ALLYSSON COELHO SAMPAIO

**REGULAÇÃO MOLECULAR DA EXPRESSÃO ATRIAL- ESPECÍFICA
DO GENE SMyHC3**

Tese apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e do Desenvolvimento do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular
e Tecidual

Orientador: Prof. Dr. José Xavier Neto

São Paulo
2010

RESUMO

Sampaio AC. Regulação Molecular da Expressão Atrial Específica do Gene SMyHC3 [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

Para elucidar as vias genéticas controlando a formação das câmaras cardíacas, foi analisada a regulação do promotor atrial-específico do gene de codorna que codifica a isoforma lenta da cadeia pesada de miosina (slow myosin heavy chain 3 - SMyHC3). Em camundongos transgênicos, a expressão atrial-específica dos 840 pb do promotor SMyHC3 fundido ao gene repórter da fosfatase alcalina (HAP), SMyHC3-HAP, é controlada pelos 72 pb mais distais deste promotor. Este fragmento contém sítios putativos para ligação a receptores nucleares os quais foram denominados ECRRN (elemento complexo de resposta a receptores nucleares), definidos por modelagem molecular. Tratamento de embriões SMyHC3-HAP com ácido retinoico (AR) expande o domínio atrial de expressão do transgene, enquanto que a inibição da via de sinalização por AR reduz o domínio de expressão do transgene. Ensaio de gel *shift* revelam que os receptores de AR, RAR/RXR se ligam fracamente a esse promotor. Também, esses receptores não ativam o promotor SMyHC3 em experimentos de transfecção transiente, mesmo na presença de coativadores, tais como p300, CBP e GRIP1. Isso sugere a participação indireta de AR na regulação deste marcador atrial. Ensaio de transfecção celular demonstram que COUPTF2 é capaz de ativar o promotor SMyHC3 e, siRNA contra COUPTF2 inibe esta transativação. Embriões tratados com AR apresentam um aumento geral da expressão de COUPTF2, reforçando a idéia de que AR age indiretamente ativando este gene. Estudos de bioinformática revelam que o ECRRN está presente na região 3' do gene AMHC1 de galinha e alinhamentos indicam que pode se tratar de um elemento móvel que pode ter sido adquirido por um evento de exaptação. Em resumo, COUPTF2 e AR controlam a expressão do promotor SMyHC3, porém a natureza da relação entre os 2 elementos necessita ser elucidada.

Palavras-chave: Receptores Nucleares. Ácido Retinoico. COUPTF2. SMyHC3.

ABSTRACT

Sampaio AC. Molecular Regulation of atrial-specific expression of the SMyHC3 gene [Ph.D. Thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

To elucidate the genetic pathways controlling cardiac chamber formation, the atrial specific gene promoter SMyHC3 was analyzed. In transgenic mice, the atrial specific expression an 840 bp of the SMyHC3 promoter was linked to reporter gene human alkaline phosphatase (HAP), SMyHC3-HAP. By directed mutagenesis and deletion analysis we identified the more distal 72 bp of the promoter as responsible of the atrial expression. This fragment contains putative binding sites to nuclear receptors, the CNRRE (complex nuclear receptor response element), defined by molecular modeling. RA (retinoic acid) treatment in SMyHC3-HAP embryos expands the atrial domain. However, the RA effectors, RXR/RAR bind with low affinity to the SMyHC3 promoter. These receptors are not able to activate the promoter even in the presence of coactivators such as p300, CBP and GRIP1. These results suggest that RA acts indirectly to regulate this atrial marker. Cell transient transfection shows that COUPTF2 activate the SMyHC3 promoter, and COUPTF2 siRNA inhibits the transactivation of the SMyHC3 promoter. Treatment of embryos with RA increases the COUPTF2 expression reinforcing the idea that this receptor could be regulated indirectly by RA. Bioinformatic studies revealed that CNRRE is present in the 3' region of the ortholog chicken AMHC1 gene. Alignments indicate that this CNRRE could have been acquired by an exaptation event. In conclusion, the SMyHC3 promoter seems to be controlled by RA and COUPTF2 governing atrial expression. However the nature of relationships between RA and COUPTF2 need to be elucidated.

Key Words: Nuclear Receptors. Retinoic acid. COUPTF2. SMyHC3.

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Embriogenia Cardíaca

O coração é o primeiro órgão a tornar-se funcional durante o desenvolvimento embrionário. O desenvolvimento cardíaco é um processo complexo que envolve a participação de vários tipos celulares de diferentes origens embrionárias (de La Cruz e Markwald, 2000; Brand, 2003; Buckingham, *et al.*, 2005; Sampaio, *et al.*, 2008). Basicamente, durante os primeiros estágios da embriogênese, células progenitoras do mesoderma embrionário anterior são estabelecidas como campos bilaterais cardiogênicos. Com os processos de dobramento e curvatura embrionária, estes campos de células são alinhados na região mediana do embrião e se fundem formando um tubo cardíaco primitivo (Manner, 2000). Posteriormente, o tubo sofre processos de padronização espacial e molecular ao longo de seu eixo ântero-posterior (AP) para formar as futuras regiões das câmaras cardíacas. Durante as próximas fases do desenvolvimento, o tubo cardíaco sofre adições de células em seus pólos anteriores e posteriores, aumenta em comprimento e inicia um processo de dobramento, alinhando as futuras câmaras cardíacas em uma configuração tridimensional do coração adulto (para uma revisão detalhada, Sampaio *et al.*, 2008).

O processo de padronização é regulado inicialmente por moléculas sinalizadoras e circuitos transcricionais que induzem ou inibem a expressão de genes em uma maneira tecido-específica, de modo a estabelecer diferenças genéticas entre as células que contribuirão na formação dos diversos territórios cardíacos (Christofells, *et al.*, 2000; Bruneau, *et al.*, 2002; Brand, 2003; Buckingham, *et al.*, 2005; Sampaio *et al.*, 2008). A dissecção destes circuitos regulatórios que induzem a expressão célula/tecido-específico de genes importantes para formação do coração é uma das estratégias utilizadas para se entender como a diversidade celular é estabelecida durante o desenvolvimento.

Uma das mais recentes descobertas do campo da embriologia cardíaca é que o coração é um mosaico de células de diferentes origens embrionárias (de La Cruz e Markwald, 2000). Além do campo cardíaco clássico, o qual expressa genes (marcadores) como NKX2.5 e que contribui principalmente para formação do ventrículo esquerdo, um segundo grupo de células progenitoras, o campo cardíaco secundário, contribui com células para o ventrículo esquerdo e parte da região sino-atrial. Este último campo é marcado pela expressão do gene ISL1 e FGF8 (Cai, *et al.*, 2003; Buckingham, *et al.*, 2005; Ilagan, *et al.*, 2006).

Figura 1 - Desenvolvimento cardíaco, contribuições dos campos cardíacos. (A) Esquema do estágio de crescente cardíaco. Essa figura mostra a continuidade dos dois campos cardíacos, o campo cardíaco clássico (em azul), que contribui principalmente para formação do ventrículo esquerdo e grande parte dos átrios, e de um segundo grupo de progenitores (em verde) que contribui com alguns precursores sino-atriais além de originar o campo cardíaco secundário (mesoderma faríngeo, em B, verde), que fornece células para o ventrículo direito e conotronco. (C) Coração de camundongo de 11,5 dpc mostrando a contribuição dos dois grupos de progenitores cardíacos

Três estudos de 2001 mostraram evidências para diferentes populações de progenitores cardíacos no mesoderma sub-faríngeo de embriões de galinha e camundongo (Kelly, *et al.*, 2001; Mjaatvedt, *et al.*, 2001; Waldo, *et al.*, 2001). Estes trabalhos indicaram que estes progenitores contribuem para a formação do ventrículo direito e conotronco do coração em camundongos (Mjaatvedt, *et al.*, 2001; Waldo, *et al.*, 2001) ou para o conotronco em embriões de galinha (Waldo, *et al.*, 2001), denominando essas regiões de campo cardíaco anterior ou campo cardíaco secundário, respectivamente, levando à discussões sobre a contribuição de duas populações de progenitores cardíacos com diferentes contribuições para o coração.

Cai, *et al.* (2003) mostraram que este campo cardíaco anterior/secundário faz parte de um domínio contínuo de progenitores cardíacos que expressam o gene ISL1 e ocupa uma posição mais medial/dorsal com relação ao campo cardíaco primário (Cai, *et al.*, 2003). Este estudo, juntamente com uma revisão proposta por Abu-Issa, *et al.* (2004), demonstram que a formação do coração pode ser entendida não como a contribuição de dois campos cardíacos independentes, mas um único campo cardíaco mais complexo que contém populações de células expressando os diferentes marcadores cardíacos, mas que se sobrepõem e são gradualmente separadas com o decorrer do desenvolvimento (Cai, *et al.*, 2003; Abu-Issa, *et al.*, 2004). Estes dados são corroborados por estudos em *Xenopus levis* onde o crescente cardíaco expressando ISL1 se sobrepõe ao domínio de expressão de

NKX2.5 (Brade, *et al.*, 2007), e estudos em *Drosophila*, onde, durante a formação da bomba circulatória, há co-expressão dos fatores tipo NK2 e ISL11 (Mann, *et al.*, 2009). Assim, embora possa haver diferentes contribuições para as diferentes câmaras cardíacas, no início da embriogênese, essas populações celulares estão sujeitas aos mesmos eventos de padronização, sendo posteriormente diversificadas e desempenhando diferentes papéis na formação dos compartimentos cardíacos.

O estabelecimento da polaridade ântero-posterior é essencial para que o coração seja organizado corretamente em segmentos de influxo (câmaras posteriores, região sino-atrial) e efluxo (câmaras anteriores, regiões de ventrículo e trato de saída do coração) (Yutzey e Bader, 1995). Embora vários circuitos transcricionais operem de maneira complexa e ainda não muito bem compreendida nas células de diferentes origens que contribuem para cada câmara, o processo global de padronização AP é dependente da sinalização por ácido retinoico (AR) (Rosenthal e Xavier-Neto, 2000; Hochgreb, *et al.*, 2003).

1.2 O Ácido Retinoico (AR)

Retinoides é o termo genérico que abrange moléculas que incluem os metabólitos da vitamina A (retinol) e seus análogos sintéticos ativos. São moléculas hidrofóbicas (lipofílicas) que atravessam facilmente a bicamada lipídica das células (para uma revisão sobre a via de sinalização por AR, ver Simões-Costa, *et al.*, 2008).

O AR é um retinoide natural sintetizado a partir da vitamina A (retinol) mediante duas oxidações sucessivas: de retinol a retinaldeído e de retinaldeído à AR (Duester, 2008). Dois isômeros do AR, *all-trans* e *9-cis* AR, podem se ligar com alta afinidade nos receptores de AR, porém, permanece em debate se este último componente é um retinoide bioativo natural e fisiológico (Mic, *et al.*, 2003).

Durante o desenvolvimento cardíaco, a síntese de AR é regulada pela presença de uma enzima da família das aldeído desidrogenases, a retinaldeído desidrogenase 2, RALDH2 (também conhecida como ALDH1A2) (Zhao, *et al.*, 1996).

Em 1998, Moss, *et al.* descreveram a relação topológica da expressão do

gene RALDH2 com o coração embrionário e observaram que a expressão deste divide o território mesodérmico que originará o coração em regiões anteriores e posteriores (Moss, *et al.*, 1998). Em seguida, estudos em camundongos com deleção no gene da RALDH2 demonstraram a importância deste gene tanto para o desenvolvimento em geral quanto para a formação atrial, uma vez que estes camundongos desenvolvem apenas uma grande câmara com características ventriculares (Niederreither, *et al.*, 1999). Também em 1999, Xavier-Neto e colaboradores demonstraram que AR é capaz de expandir os domínios de expressão de um gene específico de regiões que originarão as câmaras atriais, o gene para a cadeia pesada de uma miosina lenta, SMyHC3, e que, inibidores da enzima RALDH2, causam uma grande diminuição da expressão deste gene (Xavier-Neto, *et al.*, 1999).

De posse destes resultados, foi proposto um modelo de padronização do coração, onde os precursores que recebessem sinalização por AR tornar-se-iam células atriais, enquanto aqueles privados desta sinalização se transformariam em células ventriculares (Rosenthal e Xavier-Neto, 2000). Posteriormente, AR foi estabelecido definitivamente como a molécula sinalizante responsável pela partição do coração em átrios e ventrículos (Hochgreb, *et al.*, 2003). Foi demonstrado que em uma janela temporal específica durante a morfogênese cardíaca, as células que entram em contato com a zona de expressão da enzima RALDH2, ou os tecidos contendo AR produzido pela mesma, adquirem o fenótipo atrial, enquanto aquelas células que não entram em contato com AR diferenciam-se em células ventriculares, corroborando o modelo anteriormente proposto (Hochgreb, *et al.*, 2003).

Além de RALDH2, uma série de outros genes para fatores de transcrição é expressa de maneira específica ou mais concentrada nas regiões de influxo cardíaco. O compartimento atrial é marcado pela expressão de genes tais como GATA4, TBX5 e do receptor nuclear COUPTF2. Também há expressão de ISL1 e FGF8 vindos do campo cardíaco secundário. Como esta rede regulatória é estabelecida permanece como uma questão fundamental para se compreender a formação das diferentes regiões do coração (Olson, 2006).

GATA4 é um gene expresso em um amplo domínio durante os primeiros estágios do desenvolvimento cardíaco, porém, sua expressão diminui nos territórios ventriculares permanecendo concentrado na futura região atrial (Jiang *et al.*, 1998).

De maneira interessante, a expressão de GATA4 é reduzida em embriões de codorna deficientes em AR, com um desenvolvimento deficiente dos átrios e maior formação ventricular (Kostetskii, *et al.*, 1999). Camundongos nocaute para TBX5 mostram grave hipoplasia atrial e de ventrículo esquerdo enquanto o ventrículo direito e trato de saída do coração permanecem não afetados (Bruneau, *et al.*, 2001). Em camundongos nocaute para RALDH2, a expressão de TBX5 é bastante reduzida ou perdida (Niederreither, *et al.*, 2001). Mutação nula no gene COUPTF2 está associada com falha no desenvolvimento atrial e do seio venoso (Pereira, *et al.*, 1999; ver adiante).

Para avançar no entendimento das vias moleculares envolvidas com a diferenciação atrial é necessário elucidar como as células progenitoras cardíacas se comprometem com uma via de diferenciação atrial. Para tanto, foi utilizado um transgene que corresponde à região promotora de um gene que se expressa nas futuras regiões embrionárias que formarão o átrio cardíaco, o gene SMyHC3 (Wang, *et al.*, 1996; Xavier-Neto, *et al.*, 1999).

1.3 O Promotor atrial-específico do gene SMyHC3

O gene SMyHC3 (*slow myosin heavy chain 3*) é apropriado para tal análise, pois codifica a isoforma 3 da cadeia pesada de miosina lenta expressa de maneira atrial-específica no coração de codorna adulta (Nikovitits, *et al.*, 1996; Wang, *et al.*, 1996). Estudos moleculares anteriores indicaram um fragmento de 840 pares de base (pb) do promotor deste gene como o responsável pela expressão endógena do gene, em cultura de cardiomiócitos de codorna (Wang *et al.*, 1996). Em 1999, Xavier-Neto e colaboradores ligaram este fragmento de 840 pb do promotor com o gene-repórter da fosfatase alcalina humana (HAP) para produzir os camundongos transgênicos SMyHC3-HAP, e este mesmo fragmento direciona a expressão do gene-repórter no átrio destes camundongos (Xavier-Neto, *et al.*, 1999). Os padrões de expressão do transgene SMyHC3-HAP refletem como as regiões de influxo cardíaco se desenvolvem, abrindo oportunidades para se entender como os diferentes segmentos do coração são organizados no eixo ântero-posterior (Xavier-Neto, *et al.*, 1999).

Nos corações SMyHC3-HAP o promotor já é diferencialmente ativado nos primeiros estágios de coração tubular, com a expressão do gene-repórter concentrando-se na região posterior, de influxo, que mais tarde originará os átrios e seio venoso do coração (Xavier-Neto, *et al.* 1999). Em codornas, esse gene é expresso em todo coração tubular, para posteriormente sua atividade gradualmente se concentrar nos átrios, enquanto diminui nos ventrículos e tronco cardíaco (Wang, *et al.*, 1996).

Uma importante característica do transgene SMyHC3-HAP é que sua expressão é ativa nas áreas de influxo, que são os locais de síntese e resposta do AR durante o processo de diversificação de câmaras. Interessantemente, AR exógeno é capaz de aumentar a expressão do transgene, enquanto a inibição da síntese de AR reduz a expressão do mesmo a poucas células na região mais posterior do coração (Figura 2; Xavier-Neto, *et al.*, 1999). Assim, há fortes evidências que o promotor SMyHC3 seja ativado por AR através de seus efetores, os receptores nucleares RXR e RAR (Mangelsdorf, *et al.*, 1995; Chambon, 1996; Aranda e Pascual, 2001; ver adiante). AR age diretamente no núcleo das células por influenciar a expressão gênica via a heterodimerização dos fatores de transcrição da família dos receptores nucleares, o receptor de ácido retinoico (RAR) e o receptor de retinoide X (RXR) (Chambon, 1996).

Estudos de Wang, *et al.* (1998) mostraram que a restrição atrial do gene SMyHC3 requer um elemento dual responsivo a vitamina D e AR (VDRE/RARE) localizado dentro de um fragmento de 72 pb mais distais do promotor de 840 pb do gene SMyHC3 (Figura 3).

Dado a importância do AR na morfogênese cardíaca e na determinação das células atriais e ventriculares (Hochgreb, *et al.*, 2003), uma inspeção minuciosa do fragmento de 72pb para a existência de outros sítios potenciais de ligação a receptores nucleares, inclusive para AR, foi realizada e várias possibilidades foram encontradas, sendo a região que continha o elemento dual VDRE/RARE denominada de Elemento Complexo de Resposta a Receptores Nucleares (ECRRN). Aparentemente, ao invés de conter apenas um elemento dual de resposta a AR e vitamina D (RARE/VDRE), como proposto originalmente (Wang, *et al.*, 1998), essa região contém pelo menos mais uma região com potencial de sítio de ligação para receptores nucleares (Figura 3).

Figura 2 - Embriões de camundongos transgênicos SMyHC3-HAP e efeito da manipulação da sinalização por ácido retinoico. Embrião de camundongo transgênico, 9,0 dpc (dias pós coito), com 840 pb do promotor slowSMyHC3 controlado pelo gene repórter da fosfatase alcalina humana (HAP). (A) A expressão do transgene é limitada ao átrio em desenvolvimento. (B) Coloração HAP de embrião SMyHC3-HAP 10,5 dpc tratado com AR aos 7,5 dpc. Há uma expansão do domínio atrial, bem como aumento da expressão do gene-repórter dirigido pelo promotor de 840 pb do gene SMyHC3. (C) Embrião SMyHC3-HAP 9,0 dpc tratado com disulfiram, uma droga inibidora das RALDHs, ou seja, das enzimas que sintetizam AR. Há um bloqueio no desenvolvimento da câmara atrial. Note a reduzida coloração HAP.

1.3.1 Anatomia do promotor SMyHC3

Para entender como o gene SMyHC3 torna-se regulado de maneira atrial-específica, sua região regulatória (promotora) foi estudada de modo a servir como modelo para delinear e dissecar as vias moleculares que governam a expressão câmara-específica.

Para definir os elementos *cis*-controladores na região regulatória deste gene, o grupo de Stockdale identificou uma região de 160 pb da região (5') promotora entre -840 e -680 pares de base (pb), a qual foi denominada domínio regulatório atrial (ARD1) e que funciona como um *enhancer* atrial-específico em cultura de cardiomiócitos primários, bem como em embriões (Wang, *et al.*, 1996). Essa região contém vários motivos regulatórios (elementos *cis*-regulatórios), incluindo HF-1A, M-CAT, E-box (Wang, *et al.*, 1996) e um elemento dual de resposta à Vitamina D (VDRE) ou ácido retinoico (RARE) e um sítio GATA (estes últimos destacados na Figura 3).

Estudos de deleção do promotor e expressão de gene-repórter em cultura de cardiomiócitos sugerem que os motivos HF-1A, M-CAT e E-box dentro do ARD1 não são necessários para a expressão câmara-específica do gene SMyHC3, mas que as sequências envolvidas em sua restrição atrial-específica estão contidas numa região que inclui o elemento dual de resposta à vitamina D ou ao ácido retinoico (VDRE/RARE) (Wang, *et al.*, 1998). Mutações neste sítio resultam na regulação positiva de SMyHC3 nos cardiomiócitos ventriculares, mas não nos atriais (Wang *et al.*, 1998). Já o sítio GATA, o qual se encontra imediatamente *downstream* do elemento VDRE/RARE, é requerido para a expressão do gene repórter em todos os tipos de cardiomiócitos (Wang, *et al.*, 1998).

Deste modo, estes dois sítios parecem funcionar independentemente, sendo que o sítio GATA é responsável por uma expressão ubíqua do gene no coração, enquanto que o elemento VDRE/RARE restringe sua expressão ao compartimento atrial (Wang, *et al.*, 1998).

Figura 3 - Sequência do promotor de 840 pb do gene SMyHC3. Sequência de nucleotídeos do promotor do gene SMyHC3 mostrando a região entre -840 e -680 pb contendo o elemento dual de resposta a receptores nucleares descritos por Wang et al. (1996) e O ECRRN contendo as 3 héxades A, B e C. A região demarcada em azul claro representa os 72 pb mais distais do sítio inicial de tradução, a qual contém o ECRRN. Também observe o sítio de ligação para proteínas GATA. Em destaque (linha pontilhada), o ECRRN composto de 3 héxades, A, B e C, mostrando o elemento dual, composto pelas héxades A e B. A sequência é mostrada duas vezes, porém destacando diferentes héxades. A héxade B pode estar separada da héxade A por 3 nucleotídeos (VDRE) ou por 5 nucleotídeos (RARE) (elemento dual).

O transgene SMyHC3-HAP foi o primeiro marcador molecular de tecido predominantemente atrial identificado e permanece ser um dos poucos conhecidos, sendo assim, uma importante ferramenta para entender as vias moleculares de morfogênese da câmara cardíaca atrial (Xavier-Neto, *et al.*, 1999).

1.3.2 Deleção dos 72 pb mais distais do promotor da SMyHC3

Utilizando mutagênese do promotor no contexto de camundongos transgênicos, foram identificados os centros controladores da expressão atrial-específica do transgene SMyHC3-HAP. Este centro controlador encontra-se dentro de um fragmento distal (5') de 72 pb (Figura 3), o qual contém o elemento ARD1 descrito anteriormente em Wang, *et al.* (1998). Em camundongos transgênicos mutantes, a remoção desse fragmento de 72 pb libera a expressão do gene repórter HAP nos ventrículos e, simultaneamente, reduz consideravelmente a expressão atrial, de modo que o coração apresenta uma coloração ubíqua indiscriminada (Tatiana Matos, Dissertação de Mestrado).

Desta maneira, pode-se concluir que o fragmento de 72 pb contém elementos repressores da expressão ventricular e elementos estimuladores da expressão atrial. Além disso, a presença de coloração indiscriminada em átrios e ventrículos indica que seqüências presentes fora do fragmento de 72 pb controlam uma expressão que, se específica para o coração, não discrimina entre as câmaras cardíacas. Esses resultados também foram demonstrados anteriormente por Wang e colaboradores em experimentos de deleção e transfecção em cultura de cardiomiócitos de codorna (Wang, *et al.*, 1998).

Os resultados descritos acima indicam que a expressão atrial específica do transgene SMyHC3-HAP é obtida em três passos. O primeiro passo é o estabelecimento de uma expressão em todo o coração, expressão essa que é função de elementos localizados fora do fragmento de 72 pb. O segundo passo é a repressão da expressão no ventrículo, enquanto que o terceiro passo é a estimulação da expressão atrial. Em resumo, controladores positivos e negativos dentro do fragmento de 72 pb atuam sobre uma expressão cardíaca basal, indiscriminada entre as câmaras cardíacas, para torná-la atrial específica (Dissertação de Mestrado de Tatiana Matos).

Para definir quais os elementos regulatórios da expressão atrial específica contidos no fragmento de 72 pb, análises para a detecção de seqüências regulatórias putativas foram realizadas e foi verificado que o fragmento de 72 pb continha seqüências típicas de um elemento de resposta a receptores nucleares.

Em camundongos transgênicos, mutações foram realizadas na região contendo o elemento dual RARE/VDRE para entender o comportamento do transgene. Mutações no sítio dual, caracterizado em codornas por Wang, *et al.* (1996, 1998), não demonstraram nenhum fenótipo aparente em camundongos transgênicos. Ao contrário, o sítio relevante de controle do promotor SMyHC3 estava fora do RARE/VDRE descrito anteriormente (Wang, *et al.*, 1996). Este sítio localizava-se numa posição 3' ao sítio dual, sugerindo ser este um sítio putativo para ligação a receptores de AR (sítio C, Figura 3). Esses resultados são consistentes com o papel do AR na morfogênese atrial (Figura 2) (Xavier-Neto, *et al.*, 1999; 2001; Hochgreb, *et al.*, 2003).

1.4 Receptores Nucleares

Os receptores nucleares compreendem uma superfamília de fatores de transcrição ativados por ligantes que incluem hormônios lipofílicos: receptores para hormônio tireoidiano (TR), estrogênio (ER), vitamina D (VDR), ácido retinoico (RAR); receptores para metabólitos endógenos (ácidos graxos e biliares, eicosanóides); receptores para xenobióticos (envolvidos em processos de detoxificação); bem como receptores “órfãos”, tais como COUPTF1 e 2, para os quais nenhum ligante foi identificado até o momento (Kliwer, *et al.*, 1999; Chawla, *et al.*, 2001). No genoma humano foram identificados 48 genes pertencentes a esta família de fatores de transcrição. Estes fatores de transcrição são reguladores transcripcionais por sua ligação aos elementos *cis*-regulatórios (seqüências de DNA) nos promotores de genes alvos influenciados por eles (Glass, 1994; Chambon, 1996; Aranda e Pascual, 2001; Khorasanizadeh e Rastinejad, 2001).

Os receptores nucleares são proteínas modulares contendo entre 5 e 6 domínios e compartilham similaridades estruturais em várias regiões que variam de A até F (Giguere, *et al.*, 1986; Krust, *et al.*, 1986; Chambon, 1996). Cada domínio desempenha uma função específica, sendo o domínio mais conservado, o Domínio de Ligação ao DNA (DBD, *DNA-Binding Domain*), o qual é localizado na região C. Outro domínio bastante conservado é o Domínio de Ligação ao Ligante (LBD, *Ligand-Binding Domain*), localizado na região E. Dois domínios de transativação separados são: domínio de função de ativação dependente de ligante (AF-2) localizado no LBD e, domínio de ativação independente de ligante (AF-1), localizado na região divergente A/B (Chambon, 1996).

1.4.1 Elemento de Resposta a Receptores Nucleares

As seqüências de DNA às quais se ligam estes receptores são conhecidas como elementos de resposta a receptores nucleares e estão usualmente localizadas

na região 5' (promotora) de genes alvos (Glass, 1994; Aranda e Pascual, 2001; Khorasanizadeh e Rastinejad, 2001). Geralmente, o reconhecimento dos elementos de resposta por estes fatores de transcrição ocorre concomitante com a formação de homodímeros ou heterodímeros de receptores nucleares, embora alguns receptores ajam como monômeros (Glass, 1994, Mangelsdorf, *et al.*, 1995).

Os elementos de resposta a receptores nucleares consistem de duas héxades de nucleotídeos, cujo consenso é 5'-(A/G)G(T/G)TCA-3' (podendo ocorrer muitas variações desta sequência), que podem se configurar em vários motivos funcionais (Mangelsdorf e Evans, 1995). Múltiplas combinações dois a dois podem formar palíndromos, palíndromos invertidos ou repetições diretas (direct repeats ou DRs) das seqüências consensuais separados por um número variável de nucleotídeos (Glass, 1994). Análises da maioria dos elementos de resposta naturais, principalmente para receptores nucleares não-esteróides, tais como VDR, RXR, RAR, PPAR, TR e vários receptores órfãos, mostram que as repetições diretas (*Direct Repeats*, DRs), "AGGTCA N_x AGGTCA", são as mais comuns. Uma visão popular é que a especificidade de ligação obedeceria a uma regra em que o espaçamento entre as héxades (N_x – onde N pode ser qualquer nucleotídeo e x representa o número de nucleotídeos) definiria o tipo de receptor nuclear capaz de se ligar ao elemento regulatório em questão. Assim, um espaçamento de 1 nucleotídeo entre as héxades (DR1) caracterizaria um receptor de COUPTF2, PPAR ou de RXR; um espaçamento de 2 nucleotídeos (DR2) caracterizaria um receptor de ácido retinoico; um espaçamento de 3 nucleotídeos (DR3), um receptor de vitamina D; um espaçamento de 4 nucleotídeos (DR4), um receptor tireoidiano; e um espaçamento de 5 nucleotídeos (DR5), um receptor de ácido retinoico (Perlmann, *et al.*, 1993; Aranda and Pascual, 2001). Esse esquema simples tem sido útil para uma visão preliminar de sítios putativos de ligação a receptores nucleares, mas tornou-se claro que ele representa apenas uma aproximação superficial da grande variação estrutural dos receptores nucleares (Umesono, *et al.*, 1988, 1991)

Sabe-se hoje que receptores de AR podem se ligar a elementos de resposta do tipo DR2, DR3, DR4, DR5 e até DR1, porém com menor afinidade (Mader, *et al.*, 1993). Por sua vez, o receptor de vitamina D pode se ligar a elementos tipo DR3 e DR5, enquanto que COUPTF2, por exemplo, exibe uma grande flexibilidade de ligação a vários tipos de elementos como DR1, DR6, DR4, DR8, DR0, DR11, podendo ainda ligar-se a DR2, DR3 e DR5, embora o elemento preferido e mais

comum em promotores de genes influenciados pelo COUPTF2 seja o DR1. Para enfatizar a grande diversidade de possibilidades, determinou-se também que DRs com mais que 150 nucleotídeos de espaçamento conferem resposta a AR e vitamina D (Kato, *et al.*, 1995). Desse modo, fica bastante arbitrário afirmar que determinada sequência de DNA comporta um elemento de resposta a um específico receptor nuclear, fazendo a busca de métodos mais racionais, tais como ferramentas de simulação e modelagem molecular, um importante passo no entendimento e busca destes motivos.

1.4.2 Receptores de Ácido Retinoico (RARs e RXRs)

Como o AR ou seus derivados ativos (retinoides) exercem seus efeitos durante os processos de diferenciação celular ou durante o desenvolvimento embrionário foi uma questão solucionada com a descoberta de duas classes de reguladores transcricionais que se ligam a AR, os receptores de ácido retinoico (os isotipos de RAR α , β e γ) e os receptores de X retinoides (os isotipos de RXR α , β e γ) (Leid, *et al.*, 1992; Chambon, 1996).

Camundongos mutantes para cada uma das isoformas de RAR são viáveis, porém duplo mutantes para várias das combinações de RAR morrem *in útero* (discutidos em Mark, *et al.*, 2006) ou manifestam uma série de defeitos embrionários que incluem o espectro de malformações da síndrome induzida por deficiência de Vitamina A descrita muitos anos atrás pelo grupo de Warkany (Wilson, *et al.*, 1953).

Dos mutantes de RXR, o isotipo RXR α é o principal envolvido na embriogênese, uma vez que camundongos mutantes para este isotipo desenvolvem uma hipoplasia da camada compacta do miocárdio ventricular, o que parece ser a principal causa de morte do embrião por volta dos 14,5 dias de desenvolvimento (Kastner, *et al.*, 1997). Interessantemente, camundongos duplo-mutantes para as outras isoformas não manifestam nenhum defeito morfológico óbvio, nem mesmo quando são mutantes adicionais para o alelo de RAR α (Krezel, *et al.*, 1996). Isso indica claramente que RXR α é o mais importante isotipo de RXR funcionalmente durante o desenvolvimento embrionário (Krezel, *et al.*, 1996).

Assim, os heterodímeros de RAR/RXR α são claramente as unidades funcionais da via de transdução de sinal por AR durante o desenvolvimento controlando a expressão de vários genes-alvo (Leid, *et al.*, 1992; Mark, *et al.*, 2006)

Outro ponto interessante é o fato de que mutantes para RXRs geralmente manifestam defeitos morfogênicos semelhantes à deprivação fetal de AR ou aos mutantes das enzimas que sintetizam AR, sugerindo que os mesmos estão envolvidos na morfogênese por sua heterodimerização com RARs e não com os outros tipos de receptores nucleares (Kastner, *et al.*, 1997, Mark, *et al.*, 2006).

Camundongos mutantes para outros receptores nucleares que se dimerizam com RXR e para o qual um ligante é conhecido (como, por exemplo, PPAR α , PPAR β , TR α , TR β , VDR, e outros) não manifestam defeitos morfológicos (Flamant e Samarut, 2003; Kato, 2000; Lee e Gonzalez, 1996). Assim, embora os receptores RXR sejam parceiros “promíscuos” na ligação aos vários receptores nucleares, AR parece ser o sinal mais importante para a morfogênese embrionária, dentre estes sinais possíveis com RXR.

1.4.3 COUPTF2

Outros importantes receptores nucleares são aqueles da família do COUPTF. Estes são receptores órfãos para os quais nenhum ligante foi encontrado até o momento, porém os mais bem caracterizados deste subgrupo (Pereira *et al.*, 2000). COUPTF2 funciona como dímero e se liga com alta afinidade em repetições diretas imperfeitas do tipo DR-1 (Tsai e Tsai, 1997), podendo também se ligar a uma grande variedade de diferentes conformações (Cooney, *et al.*, 1992). Geralmente funciona como homodímero, mas pode se associar com RXR, um receptor promíscuo universal dos receptores nucleares.

A expressão de COUPTF2 é pouco descrita em detalhes durante os vários estágios de desenvolvimento embrionário na literatura, se mostrando presente no mesênquima de órgãos internos como glândulas salivares, septo nasal, língua, também expresso no átrio do coração, pulmão, estômago, pâncreas e bastante expresso no sistema nervoso (Qiu, *et al.*, 1994, Pereira, *et al.*, 1995).

Camundongos *knockout* para COUPTF2 morrem em torno de 10 dias pós-fertilização devido a crescimento retardado da cabeça e problemas no coração, principalmente no átrio, seio venoso e nas vaías cardinais (Pereira, *et al.*, 1999)

O gene ortólogo de *Drosófila*, *seven-up* (*svp*), é expresso nos óstios cardíacos (Molina e Cripps, 2001), estruturas análogas ao átrio dos vertebrados. Isto sugere que COUPTF2 está ligado ao desenvolvimento de câmaras de influxo cardíaco.

1.4.4 Coreguladores da transcrição

Após ligação dos receptores nucleares ao DNA, a atividade transcricional depende de uma série de proteínas associadas, denominadas coativadores e corepressores. (Chen e Evans, 1995; Horlein, *et al.*, 1995; Hermanson, *et al.*, 2002; Privalsky, 2004)

Dois principais grupos de corepressores incluem o corepressor de Receptores Nucleares NCoR (NCoR1/TRIP13) e SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors, NCoR2/TRAC) (Glass e Rosenfeld, 2000; Privalsky, 2001; 2004).

Coativadores incluem essencialmente uma subfamília de proteínas p160 de coativadores de receptores esteróides (SRC), denominados SRC-1 (NCoA-1), SRC-2 (TIF-2, GRIP-1) e SRC-3 (pCIP, ACTR, AIB1, TRAM1, RAC3) (McKenna, *et al.*, 1999; Glass e Rosenfeld, 2000).

De acordo com o atual modelo de regulação gênica por receptores nucleares, os mesmos são forte repressores da expressão de genes-alvos na ausência de ligantes e em um contexto de cromatina onde os nucleossomos não impedem a ligação aos elementos de resposta. Esta atividade repressora reflete a capacidade dos receptores nucleares de recrutarem corepressores tais como NCoR e SMRT, os quais, por sua vez, comportam uma atividade enzimática intrínseca ou recrutam complexos com atividade de histona desacetilase (HDAC), mantendo a cromatina em estado reprimido, mais condensado (Privalsky, 2001; Glass e Rosenfeld, 2000).

Com a ligação do ligante, os complexos correpresores se desligam e os receptores nucleares ficam livres para interagir com coativadores da transcrição, tais como as proteínas da família p160, as quais possuem atividade de remodelagem e modificação da cromatina, como acetilação, liberando-a de um estado repressivo (Glass e Rosenfeld, 2000; Hermanson, *et al.*, 2002).

Os corepressores, NCoR e SMRT, são expressos de maneira ubíqua e modulam a atividade transcricional de uma série de fatores de transcrição (Jepsen e Rosenfeld, 2002).

1.5 O elemento dual VDRE/RARE no promotor do gene SMyHC3

Análises da região ARD1 do promotor do gene SMyHC3, realizadas por Wang, *et al.* (1998), haviam predito a presença de um elemento dual, parcialmente sobreposto, de resposta à vitamina D ou ácido retinoico (VDRE/RARE), ou seja, duas héxades que poderiam ser separadas por 3 ou 5 nucleotídeos respectivamente. O elemento VDRE foi demonstrado ser requerido para a inibição da expressão do gene nos ventrículos (Wang, *et al.*, 1998).

Dado a importância do AR na morfogênese cardíaca e na determinação das linhagens atriais e ventriculares (Hochgreb, *et al.*, 2003), uma inspeção minuciosa do fragmento de 72 pb para a existência de outros sítios potenciais de ligação a receptores nucleares, inclusive para AR, foi realizada e várias possibilidades foram encontradas, redefinindo a região que continha o elemento dual VDRE/RARE de Elemento Complexo de Resposta a Receptores Nucleares (ECRRN).

Assim, este trabalho pretende estabelecer os elementos *cis* e fatores regulatórios que controlam a expressão atrial-específica do gene SMyHC3.

CONCLUSÕES

- Ensaios de gel shift demonstraram que RAR/RXR é capaz de se ligar ao promotor do gene SMyHC3 porém com baixa afinidade, como também revelado por anticorpos específicos contra RAR e RXR.

- Ensaios de competição revelam que o ECRRN consegue competir com o elemento RARE β 2, porém somente com excesso molar de mais de 100x, mostrando a baixa afinidade deste elemento

- Ensaios de transfecção transiente demonstraram que neste contexto, RAR/RXR ou VDR/RXR não são capazes de ativar o promotor SMyHC3 ligado a gene-repórter, mesmo na presença de ácido retinoico ou vitamina D, respectivamente.

- Coativadores da transcrição tais como: GRIP1, p300 e CBP, juntamente com RAR/RXR ou VDR/RXR não ativaram o promotor SMyHC3 no contexto de transfecção celular.

- Análises de modelagem molecular confirma que o promotor SMyHC3 apresenta um Elemento Complexo de Resposta a Receptores nucleares, com pelo menos 3 sítios de ligação para receptores nucleares, ao contrário do elemento dual RARE/VDRE descrito por Wang e colaboradores (1998).

- Ensaios de transfecção transiente revelaram que outro receptor nuclear, COUPTF2 é capaz de transativar o promotor atrial-específico do gene SMyHC3. Também confirmado por perda de função por meio de siRNA contra COUPTF2 em ensaio celular.

- Análises de alinhamento mostraram que o ECRRN do gene SMyHC3 está contido na região 3' do gene ortólogo de galinha AMHC

- Hibridação *in situ* demonstra que a expressão de COUPTF2 é específica do tecido atrial em todos os estádios de desenvolvimento embrionário de camundongo analisados.

- Embriões de camundongo tratados com AR apresentam um aumento global da expressão do gene COUPTF2, indicando que este pode ser um alvo indireto da via de sinalização por AR.

- Análises *in silico* revelam que o ECRRN pode fazer parte de um elemento transponível e se apresenta espalhado por todo o genoma de galinha, sugerindo eventos de exaptação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

¹Abu-Issa R, Waldo K, Kirby ML. Heart fields: one, two or more? *Dev Biol.* 2004;272(2):281-5

Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.* 2001;81(3):1269-304.

Bejerano G, Lowe CB, Ahituv N, King B, Siepel A, Salama SR, Rubin EM, Kent WJ, Haussler D. A distal enhancer and an ultraconserved exon are derived from a novel retroposon. *Nature.* 2006;441(7089):87-90.

Black BL, Olson EN. Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14(1):167-96.

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

Brade T, Gessert S, Kühl M, Pandur P. The amphibian second heart field: *Xenopus* islet-1 is required for cardiovascular development. *Dev Biol.* 2007;311(2):297-310.

Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol.* 2003;258(1):1-19.

Bruck N, Vitoux D, Ferry C, Duong V, Bauer A, de Thé H, Rochette-Egly C. A coordinated phosphorylation cascade initiated by p38MAPK/MSK1 directs RARalpha to target promoters. *EMBO J.* 2009;28(1):34-47.

Bruneau BG. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res.* 2002;90(1):509-19.

Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor *Tbx5* in cardiogenesis and disease. *Cell.* 2001;106(6):709-21.

¹ De acordo com:

Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet.* 2005;6(11):826-35.

Bugge TH, Pohl J, Lonnoy O, Stunnenberg HG. RXR alpha, a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. *EMBO J.* 1992;11(4):1409-18.

Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. *Dev Cell.* 2003;5(6):877-89.

Case DA, Pearlman DA, Caldwell JW, Cheatham III TE, Wang J, Ross WS, Simmerling CL, Darden TA, Merz KM, Stanton RV, Cheng AL, Vincent JJ, Crowley M, Tsui V, Gohlke H, Radmer RJ, Duan Y, Pitera J, Massova I, Seibel GL, Singh UC, Weiner PK, Kollman PA. AMBER 7, University of California, San Francisco. 2002

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

Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science.* 2001;294(5548):1866-70.

Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature.* 1995;377(6548):454-7.

Christoffels VM, Habets PE, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH, et al. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol.* 2000;223(2):266-78.

Cooney AJ, Tsai SY, O'Malley BW, Tsai MJ. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) dimers bind to different GGTC A response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D3, thyroid hormone, and retinoic acid receptors. *Mol Cell Biol.* 1992;12(9):4153-63.

de la Cruz MV, Markwald RR. Living morphogenesis of the heart. Cambridge, EUA: Birkhäuser; 1998. p.233

de The H, Vivanco-Ruiz MM, Tiollais P, Stunnenberg H and Dejean A. Identification of a retinoic acid responsive element in the retinoic acid receptor beta gene. *Nature* 1990;343:177-80.

Drysdale TA, Patterson KD, Saha M, Krieg PA. Retinoic acid can block differentiation of the myocardium after heart specification. *Dev Biol.* 1997;188(2):205-15.

Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell.* 2008;134(6):921-31.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411(6836):494-8.

Fishman MC, Olson EN. Parsing the heart: genetic modules for organ assembly. *Cell.* 1997;91(2):153-6.

Flamant F, Samarut J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14(2):85-90.

Germain P, Iyer J, Zechel C, Gronemeyer H. Co-regulator recruitment and the mechanism of retinoic acid receptor synergy. *Nature.* 2002;415(6868):187-92.

Giguère V, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM. Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell.* 1986;46(5):645-52.

Glass CK Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev.* 1994;15(3):391-407

Gould SJ, Vrba ES. Exaptation, a missing term in the science of form. *Paleobiology*:1982;8(1): 4-15

Graham FL, van der Eb AJ. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology.* 1973;54(2):536-9.

Han JS, Boeke JD. LINE-1 retrotransposons: modulators of quantity and quality of mammalian gene expression? *Bioessays.* 2005;27(8):775-84

Hermanson O, Glass CK, Rosenfeld MG. Nuclear receptor coregulators: multiple modes of modification. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(2):55-60.

Hochgreb T, Linhares VL, Menezes DC, Sampaio AC, Yan CY, Cardoso WV, et al. A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. *Development*. 2003;130(22):5363-74.

Hörlein AJ, Näär AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, Ryan A, Kamei Y, Söderström M, Glass CK, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*. 1995;377(6548):397-404.

Ilagan R, Abu-Issa R, Brown D, Yang YP, Jiao K, Schwartz RJ, Klingensmith J, Meyers EN. Fgf8 is required for anterior heart field development. *Development*. 2006;133(12):2435-45.

Jepsen K, Rosenfeld MG. Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J Cell Sci*. 2002;115(Pt 4):689-98

Joyce GF. In vitro evolution of nucleic acids. *Curr Opin Struct Biol*. 1994;4:331-6

Kato S. The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J Biochem*. 2000;127(5):717-22

Kato S, Sasaki H, Suzawa M, Masushige S, Tora L, Chambon P, Gronemeyer H. Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements act as promiscuous enhancers for different classes of nuclear receptors. *Mol Cell Biol*. 1995;15(11):5858-67.

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

Kazazian HH Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science*. 2004;303(5664):1626-32.

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

Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell*. 2001;1(3):435-40.

Kerr LD. Electrophoretic mobility shift assay. *Methods Enzymol*. 1995;254:619-32

Khorasanizadeh S, Rastinejad F. Nuclear-receptor interactions on DNA-response elements. Trends Biochem Sci. 2001;26(6):384-90.

Kidwell MG, Lisch DR. Transposable elements and host genome evolution. Trends Ecol Evol. 2000;15(3):95-99.

Kliwer SA, Lehmann JM, Milburn MV, Willson TM. The PPARs and PXR: nuclear xenobiotic receptors that define novel hormone signaling pathways. Recent Prog Horm Res. 1999;54:345-67

Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ and Evans RM. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. Nature 1992;355(6359):446-9.

Kostetskii I, Jiang Y, Kostetskaia E, Yuan S, Evans T, Zile M. Retinoid signaling required for normal heart development regulates GATA-4 in a pathway distinct from cardiomyocyte differentiation. Dev Biol. 1999;206(2):206-18.

Kouskouti A, Talianidis I. Regulation of the transcriptional activity of COUP-TF II by MAPK-mediated phosphorylation. FEBS Journal. 2005; 272(S1):k3-020P

Krezel W, Dupé V, Mark M, Dierich A, Kastner P, Chambon P. RXR gamma null mice are apparently normal and compound RXR alpha +/- /RXR beta -/- /RXR gamma -/- mutant mice are viable. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(17):9010-4.

Kruse SW, Suino-Powell K, Zhou XE, Kretschman JE, Reynolds R, Vonnrhein C, Xu Y, Wang L, Tsai SY, Tsai MJ, Xu HE. Identification of COUP-TFII orphan nuclear receptor as a retinoic acid-activated receptor. PLoS Biol. 2008;6(9):e227.

Krust A, Green S, Argos P, Kumar V, Walter P, Bornert JM, Chambon P. The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. EMBO J. 1986;5(5):891-7.

Lee SS, Gonzalez FJ. Targeted disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene, PPAR alpha. Ann N Y Acad Sci. 1996;804:524-9.

Leid M, Kastner P, Lyons R, Nakshatri H, Saunders M, Zacharewski T, Chen JY, Staub A, Garnier JM, Mader S, *et al.* Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. Cell. 1992;68(2):377-95

Liu X, Chen Q, Kuang C, Zhang M, Ruan Y, Xu ZC, Wang Z, Chen Y. A 4.3 kb Smad7 promoter is able to specify gene expression during mouse development. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1769(2):149-52

Mader S, Leroy P, Chen JY, Chambon P. Multiple parameters control the selectivity of nuclear receptors for their response elements. Selectivity and promiscuity in response element recognition by retinoic acid receptors and retinoid X receptors. *J Biol Chem*. 1993;268(1):591-600.

Madsen D e Kleywegt GJ. Interactive motif and fold recognition in protein structures. *J. Appl. Cryst*. 2002;35:137-9

Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P and Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83(6):835-9.

Mann T, Bodmer R, Pandur P. The Drosophila homolog of vertebrate Islet1 is a key component in early cardiogenesis. *Development*. 2009;136(2):317-26

Manner J. Cardiac looping in the chick embryo: a morphological review with special reference to terminological and biomechanical aspects of the looping process. *Anat Rec*. 2000;259(3):248-62.

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

Marks MS, Hallenbeck PL, Nagata T, Segars JH, Appella E, Nikodem VM, Ozato K. H-2RIIBP (RXR beta) heterodimerization provides a mechanism for combinatorial diversity in the regulation of retinoic acid and thyroid hormone responsive genes. *EMBO J*. 1992;11(4):1419-35.

Masiá S, Alvarez S, de Lera AR, Barettino D. Rapid, nongenomic actions of retinoic acid on phosphatidylinositol-3-kinase signaling pathway mediated by the retinoic acid receptor. *Mol Endocrinol*. 2007;;21(10):2391-402

McKenna NJ, O'Malley BW. Minireview: nuclear receptor coactivators--an update. *Endocrinology*. 2002;143(7):2461-5.

McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999;69(1-6):3-12.

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

Milligan JF, Groebe DR, Witherell GW, Uhlenbeck OC. Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res*. 1987;15(21):8783-98.

Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, et al. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol*. 2001;238(1):97-109.

Molina MR, Cripps RM. Ostia, the inflow tracts of the *Drosophila* heart, develop from a genetically distinct subset of cardiac cells. *Mech Dev*. 2001;109(1):51-9.

Moorman AF, Christoffels VM. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev*. 2003;83(4):1223-67.

Moss JB, Xavier-Neto J, Shapiro MD, Nayeem SM, McCaffery P, Drager UC, et al. Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Dev Biol*. 1998;199(1):55-71.

Nagpal S, Saunders M, Kastner P, Durand B, Nakshatri H, Chambon P. Promoter context- and response element-dependent specificity of the transcriptional activation and modulating functions of retinoic acid receptors. *Cell*. 1992;70(6):1007-19.

Niederreither K, Abu-Abed S, Schuhbaur B, Petkovich M, Chambon P, Dolle P. Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid signaling during mouse development. *Nat Genet*. 2002;31(1):84-8.

Niederreither K, McCaffery P, Drager UC, Chambon P, Dolle P. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev*. 1997;62(1):67-78.

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

Nikovits W Jr, Wang GF, Feldman JL, Miller JB, Wade R, Nelson L and Stockdale FE. Isolation and characterization of an avian slow myosin heavy chain gene expressed during embryonic skeletal muscle fiber formation. *J Biol Chem*. 1996;271(29):17047-56.

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

Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*. 2006;313(5795):1922-7.

O'Malley B. The Year in Basic Science: nuclear receptors and coregulators. *Mol Endocrinol*. 2008;22(12):2751-8.

Partanen A, Motoyama J, Hui CC. Developmentally regulated expression of the transcriptional cofactors/histone acetyltransferases CBP and p300 during mouse embryogenesis. *Int J Dev Biol*. 1999;43(6):487-94.

Pereira FA, Qiu Y, Tsai MJ, Tsai SY. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): expression during mouse embryogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;53(1-6):503-8.

Pereira FA, Qiu Y, Zhou G, Tsai MJ, Tsai SY. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. *Genes Dev*. 1999;13(8):1037-49.

Pereira FA, Tsai MJ, Tsai SY. COUP-TF orphan nuclear receptors in development and differentiation. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57(10):1388-98

Perlmann T, Umesono K, Rangarajan PN, Forman BM, Evans RM. Two distinct dimerization interfaces differentially modulate target gene specificity of nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol*. 1996;10(8):958-66.

Plageman TF, Jr., Yutzey KE. Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development. *J Biol Chem*. 2004;279(18):19026-34.

Privalsky ML. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:315-60

Privalsky ML. Regulation of SMRT and N-CoR corepressor function. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2001;254:117-36

Qiu Y, Cooney AJ, Kuratani S, DeMayo FJ, Tsai SY, Tsai MJ. Spatiotemporal expression patterns of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factors in the developing mouse central nervous system: evidence for a role in

segmental patterning of the diencephalon. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(10):4451-5.

Roman AC, Benitez DA, Carvajal-Gonzalez JM, Fernandez-Salguero PM. Genome-wide B1 retrotransposon binds the transcription factors dioxin receptor and Slug and regulates gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(5):1632-7.

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

Sakai Y, Meno C, Fujii H, Nishino J, Shiratori H, Saijoh Y, et al. The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev*. 2001;15(2):213-25.

Santangelo AM, de Souza FS, Franchini LF, Bumashny VF, Low MJ, Rubinstein M.

Ancient exaptation of a CORE-SINE retroposon into a highly conserved mammalian neuronal enhancer of the proopiomelanocortin gene. *PLoS Genet*. 2007 ;3(10):1813-26.

Simoës-Costa MS, Azambuja AP, Xavier-Neto J. The search for non-chordate retinoic acid signaling: lessons from chordates. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*. 2008;310(1):54-72.

Simoës-Costa MS, Vasconcelos M, Sampaio AC, Cravo RM, Linhares VL, Hochgreb T, et al. The evolutionary origin of cardiac chambers. *Dev Biol*. 2005;277(1):1-15.

Sirbu IO, Gresh L, Barra J, Duester G. Shifting boundaries of retinoic acid activity control hindbrain segmental gene expression. *Development*. 2005;132(11):2611-22.

Somi S, Klein AT, Houweling AC, Ruijter JM, Buffing AA, Moorman AF, van den Hoff MJ. Atrial and ventricular myosin heavy-chain expression in the developing chicken heart: strengths and limitations of non-radioactive in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*. 2006;54(6):649-64

Sampaio AC, Azambuja AP, Simões-Costa Ms, Vasconcelos M, Simões-Costa, MS, Lopes LM, Xavier-Neto J. Embriogenia Cardiovascular e Circulação Fetal.

In: In: Croti UA, Mattos SS, Pinto Jr. VC, Aiello VD. (Org.). *Cardiologia e Cirurgia Cardiovascular Pediátrica*. Ed. Roca; 2008, p. 25-44.

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

Tsai SY, Tsai MJ. Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age. *Endocr Rev*. 1997;18(2):229-40

Toell A, Polly P, Carlberg C. All natural DR3-type vitamin D response elements show a similar functionality in vitro. *Biochem J*. 2000;352:Pt 2:301-9.

Umesono K, Giguere V, Glass CK, Rosenfeld MG, Evans RM. Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature*. 1988;336(6196):262-5.

Umesono K, Murakami KK, Thompson CC and Evans RM. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell*. 1991;65(7):1255-66.

van de Lagemaat LN, Landry JR, Mager DL, Medstrand P. Transposable elements in mammals promote regulatory variation and diversification of genes with specialized functions. *Trends Genet*. 2003;19(10):530-6.

Vandergon TL, Reitman M. Evolution of chicken repeat 1 (CR1) elements: evidence for ancient subfamilies and multiple progenitors. *Mol Biol Evol*. 1994;11(6):886-98.

Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, et al. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*. 2001;128(16):3179-88.

Wang GF, Nikovits W Jr, Bao ZZ, Stockdale FE. Irx4 forms an inhibitory complex with the vitamin D and retinoic X receptors to regulate cardiac chamber-specific slow MyHC3 expression. *J Biol Chem*. 2001;276(31):28835-41

Wang GF, Nikovits W, Schleinitz M and Stockdale FE. Atrial chamber-specific expression of the slow myosin heavy chain 3 gene in the embryonic heart. *J. Biol. Chem*. 1996;271(33):19836-45.

Wang GF, Nikovits W Jr, Schleinitz M and Stockdale FE. A positive GATA element and a negative vitamin D receptor-like element control atrial chamber-

specific expression of a slow myosin heavy-chain gene during cardiac morphogenesis. *Mol Cell Biol.* 1998;18(10):6023-34.

Wasserman WW and Sandelin A. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat Rev Genet.* 2004;5(4):276-87.

Waxman JS, Yelon D. Increased Hox activity mimics the teratogenic effects of excess retinoic acid signaling. *Dev Dyn.* 2009;238(5):1207-13.

Wilson JG, Roth CB, Warkany J. An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am. J. Anat.* 1953;92(2):189-217

Wilkinson DG. RNA detection using non-radioactive in situ hybridization. *Curr Opin Biotechnol.* 1995;6(1):20-3.

Xavier-Neto J, Castro RA, Sampaio AC, Azambuja AP, Castillo HA, Cravo RM, *et al.* Parallel avenues in the evolution of hearts and pumping organs. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(6):719-34.

Xavier-Neto J, Neville CM, Shapiro MD, Houghton L, Wang GF, Nikovits W, Jr., *et al.* A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart. *Development.* 1999;126(12):2677-87.

Xavier-Neto J, Rosenthal N, Silva FA, Matos TG, Hochgreb T, Linhares VL. Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation. *Genesis.* 2001;31(3):97-104.

Xavier-Neto J, Shapiro MD, Houghton L, Rosenthal N. Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart. *Dev Biol.* 2000;219(1):129-41.

Yamada M, Szendro PI, Prokscha A, Schwartz RJ, Eichele G. Evidence for a role of Smad6 in chick cardiac development. *Dev Biol.* 1999;215(1):48-61.

Yang Z, Boffelli D, Boonmark N, Schwartz K, Lawn R. Apolipoprotein(a) gene enhancer resides within a LINE element. *J Biol Chem.* 1998;273(2):891-7.

Yao TP, Oh SP, Fuchs M, Zhou ND, Ch'ng LE, Newsome D, Bronson RT, Li E, Livingston DM, Eckner R. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell.* 1998;93(3):361-72.

Yu VC, Delsert C, Andersen B, Holloway JM, Devary OV, Naar AM, Kim SY, Boutin JM, Glass CK, Rosenfeld MG. RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell*. 1991;67(6):1251-66.

Yu JY, DeRuijter SL and Turner DL. RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *PNAS*. 2002;99(9):6047-52

Yutzey KE, Bader D. Diversification of cardiomyogenic cell lineages during early heart development. *Circ Res*. 1995;77(2):216-9.

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

Zhang XK, Hoffmann B, Tran PB, Graupner G, Pfahl M. Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature*. 1992;355(6359):441-6.

Zhao D, McCaffery P, Ivins KJ, Neve RL, Hogan P, Chin WW, et al. Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur J Biochem*. 1996;240(1):15-22.

Zhou Y, Zheng JB, Gu X, Li W, Saunders GF. A novel Pax-6 binding site in rodent B1 repetitive elements: coevolution between developmental regulation and repeated elements?