras válvulas cardíacas, as células mesenquimais que povoam os coxins endocárdicos e as células do miocárdio continuaram sendo positivas em estágios mais avançados da formação cardíaca. Foi de nosso interesse analisar se a integrina beta 2 continuava sendo necessária durante essas etapas e se desempenhava função. Os estudos funcionais *in vivo* foram utilizados para dar resposta a essas perguntas. As análises dos dados obtidos

não mostraram alterações evidentes nas amostras verificadas. Aparentemente, as válvulas cardíacas e o miocárdio prosseguiram com seu desenvolvimento normal, não sendo afetados pelo emprego das diferentes construções virais. O fato de não se observarem alterações morfológicas, pode ser consequência do estágio de desenvolvimento escolhido para realizar as microinjecções, ou seja, o estágio HH17. Neste estágio, as células dos coxins cardíacos já iniciaram a EMT e as células do miocárdio já estão em um estágio mais avançado de desenvolvimento. Mesmo diante dos dados funcionais *in vivo*, o uso dessa metodologia continua sendo de grande importância para os estudos durante a embriogênese. Uma alternativa talvez fosse a realização das microinjecções em estágios anteriores ao início da EMT, como o estágio HH14. Outro fator que pode estar influenciando a não detecção de alterações morfológicas, após o emprego das diferentes construções virais, é que as células do coração possam estar se utilizando de outros heterodímeros de integrinas.

Um dado importante a se considerar é a expressão da integrina beta 2 durante a formação das válvulas cardíacas, associada ao fato de o seu gene estar localizado em um região do cromossomo 21 relacionado a defeitos cardíacos congênitos (KORENBERG *et al.*, 1992; CAPONE, 2001). Aproximadamente 40% dos indivíduos com Síndrome de Down apresentam defeitos cardíacos congênitos, sendo que a maioria é AVSDs. A taxa de mortalidade nos primeiros anos de vida é de 5 a 8 vezes maior nos indivíduos com Síndrome de Down, em comparação à população geral, sendo que a maioria dos óbitos é devida aos defeitos cardíacos congênitos apresentados por esses indivíduos.

Bons resultados têm sido obtidos, após tratamento cirúrgico em pacientes com Síndrome de Down que apresentam defeitos cardíacos, reduzindo a taxa de mortalidade e, como consequência, aumentando a expectativa de vida até os níveis encontrados na população em geral (VIS *et al.*, 2009).

É conhecido na literatura que leucócitos e timócitos de pacientes com síndrome de Down super-expressam integrina beta 2, fato que pode estar afetando o sistema imune desses indivíduos (TAYLOR *et al.*, 1988; MURPHY *et al.*, 1993). Outros estudos relatam que não há, estatisticamente, diferença significativa nos níveis de expressão de integrina beta 2 entre fetos normais e os com síndrome de Down. (MAKRYDIMAS *et al.*, 1995).

Com base nas observações apresentadas aqui, a expressão aumentada de integrina beta 2 no canal AV de embriões com síndrome de Down poderia afetar etapas críticas de adesão e migração celular que ocorrem na formação inicial das válvulas AV e, por consequência, estar envolvida nos defeitos cardíacos congênitos manifestados por esses indivíduos. Poderíamos supor que ocorreria aumento na taxa de migração das células mesenquimais dos coxins cardíacos em embriões com síndrome de Down; entretanto, não sabemos qual o efeito, em longo prazo, desse fenômeno nos coxins cardíacos. Várias proteínas da matriz extracelular são codificadas por genes localizados no cromossomo 21, proteínas presentes durante o desenvolvimento cardíaco.

O colágeno VI está presente no embrião em desenvolvimento, sendo expresso nas válvulas AV e no septo durante sua formação (KLEWER *et al.*, 1998). Alguns autores concluíram em seus trabalhos que o colágeno VI é mais expresso em corações fetais com síndrome de Down, quando comparados a fetos normais, e esse fato pode estar relacionado aos defeitos cardíacos apresentados por esses pacientes (GITTENBERGER-DE GROOT *et al.*, 2003). O colágeno XVIII/endostatina também é expresso nos coxins do canal AV em pacientes com síndrome de Down, e também pode estar relacionado aos defeitos cardíacos apresentados por esses indivíduos (CARVALHAES *et al.*, 2006). Ainda não foi relatado na literatura se a integrina beta 2 pode se ligar ao colágeno VI e XVIII.

Apesar de sabermos que síndrome de Down é uma doença genética multifatorial, supomos que a expressão aumentada de proteínas da matriz extracelular, juntamente com a integrina beta 2, pode estar afetando a integridade estrutural da matriz na geléia cardíaca e a migração das células mesenquimais. A identificação dos possíveis genes relacionados à geração das características fenotípicas apresentadas por indivíduos com síndrome de Down se faz necessária, pois guiará o desenvolvimento de futuras pesquisas para tratamentos que possam minimizar, ou contrapor os efeitos dessa dosagem gênica. O resultado dessa intervenção precoce poderá, como já vem sendo observado com o aumento da expectativa de vida, ser a melhoria da qualidade de vida dos indivíduos portadores da síndrome de Down.

A identificação das subunidades alfa que formam heterodímero com a integrina beta 2 durante a cardiogênese também foi de grande importância em nosso trabalho. Como citado anteriormente, três das possíveis subunidades alfa que se

associam com a integrina beta 2 foram identificadas. Nos estágios analisados, ou seja, E11.5 e E13.5, as células endoteliais, as mesenquimais e as do miocárdio expressam as subunidades alfa L, M e X. Além de reafirmarem a presença da família da integrina beta 2 durante a cardiogênese, esse dado nos remete a uma possível ação conjunta desses heterodímeros durante a formação do coração, mais especificamente, durante a valvulogênese. Além disso, podemos pesquisar qual dos heterodímeros é mais importante durante uma fase específica da embriogênese. Experimentos futuros que forneçam respostas a esses questionamentos devem ser executados. Apesar de a subunidade alfa D não ter sido pesquisada no nosso trabalho, persiste ainda a dúvida sobre sua possível presença no nosso modelo de estudo.

Sabemos que a integrina beta 2 e seus parceiros alfa são apenas mais uma peça da complexa etapa da organogênese cardíaca. Entendê-los, nos permitirá aprofundar os conhecimentos sobre esse processo embriológico e, talvez, servir de base para se entenderem processos fisiológicos e o aparecimento de doenças por malformações que acometem o coração.

Após análise geral dos dados obtidos a partir da metodologia empregada, concluímos que:

- A integrina beta 2 é expressa durante a cardiogênese pelas células do epicárdio, miocárdio, endocárdio e pelas células mesenquimais dos coxins, que são responsáveis pela morfogênese das futuras válvulas cardíacas em embriões de galinha;
- A integrina beta 2 desempenha função na migração das células endoteliais e mesenquimais em cultura de canal AV;
- A integrina beta 2 participa do processo de EMT;
- A expressão da integrina beta 2 na sua forma completa e dominante negativos, não afeta as taxas de proliferação e apoptose celular, em nosso modelo de estudo,
- A integrina beta 2 nos estudos *in vivo*, e utilizando a metodologia empregada, aparentemente não afetou o processo de cardiogênese em embriões de galinha;

- As subunidades alfa L, alfa M e alfa X, que formam heterodímero com a integrina beta 2, também são expressas durante a formação cardíaca em embriões de camundongo e se localizam nas células endoteliais dos coxins cardíacos, nas células mesenquimais no interior da geléia cardíaca e nas células do miocárdio.

9 REFERÊNCIA

ALBERTS, B. *et al. Molecular Biology of the Cell*. 4^o ed., New York: Garland Science, 2002, 1463 p.

ALCAIDE, P., AUERBACH, S., LUSCINSKAS, F.W. Neutrophil Recruitment Under Shear Flow: It's All About Endothelial Cell Rings And Gaps. *Microcirculation*, v.16, n.1, p.43–57, Jan.2009.

ARNAOUT, M.A., GOODMAN, S.L., XIONG, J.P. Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion. *Current Opinion in Cell Biology*, v.19, p.495-507, 2007.

BERRIER, A.L., MARTINEZ, R., BOKOCH, G.M., LaFLAMME, S.E.. The integrin β tail is required and sufficient to regulate adhesion signaling to Rac1. *Journal of Cell Science*, v.115, p.4285-4291, 2002.

CAMENISCH T.D. *et al.* Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *Journal of Clinical Investigation*, v.106, p.349–360, 2000.

CAPONE, G.T. Down Syndrome: Advances in Molecular Biology and the Neurosciences. *Journal of Developmental and Behavioral Pediatrics*, Baltimore, v.22, n.1, p.40-59, Feb. 2001.

CARVALHAES, L.S., GERVASIO, O.L., GUATIMOSIM, C., HELJASVAARA, R., SORMUNEN, R., PIHLAJANIEMI, T., KITTEN, G.T. Collagen XVIII/endostatin is associated with the epithelial-mesenchymal transformation in the atrioventricular valves during cardiac development. *Developmental Dynamics*, v.235, p.132-42, 2006.

CARVER, W., PRICE, R.L., RASO, D.S., TERRACIO, L., BORG, T.K. Distribution of beta-1 integrin in the developing rat heart. *J Histochem Cytochem*, v.42, n.2, p.167-75, Feb.1994.

CASWELL, P.T., SPENCE, H.J., PARSONS, M., WHITE, D.P., CLARK, K., CHENG, K.W., MILLS, G.B., HUMPHRIES, M.J., MESSENT, A.J., ANDERSON, K.I., McCAFFREY, M.W., OZANNE, B.W., NORMAN, J.C. Rab25 Associates with $\alpha 5\beta 1$ Integrin to Promote Invasive Migration in 3D Microenvironments. *Developmental Cell*, v.13, p.496–510, Oct.2007.

CAVALLARO, U., LIEBNER, S., DEJANA, E. Endothelial cadherins and tumor angiogenesis. *Experimental Cell Research*, v.312, n.5, p.659-667, Mar.2006.

CHAMOUX, E., BOLDUC, L., LEHOUX, J.G., GALLO-PAYET, N. Identification of extracellular matrix components and their integrin receptors in the human fetal

adrenal gland. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.86, p.2090-8, 2001.

CHAVAKIS, E., AICHER, A., HEESCHEN, C., SASAKI, K., KAISER, R., EL MAKHFI, N., URBICH, C., PETERS, T., SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K., ZEIHNER, A.M., CHAVAKIS, T., DIMMELER, S. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *Journal of Experimental Medicine*, v.201, p.63-72, 2005.

CHAPMAN, S.C., COLLIGNON, J., SCHOENWOLF, G.C., LUMSDEN, A. Improved Method for Chick Whole-Embryo Culture Using a Filter Paper Carrier. *Developmental Dynamics*, v.220, p.284-289, 2001.

CHEN, C.C., LAU, F.L. Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, v.41, p.771-783, 2009.

CHEN, J., YANG, W., KIM, M., CARMAN, C.V., SPRINGER, T.A.. Regulation of outside-in signaling and affinity by the $\beta 2$ I domain of integrin $\alpha L\beta 2$. *PNAS*, v.103, n.35, p.13062–13067, Aug.2006.

CHUVA DE SOUSA LOPES, S.M., FEIJEN, A., KORVING, J., KORCHYNSKYI, O., LARSSON, J., KARLSSON, S., TEN DIJKE, P., LYONS, K.M., GOLDSCHMEDING, R., DOEVENDANS, P., MUMMERY, C.L. Connective Tissue Growth Factor Expression and Smad Signaling During Mouse Heart Development and Myocardial Infarction. *Dev Dyn*, v.231, n.3, p.542-50. Nov.2004.

CLARK, E.A., BRUGGE, J.S. Integrin and Signal Transduction Pathways: The Road Taken. *Science*, Washington, v.268, n.5208, p.233-239, Apr.1995.

CORBEL, C., SALAÜN, J. α_{11b} Integrin Expression during Development of the Murine Hematopoietic Systems. *Developmental Biology*, San Diego, v.243, n.2, p.301-311, Mar.2002.

D'AMICO, G., BIANCHI, G., BERNASCONI, S., BERSANI, L., PIEMONTI, L., SOZZANI, S., MANTOVANI, A., ALLAVENA, P. Adhesion, Transendothelial Migration, and Reverse Transmigration of In Vitro Cultured Dendritic Cells. *Blood*, v.92, p.207-214, 1998.

DANEN, E.H.J., SONNENBERG, A.. Integrins in regulation of tissue development and function. *J Pathol*, v.200, p.471–480, 2003.

DARNELL, D.K., SCHOENWOLF, G.C. Culture of avian embryos. *Methods Mol. Biol*, v.135, p.31–38, 2000.

DRAKE, C.J., BRANDT, S.J., TRUSK, T.C., LITTLE, C.D. TAL1/SCL is expressed in endothelial progenitor cells/angioblasts and defines a dorsal-to-ventral gradient of vasculogenesis. *Developmental Biology*, v.192, p.17-30, 1997.

EISENBERG, L.M., MARKWALD, R.R. Molecular Regulation of Atrioventricular Valvuloseptal Morphogenesis. *Circulation Research*, v.77, p.1-6, 1995.

ELICEIRI, B.P. Integrin and Growth Factor Receptor Crosstalk. *Circ Res*, v.89, p.1104-1110, 2001.

FERKOWICZ, M. J., YODER, M.C. Blood island formation: longstanding observations and modern interpretations. *Experimental Hematology*, v.33, p.1041-1047, 2005.

GERVÁSIO, O. Expressão de colágeno VI em gengiva de indivíduos com Síndrome de Down. 2000, 72p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GREEN, L.J., MOULD, A.P., HUMPHRIES, M.J. The integrin β subunit. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Oxford, v.30, n.2, p.179-184, Feb.1998.

GITTENBERGER-DE GROOT, A.C., VRANCKEN PEETERS, M.P., MENTINK, M.M., GOURDIE, R.G., POELMANN, R.E. Epicardium-derived cells contribute a novel population to the myocardial wall and the atrioventricular cushions. *Circ Res*, v.82, n.10, p.1043-52, Jun.1998.

GITTENBERGER-DE GROOT, A.C., BARTRAM, U., OOSTHOEK, P.W., BARTELINGS, M.M., HOGERS, B., POELMANN, R.E., JONGEWAARD, I.N., KLEWER, S.E. Collagen type VI expression during cardiac development and in human fetuses with trisomy 21. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, v.275, n.2, p.1109-16, Dec-2003.

HAMBURGER, V., HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, v.88, 1951.

HAO, Y., CHUN, A., CHEUNG, K., RASHIDI, B., YANG, X. Tumor suppressor LATS1 is a negative regulator of oncogene YAP. *J Biol Chem*, v.283, n.9, p.5496-509, Feb.2008.

HARBURGER, D.S., CALDERWOOD, D.A. Integrin signalling at a glance. *Journal of Cell Science*, v.122, p.159-163, 2009.

HARLER, M.B., WAKSHULL, E., FILARDO, E.J., ALBINA, J.E., REICHNER, J.S. Promotion of Neutrophil Chemotaxis Through Differential Regulation of β_1 and β_2

Integrins. *The Journal of Immunology*, Baltimore, v.162, n.11, p.6792-6799, Jun.1999.

HENDERSON, R.B., LIM, L.H., TESSIER, P.A., GAVINS, F.N., MATHIES, M., PERRETTI, M., HOGG, N. The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice to determine the role of LFA-1, Mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory response of neutrophils. *J Exp Med*, v.194, n.219-26, 2001.

HIERCK, B.P., POELMANN, R.E., IPEREN, L.V., BROUWER, A., GITTENBERGER-DE GROOT, A.C. Differential Expression of $\alpha 6$ and Other Subunits of Laminin Binding Integrins During Development of the Murine Heart. *DEVELOPMENTAL DYNAMICS*, v.206, p.100-111, 1996.

HIXSON, P., SMITH, X.W., SHURIN, S.B., TOS, I.M.F. Unique CD18 mutations involving a deletion in the extracellular stalk region and a major truncation of the cytoplasmic domain in a patient with leukocyte adhesion deficiency type 1. *Blood*, v.103, p.1105-1113, 2004.

HUMPHRIES, J.D., BYRON, A., HUMPHRIES, M.J. Integrin ligands at a glance. *J Cell Sci*, v.119, p.3901-3903, 2006.

HYNES, R.O. Integrins: A Family of Cell Surface Receptors. *Cell*, v.48, p.549-554, 1987.

HYNES, R.O. Integrins: Versatility, Modulation, and Signaling in Cell Adhesion. *Cell*, Cambridge, v.69, n.1, p.11-24, Apr.1992.

HYNES, R.O. Cell adhesion: old and new questions. *Trends in Cell Biology*, Cambridge, v.9, n.12, p.M33-M37, Dec.1999.

HYNES, R.O. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell*, v.110, p.673-687, 2002.

HOGG, N., BATES, P.A. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biology*, Stuttgart, v.19, n.3, p.211-222, Jul.2000.

JAFFREDO, T., NOTTINGHAM, W., LIDDIARD, K., BOLLEROT, K., POUGET, C., de BRUIJN, M. From hemangioblast to hematopoietic stem cell: An endothelial connection? *Experimental Hematology*, v.33, p.1029-1040, 2005a.

JAFFREDO, T., BOLLEROT, K., SUGIYAMA, D., GAUTIER, R. & DREVON, C. Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *International Journal Dev. Biology*, v.49, p.269-277, 2005b.

JANES, S.M., WATT, F.M. New roles for integrins in squamous cell carcinoma. *Nature Reviews/Cancer*, v.6, p.175-183, 2006.

KARMAKAR, S., MUKHERJEE, R. Integrin receptors and ECM proteins involved in preferential adhesion of colon carcinoma cells to lung cells. *Cancer Letters*, Amsterdam, v.196, n.2, p.217-227, Jul.2003.

KITTEN, G.T., MARKWALD, R.R., BOLENDER, D.L. Distribution of basement membrane antigens in cryopreserved early embryonic hearts. *Anatomical Records*, v.217, p.379-90, 1987.

KLEWER, S.E., KROB, S.L., KOLKER, S.J., and KITTEN, G.T. Expression of type VI collagen in the developing mouse heart. *Developmental Dynamics*, v.211, p.248-255, 1998.

KORN, M.J., CRAMER, K.S. Windowing chicken eggs for developmental studies. *J Vis Exp*, v.8, p.306, Oct.2007.

LANGEGGEN, H., BERGE, K. E., JONHSON, E., HETLAND, G. Human Umbilical Vein Endothelial Cells Express Complement Receptor 1 (CD35) and Complement Receptor 4 (CD11c/CD18) *in vitro*. *Inflammation*, New York, v.26, n.3, p.103-110, Jun.2002.

LEASK, A., HOLMES, A., BLACK, C.M., ABRAHAM, D.J. Connective Tissue Growth Factor Gene Regulation: requirements for its induction by transforming growth factor- β 2 in fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, v.278, n.15, p.13008–13015, Apr.2003.

LEBER, S.M., YAMAGATA, M., SANES, J.R. Gene Transfer Using Replication-Defective Retroviral and Adenoviral Vectors. *Methods in Cell Biology*, v.51, p.161-183, 1996.

LEE, K.K., DE REPENTIGNY, Y., SAULNIER, R., RIPPSTEIN, P., MACKLIN, W.B., KOTHARY, R. Dominant negative beta1 integrin mice have region-specific myelin defects accompanied by alterations in MAPK activity. *Glia*, v.53, p.836-44, 2006

LEGATE, K.R., WICKSTRÖM, S.A., FÄSSLER, R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev*, v.23, p.397-418, 2009.

LEU, S.T., JACQUES, S.A., WINGERD, K.L., HIKITA, S.T., TOLHURST, E.C., PRING, J.L., WISWELL, D., KINNEY, L., GOODMAN, N.L., JACKSON, D.Y., CLEGG, D.O. Integrin alpha4beta1 function is required for cell survival in developing retina. *Developmental Biology*, v.276, p.416-430, 2004.

LISHKO, V.K., YAKUBENKO, V.P., UGAROVA, T.P. The interplay between integrins $\alpha_m\beta_2$ and $\alpha_5\beta_1$ during cell migration to fibronectin. *Experimental Cell Research*, New York, v.283, n.1, p.116-126, Feb.2002.

LITTLE, C.D., RONGISH, B.J. The extracellular matrix during heart development. *Experientia*, v.51, p.873-82, 1995.

LIU, J., HE, X., CORBETT, S.A., LOWRY, S.F., GRAHAM, A.M., FÄSSLER, R., LI, S. Integrins are required for the differentiation of visceral endoderm. *Journal of Cell Science*, v.122, p.233-242, 2009.

LIU, S., CALDERWOOD, D.A., GINSBERG, M.H. Integrin cytoplasmic domain-binding proteins. *Journal of Cell Science*, Colchester, v.113, n.20, p.3563-3571, Oct.2000.

LLIC, D., DAMSKY, C.H. Integrin signalling: it's where the action is. *Current Opinion in Cell Biology*, London, v.14, n.5, p.594-602, Oct.2002.

LORGER, M., KRUEGER, J.S., O'NEAL, M., STAFLIN, K., FELDING-HABERMANN, B. Activation of tumor cell integrin $\alpha_v\beta_3$ controls angiogenesis and metastatic growth in the brain. *PNAS*, vol.106, n.26, p.10666-10671, Jun.2009.

LUB, M., VAN VLIET, S.J., OOMEN, S.P., PIETERS, R.A., ROBINSON, M., FIGDOR, C.G., VAN KOOYK, Y. Cytoplasmic tails of beta 1, beta 2, and beta 7 integrins differentially regulate LFA-1 function in K562 cells. *Molecular Biology of the Cell*, vol.8, p.719-728, Apr.1997.

LUO, B.H., CARMAN, C.V., SPRINGER, T.A. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual Review Immunology*, v.25, p.619-47, 2007.

MAITRA, N., FLINK, I.L., BAHL, J.J., MORKIN, E. Expression of alpha and beta integrins during terminal differentiation of cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, v.47, p.715-725, 2000.

MAKRYDIMAS, G., THILAGANATHAN, B., PLACHOURAS, N., NICOLAIDES, K.H. Neutrophil and monocyte beta 2-integrin expression in trisomic fetuses. *Prenatal Diagnosis*, v.15, p.325-327, 1995.

MANCUSO, M.R., KUHNERT, F., KUO, C.J. Developmental Angiogenesis of the Central Nervous System. *Lymphat Res Biol*, v.6, n.3-4, p.173-180, 2008.

McDOWALL, A., INWALD, D., LEITINGER, B., JONES, A., LIESNER, R., KLEIN, N., Hogg, N. A novel form of integrin dysfunction involving β_1 , β_2 , and β_3 integrins. *J. Clin. Invest*, v.111, p.51-60, 2003.

MARKWALD, R.R., RUNYAN, R.B., KITTEN, G.T., FUNDERBURG, F.M., BERNANKE, D.H., BRAUER, P.R. Use of collagen gel cultures to study heart development: proteoglycan and glycoprotein interactions during formation of endocardial cushion tissue. In: Trelstad RL, editor. *The role of extracellular matrix in development*. New York: Alan R. Liss, Inc. p 323–350, 1984.

MARTINSEN, B.J. Reference Guide to the Stages of Chick Heart Embryology. *Developmental Dynamics*, v.233, p.1217-1237, 2005.

MEIGHAN, C.M., SCHWARZBAUER, J.E. Temporal and spatial regulation of integrins during development. *Current Opinion Cell Biology*, v.20, p.520-4, 2008.

MILNER, R., CAMPBELL, I.L. The Integrin Family of Cell Adhesion Molecules has Multiple Functions Within the CNS. *Journal of Neuroscience Research*, New York, v.69, n.3, p.286-291, Aug.2002.

MIURA, Y., MIURA, M., GRONTHOS, S., ALLEN, M.R., CAO, C., UVEGES, T.E., BI, Y., EHIRCHIOU, D., KORTESIDIS, A., SHI, S., ZHANG, L. Defective osteogenesis of the stromal stem cells predisposes CD18-null mice to osteoporosis. *PNAS, USA*, v.102, p.14022-7, 2005.

MO, F-E, LAU, L.F. The matricellular protein Ccn1 is essential for cardiac development. *Circ Res*, v.99, p.961-969, 2006.

MOORE, K. L., PERSAUD, T. V. N. *The Developing Human*. 6.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1998, p. 349-404.

MORGAN, B.A., FEKETE D.M. Manipulating Gene Expression with Replication-Competent Retroviruses. *Methods in Cell Biology*, v.51, p.185-218, 1996.

MURPHY, M., INSOFT, R.M., PIKE-NOBILE, L., DERBIN, K.S., EPSTEIN, L.B. Overexpression of LFA-1 and ICAM-1 in Down Syndrome Thymus. *The Journal of Immunology*, Baltimore, v.150, n.12, p.5696-5703, Jun.1993.

NIETO, M.A., PATEL, K., WILKINSON, D.G. *In Situ* Hybridization Analysis of Chick Embryos in Whole Mount and Tissue Sections. *Methods in Cell Biology*, v.51, p.219-235, 1996.

NISHIGAKI, R., SHINOHARA, T., TODA, T., OMORI, A., ICHINOSE, S., ITOH, M., SHIRAYOSHI, Y., KURIMASA, A. & OSHIMURA, M. An extra human chromosome 21 reduces mlc-2a in chimeric mice and Down Syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.295, p.112-118, 2002.

NORTH, T.E., BRUIJIN, M.F.T.R., STACY, T., TALEBIAN, L., LIND, E., ROBIN, C., BINDER, M., DZIERZAK, E., SPECK, N.A. Runx1 Expression marks long term

repopulating Hematopoietic Stem Cells in the Midgestation Mouse Embryo. *Immunity*, Cambridge, v.16, n.5, p.661-672, May, 2002.

OGUEY, D., GEORGE, P.W., RUEGG, C. Disruption of integrin-dependent adhesion and survival of endothelial cells by recombinant adenovirus expressing isolated beta integrin cytoplasmic domains. *Gene Therapy*, v.7, p.1292-303, 2000.

OLIVEIRA, L.A.M, KITTEN, G.T. Expressão de integrina beta 2 durante a cardiogênese. 2004. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PALAZZO, A.J., JONES, S.P., GIROD, W.G., ANDERSON, D.C., GRANGER, D.N., LEFER, D.J. Myocardial ischemia-reperfusion injury in CD18- and ICAM-1- deficient mice. *American Journal of Physiology*, Baltimore, v.275, n.6, p.H2300-H2307, Dec. 1998.

PEACOCK, J.D., LU, Y., KOCH, M., KADLER, K.E., LINCOLN, J. Temporal and spatial expression of collagens during murine atrioventricular heart valve development and maintenance. *Developmental Dynamics*, v.237, p.3051-3058, 2008.

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

PERSON, A.D., KLEWER, S.E., RUNYAN, R.B.. Cell biology of cardiac cushion development. *International Review of Cytology*, v.243, p.287–335, 2005b.

PESHO, M.M., BLEDZKA, K., MICHALEC, L., CIERNIEWSKI, C.S., PLOW, E.F. The Specificity and Function of the Metal-binding Sites in the Integrin $\beta 3$ A-domain. *The Journal Of Biological Chemistry*, v.281, n.32, p.23034–23041, Aug.2006.

PELLINEN, T., IVASKA, j. Integrin traffic. *Journal of Cell Science*, v.119, p.3723-3731, 2006.

PIWKO-CZUCHRA, A., KOEGEL, H., MEYER, H., BAUER, M., WERNER, S., BRAKEBUSCH, C., FASSLER, R. $\beta 1$ Integrin-Mediated Adhesion Signalling Is Essential for Epidermal Progenitor Cell Expansion. *PLoS ONE*, v.4, n.5, p.e5488, 2009.

PYSZNIAK, A.M., CARPENITO, C., TAKEI, F. The Role of LFA-1 (CD11a/CD18) Cytoplasmic Domains in Binding to Intercellular Adhesion Molecule-1 (CD54) and in Postreceptor Cell Spreading. *Experimental Cell Research*, v.233, p.78–87, 1997.

RANSOM, D.G., HENS, M.D., DeSIMONE, D.W. Integrin Expression in Early Amphibian Embryos: cDNA Cloning and Characterization of *Xenopus* β_1 , β_2 , β_3 e β_6 Subunits. *Developmental Biology*, San Diego, v.160, n.1, p.265-275, Nov.1993.

REY-LADINO, J.A., PYSZNIAK, A.M., TAKEI, F. Dominant-negative effect of the Lymphocyte Function-Associated Antigen-1 β (CD18) cytoplasmic domain on leukocyte adhesion to ICAM-1 and fibronectin. *Journal. of Immunology*, v.160, p.3494-3501, 1998.

ROCHON, Y.P., KAVANAGH, T.J. & HARLAN, J.M. Analysis of integrin (CD11b/CD18) movement during neutrophil adhesion and migration on endothelial cells. *Journal of Microscopy*, Oxford, v.197, n.1, p.15-24, Jan. 2000.

ROOTE, C.E., ZUSMAN.S. Functions for PS Integrin in Tissue Adhesion, Migration and Shape changes during Early Embryonic Development in *Drosophila*. *Developmental Biology*, San Diego, v.169, n.1, p.322-336, May, 1995.

ROSE, D.M., ALON, R., GINSBERG, M.K. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunological Reviews*, v.218, p.126–134, 2007.

ROSS, R.S., BORG, T.K. Integrins and the Myocardium. *Circ Res*, v.88, p.1112-1119, 2001.

RUNYAN, R.B., MARKWALD, R.R. Invasion of mesenchyme into three-dimensional collagen gels: A regional and temporal analysis of interaction in embryonic heart tissue. *Developmental Biology*, v.95, p.108-114, 1983.

SADHU, C., TING, H.J., LIPSKY, B., HENSLEY, K., GARCIA-MARTINEZ, L.F., SIMON, S.I., STAUNTON, D.E. CD11c/CD18: novel ligands and a role in delayed-type hypersensitivity. *Journal of Leukocyte Biology*, v.81, n.6, p.1395-403, Jun.2007.

SADLER, T.W. *Langman's Medical Embriology*. 7.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995, p. 183-231.

SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K., LU, H., NORMAN, K., van NOOD, N., MUNOZ, F., GRABBE, S., McARTHUR, M., LORENZO, I., KAPLAN, S., LEY, K., SMITH, C.W., MONTGOMERY, C.A., RICH, S., BEAUDET, A.L. Spontaneous skin ulceration and defective T cell function in CD18 null mice. *J Exp Med*, v.188, p.119-31, 1998.

SCHOBBER, J.L., LAU, L.F., UGAROVA, T.P., LAM, S.C-T. Identification of a Novel Integrin $\alpha M\beta 2$ Binding Site in CCN1 (CYR61), a Matricellular Protein Expressed in Healing Wounds and Atherosclerotic Lesions. *The Journal Of Biological Chemistry*, v.278, n.28, p.25808–25815, Jul.2003.

SENGBUSCH, J.K., HE, W., PINCO, K., Yang, J.T. Dual functions of $\alpha 4\beta 1$ integrin in epicardial development: initial migration and long-term attachment. *The Journal of Cell Biology*, v.157, n.5, May, 2002.

SEVERSON, E.A., LEE, W.Y., CAPALDO, C.T., NUSRAT, A., PARKOS, C.A. Junctional Adhesion Molecule A Interacts with Afadin and PDZ-GEF2 to Activate Rap1A, Regulate $\beta 1$ Integrin Levels and Enhance Cell Migration. *Molecular Biology of the Cell*, v.20, p.1916–1925, Apr.2009.

SHINOHARA, T., TOMIZUKA, K., MIYABARA, S., TAKEHARA, S., KAZUKI, Y., INOUE, J, KATOH, M., NAKANE, H., IINO, A., OHGUMA, A., IKEGAMI, S., INOKUCHI, K., ISHIDA, I., REEVES, R. H., OSHIMURA, M. Mice containing a human chromosome 21 model behavioral impairment and cardiac anomalies of Down's syndrome. *Human Molecular Genetics*, Oxford, v.10, n.11, p.1163-1175, May, 2001.

SIMPSON, D.G., REAVES, T.A., SHIH, D., BURGESS, W., BORG, T.K., TERRACIO, L. Cardiac Integrins: The ties that bind. *Cardiovascular Pathology*, v.7, p.135-143, 1998.

SKALSKI, M., ALFANDARI, D., DARRIBERE, T. A Key function for α_v containing integrins in Mesodermal Cell migration during *Pleurodeles waltl* gastrulation. *Developmental Biology*, San Diego, v.195, n.2, p.158-173, Mar.1998.

SOUZA, L.C.M. Colágeno XVIII em Coração e Síndrome de Down. 2001, 107p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*, v.76, p.301–314, 1994.

STREULI, C.H. Integrins and cell-fate determination. *Journal of Cell Science*, v.122, p.171-177, 2009.

TAN, S., HYLAND, R.H., AL-SHAMKHANI, A., DOUGLASS, W.A., SHAW, J.M., ALEX LAW, S.K. Effect of integrin beta 2 subunit truncation of LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) assembly, surface expression and function. *Journal. of Immunology*, v.165, p.2574-2581, 2000.

TANG, C-H., HILL, M.L., BRUMWELL, A.N., CHAPMAN, H.A., WEI,Y. Signaling through urokinase and urokinase receptor in lung cancer cells requires interactions with $\beta 1$ integrins. *Journal of Cell Science*, v.121, p.3747-3756, 2008.

TANG, X-Y., LI, Y-F., TAN, S-M. Intercellular Adhesion Molecule-3 Binding of Integrin α L β 2 Requires Both Extension and Opening of the Integrin Headpiece. *The Journal of Immunology*, v.180, p.4793–4804, 2008.

TAVARES, A.L.P., MERCADO-PIMENTEL, M.E., RUNYAN, R.B., KITTEN, G.T. TGF β -Mediated RhoA Expression Is Necessary for Epithelial-Mesenchymal Transition in the Embryonic Chick Heart. *Developmental Dynamics*, v.235, p.1589–1598, 2006.

TAYLOR, G.M., WILLIAMS, A., D'SOUZA, S.W., FERGUSSON, W.D., DONNAI, D., FENNELL, J., HARRIS, R. The expression of CD18 is increased on Trisomy 21 (Down syndrome) lymphoblastoid cells. *Clinical Experimental Immunology*, v.71, p.324-328, 1988.

VALLEJO-ILLARRAMENDI, A., ZANG, K., REICHARDT, L.F. Focal adhesion kinase is required for neural crest cell morphogenesis during mouse cardiovascular development. *J. Clin. Invest.*, v.119, p.2218–2230, 2009.

VAN DER FLIER, A., SONNENBERG A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Research*, v.305, p.285-98, 2001.

VIS, J.C., DUFFELS, M.G., WINTER, M.M., WEIJERMAN, M.E., COBBEN, J.M., HUISMAN, S.A., MULDER, B.J. Down syndrome: a cardiovascular perspective. *J Intellect Disabil Res*, v.53, n.5, p.419-425, May-2009.

VISCONTI, R.P., EBHARA, Y., LARUE, A.C., FLEMING, P.A., MCQUINN, T.C., MASUYA, M., MINAMIGUCHI, H., MARKWALD, R.R., OGAWA, M. & DRAKE, C.J. An In Vivo Analysis of Hematopoietic Stem Cell Potential: Hematopoietic Origin of Cardiac Valve Interstitial Cells. *Circ Res*, v.98, p.690-696, 2006.

WEBB, D.J., PARSONS, T., HORWITZ, A.F. Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells – over and over and over again. *Nature Cell biology*, London, v.4, p.E97-E100, Apr.2002.

YAKUBENKO, V.P., LISHKO, V.K., LAM, S.C., UGAROVA, T.P. A molecular basis for integrin alphaMbeta 2 ligand binding promiscuity. *Journal of Biological Chemistry*, v.277, n.50, p.48635-48642, 2002.

YAKUBENKO, V.P., BELEVYCH, N., MISHCHUK, D., SCHURIN, A., LAM, S.C., UGAROVA, T.P. The role of integrin alpha D beta2 (CD11d/CD18) in monocyte/macrophage migration. *Exp Cell Res*, v.314, p.2569-2578, 2008.

ZAMBIDIS, E.T., OBERLIN, E., TAVIAN, M., & PE'AULT, B. Blood-Forming Endothelium in Human Ontogeny: Lessons From In Utero Development and Embryonic Stem Cell Culture. *Trends Cardiovascular Med*, v.16, p.95–101, 2006.