

BÁRBARA SANTOS PIRES DA SILVA

O PAPEL DOS RECEPTORES NUCLEARES NA ESPECIFICAÇÃO ATRIAL

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

Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual

Orientador: Dr. José Xavier Neto

Versão original

São Paulo
2013

RESUMO

SILVA, B. S. P. **O papel dos receptores nucleares na especificação atrial.** 2013. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Tecidual) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Foi definido que elementos regulatórios da expressão atrial-específica do promotor da SMyHC3 estão contidos em um elemento complexo de resposta a receptores nucleares (ECRRN). Ensaios de transativação celular indicam que alguns receptores nucleares se ligam nesta região. A partir destes ensaios verificamos a ativação do promotor por um receptor nuclear, o COUP-TFII. Ele regula muitos processos biológicos, como angiogênese e o próprio desenvolvimento atrial. Através da deleção do ECRRN observamos que o promotor não era ativado por COUP-TFII, indicando a sua ligação nessa região. Verificamos ainda que somente o domínio de ligação ao ligante do COUP-TFII é capaz de ativar o promotor, sugerindo a necessidade de uma interação com outros RNs para ativar o promotor. Uma análise proteômica indica que a maioria dos interactores de COUP-TFII está relacionada com complexos reguladores da transcrição e com a via de sinalização do receptor de andrógenos (AR). Ensaios de transativação celular mostram que juntos, COUP-TFII e AR, são capazes de aumentar a ativação do promotor.

Palavras-chave: Especificação Atrial. SMyHC3. Receptores Nucleares. COUP-TFII.

ABSTRACT

SILVA, B. S. P. **The role of nuclear receptors in atrial specification.** 2013. 126 p. Masters thesis (Master in Cell and Tissue Biology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

It was determined that regulatory elements of the atrial-specific expression of the promoter SMyHC3 are contained in a complex nuclear receptor response element (CNRRE). Cellular transactivation assays indicated certain nuclear receptors (NR) can bind in this region. From these trials, was observed the promoter activation by a nuclear receptor, COUP-TFII. It regulates many biological processes such as angiogenesis and atrial development. Deletion of CNRRE resulted in no activation of the promoter by COUP-TFII, indicating their connection in this region. We also verified that only the ligand binding domain of COUP-TFII is able to activate the promoter, suggesting interaction with other NRs to activate it. A proteomic analysis revealed that most of COUP-TFII partners relates to complexes of transcription regulators and the androgen receptor (AR) signaling pathway. Cell transactivation assays showed that together, COUP - TFII and AR, are able to increase promoter activation.

Keywords: Atrial Specification. SMyHC3. Nuclear Receptors. COUP-TFII.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Desenvolvimento cardíaco

Um dos primeiros órgãos a ser formado, o coração tem um papel vital na distribuição de nutrientes e oxigênio no embrião. Inicialmente ele funciona como um tubo cardíaco e é composto principalmente por células miocárdicas contráteis e células endocárdicas que, em conjunto, são essenciais para seu funcionamento como uma bomba peristáltica (XAVIER-NETO et al., 2001).

Durante os primeiros estágios da embriogênese, os campos bilaterais cardiogênicos são originados por células progenitoras no mesoderma embrionário anterior. Com os processos de dobramento e curvatura embrionária, estes campos de células são alinhados na região mediana do embrião e se unem formando um tubo cardíaco primitivo. Este tubo sofre processos de padronização espacial e molecular ao longo do seu eixo ântero-posterior para especificar as zonas progenitoras que darão origem aos segmentos de influxo (câmaras posteriores, região sino-atrial) e efluxo cardíaco (câmaras anteriores, regiões de ventrículo e trato de saída do coração) (SIMOES-COSTA et al., 2005; YUTZEY; BADER, 1995). A distinção inicial entre as extremidades anterior (efluxo) e posterior (influxo) é decisiva para a junção entre o coração e os vasos sanguíneos. Além disso, também é necessária para a divisão do tecido cardíaco em discretos segmentos, cada um apresentando diferenças eletrofisiológicas e contráteis que, coletivamente, fazem com que a ativação dos músculos cardíacos produza a contração coordenada e o fluxo direcional, requeridos para um bombeamento efetivo (HOCHGREB et al., 2003). Durante as fases posteriores do desenvolvimento, o tubo cardíaco sofre adições de células em seus pólos craniais e caudais, aumenta em comprimento e inicia um processo de dobramento, que é fundamental para alinhar as futuras câmaras cardíacas e estabelecer a configuração tridimensional do coração adulto (MANNER, 2000) (figura 1).

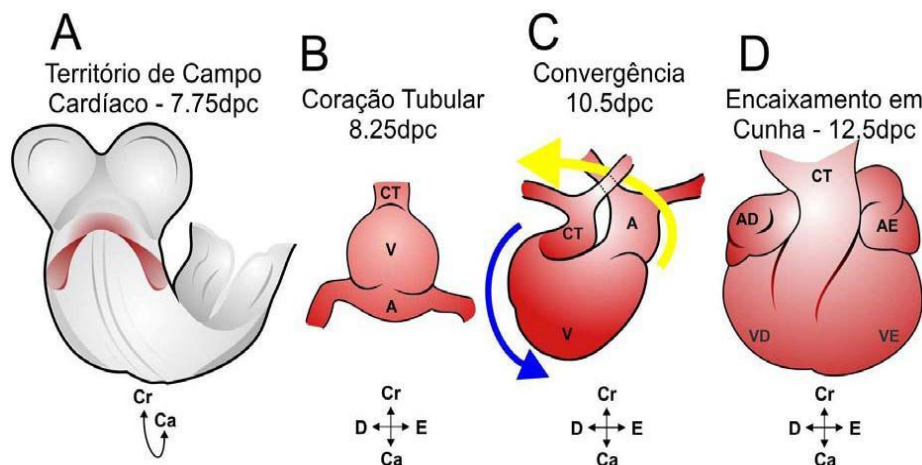


Figura 1. Desenvolvimento Cardíaco (A) Os progenitores cardíacos apresentam-se como um crescente cardíaco na parte cranial e cranio-lateral do embrião. A população progenitora estende-se cranialmente e lateralmente até a junção entre as regiões embrionárias e extra-embrionárias. (B) Os progenitores cardíacos movem-se ventralmente para formar um tubo cardíaco linear. (C) O coração tubular então inicia um processo chamado dobramento cardíaco, onde o coração tubular adquire uma forma espiral. Durante o dobramento, a região de influxo do coração é forçada dorsalmente e cranialmente, ficando acima dos ventrículos em desenvolvimento. (D) Durante essa fase de remodelamento, a divisão das câmaras cardíacas pela septação está completa, os ventrículos direito e esquerdo, e os átrios direito e esquerdo estão evidentes. Adaptado (HARVEY, 2002).

O processo de desenvolvimento cardíaco é regulado inicialmente pela expressão de alguns genes como, por exemplo, Gata-4, Tbx-5, Tbx-20, receptores nucleares como o COUP-TFII (PEREIRA et al., 1999; PLAGEMAN; YUTZEY, 2004; ROSENTHAL; XAVIER-NETO, 2000; WANG et al., 1998) e outros. Além disto, múltiplas moléculas sinalizadoras estão envolvidas na padronização cardíaca. Uma das moléculas que possui um papel importante na formação das câmaras cardíacas é o ácido retinóico (HOCHGREB et al., 2003; NIEDERREITHER et al., 2001; XAVIER-NETO et al., 1999). Em 1999, Xavier-Neto et al. administraram pulsos de ácido retinóico em camundongas grávidas com embriões no estágio de 7.5 dias pós-coito (dpc), e observaram uma dismorfologia cardíaca com completa ausência do trato de efluxo e de ventrículos. Em contraste, o bloqueio da síntese de ácido retinóico produziu corações com ausência de câmara atrial. A partir de então nosso grupo vem acumulando dados consistentes com a interpretação de que a sinalização por ácido retinóico exerce um papel essencial na

especificação do tecido cardíaco progenitor que vai dar origem às câmaras de influxo cardíaco: os átrios e o seio venoso (XAVIER-NETO et al., 1999).

1.2 O ácido retinóico e o desenvolvimento cardíaco

O ácido retinóico é uma molécula essencial para o crescimento e desenvolvimento. Ele é sintetizado a partir da vitamina A (retinol), que sofre duas oxidações sucessivas: de retinol à retinaldeído, pelas álcool desidrogenases (ADHs) e pela família de redutases de cadeia curta (SDR), e de retinaldeído em ácido retinóico, pelas retinaldeído desidrogenases (RALDHs) (NIEDERREITHER et al., 2001). A síntese de ácido retinóico é, portanto, regulada por enzimas da família das retinaldeído desidrogenases, sendo a RALDH2 a mais importante para o desenvolvimento cardíaco precoce (DUESTER, 2001), uma vez que a expressão de outras RALDHs não pode ser detectada antes de 8.5-9.5 dpc (DUESTER, 2000) e que dentre todas as RALDHs, apenas a RALDH2 apresenta fenótipos letais em animais nocautes. RALDH2 é uma enzima altamente específica (ZHAO et al., 1996) que é expressa primeiramente no mesoderma posterior de embriões de camundongos durante a gastrulação (NIEDERREITHER et al., 1997), e depois se torna restrita a estruturas posteriores (trato de influxo) do coração em desenvolvimento (MOSS et al., 1998).

Em 1999, Niederreither et al. demonstraram a importância do gene RALDH2 para o desenvolvimento, incluindo a correta formação cardíaca, utilizando camundongos nocaute para o gene (NIEDERREITHER et al., 1999). Os embriões dos camundongos desenvolveram um tubo cardíaco, o qual não apresentava o átrio e possuía uma câmara ventricular anormalmente aumentada (NIEDERREITHER et al., 2001). Também em 1999, Xavier-Neto e colaboradores demonstraram que o ácido retinóico exógeno 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 grande diminuição da expressão deste gene (XAVIER-NETO et al., 1999).

Rosenthal e Xavier-Neto, baseados nas mudanças dinâmicas da imunorreatividade na RALDH2 descrita em camundongo (MOSS et al., 1998) e em

corações embrionários de aves (XAVIER-NETO et al., 2000), propuseram que a segmentação cardíaca pode ser iniciada por dois eventos distintos de especificação e destino sino-atrial. No evento de especificação, células precursoras sino-atriais são instruídas pela difusão de ácido retinóico nas proximidades do mesoderma lateral, ou pela produção autônoma de ácido retinóico via RALDH2. O tecido precursor atrial é dotado com a capacidade estável de expressar RALDH2 e produzir ácido retinóico. Portanto, de acordo com esse modelo, a sinalização por ácido retinóico determina o destino atrial (posterior) das células, enquanto o destino ventricular (anterior) é especificado na ausência de ácido retinóico (MOSS et al., 1998; ROSENTHAL; XAVIER-NETO, 2000; XAVIER-NETO et al., 1999; XAVIER-NETO et al., 2000).

Em 2003, Hochgreb et al. estabeleceram a participação do ácido retinóico na organização do coração em átrios e ventrículos. De acordo com o modelo proposto acima, foi demonstrado que durante a morfogênese cardíaca, as células que entram em contato com ácido retinóico adquirem as características atriais e as que não entram em contato transformam-se em células ventriculares. As células que adquiriram características atriais tornam-se irreversíveis em resposta as altas concentrações de ácido retinóico produzidas por uma onda caudorostral de RALDH2, que em galinha ocorre entre os estágios Hamburger e Hamilton (HH) 7 e 8 e em camundongo, entre 8.5 e 9.5 dpc (HOCHGREB et al., 2003).

Além de RALDH2, genes para fatores de transcrição também são expressos nas regiões de influxo cardíaco, como por exemplo, Gata-4, Tbx5 e o receptor nuclear COUP-TFII (PEREIRA et al., 1999; PLAGEMAN; YUTZEY, 2004; ROSENTHAL; XAVIER-NETO, 2000; WANG et al., 1998). GATA-4 é um gene expresso em um domínio amplo durante os primeiros estágios do desenvolvimento cardíaco, porém, sua expressão diminui nos territórios ventriculares permanecendo concentrado na futura região atrial (WANG et al., 1998). De maneira interessante, a expressão de GATA-4 é reduzida em embriões de codorna deficientes em ácido retinóico. Estes embriões apresentam desenvolvimento deficiente dos átrios e uma formação exagerada de tecido ventricular (KOSTETSKII et al., 1999). Tbx5 está presente nos átrios e no ventrículo esquerdo, mas não é expresso no ventrículo direito e trato de saída (PLAGEMAN; YUTZEY, 2004). Por sua vez, COUP-TFII é expresso no mesênquima de órgãos

internos como glândulas salivares, septo nasal, língua, também expresso no átrio, pulmão, estômago, pâncreas e bastante expresso no sistema nervoso (PEREIRA et al., 1995; QIU et al., 1994). A sua inativação por recombinação homóloga resulta em falha no desenvolvimento do átrio e do seio venoso em camundongos (PEREIRA et al., 1999).

Em resumo, nosso entendimento sobre a rede de regulação genética necessária para a especificação, determinação, diferenciação e morfogenia do átrio ainda é muito rudimentar. 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, utilizamos 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 gene SMyHC3

Em 1996, Wang et al identificaram e caracterizaram um novo gene, o SMyHC3, que é expresso em corações de embriões de codorna em desenvolvimento e em músculos esqueléticos embrionários. Este gene é homólogo a um gene que codifica a cadeia pesada de uma miosina atrial, AMHC1, na galinha, e é preferencialmente expresso nos átrios (NIKOVITS et al., 1996; WANG et al., 1996; YUTZEY et al., 1994). Inicialmente SMyHC3 é expresso no coração tubular, porém, à medida que as câmaras cardíacas vão se desenvolvendo, a expressão do SMyHC3 nos ventrículos vai diminuindo, enquanto no átrio a expressão é mantida (WANG et al., 1996).

Wang et al., 1996, identificaram um fragmento de 840 pares de base (pb) do promotor do gene SMyHC3 como suficiente para regular a expressão gênica preferencial nos átrios. Dentro desse promotor foram encontradas regiões que continham tanto elementos cis-regulatórios positivos quanto negativos.

Em 1999, Xavier-Neto et al. ligaram o fragmento de 840 pb do promotor SMyHC3 ao gene-repórter da fosfatase alcalina (HAP) para gerar os camundongos transgênicos SMyHC3-HAP. Os autores observaram que este fragmento direciona a expressão do

gene-repórter no átrio dos camundongos desde o início do desenvolvimento (XAVIER-NETO et al., 1999). Os padrões de expressão da HAP durante o desenvolvimento cardíaco indicam que a especificação do trato de influxo está bem estabelecida antes da formação das câmaras cardíacas e o transgene SMyHC3-HAP é ativado somente nas estruturas sino-atriais (WANG et al., 1996; XAVIER-NETO et al., 1999). Com inibição da síntese de ácido retinóico, pode-se observar deleção do átrio e redução da expressão cardíaca do transgene SMyHC3, enquanto o tratamento com ácido retinóico exógeno aumenta a expressão de HAP, expande o compartimento sino-atrial e há expressão ectópica do transgene na região que daria origem aos ventrículos. Esses resultados sugeriram que o promotor do gene SMyHC3 é um alvo direto ou indireto de ácido retinóico (XAVIER-NETO et al., 1999).

1.3.1 O promotor atrial-específico do gene SMyHC3

Para entender como o gene SMyHC3 é regulado de maneira atrial-específica, sua região promotora foi estudada.

Uma sequência de 160 pb entre -840 e -680 foi identificada dentro do promotor de 840 pb e foi designada como domínio regulatório atrial 1 (ARD1). Essa região funciona como um enhancer atrial-específico em embriões de codorna (WANG et al., 1996). Vários elementos cis-regulatórios estão presentes no promotor SMyHC3, incluindo HF-1A, M-CAT, E-box, elemento de resposta à vitamina D (VDRE) ou ácido retinóico (RARE) e um sítio GATA (WANG et al., 1996).

Através da deleção e mutação do domínio regulatório atrial 1 (ARD1) e transfecção transiente dos mutantes em culturas de cardiomiócitos atriais e ventriculares, foi identificado um elemento dual de resposta à vitamina D ou ácido retinóico (VDRE/RARE). Esse elemento dual, VDRE/RARE, quando ligado a um promotor heterólogo em um vetor retroviral direcionava a expressão gênica preferencialmente atrial em embriões de galinha. Ambos os receptores de ácido retinóico e vitamina D (RAR e VDR) se ligavam ao elemento dual e inibiam a expressão do gene repórter em cultura ventricular, mas não nos cardiomiócitos atriais (WANG et al., 1998). Portanto,

este elemento regula a expressão atrial específica, uma vez que inibe a expressão do gene-repórter em cardiomiócitos ventriculares (WANG et al., 1996).

Esse estudo sugere que os elementos HF-1A, M-CAT e E-box contidos no ARD1 não são necessários para a expressão câmara-específica do gene SMyHC3, mas que as sequências envolvidas em sua restrição atrial-específica estão dentro dos 40 pb que incluem o elemento de resposta à vitamina D ou ao ácido retinóico (VDRE/RARE) (WANG et al., 1996).

Essa região de 40 pb está localizada dentro de um fragmento de 72 pb mais distais do promotor de 840 pb do gene que é requerido para a restrição atrial do SMyHC3 (WANG et al., 1996). Dada a importância do elemento dual VDRE/RARE e a sinalização por ácido retinóico na morfogênese cardíaca e na determinação das linhagens atriais e ventriculares (HOCHGREB et al., 2003), uma análise do fragmento de 72 pb para a existência de outros sítios potenciais de ligação a receptores nucleares, inclusive para ácido retinóico, foi realizada. Essa análise revelou que o fragmento contém sítios para repressores ventriculares, ativadores atriais, múltiplos sítios de ligação para receptores nucleares e um elemento complexo de resposta para receptores nucleares (ECRRN) de 32 pb. Aparentemente, ao invés de conter apenas um elemento dual de resposta a ácido retinóico e vitamina D (RARE/VDRE), como proposto anteriormente (WANG et al., 1998), essa região contém pelo menos mais uma região com potencial de sítio de ligação para receptores nucleares. O ECRRN abrange três sítios de ligação, as hexades A, B e C, que suporta três modos de ligação exclusivos: distal (A+B), proximal (B+C) e espaçado (A+C) (MATOS, 2002) (figura 2).

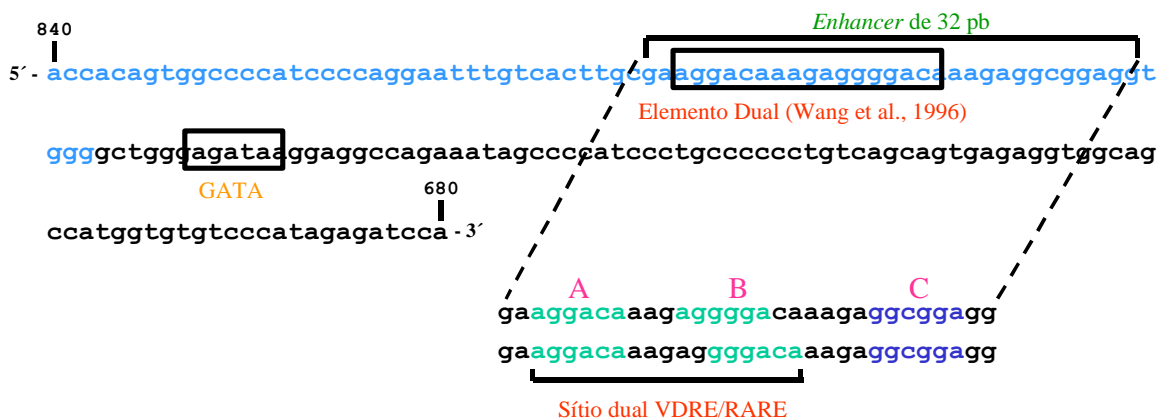


Figura 2. Sequência da região -840 a -680 do promotor do gene SMyHC3. Sequência de nucleotídeos do promotor do gene SMyHC3 mostrando a região entre -840 e -680 pb que contém o elemento dual de resposta a receptores nucleares descritos por Wang et al. (1996) e a nova região de 32 pb definida pelas análises de bioinformática (contendo 3 héxades, ABC). A região demarcada em azul claro representa os 72 pb mais distais do sítio inicial de tradução, a qual contém o *enhancer* de 32 pb. Também observa-se o sítio de ligação para proteínas GATA. Em destaque (linha pontilhada), o *enhancer* composto de 3 héxades, A, B e C, mostrando o elemento dual, composto pelas héxades A e B. A héxade B pode estar separada da héxade A por 3 nucleotídeos (VDRE) ou por 5 nucleotídeos (RARE) (SAMPAIO, 2010)

1.3.2 Deleção da região de 72 pb do promotor

Foram identificados os centros controladores da expressão atrial-específica do transgene SMyHC3-HAP utilizando mutagênese no contexto de camundongos transgênicos. Esse centro controlador encontra-se em uma região de 72 pb à 5' do promotor, na região do ARD1 descrito anteriormente (WANG et al., 1998). Os camundongos transgênicos contêm o promotor de 840 pb com os 72 pb mais distais deletados, ligado ao gene repórter da fosfatase alcalina. Foi observado que a redução desse fragmento de 72 pb libera a expressão do gene repórter nos ventrículos e, simultaneamente, reduz consideravelmente a expressão atrial, de modo que o coração apresenta uma coloração ubíqua indiscriminada (MATOS, 2002) (figura 3).

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 coloração indiscriminada em átrios e ventrículos indica que sequências fora do fragmento de 72 pb controlam uma expressão que não discrimina entre as câmaras cardíacas. 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-las atrial específica (MATOS, 2002).

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

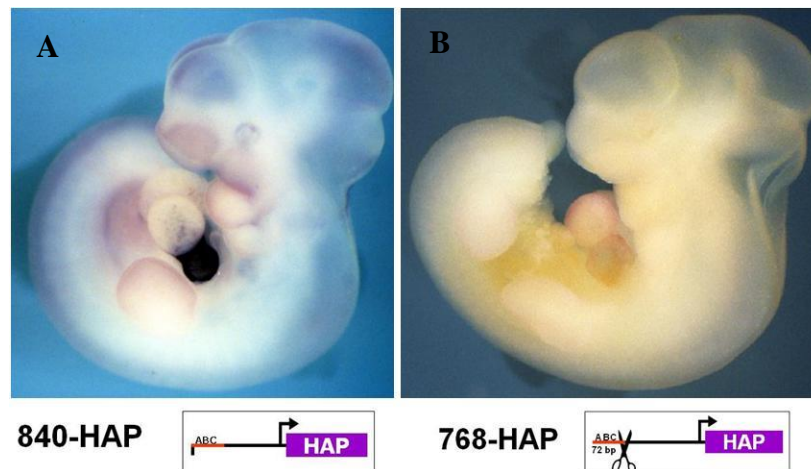


Figura 3. Variação entre as linhagens transgênicas do promotor do gene SMYHC3, 840-HAP e 768-HAP. (A) Embrião 840-HAP com 10,5dps mostrando coloração atrial intensa e delimitada. (B) Embrião 768-HAP com 10,5dpc mostrando ausência de coloração atrial, o que indica que o fragmento de 72 pb deletado nesta linhagem controla a especificidade atrial do promotor do gene SMYHC3 (MATOS, 2002).

1.4 Receptores nucleares

Os receptores nucleares compreendem uma ampla família de fatores de transcrição ativados por ligantes que medeiam a expressão de genes-alvo envolvidos no metabolismo, desenvolvimento e reprodução. A função primária é mediar a resposta transcricional, em células-alvo, a ligantes específicos como esteroides sexuais (progestinas, estrógenos e andrógenos), esteroides adrenais (mineralocorticoides e glicocorticoides), vitamina D, hormônio tireoidiano e retinóides (9-cis e all-trans) (MANGELSDORF et al., 1995; MCKENNA et al., 1999).

Os receptores nucleares podem ser subdivididos em três tipos gerais: o tipo 1 inclui os receptores esteroides clássicos como receptor de andrógenos (RA), receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR), receptor de glicocorticoide (GR) e receptor de mineralocorticoide (MR). O tipo 2 inclui os receptores nucleares que dimerizam com o receptor de retinóide X (RXR). São eles os receptores de vitamina D (VDR), hormônio tireoidiano (TR), ácido retinóico all-trans e receptores de ativadores da proliferação de peroxissomos (PPAR). O tipo 3 são os receptores nucleares órfãos, como o *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor* (COUP-TFII), para os quais ainda não foram encontrados ligantes (MCKENNA et al., 1999) (figura 4).

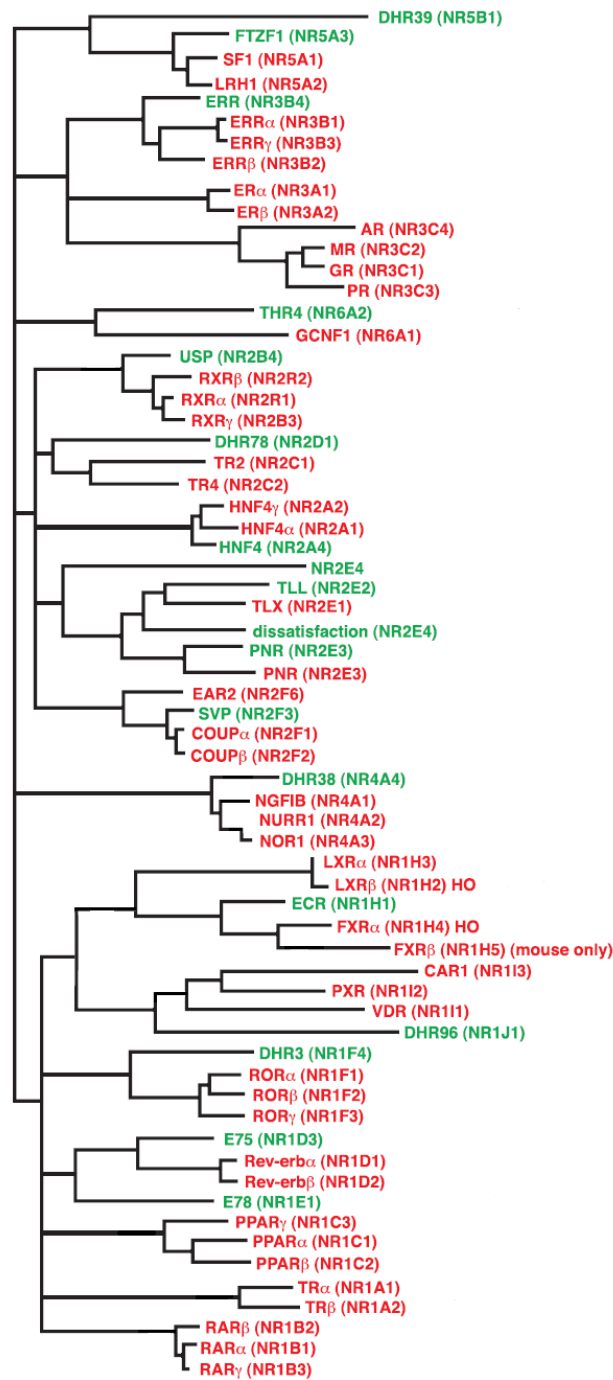


Figura 4. A superfamília de Receptores Nucleares. Os receptores nucleares formam uma superfamília de proteínas relacionadas filogeneticamente. Essa diversidade tem sido organizada em uma nomenclatura baseada na filogenia, onde a abreviação NR (nuclear receptor) é seguida por xyz, sendo x a subfamília, y o grupo e z o gene. A superfamília inclui receptores para moléculas hidrofóbicas como hormônios esteroides (por exemplo, estrógeno, glicocorticoides, progesterona, mineralocorticoides,

andrógenos, vitamina D), ácido retinóico (isoformas all-trans e 9-cis), hormônios tireoideos, ácidos graxos, leucotrienos e prostaglandinas. Adaptado (ROBINSON-RECHAVI et al., 2003)

Foi proposto que os receptores nucleares evoluíram de um receptor órfão ancestral sem ligante conhecido, por uma diversificação precoce, o qual só mais tarde adquiriu a ligação ao ligante. Esse conceito é bem aceito juntamente com a hipótese de que alguns receptores órfãos funcionem exclusivamente como repressores constitutivos ou ativadores de transcrição. Um exemplo disso é o repressor constitutivo Rev-Erb, capaz de recrutar correpressores ou ativadores mesmo sem a presença do AF-2 (GRONEMEYER; LAUDET, 1995).

Na região N-terminal ou A/B se encontra a região AF-1 (Active Function-1), que atua como ativadora constitutiva da transcrição (ARANDA; PASCUAL, 2001). A comparação da região A/B de subfamílias diferentes demonstra que esta é a região mais fracamente conservada entre os receptores nucleares. A principal função do AF-1 é conferir especificidade à célula, ao DNA e aos promotores (KRAICHELY et al., 1999; REICHARDT et al., 1998). Além disso, a região N-terminal dos receptores nucleares pode sofrer modificações pós-traducionais como fosforilação, que aumenta a probabilidade de transativação do AF-1, assim como a sinergia e cooperatividade do AF-1 com o AF-2 (REICHARDT et al., 1998; SHAO; LAZAR, 1999).

A região C abriga o domínio de ligação ao DNA (DBD) e é responsável pelo reconhecimento de sequências específicas de DNA (HREs, Elementos Responsivos a Hormônios). O DBD possui quatro sub-regiões que foram caracterizadas por definir ou contribuir diretamente em diversos fatores como: na especificidade aos elementos responsivos; na formação de uma interface de dimerização entre os DBDs; e no contato com o esqueleto do DNA (CHAMBON, 1996; GRONEMEYER; LAUDET, 1995).

Já a região D é menos conservada que as regiões que a cercam (C e E) e parece corresponder a uma “dobradiça” (“hinge”) que permite que os domínios de ligação ao ligante e ao DNA adotem diversas conformações evitando problemas conformacionais. Esta região também contém um sinal de localização nuclear (NLS) ou pelo menos uma parte funcional dele (CHEN et al., 1994). A região E engloba o domínio de ligação ao ligante (LBD) e AF-2, é uma das regiões mais bem estruturadas e ainda possui diversas funções reguladas pela ligação de moléculas lipofílicas, entre elas

estão a liberação do receptor do complexo de proteínas de choque térmico, translocação para o núcleo, homodimerização, heterodimerização e ativação da transcrição de genes-alvo (ARANDA; PASCUAL, 2001). Sua associação com proteínas correguladoras, como os correpressores (HEERY et al., 1997; HORLEIN et al., 1995) e os coativadores (FENG et al., 1998; RIBEIRO et al., 1995), são respectivamente essenciais para repressão e ativação de genes pelos receptores. A função ativadora dependente de ligante, AF-2, presente nesta região é a responsável pelo recrutamento de coativadores, embora às vezes, possa ter função repressora. É no LBD que agem os agonistas e antagonistas, ativando ou reprimindo a transcrição (GRONEMEYER; LAUDET, 1995) (figura 5).

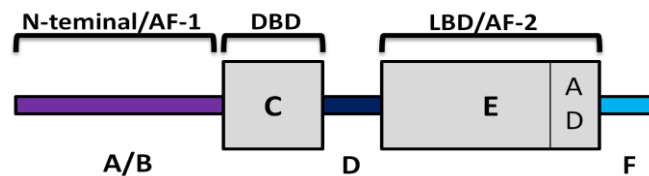


Figura 5. Estrutura dos receptores nucleares. Ilustração esquemática da organização estrutural e funcional dos receptores nucleares. As regiões mais bem conservadas C e E estão representadas por um retângulo cinza, e as barras coloridas são as regiões divergentes A/B, D e F. AF 1 e 2 representam os domínios de ativação da transcrição (Transcription Activation Function, AF). Dentro do AF-2 existe um domínio de transativação autônoma (Autonomous Transactivation Domain, AD).

1.4.1 Elemento de resposta a receptores nucleares

Os receptores nucleares regulam a transcrição por se ligarem a sequências específicas de DNA nos genes alvos, chamados de elementos de resposta a receptores nucleares. Esses elementos estão localizados nas sequências regulatórias normalmente presentes na região 5' (promotora) do gene alvo (ARANDA; PASCUAL, 2001).

Os elementos de resposta a receptores nucleares consistem em duas héxades de nucleotídeos, cujo consenso é 5'-PuGGTCA-3' (Pu = A ou G), que podem ser configuradas em uma variedade de motivos funcionais (GLASS, 1994; MANGELSDORF

et al., 1995). Esses elementos de resposta a receptores nucleares refletem diretamente os modos de ligação do receptor, que podem ser como heterodímeros, homodímeros ou monômeros (MANGELSDORF et al., 1995). Múltiplas combinações dois a dois podem formar palíndromos, palíndromos invertidos ou repetições diretas (direct repeats ou DRs) das sequências consensuais. A análise da maioria dos elementos de resposta, revelou que o consenso das repetições diretas mais comum é “AGGTCAN_xAGGTCA” (N_x – onde **N** pode ser qualquer nucleotídeo e **x** representa o número de nucleotídeos). Uma visão popular é que a especificidade de ligação obedeceria a uma regra em que o espaçamento entre as héxades 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 COUPTF-II, PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) ou de RXR; um espaçamento de 2 nucleotídeos (DR2) caracterizaria um receptor de ácido retinóico; um espaçamento de 3 nucleotídeos (DR3), um receptor de vitamina D; um espaçamento de 4 nucleotídeos (DR4), um receptor tireoideano; e um espaçamento de 5 nucleotídeos (DR5), um receptor de AR (PERLMANN et al., 1993).

Atualmente, sabe-se que os receptores de ácido retinóico podem se ligar a elementos de resposta além de DR2 e DR5, como DR1, DR3 e DR4 (MADER et al., 1993). Por sua vez, o receptor de vitamina D pode se ligar a elementos tipo DR3 e DR5, enquanto que COUPTF-II, por exemplo, exibe uma grande flexibilidade de ligação a vários tipos de elementos como DR0, DR1, DR4, DR6, DR8, DR11, podendo ainda ligar-se a DR2, DR3 e DR5, embora o elemento preferido e mais comum em promotores de genes influenciados pelo COUPTF-II seja o DR1. Para enfatizar a grande diversidade de possibilidades, determinou-se também que DRs com mais de 150 nucleotídeos de espaçamento conferem resposta a ácido retinóico e vitamina D (KATO et al., 1995). Em resumo, 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; UMESONO et al., 1991).

1.4.2 Co-reguladores

A atividade transcricional depende de uma série de proteínas associadas após a ligação dos receptores nucleares ao DNA, os co-ativadores e os co-repressores (CHEN; EVANS, 1995; HORLEIN et al., 1995). Os dois principais grupos de co-repressores incluem o co-repressor de receptores nucleares NCoR (NCoR/TRIP13) e o SMRT (silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors), NCoR2/TRAC (GLASS; ROSENFELD, 2000). Os co-ativadores incluem uma subfamília de proteínas p160 de co-ativadores de receptores esteróides (SRC) denominadas SRC-1 (NCoA-1), SRC-2 (TIF-2, GRIP-1) e SRC-3 (pCIP, ACTR, AIB1, TRAM1, RAC3) (GLASS; ROSENFELD, 2000).

Os receptores nucleares têm a capacidade de recrutarem correpressores tais como NCoR e SMRT, os quais, por sua vez, possuem uma atividade enzimática intrínseca ou recrutam complexos com atividade de histona desacetilase (HDAC) (GLASS; ROSENFELD, 2000). Durante a ligação do ligante, os correpressores são liberados e os receptores nucleares interagem com coativadores da transcrição, tais como as proteínas da família p160, as quais possuem atividade de remodelamento e modificação da cromatina, liberando-a do estado repressivo (GLASS; ROSENFELD, 2000).

1.4.3 Receptores de ácido retinóico (RARs e RXRs)

A sinalização por ácido retinóico é gerada através da existência de duas famílias de receptores, os RARs (α , β e γ) e os RXRs (α , β e γ), e suas inúmeras isoformas, que ligam como heterodímeros RXR/RAR aos elementos de resposta dos genes alvos de ácido retinóico. RAR e RXR interagem com múltiplos coativadores (mediadores transcricionais) e/ou corepressores (CHAMBON, 1996). Camundongos nocautes para cada uma das isoformas de RAR mostraram ser viáveis, porém, mutações para várias das combinações de RAR morrem in utero (MARK et al., 2006) ou apresentam defeitos embrionários que incluem o espectro de malformações da síndrome induzida por deficiência de vitamina A descrita muitos anos atrás (WILSON et al., 1953). Das

mutações para RXR, foi evidenciado que a isoforma RXR α é o principal envolvido na embriogênese, uma vez que camundongos mutantes para esta isoforma 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).

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

1.4.4 O receptor nuclear órfão COUP-TFII

Outros receptores nucleares importantes durante o desenvolvimento são aqueles da família do COUP-TFII. Estes são receptores nucleares órfãos, para qual ainda nenhum ligante foi encontrado (MCKENNA et al., 1999).

O COUP-TFII funciona como dímero e se liga com alta afinidade em repetições diretas imperfeitas do tipo DR-1 (TSAI; 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 (COONEY et al., 1992).

Em mamíferos, o COUP-TFII regula muitos processos biológicos, incluindo angiogênese, desenvolvimento neural, organogênese, determinação celular, homeostasia metabólica, ritmo circadiano e desenvolvimento atrial (KRUSE et al., 2008; PEREIRA et al., 1999). Está presente no mesênquima de órgãos internos como glândulas salivares, septo nasal, língua, também expresso no átrio, pulmão, estômago, pâncreas e bastante expresso no sistema nervoso (PEREIRA et al., 1995; QIU et al., 1994). Camundongos nocautes para COUP-TFII apresentam defeitos na angiogênese e no desenvolvimento cardíaco, e morrem antes de 10.5dpc devido a crescimento retardado da cabeça e problemas no coração, principalmente no átrio, seio venoso e nas veias cardinais (PEREIRA et al., 1995).

De acordo com esses estudos, é possível notar que o COUP-TFII é um receptor nuclear crítico durante o desenvolvimento e diferenciação de diversos tecidos. Contudo,

o papel do COUP-TFII durante o desenvolvimento cardíaco não está bem estabelecido. Ainda, a regulação de COUP-TFII não está bem clara, seja por ligantes ou através da modulação de sua expressão por outros fatores de transcrição ou mecanismos de sinalização como, por exemplo, o do ácido retinóico (KRUSE et al., 2008). Portanto, uma análise da regulação de genes-alvo, regulados por COUP-TFII permitirá uma melhor compreensão dos papéis que esse receptor nuclear órfão desempenha no desenvolvimento e na diferenciação.

2 CONCLUSÕES

- Ensaios de transativação celular demonstraram que neste contexto, RAR/RXR ou VDR/RXR não são capazes de ativar o promotor SMyHC3 ligado ao gene-repórter da luciferase, mesmo na presença de ácido retinóico ou vitamina D, respectivamente.
- Receptores nucleares como ROR α , REV-ERB β e ERR α , não ativam o promotor do gene no contexto celular.
- Através do rastreamento de receptores nucleares por transativação celular, observamos que os receptores nucleares PPAR α e PPAR β na ausência de seus respectivos ligantes, fenofibrato e GW0742, ativam o promotor do gene. Já o PPAR γ , ativa o promotor na presença de seu ligante, rosiglitazona.
- Os receptores nucleares TR α e TR β ativam o promotor na presença de seu ligante, T3, no contexto de transativação celular.
- O receptor nuclear AR, ativa o promotor na ausência de testosterona.
- Ensaios de transativação celular revelam que outro receptor nuclear, COUP-TFII, também é capaz de transativar o promotor atrial-específico do gene SMyHC3.
- Através de construções variadas do receptor nuclear COUP-TFII, uma *full-length*, uma somente com o domínio de ligação ao DNA (DBD), uma com o domínio de ligação ao ligante (LBD) e outra com o DBD e LBD sem o N-terminal, observamos a ativação do promotor pela construção *full-length* e também pela construção LBD.
- Ensaios de transativação celular com promotor Δ ECRRN cotransfectado com COUP-TFII não mostram atividade do gene-repórter.

- Uma abordagem proteômica, através de experimentos de espectrometria de massas, revela que as proteínas imunoprecipitadas com COUP-TFII-FLAG fazem parte de complexos remodeladores de cromatina, complexos de acetilação e desacetilação de histonas, fatores de transcrição gerais, ativadores e repressores de fatores de transcrição.
- Uma análise das proteínas encontradas a partir da espectrometria de massas revela que, em sua maioria, elas fazem parte de interactores das vias de sinalização por receptores de glicocorticoides (GR) e receptores de andrógenos (AR).
- Ensaios de transativação celular mostram uma ativação de duas vezes do promotor tanto pelo receptor nuclear COUP-TFII quanto por AR. Porém, quando associados, os dois receptores nucleares ativam o promotor em seis vezes.
- A partir da construção do ECRRN dirigido pelo promotor mínimo TK, observamos a ativação do gene-repórter quando cotransfectado com COUP-TFII e AR, simultaneamente.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- ABBOTT, B. D. Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. **Reprod Toxicol**, v. 27, n. 3-4, p. 246-257, Jun 2009.
- AMOUTZIAS, G. D. et al. A protein interaction atlas for the nuclear receptors: properties and quality of a hub-based dimerisation network. **BMC Syst Biol**, v. 1, p. 34, 2007.
- ARANDA, A.; PASCUAL, A. Nuclear hormone receptors and gene expression. **Physiol Rev**, v. 81, n. 3, p. 1269-1304, Jul 2001.
- CHAMBON, P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. **FASEB J**, v. 10, n. 9, p. 940-954, Jul 1996.
- CHEN, H. et al. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. **Cell**, v. 98, n. 5, p. 675-686, Sep 1999.
- CHEN, J. D.; EVANS, R. M. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. **Nature**, v. 377, n. 6548, p. 454-457, Oct 1995.
- CHEN, Z. P. et al. Pure and functionally homogeneous recombinant retinoid X receptor. **J Biol Chem**, v. 269, n. 41, p. 25770-25776, Oct 1994.
- COONEY, A. J. et al. 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**, v. 12, n. 9, p. 4153-4163, Sep 1992.
- DE MARTINO, M. U. et al. Interaction of the glucocorticoid receptor and the chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II (COUP-TFII): implications for the actions of glucocorticoids on glucose, lipoprotein, and xenobiotic metabolism. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1024, p. 72-85, Jun 2004.
- DUESTER, G. Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. **Eur J Biochem**, v. 267, n. 14, p. 4315-4324, Jul 2000.
- DUESTER, G. Genetic dissection of retinoid dehydrogenases. **Chem Biol Interact**, v. 130-132, n. 1-3, p. 469-480, Jan 2001.
- FENG, W. et al. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. **Science**, v. 280, n. 5370, p. 1747-1749, Jun 1998.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- FRYER, C. J.; ARCHER, T. K. Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex. **Nature**, v. 393, n. 6680, p. 88-91, May 1998.
- GLASS, C. K. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. **Endocr Rev**, v. 15, n. 3, p. 391-407, Jun 1994.
- GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. **Genes Dev**, v. 14, n. 2, p. 121-141, Jan 2000.
- GRONEMEYER, H.; LAUDET, V. Transcription factors 3: nuclear receptors. **Protein Profile**, v. 2, n. 11, p. 1173-1308, 1995.
- HARVEY, R. P. Patterning the vertebrate heart. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 7, p. 544-556, Jul 2002.
- HEERY, D. M. et al. A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. **Nature**, v. 387, n. 6634, p. 733-736, Jun 1997.
- HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. **Endocr Rev**, v. 23, n. 2, p. 175-200, Apr 2002.
- HOCHGREB, T. et al. A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. **Development**, v. 130, n. 22, p. 5363-5374, Nov 2003.
- HORLEIN, A. J. et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. **Nature**, v. 377, n. 6548, p. 397-404, Oct 1995.
- KASTNER, P. et al. Vitamin A deficiency and mutations of RXRalpha, RXRbeta and RARalpha lead to early differentiation of embryonic ventricular cardiomyocytes. **Development**, v. 124, n. 23, p. 4749-4758, Dec 1997.
- KATO, S. et al. Widely spaced, directly repeated PuGGTCA elements act as promiscuous enhancers for different classes of nuclear receptors. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 11, p. 5858-5867, Nov 1995.
- KINGSTON, R. E.; NARLIKAR, G. J. ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. **Genes Dev**, v. 13, n. 18, p. 2339-2352, Sep 1999.
- KOSTETSKII, I. et al. Retinoid signaling required for normal heart development regulates GATA-4 in a pathway distinct from cardiomyocyte differentiation. **Dev Biol**, v. 206, n. 2, p. 206-218, Feb 1999.
- KRAICHELY, D. M.; NAKAI, Y. D.; MACDONALD, P. N. Identification of an autonomous transactivation domain in helix H3 of the vitamin D receptor. **J Cell Biochem**, v. 75, n. 1, p. 82-92, Oct 1999.
- KRUSE, S. W. et al. Identification of COUP-TFII orphan nuclear receptor as a retinoic acid-activated receptor. **PLoS Biol**, v. 6, n. 9, p. e227, Sep 2008.

LAUDET, V.; GRONEMEYER, H. General organization of nuclear receptors. In: _____ (Ed.). **The Nuclear Receptors Facts Book**. San Diego: Academic Press, 2002. cap. 1, p.462. ISBN 0-12-437735-4.

LEID, M. et al. Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heterodimerizes to bind target sequences efficiently. **Cell**, v. 68, n. 2, p. 377-395, Jan 1992.

MADER, S. et al. 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**, v. 268, n. 1, p. 591-600, Jan 1993.

MANGELSDORF, D. J. et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835-839, Dec 1995.

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**, v. 259, n. 3, p. 248-262, Jul 2000.

MARK, M.; GHYSELINCK, N. B.; 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**, v. 46, p. 451-480, 2006.

MATOS, T. G. D. F. **Identificação de elementos regulatórios que controlam a expressão atrial-específica do transgene SMyHC3-HAP em camungongos**. 2002. 144 f. (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MATSUMOTO, T. et al. The androgen receptor in health and disease. **Annu Rev Physiol**, v. 75, p. 201-224, 2013.

MCKENNA, N. J.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. **Endocr Rev**, v. 20, n. 3, p. 321-344, Jun 1999.

MIZZEN, C. A. et al. The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. **Cell**, v. 87, n. 7, p. 1261-1270, Dec 1996.

MOSS, J. B. et al. Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. **Dev Biol**, v. 199, n. 1, p. 55-71, Jul 1998.

MUCHARDT, C.; YANIV, M. A human homologue of *Saccharomyces cerevisiae* SNF2/SWI2 and *Drosophila* brm genes potentiates transcriptional activation by the glucocorticoid receptor. **EMBO J**, v. 12, n. 11, p. 4279-4290, Nov 1993.

NEELY, K. E. et al. Activation domain-mediated targeting of the SWI/SNF complex to promoters stimulates transcription from nucleosome arrays. **Mol Cell**, v. 4, n. 4, p. 649-655, Oct 1999.

NIEDERREITHER, K. et al. Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. **Mech Dev**, v. 62, n. 1, p. 67-78, Feb 1997.

NIEDERREITHER, K. et al. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for early mouse post-implantation development. **Nat Genet**, v. 21, n. 4, p. 444-448, Apr 1999.

NIEDERREITHER, K. et al. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. **Development**, v. 128, n. 7, p. 1019-1031, Apr 2001.

NIKOVITS, W., JR. et al. Isolation and characterization of an avian slow myosin heavy chain gene expressed during embryonic skeletal muscle fiber formation. **J Biol Chem**, v. 271, n. 29, p. 17047-17056, Jul 1996.

OGRYZKO, V. V. et al. Histone-like TAFs within the PCAF histone acetylase complex. **Cell**, v. 94, n. 1, p. 35-44, Jul 1998.

OGRYZKO, V. V. et al. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. **Cell**, v. 87, n. 5, p. 953-959, Nov 1996.

PARK, J. I.; TSAI, S. Y.; TSAI, M. J. Molecular mechanism of chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor (COUP-TF) actions. **Keio J Med**, v. 52, n. 3, p. 174-181, Sep 2003.

PASCUAL, A.; ARANDA, A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 7, p. 3908-3916, Jul 2013.

PAZIN, M. J.; KADONAGA, J. T. SWI2/SNF2 and related proteins: ATP-driven motors that disrupt protein-DNA interactions? **Cell**, v. 88, n. 6, p. 737-740, Mar 1997a.

PAZIN, M. J.; KADONAGA, J. T. What's up and down with histone deacetylation and transcription? **Cell**, v. 89, n. 3, p. 325-328, May 1997b.

PEREIRA, F. A. et al. Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF): expression during mouse embryogenesis. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 53, n. 1-6, p. 503-508, Jun 1995.

PEREIRA, F. A. et al. The orphan nuclear receptor COUP-TFII is required for angiogenesis and heart development. **Genes Dev**, v. 13, n. 8, p. 1037-1049, Apr 1999.

PERLMANN, T. et al. Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs. **Genes Dev**, v. 7, n. 7B, p. 1411-1422, Jul 1993.

PINA, B.; BRUGGEMEIER, U.; BEATO, M. Nucleosome positioning modulates accessibility of regulatory proteins to the mouse mammary tumor virus promoter. **Cell**, v. 60, n. 5, p. 719-731, Mar 1990.

PLAGEMAN, T. F., JR.; YUTZEY, K. E. Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development. **J Biol Chem**, v. 279, n. 18, p. 19026-19034, Apr 2004.

POLLARD, K. J.; PETERSON, C. L. Chromatin remodeling: a marriage between two families? **Bioessays**, v. 20, n. 9, p. 771-780, Sep 1998.

QIU, Y. et al. 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**, v. 91, n. 10, p. 4451-4455, May 1994.

REICHARDT, H. M. et al. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival. **Cell**, v. 93, n. 4, p. 531-541, May 1998.

REIK, A.; SCHUTZ, G.; STEWART, A. F. Glucocorticoids are required for establishment and maintenance of an alteration in chromatin structure: induction leads to a reversible disruption of nucleosomes over an enhancer. **EMBO J**, v. 10, n. 9, p. 2569-2576, Sep 1991.

RIBEIRO, R. C.; KUSHNER, P. J.; BAXTER, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. **Annu Rev Med**, v. 46, p. 443-453, 1995.

ROBINSON-RECHAVI, M.; ESCRIVA GARCIA, H.; LAUDET, V. The nuclear receptor superfamily. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 4, p. 585-586, Feb 2003.

ROSENTHAL, N.; XAVIER-NETO, J. From the bottom of the heart: anteroposterior decisions in cardiac muscle differentiation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 12, n. 6, p. 742-746, Dec 2000.

SABBADINI, M. G. et al. Central nervous system involvement in systemic lupus erythematosus patients without overt neuropsychiatric manifestations. **Lupus**, v. 8, n. 1, p. 11-19, 1999.

SAMPAIO, A. C. **Regulação molecular da expressão atrial-específica do gene SMYHC3**. 2010. 122 f. (Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

SHAO, D.; LAZAR, M. A. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. **J Clin Invest**, v. 103, n. 12, p. 1617-1618, Jun 1999.

SIMOES-COSTA, M. S. et al. The evolutionary origin of cardiac chambers. **Dev Biol**, v. 277, n. 1, p. 1-15, Jan 2005.

SONG, C. H. et al. The chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II negatively regulates the transactivation of androgen receptor in prostate cancer cells. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49026, 2012.

STRUHL, K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. **Genes Dev**, v. 12, n. 5, p. 599-606, Mar 1998.

STRUHL, K. Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. **Cell**, v. 98, n. 1, p. 1-4, Jul 1999.

TSAI, S. Y.; TSAI, M. J. Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age. **Endocr Rev**, v. 18, n. 2, p. 229-240, Apr 1997.

TYLER, J. K.; KADONAGA, J. T. The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. **Cell**, v. 99, n. 5, p. 443-446, Nov 1999.

UMESONO, K. et al. Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. **Nature**, v. 336, n. 6196, p. 262-265, Nov 1988.

UMESONO, K. et al. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. **Cell**, v. 65, n. 7, p. 1255-1266, Jun 1991.

VILLEN, J.; BEAUSOLEIL, S. A.; GYGI, S. P. Evaluation of the utility of neutral-loss-dependent MS3 strategies in large-scale phosphorylation analysis. **Proteomics**, v. 8, n. 21, p. 4444-4452, Nov 2008.

WANG, G. F. et al. Irx4 forms an inhibitory complex with the vitamin D and retinoic X receptors to regulate cardiac chamber-specific slow MyHC3 expression. **J Biol Chem**, v. 276, n. 31, p. 28835-28841, Aug 2001.

WANG, G. F. et al. 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**, v. 18, n. 10, p. 6023-6034, Oct 1998.

WANG, G. F. et al. Atrial chamber-specific expression of the slow myosin heavy chain 3 gene in the embryonic heart. **J Biol Chem**, v. 271, n. 33, p. 19836-19845, Aug 1996.

WILSON, J. G.; ROTH, C. B.; 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**, v. 92, n. 2, p. 189-217, Mar 1953.

WU, S. P. et al. Atrial identity is determined by a COUP-TFII regulatory network. **Dev Cell**, v. 25, n. 4, p. 417-426, May 2013.

XAVIER-NETO, J. et al. A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart. **Development**, v. 126, n. 12, p. 2677-2687, Jun 1999.

XAVIER-NETO, J. et al. Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation. **Genesis**, v. 31, n. 3, p. 97-104, Nov 2001.

XAVIER-NETO, J. et al. Sequential programs of retinoic acid synthesis in the myocardial and epicardial layers of the developing avian heart. **Dev Biol**, v. 219, n. 1, p. 129-141, Mar 2000.

YAO, T. P. et al. Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. **Cell**, v. 93, n. 3, p. 361-372, May 1998.

YOSHINAGA, S. K. et al. Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. **Science**, v. 258, n. 5088, p. 1598-1604, Dec 1992.

YUTZEY, K. E.; BADER, D. Diversification of cardiomyogenic cell lineages during early heart development. **Circ Res**, v. 77, n. 2, p. 216-219, Aug 1995.

YUTZEY, K. E.; RHEE, J. T.; BADER, D. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart. **Development**, v. 120, n. 4, p. 871-883, Apr 1994.

ZHAO, D. et al. Molecular identification of a major retinoic-acid-synthesizing enzyme, a retinaldehyde-specific dehydrogenase. **Eur J Biochem**, v. 240, n. 1, p. 15-22, Aug 1996.