Caracterização da expressão de *WFDC1* durante o desenvolvimento cardíaco de embriões de galinha (*Gallus gallus*)

Palavras-Chave: Desenvolvimento cardíaco, Embrião de galinha, WFDC1

Autores(as):

Erika Track Martins, IB - Unicamp

Thaís Metzker Pinto, IB - Unicamp

Jórdan Fares Sampar, IB - Unicamp

Igor Buzzatto Leite, IB - Unicamp

Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares (orientadora), IB - Unicamp

INTRODUÇÃO

O gene *WFDC1* codifica a proteína ps20, uma proteína de matriz extracelular pertencente à família *Whey Acidic Protein* (WAP). Os membros dessa família compartilham o domínio *WAP Four-Disulfide Core* (WFDC), altamente conservado entre espécies, e estão frequentemente associados à inibição de proteases, à resposta imune e à reparação tecidual. Para além dessas funções gerais, *WFDC1* também tem sido implicado na regulação de processos celulares fundamentais, como migração, adesão e proliferação (RESSLER & ROWLEY, 2011), sugerindo um papel mais amplo na dinâmica e organização dos tecidos.

Com base nessas propriedades, o gene tem sido considerado um possível regulador de processos do desenvolvimento embrionário. Sua expressão foi observada em tecidos como o sistema nervoso e o olho durante o desenvolvimento e a vida adulta em mamíferos (JENSEN et al., 2019; ABBASI et al., 2009). No entanto, camundongos nocaute não apresentam alterações fenotípicas evidentes (RESSLER et al., 2014). Por outro lado, bovinos com mutações em *WFDC1* exibem defeitos oculares (ABASI et al., 2009), sugerindo funções contexto-dependentes. Para investigar esse cenário, recentemente nosso grupo de pesquisa analisou a expressão de *WFDC1* em embriões de galinha e camundongo, identificando domínios de expressão conservados, como o olho, e regiões de expressão específicas, como o átrio cardíaco de embriões de galinha (METZKER-PINTO et al., 2025).

Em especial, esse padrão específico de expressão no coração ganha relevância à luz de estudos que associam *WFDC1* a condições cardiovasculares. Em modelo murino com hipertrofia cardíaca, sua expressão está significativamente aumentada, e em casos de falência cardíaca, o gene está entre os mais expressos no tecido comprometido (DWYER et al., 2008; LU et al., 2012). Nesse contexto, compreender as funções e padrão fisiológico de expressão do gene estabelecidos durante o desenvolvimento embrionário pode auxiliar no entendimento de seu papel no contexto patológico.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão espacial e temporal de *WFDC1* durante o desenvolvimento cardíaco em embriões de galinha, como um primeiro passo para entender como seus padrões fisiológicos de expressão podem se relacionar aos mecanismos envolvidos em patologias cardíacas.

METODOLOGIA

a. COLETA DOS CORAÇÕES

Embriões de galinha nos estádios E05, E06, E07, E08 e E10 foram retirados do ovo e tiveram o coração removido. A escolha dos estádios foi baseada a partir da identificação do início da detecção de *WFDC1* em ensaios anteriores, com 5.5 dias de desenvolvimento. Para a remoção do excesso de sangue, os corações foram lavados com heparina morna (50 mg/ml).

b. PCR SEMI-QUANTITATIVA

A extração de RNA total foi realizada com o protocolo empregando TRIzol e clorofórmio. A síntese de cDNA de cada fase do desenvolvimento utilizou o kit "*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*". Para a PCR, foram usados primers específicos para o *WFDC1* e a beta-actina, sendo esta última o controle experimental por ser um gene constitutivamente expresso. Durante a amplificação**,** foram retiradas alíquotas no final do 15º, 20º, 25º e 30º ciclo da PCR. Essas alíquotas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose para o acompanhamento da amplificação e análise de abundância relativa do gene em comparação ao controle.

c. HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU WHOLE-MOUNT*

A hibridização *in situ* foi realizada com sonda antissenso para *WFDC1*, sintetizada a partir do cDNA de galinha, conforme protocolo de Álvares et al. (2009). As amostras foram imageadas em estereomicroscópio.

d. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os cortes parafinados de corações em desenvolvimento (E07, E08 e E10) foram processados para imunofluorescência com recuperação do antígeno em citrato de sódio. As lâminas foram incubadas com anticorpos primários anti-*WFDC1* e anti-pan-caderina, seguidos de anticorpos secundários fluorescentes e DAPI para marcação nuclear. Os controles negativos receberam apenas PBS. As lâminas foram montadas com Vectashield e analisadas em microscópio confocal de fluorescência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise por PCR, foi possível visualizar, de forma semi-quantitativa, a abundância relativa de *WFDC1* durante o desenvolvimento cardíaco em embriões de galinha. A detecção do gene a partir do 25º ciclo, em contraste com a beta-actina, já visível no 20° ciclo, sugere que *WFDC1* apresenta uma expressão substancialmente menor, compatível com um gene expresso em subpopulações celulares específicas. Além disso, a presença de *WFDC1* em todos os estádios embrionários analisados indica uma expressão contínua ao longo do desenvolvimento.

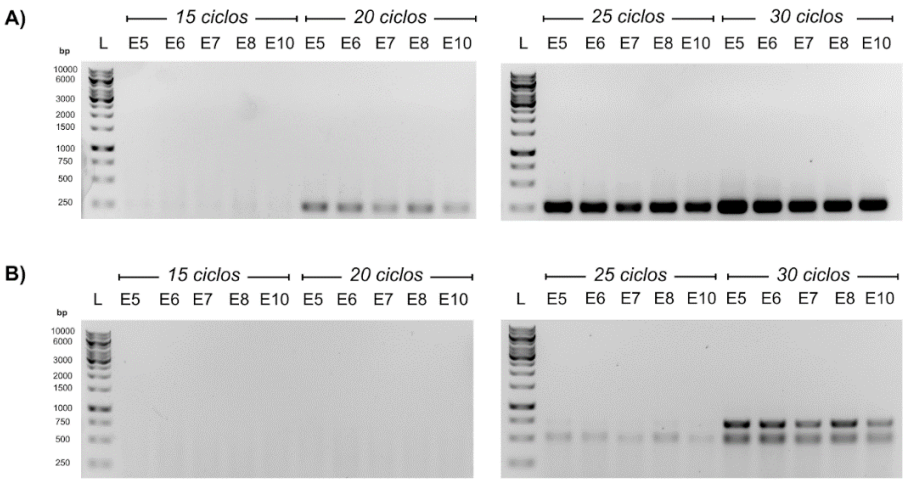


Figura 1. (A) Resultados da PCR semi quantitativa para a beta-actina. (B) Resultados da PCR semi-quantitativa para o gene WFDC1. Acima estão indicados o marcador de peso molecular ("L") e os dias de desenvolvimento cardíaco aos quais se referem as amostras: E5 - 5 dias; E6 - 6 dias; E7 - 7 dias; E8 - 8 dias; E10 - 10 dias. Na barra superior, estão indicados os ciclos da PCR em que cada conjunto de amostras foi coletado.

Como forma de complementar a análise e compreender melhor a distribuição espacial dessa expressão, utilizamos a técnica de hibridização *in situ,* que revelou padrões distintos de marcação conforme o estádio analisado. No embrião de 5 dias, a expressão foi mais evidente no átrio e na região de saída dos grandes vasos, enquanto aos 6 dias o sinal se concentrou principalmente no ventrículo. Esse padrão reforça a ideia de que a expressão de *WFDC1* é regulada espacial e temporalmente, sugerindo uma possível atuação do gene na morfogênese específica dessas estruturas cardíacas.

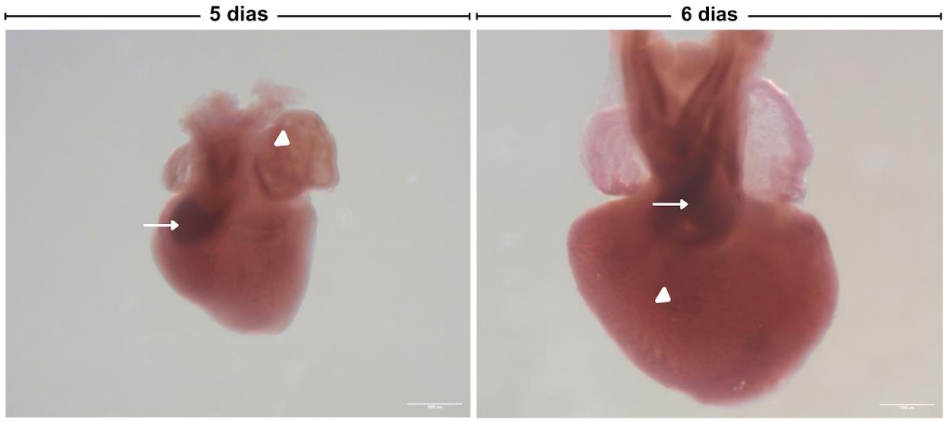
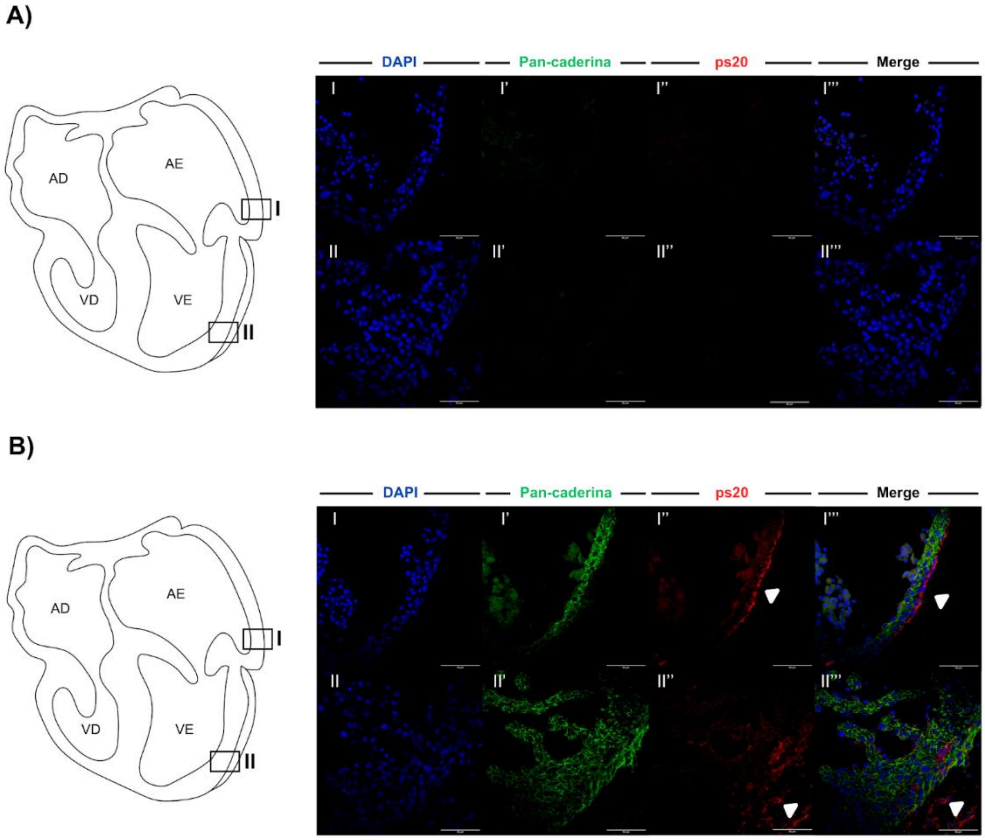


Figura 2. Expressão de WFDC1 em corações de embriões de galinha nos estádios de 5 e 6 dias de desenvolvimento, analisada por hibridização in situ. Os estádios embrionários estão indicados na barra superior. Seta branca: marcação na região de saída dos grandes vasos. Cabeça de seta: região com maior intensidade de expressão em cada estágio (átrio aos 5 dias e ventrículo aos 6 dias).

Nos estádios mais avançados (7 a 10 dias), a hibridização *in situ* mostrou-se limitada devido à dificuldade de penetração da sonda em tecidos mais densos. Para contornar essa limitação, empregamos imunofluorescência em cortes histológicos, que permitiu detectar indiretamente a expressão gênica por meio da análise da distribuição da proteína ps20. Do 7º ao 10º dia de desenvolvimento, observamos marcação no epicárdio de átrios e ventrículos, bem como ao redor das trabéculas ventriculares, possivelmente no endocárdio. Além disso, notamos marcações pontuais ao longo do miocárdio ventricular, que se tornam progressivamente mais intensas ao longo dos dias.



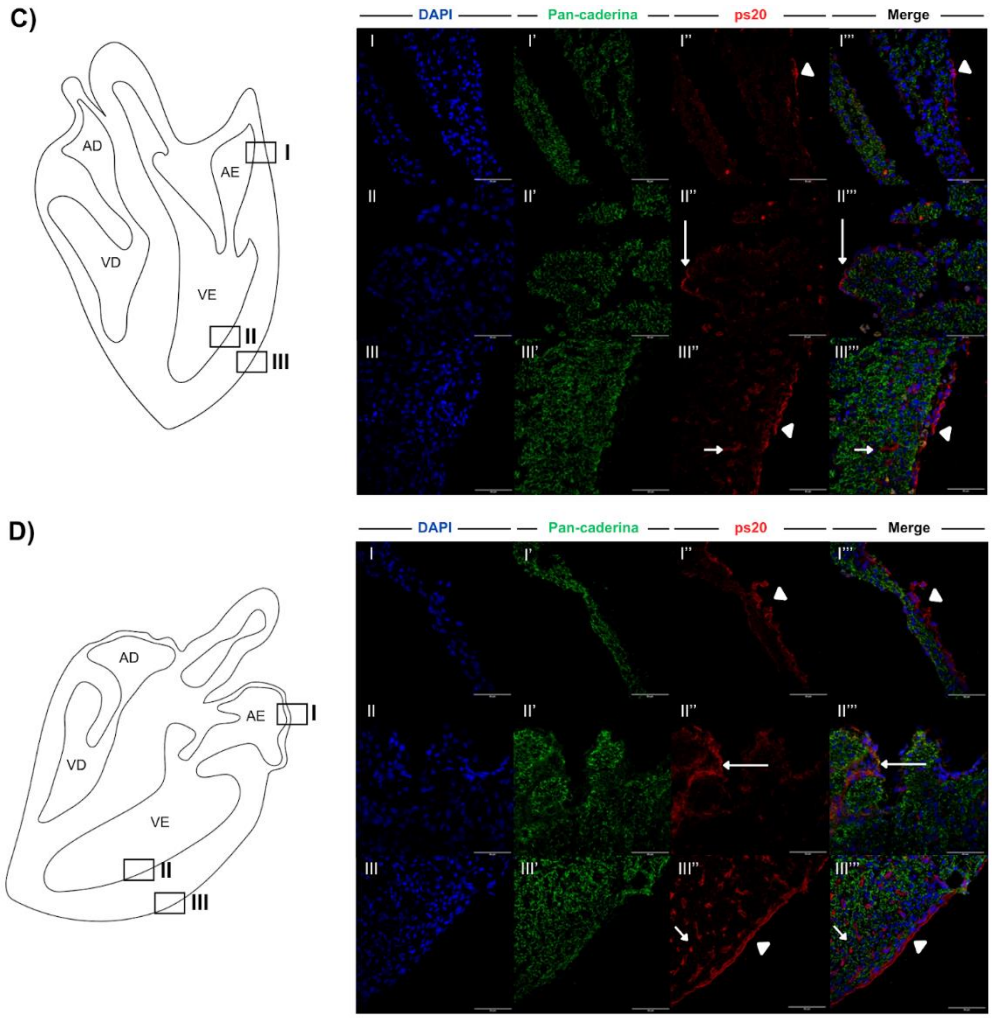


Figura 3. Detecção da proteína ps20 por imunofluorescência em corações de embriões de galinha com 7, 8 e 10 dias de desenvolvimento. (A) Controle negativo com coração de 7 dias não submetido à incubação com anticorpo primário. (B–D) Corações de 7 (B), 8 (C) e 10 (D) dias de desenvolvimento. À esquerda, esquemas representando o corte histológico com indicação das câmaras cardíacas (AD: átrio direito; AE: átrio esquerdo; VD: ventrículo direito; VE: ventrículo esquerdo). As regiões numeradas (I–III) correspondem às áreas de onde foram obtidas as imagens mostradas à direita. As imagens de imunofluorescência estão organizadas conforme a numeração dos esquemas e apresentam os canais de DAPI (em azul, marcador nuclear), pan-caderina (em verde, marcador de membrana), ps20 (em vermelho) e a imagem composta (merge). Cabeça de seta: marcação no epicárdio; Seta curta: pontuações no miocárdio ventricular; Seta longa: marcação no endocárdio.

Cabe destacar que as regiões marcadas na imunofluorescência são áreas de intensa proliferação e diferenciação celular durante a formação do coração. Assim, a presença da ps20 nesses compartimentos, somada aos seus papéis previamente descritos na regulação da proliferação celular (RESSLER & ROWLEY, 2011), levanta a hipótese de que o gene possa atuar em vias de sinalização que modulam o equilíbrio entre proliferação e diferenciação celular durante a morfogênese cardíaca.

Adicionalmente, a marcação observada no epicárdio é especialmente relevante, considerando que essa camada origina células que, por meio de transições epitélio-mesenquimais (EMT), contribuem para a formação do miocárdio e das artérias coronárias. Assim, a identificação de ps20 no epicárdio e no miocárdio sugere a participação do gene em vias envolvidas nesse processo, o que é reforçado por estudos que apontam seu envolvimento na regulação da adesão e migração celular (RESSLER & ROWLEY, 2011), eventos diretamente associados à EMT.

Embora os dados apresentados ainda não permitam conclusões definitivas sobre o papel funcional de *WFDC1*, eles indicam sua possível participação em processos relacionados à organização e remodelamento do tecido cardíaco em desenvolvimento, coerentes com o envolvimento do gene em doenças cardíacas associadas a alterações morfológicas e funcionais do coração (DWYER et al., 2008; LU et al., 2012).

CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O gene *WFDC1* é expresso de forma contínua no coração de embriões de galinha, com sítios de expressão específicos que sugerem uma atuação na formação e organização dos tecidos cardíacos em desenvolvimento. Em conjunto, nossos dados indicam que o gene pode estar envolvido na modulação de vias de sinalização associadas à adesão, proliferação e migração celular. Apesar disso, novos estudos são necessários para elucidar seus mecanismos de ação e confirmar seu papel funcional durante a morfogênese cardíaca. Como próximos passos, pretendemos realizar ensaios quantitativos de expressão gênica para caracterizar com maior precisão a modulação de *WFDC1* ao longo do desenvolvimento embrionário. Além disso, planejamos utilizar abordagens funcionais, como a superexpressão gênica, que já conta com protocolo bem estabelecido no laboratório, para investigar os efeitos da modulação de *WFDC1* na formação cardíaca.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, A. R. et al. A mutation of the WFDC1 gene is responsible for multiple ocular defects in cattle. **Genomics**, v. 94, n. 1, p. 55–62, 15 abr. 2009.

ALVARES, L. E. et al. Chicken dapper genes are versatile markers for mesodermal tissues, embryonic muscle stem cells, neural crest cells, and neurogenic placodes. **Developmental Dynamics**, v. 238, n. 5, p. 1166–1178, maio 2009.

DWYER, J. P. et al. Myocardial Gene Expression Associated with Genetic Cardiac Hypertrophy in the Absence of Hypertension. **Hypertension Research**, v. 31, n. 5, p. 941–955, 2008.

JENSEN, L. D. et al. Disruption of the Extracellular Matrix Progressively Impairs Central Nervous System Vascular Maturation Downstream of β-Catenin Signaling. Arteriosclerosis, **Thrombosis and Vascular Biology**, v. 39, n. 7, p. 1432–1447, jul. 2019.

LU, B. et al. Identification of hypertrophy and heart failure-associated genes by combining in vitro and in vivo models. **Physiological Genomics**, v. 44, n. 8, p. 443–454, 15 abr. 2012.

METZKER-PINTO, T. et al. The chicken embryo brings new insights into the evolutionary role of WFDC1 during amniote development. **Developmental Biology**, v. 521, p. 96–107, 11 fev. 2025.

RESSLER, S. J. et al. WFDC1 Is a Key Modulator of Inflammatory and Wound Repair Responses. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 11, p. 2951–2964, nov. 2014.

RESSLER, S. J.; ROWLEY, D. R. The WFDC1 gene: role in wound response and tissue homoeostasis. **Biochemical Society Transactions,** v. 39, n. 5, p. 1455–1459, out. 2011.