

LUANA NUNES SANTOS

**Redes gênicas que interagem com COUPTF-II
para determinar a identidade atrial através de
um elemento complexo de receptores nucleares
(cNRE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo como
requisito à obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

**São Paulo
2019**

LUANA NUNES SANTOS

**Redes gênicas que interagem com COUPTF-II
para determinar a identidade atrial através de
um elemento complexo de receptores nucleares
(cNRE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós- graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo como requisito à obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento.

Orientação: Dr. José Xavier Neto

Versão original.

**São Paulo
2019**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Nunes Santos, Luana
. Redes gênicas que interagem com COUPTF-II para
determinar a identidade atrial através de um
elemento complexo de receptores nucleares (cNRE).
/ Luana Nunes Santos; orientador Prof. Dr. José
Xavier Neto. -- São Paulo, 2019.
109 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Regulação Gênica. 2. Átrios. 3. Biologia do
Desenvolvimento. 4. Embriologia Molecular. 5.
Coração. I. Xavier Neto, Prof. Dr. José ,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Luana Nunes Santos

Titulo da Tese: Redes gênicas que interagem com COUPTF-II para determinar a identidade atrial através de um elemento complexo de receptores nucleares (cNRE)

Orientador: Prof. Dr. José Xavier Neto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **22/01/2020**, considerou a candidata:

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: osp@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Identificação das redes genéticas que interagem com COUP-TFII para determinar a identidade atrial em células cardíacas através do promotor do gene SMYHC III*", registrado sob o protocolo nº **90/2015**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **11/12/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) José Xavier Neto**

- Membros da Equipe: **Luana Nunes Santos (Pós-graduando)**

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Identification of gene networks that interact with COUP-TFII to determine atrial identity in cardiac cells through SMYHCIII promotor*", protocol nº **90/2015**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **12/11/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) José Xavier Neto**

- Team members: **Luana Nunes Santos (Graduate Student)**

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	FVB	Macho/male	25 g	16
	840e GFP	Macho/male	25 g	5
	FVB	Fêmea/female	25 g	240

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

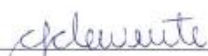


Comissão de Ética no uso de Animais
CEUA/CNPEM

Certificamos que o projeto intitulado "Identificação das redes genéticas que interagem com COUP-TFII para determinar a identidade atrial em células cardíacas através do promotor do gene SM α HCHII" (protocolo nº 16), sob responsabilidade de José Xavier Neto- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto Homem), para fins de pesquisa científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-CNPEM), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, em reunião de 28/04/2015.

Vigência do projeto	01/08/15-01/08/19		
Espécie/linhagem	Camundongo/ 840 eGFP	Camundongo/FVB	Camundongo/FVB
Número de animais	5	16	212
Peso/idade	25g	25g	25g
Sexo	M	M	F
Origem	Biotério LMG	Biotério LMG	Biotério LMG

Campinas, 05 de maio de 2015


Dra. Carolina F. M. Z. Clemente
Coordenadora


Dra. Maria Carolina Scatolin do Rio
Bióloga



Comissão de Ética no uso de Animais
CEUA/CNPEM

Certificamos que o projeto intitulado "Produção de zebrafish transgênicos" (protocolo n° 24), sob responsabilidade de José Xavier Neto- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto Homem), para fins de pesquisa científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-CNPEM), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, em reunião de 29/06/2015.

Vigência do projeto	01/07/2015 a 01/07/2018	01/07/2015 a 01/07/2018
Espécie/linhagem	Zebrafish AB e Tübingen	Zebrafish AB e Tübingen
Número de animais	72	48
Peso/idade	150mg/ até 2 anos	150mg/ até 2 anos
Sexo	M	F
Origem	LMG	LMG

Campinas, 06 de julho de 2015

Dra. Carolina F. M. Z. Clemente
Coordenadora

Dra. Maria Carolina Scatolin do Rio
Vice- Coordenadora

APPLICATION FOR APPROVAL TO AMEND AN APPROVED PROJECT**About this form:**

This form should be used to request an amendment to a previously approved project. An amendment is a minor change to an approved project that remains within the same aims of the original project, and does not change, or reduces, the impact on animal welfare.

This may include:

- Request to add or remove staff or students
- A request for additional animals, but not so many as to make the AEC question the integrity of your research design or aims of your project
- An extension to the duration of the project, for example, due to leave or issues with animal availability
- Minor amendment to, or addition of, a procedure or protocol

An amendment that falls outside of these guidelines, or increases the impact on animal welfare, should be submitted as a new application.

Before you begin your amendment application, please read the following information:

1. Applicants should visit the OREI website and download the Amendment Request form each time a new amendment is created, in order to ensure the most up-to-date version of the form is used.
[Amendment Request form](#)
2. For specific guidelines on completing the Amendment request form, click on the following link to access an online version of the Amendment Request guidance document. Open this document and use it as a companion to navigate to guidance information on the specific section of the amendment you are working on.
[Amendment Request guidance document](#)
3. Refer to the Animal Care and Use Standards and use these to describe the procedures in your amendment.
[Animal care and use standards](#)
4. To ensure that all AEC members are provided with sufficient information to participate effectively in the assessment of the amendment, all responses should be clear, concise and written in plain English.
[Writing for a non-scientific audience](#)
5. For further guidance and assistance, contact the Animal Welfare Officer or relevant animal ethics administrator.
[Contact Details](#)

What to do when you have completed your amendment application:

1. It is highly recommended that you have your amendment pre-reviewed by a trusted colleague experienced in preparing animal ethics applications prior to submission.
2. Save your amendment as a Microsoft Word file (not a PDF) using the new version ID number generated by Themis as the file name.
3. Upload your amendment into Themis as attachment type "Application".
4. Upload any new or amended Monitoring and Intervention sheets as attachment type "Monitoring and intervention proforma". Upload any other new or amended attachments as attachment type "Miscellaneous". Any existing documentation that is still relevant to the project as a whole, including unchanged Monitoring and Intervention sheets, should also be uploaded. Ensure all attachments are named clearly and logically.

1. ADMINISTRATIVE DETAILS

1.1 Project ID and Title:

ID No: 1614017.6

Title: Generating zebrafish lines and developmental studies

2. AMENDMENT DETAILS

2.1 Request to add or remove Investigators

Yes – Note: these changes will also need to be made in Themis No – Go to Section 2.2

When adding new investigators, list each protocol/procedure that they will be performing and indicate whether the investigator is 'C' (competent) or 'T' (needs training). Enter 'N/A' when an investigator is not performing a particular procedure. For instructions on *changing* procedures for investigators, and for including Animal Facility Managers, animal facility staff, veterinary nurses, farmers, etc., refer to the 'ANIMAL ETHICS AMENDMENT GUIDANCE' document. **Note that investigators requiring training must not perform procedures without supervision until deemed competent.**

INVESTIGATOR	PROTOCOL/PROCEDURE								
	Microinjection	Transplantation	Live imaging	BrdU / EdU / PTU swimming exposure	Monitoring	Euthanasia	Fin clipping		
Luana Nunes Santos	C	N/A	C	N/A	C	C	N/A		

*Add/delete rows as necessary

Luana is fully competent in the microinjection, imaging, monitoring and euthanasia she will be involved in, having worked on this project at Monash University Fishcore Facility throughout 2019.

2.2 Request for time extension

Yes No – Go to Section 2.3

Proposed new end date: (Insert date here)

2.3 Request for additional animals

Yes – Note: these changes will also need to be made in Themis No – Go to Section 2.4

Species/Strain/Sex/Age	No. Requested in this amendment	New Total

* Add more rows as necessary

Provide details of:

- The source of the animals, any transport information and housing details; and
- Statistical or other justification relevant to your experiments for the numbers requested.

2.4 Request to amend and/or add procedure/s

Yes No – Go to Section 2.5

2.5 Justify the requested amendment

Justify in full why this amendment is needed. You should:

- Provide a clear justification for the purpose of the amendment;
- Include the relationship to the aims and design of the original project, and any previously approved amendments; and
- Detail how the principles of the 3R's – Replacement, Reduction and Refinement – have been met.

Luana is a visiting PhD student from Brazil, who is conducting research on zebrafish in our collaborator's laboratory at Monash University (Dr. Mirana Ramialison's lab). As a collaboration, she would like to spend a few weeks hosting in our lab and inject zebrafish eggs with green fluorescent protein transgenes (at one-stage) and assess GFP expression by daily imaging up to 7 days postfertilization. (this will be done without the mounting required for time-lapse imaging described in our original application, and be a simple "looking at embryos / larvae under the microscope")

Reduction: The number of embryos injected will follow our approaches for transgene injection. At 2 or 3 days postfertilization, animals can be screened for successful expression (GFP in a subset of cells).

Refinement: Microinjection and screening / imaging and procedures are already refined and best current standard.

Replacement: The objective of this particular experiment is to assess how GFP expression can be targeted to different subregions of the heart by the use of modified enhancer elements that determine when and where GFP is expressed. This is based on bioinformatic modelling, but needs a living vertebrate for assessing validity of the bioinformatics predictions.

*Dedico este trabalho a cada pessoa que me estendeu
a mão ao longo da minha trajetória para que hoje eu
pudesse realizar este sonho.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter me concedido a dádiva da vida, e por, incansavelmente, me mostrar o melhor caminho a seguir quando eu me senti perdida, por me ensinar a ter coragem quando dentro de mim só havia medo e insegurança, por me ensinar a ser forte quando eu achava que não teria forças para continuar persistindo nos meus sonhos, por me mostrar que para tudo na vida existe o tempo e a hora certa, e que nem sempre são os meus, e principalmente por colocar as pessoas certas no meu caminho, para que, cada uma a sua maneira tornasse minha jornada mais leve. Dentro de mim eu só consigo sentir gratidão pela honra e o privilégio de, todos os dias, poder dizer que vivo o meu sonho.

Ao meu orientador, Dr. José Xavier Neto, por ter aceitado com que eu fizesse parte do seu grupo de pesquisa, por ter me estendido à mão e acreditado no meu potencial nos momentos de adversidade, por ter me desafiado diariamente para que eu desse o meu melhor, por ter me ensinado a lidar com o lado bom e ruim ao se fazer ciência me preparando para a vida.

Aos meus pais, Luzia e Edson, que mesmo sem entender o significado ou a importância das minhas escolhas me apoiaram cada um, à sua maneira e no seu momento, para que hoje eu chegasse até aqui com o sentimento de tudo valeu à pena. Sou extremamente grata por tudo que fizeram por mim e por terem moldado quem eu sou.

À minha irmã, Laiana, por ter trazido para as nossas vidas o Murillo me transformando na tia Lulu e permitindo com que eu pudesse experimentar o significado de amor puro.

À memória da Profa. Dra. Doralice Maria Cella por sabiamente ter me orientado a correr atrás da área de pesquisa que tanto havia feito meus olhos brilhar, biologia do desenvolvimento, por ter me incentivado a prestar, pela segunda vez, o vestibular da UNICAMP e por ter me apresentado a Profa. Dra. Lúcia Elvira e ao Prof. Dr. Henrique Marques-Souza, que me introduziram a esse mundo novo que me fascina até hoje.

Ao Prof. Dr. Henrique Marques-Souza, que foi meu orientador de iniciação científica, amigo e professor e que tanto me ensinou e deu asas para que eu pudesse alcançar voos cada vez mais altos.

À Ângela Saito, pela ajuda com alguns experimentos que foram importantes para o avanço na compreensão deste projeto.

À Hozana Castillo, por ter sido a primeira pessoa que me ensinou a manusear um par de pinças para dissecar embriões de camundongo quando eu ainda fazia parte do laboratório do Prof. Dr. Henrique, e que quando aluna do Laboratório de Modificação do Genoma me orientou e supervisionou diariamente na bancada, contribuindo para o meu desenvolvimento profissional e intelectual.

À Ângela Costa, pelos dados gerados utilizando zebrafish, pela companhia quando éramos vizinhas de bancada, pela amizade e carinho construídos que permanecem mesmo com a distância, e por ter plantando no meu coração a semente do “*Dream Big*”.

À Giulia, que para mim sempre será a "Piri", e que passou de uma colega de laboratório para uma amiga que irei levar para a vida.

À minha amiga Cleusa, pelas conversas, taças de vinho e comidas que compartilhamos depois de um dia intenso de experimentos no laboratório.

Às meninas do "anexo", Renata, Paula e Maria Luíza que fizeram dos meus dias no laboratório e horários de almoço muito mais divertidos.

Às minhas amigas, Gabriela, Bruna, Thamiris e Petra, família que a UNICAMP me deu, e que mesmo sem a convivência diária após o término da graduação, ainda assim se fazem presentes e são parceiras para todos os momentos. Eu me sinto honrada por ser amiga de mulheres fortes formando um grupo que não falta amor, carinho, palavra amiga, respeito e um “presta atenção” quando necessário.

À Bianca, que renova em mim todos os dias a minha paixão pela ciência com seu entusiasmo e brilho nos olhos quando conversamos sobre os próximos passos na carreira de cada uma.

A todas as mulheres inspiradoras que tive o prazer de conhecer e conviver, em especial a Amélia, a Cidinha, a Dona Ivone, a Simone, a minha mãe e a minha tia Lena que me transformaram com suas histórias de resiliência e coragem.

À Joanna e ao Andrews, pela amizade construída ao longo desses anos de USP, por terem me acolhido na casa de vocês todas as vezes que precisei ficar em São Paulo, por terem

sido a companhia entre uma aula e outra, na espera pela carona/ fretado e nos almoços, sempre com um sorriso no rosto e um jeito leve de viver a vida.

Ao meu amigo João, que desde o dia que nos conhecemos está sempre disposto a me ajudar. Não tenho palavras para agradecer tudo que têm feito por mim, pois sempre encontra tempo para que possamos discutir os meus dados, por vezes até altas horas da noite, por estar sempre disposto a me ouvir e dar sua opinião quando preciso tomar uma decisão importante, por ser uma das primeiras pessoas com quem eu quero dividir quando algo bom ou ruim acontece, por corrigir minhas apresentações, resumos, e ler, incansavelmente, todas as versões da minha tese, por toda a sinceridade e companheirismo. Muito obrigada por ser você mesmo em todos os tons e profundidades, e por permitir com que eu veja em você um amigo para todas as horas.

À Luciana e ao Thiago, os “perdidos em Melbourne”, por terem me acolhido durante o período que morei na Austrália fazendo que eu me sentisse em casa e entre amigos.

À Christina, pela amizade e por ter dividido comigo a experiência de muitas primeiras vezes.

À Dra. Mirana Ramialison, por ter me aceitado como sua aluna de intercâmbio, me acolhido na sua família e no seu grupo de pesquisa, e principalmente por ser um exemplo de mulher na ciência para mim. Também sou grata à Jeannette, Julian, Gulrez, Akriti, Martin, Caty e Lisa pela boa convivência, trocas de experiências, ajuda, discussão dos dados e boas risadas.

Ao Australian Regenerative Medicine Institute (ARMI) e seus colaboradores por todo suporte durante a execução do meu projeto.

À Dra. Patrícia Jusuf e a Dra. Stefanie Dudczig por terem aberto a porta do laboratório e me auxiliado nas injeções de transgenia em zebrafish.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e seus funcionários, que direta ou indiretamente contribuíram para que esse projeto fosse executado com êxito.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), por ter financiado esse projeto através dos processos 2015/12549-2 e 2018/09839-7 sem os quais seria inviável chegar até aqui.

Enfim, a você que apesar de não ter sido citado aqui contribuiu de alguma forma para que esse momento com o qual eu sempre sonhei se tornasse realidade, muito obrigada.

“Everything you can imagine is real.”

Pablo Picasso

RESUMO

Santos LN. Redes gênicas que interagem com COUPTF-II para determinar a identidade atrial através de um elemento complexo de receptores nucleares (cNRE). Tese de doutorado em Biologia de Sistemas. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A integração entre movimentos morfogenéticos e redes de regulação gênica durante o desenvolvimento embrionário é responsável pelo correto desenvolvimento cardíaco. Neste processo, padrões espaço-temporais da expressão gênica levam à transformação do tubo cardíaco primitivo num coração formado por quatro câmaras. Pouco se sabe a respeito de como esses eventos acontecem a nível molecular. Foi demonstrado que o gene *SMyHC III* apresenta dualidade na expressão durante o desenvolvimento cardíaco. Nos estágios iniciais, é expresso ao longo de todo o tubo cardíaco, enquanto na etapa da especificação das câmaras (átrio e ventrículo), sua expressão passa a ser átrio-específica. Postulou-se que um elemento de resposta à vitamina D e ao ácido retinoico (VDRE/RARE), presente na sequência do promotor do gene *SMyHC III* era responsável pela repressão da atividade ventricular, mas a sequência responsável por sua especificidade atrial carecia de elucidação. A fim de compreender este processo, nosso grupo de pesquisa descreveu o elemento complexo de receptores nucleares (cNRE), um novo sítio regulatório, de 32 pares de base e estruturalmente formado por três héxades (A, B e C) que contém sítios de ligação de receptores nucleares presente no promotor. Em face destas evidências, neste trabalho testamos a hipótese de que cNRE é responsável pela ativação átrio-específica do promotor de *SMyHC III*, além de propor o mecanismo molecular que, através do cNRE, regula esta atividade. Inicialmente, para validar a hipótese, foram realizados experimentos de transgenia em *zebrafish*, onde demonstramos que o promotor *SMyHC III* (contendo o cNRE) dirigiu a expressão de GFP de modo preferencial em átrios e transformou o padrão de atividade de um promotor ventricular (*vmhc*) numa direção atrial, demonstrando que o cNRE é um elemento necessário à ativação atrial do promotor, além de cruzar a barreira de espécie. A próxima etapa foi verificar se o regulador do destino atrial COUPTF-II (do inglês, *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II*), poderia ativar o promotor *SMyHC III* via cNRE e, apesar de COUPTF-II interagir com o promotor numa região que contém o cNRE, observamos que a ligação de COUPTF-II reprimiu a atividade do promotor. Assim, utilizamos espectrometria de massas como estratégia para identificação de coativadores de COUPTF-II e identificamos o

receptor de andrógeno (AR). De modo análogo ao COUPTF-II, AR age como repressor do promotor *SMyHC III*. No entanto, observamos que a interação sinérgica entre COUPTF-II e AR ativa promotor *SMyHC III* de forma dependente do cNRE. Em síntese, neste trabalho evidenciamos que cNRE, presente na sequência do promotor *SMyHC III*, contém a informação necessária para sua atividade átrio-específica, bem como para sua repressão ventricular. Também demonstramos que este elemento é sítio de ligação para COUPTF-II que, numa interação sinérgica com AR ativa o promotor via cNRE, revelando uma nova função para AR que não havia sido reportada na literatura. Adicionalmente, verificamos que a ativação do promotor de *SMyHC III* mediada por cNRE se dá por um mecanismo universal que cruza a barreira de espécies.

Palavras-chave: COUPTF-II. AR. Promotor *SMyHC III*. Átrio. Elemento regulatório.

ABSTRACT

Santos LN. Genetic network interacting with COUPTF-II to determine the atrial identity through the complex nuclear receptor element (cNRE). Doctoral thesis in System Biology. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The interplay between morphogenetic movements and gene regulatory networks taking place during embryonic development is responsible for proper heart development. In this process, spatial gene expression patterns lead to the development of the primary heart tube into a complex four-chamber organ. However, little is known about how these events are regulated at the molecular level. For instance, it has been evidenced that the *SMyHC III* gene has a dual pattern of expression during heart development. In the early stages, it is expressed throughout the entire heart tube and then, upon chamber specification, its expression is restricted to atria. It has been postulated that a Vitamin D/Retinoic Acid Responsive Element (VDRE/RARE), present at the *SMyHC III* promoter is in charge of its ventricular repression. However, the element driving its atrial expression remains elusive. As a means to fill this gap, our research group previously established that the *SMyHC III* gene promoter carries the complex Nuclear Receptor Element (cNRE), a new 32-bp regulatory element that is composed of three tandem-arrayed hexads, harboring binding sites for multiple transcription factors. Here, we hypothesized that cNRE is responsible for the atria-specific activation of the *SMyHC III* promoter, and the molecular mechanism regulating this characteristic. Transgenesis assays performed in zebrafish with the *SMyHC III* promoter driving GFP expression revealed that cNRE is necessary for atrial GFP expression and sufficient to switch the ventricular specific promoter (*vmhc*) towards an atrial direction. Thus, not only cNRE drives atrial specification of gene expression, it crosses the species barrier. Next, we tested whether the master regulator of atrial identity COUPTF-II (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II), would activate the *SMyHC III* promoter via cNRE. We found that COUPTF-II binds a promoter fragment that harbors the cNRE. Unexpectedly, transactivation assays showed that COUPTF-II represses *SMyHC III* promoter activation. We then employed a Mass Spectrometry-based strategy and identified the Androgen Receptor (AR) as a new COUPTF-II ligand. AR was also found to be a repressor of the *SMyHC III* promoter, but in synergic interaction with COUPTF-II, it activated the promoter in a cNRE-dependent manner. In synthesis, in this thesis, we validated a new gene regulatory sequence (cNRE) that is

responsible for the atrial activation of the *SMyHC III* promoter, as well as for the repression of the same promoter in the ventricular context. We also showed that this element has a binding site for COUPTF-II that, synergically with AR activates *SMyHC III* promoter via cNRE. Taken together, these findings point out to a new complex nuclear receptor element (cNRE) carrying species barrier-crossing information to provide chamber-specific gene expression and unveil new roles for known transcription factors in cell fate and cardiac chamber specification.

Keywords: COUPTF-II. AR. *SMyHC III* promoter. Atrium. Regulatory element.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação esquemática da sequência de movimentos morfogênicos necessários à formação do coração.....31
- Figura 2:** Representação esquemática da região -840 a -680 do promotor do gene *SMyHC III*..... 35
- Figura 3:** Matrizes das héxades A, B e C, que em conjunto compõem o cNRE, utilizadas para a análise de sintenia nas sequências promotoras de codorna, camundongo, *zebrafish* e humano..... 52
- Figura 4:** cNRE é um elemento regulatório importante para a atividade atrial do promotor *SMyHC III* em embriões de *zebrafish*..... 57
- Figura 5:** cNRE é suficiente para alterar o padrão de expressão dirigido por um promotor ventricular para atrial.....58
- Figura 6:** As héxades exercem diferentes alterações na expressão cardíaca de GFP dirigida pelo promotor *SMyHC III* em embriões de *zebrafish*.....60
- Figura 7:** A mutação nos dois últimos nucleotídeos da héxade B (Mut B2) eliminou a expressão de GFP dirigida pelo promotor *SMyHC III* no coração de embriões de *zebrafish*..... 61
- Figura 8:** Expressão átrio-específica de COUPTF-II em embrião de camundongo.....62
- Figura 9:** COUPTF-II interage com o promotor do gene *SMyHC III* reprimindo sua atividade..... 63
- Figura 10:** COUPTF-II V16 depende do cNRE para ativar a atividade do promotor do gene *SMyHC III*..... 64
- Figura 11:** COUPTF-II endógeno da linhagem HEK293T é repressor.....65
- Figura 12:** *RORα* é capaz de promover a ativação do promotor *SMyHC III* dependente da sequência do cNRE.....66
- Figura 13:** *Reverbβ* ativa o promotor *SMyHC III*, porém não é dependente do cNRE.....67
- Figura 14:** *ERRα* não exerce efeito sobre a atividade do promotor..... 68
- Figura 15:** Ensaio de transativação em HEK293T co-transfectadas com diferentes construções do promotor *SMyHC III* na presença de *PPARα*, *PPARβ* ou *PPARγ* e os respectivos ligantes.....70
- Figura 16:** *TRα* e *TRβ* ativam a atividade do promotor *SMyHC III* independente da presença da sequência do cNRE ou de testosterona. 72
- Figura 17:** *RXR* e/ou *VDR* promovem aumento da atividade do promotor mesmo na ausência do cNRE..... 74
- Figura 18:** *Irx4* e/ou *RXR* não necessitam do cNRE para aumentar a atividade do promotor *SMyHC III*..... 75

Figura 19: COUPTF-II interage fisicamente com AR, GR α e GR β	76
Figura 20: AR é expresso no núcleo das células de ambas às câmaras cardíacas.....	77
Figura 21: GR é expresso no núcleo e no citoplasma das células de ambas às câmaras cardíacas.....	78
Figura 22: COUPTF-II e AR colocalizam-se no núcleo de células atriais.....	79
Figura 23: AR reprime a atividade do promotor do gene <i>SMyHC III</i>	80
Figura 24: COUPTF-II e AR, ambos repressores, interagem sinergicamente para ativar a atividade do promotor do gene <i>SMyHC III</i>	81
Figura 25: Testosterona potencializa o sinergismo entre COUPTF-II e AR na ativação da atividade do promotor do gene <i>SMyHC III</i>	82
Figura 26: GR α é capaz de ativar a atividade do promotor do gene <i>SMyHC III</i> e a ação é potencializada pela dexametasona.....	83
Figura 27: GR β é capaz de ativar a atividade do promotor do gene <i>SMyHC III</i>	84
Figura 28: Combinação entre COUPTF-II e GR α ativa o promotor do gene <i>SMyHC III</i> independente do cNRE.....	86
Figura 29: Combinação entre COUPTF-II e GR β ativa o promotor do gene <i>SMyHC III</i> independente do cNRE.....	87
Figura 30: Análise de sintenia buscando pela assinatura das héxades que compõem o cNRE em sequências promotoras de codorna, camundongo, <i>zebrafish</i> e humano.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Oligonucleotídeos senso e antisenso utilizados para a reação de mutagênese nas respectivas héxades..... 42

Tabela 2: Sequência das regiões promotoras de codorna, camundongo, *zebrafish* e humano utilizadas para a análise de sintenia do elemento regulatório cNRE (héxade A, B e C)..... 53

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg: micrograma
µL: microlitro
µM: micromolar
cDNA: DNA complementar de cadeia simples
ChIP: imunoprecipitação da cromatina
CO₂: dióxido de carbono
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMSO: dimetilsulfóxido
DNA: ácido desoxirribonucleico
dpc: dias pós-coito
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
g: aceleração da gravidade
g: grama
gDNA: DNA genômico
h: hora
HCl: ácido clorídrico
hpf: horas pós-fertilização
HRP: anticorpo conjugado à peroxidase
Kb: quilobase
KCl: cloreto de potássio
kDa: unidade de massa atômica kiloDalton
L: litro
M: molar
mg: miligrama
MgCl₂: cloreto de magnésio
min: minuto
mL: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
Mut: mutante
NaCl: cloreto de sódio
ng: nanograma

pb: par de base

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PBSMT: solução salina tamponada com fosfato contendo leite em pó e Tween-20

PBST: solução salina tamponada com fosfato contendo Tween-20

PCR: reação em cadeia da polimerase

PFA: paraformaldeído

pH: potencial hidrogeniônico

qPCR: PCR quantitativo em tempo real

RIPA: tampão de radioimunoensaio

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

s: segundo

SDS: dodecil sulfato de sódio

TBST: solução salina tamponada com Tris contendo Tween-20

tg: transgênico

v/v: volume/volume

LISTA DE SÍMBOLOS

%: percentagem

°C: grau Celsius

α : letra grega alfa

β : letra grega beta

γ : letra grega gama

Δ : letra grega delta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	30
1.1	O desenvolvimento cardíaco.....	30
1.2	Receptores nucleares e o desenvolvimento cardíaco.....	32
1.3	O promotor atrial do gene <i>SMyHC III</i>	34
2	OBJETIVO.....	37
2.1	Objetivos específicos.....	38
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1	Construção dos plasmídeos	40
3.1.1	<i>SMyHC III</i> Δ cNRE pGL3.....	40
3.1.2	5xcNRE pGL3p, 5xcNRE- <i>vmhc</i> e 1xcNRE pGL3p.....	40
3.1.3	<i>Vmhc</i> -mCherry.....	41
3.1.4	Tol2- <i>SMyHC III</i> : GFP e Tol2- <i>SMyHC III</i> Δ cNRE: GFP....	41
3.1.5	Mutações específicas na sequência das héxades do Tol2- <i>SMyHC III</i> : GFP.....	42
3.1.6	Transformação de cepas DH5 α de <i>Escherichia coli</i>	42
3.2	<i>Zebrafish</i>	43
3.2.1	Transgenia em <i>zebrafish</i>	43
3.2.2	Linhagem <i>vmhc</i> -mCherry.....	44
3.3	Transfecção celular para os ensaios de transativação celular.....	44
3.4	Linhagem celular estavelmente transfectada com <i>SMyHC III</i> - Luc pGL3.....	45
3.4.1	Co-transfecção dos plasmídeos <i>SMyHC III</i> -Luc pGL3 e pBabe Puromicina.....	45
3.4.2	PCR para seleção dos clones <i>SMyHC III</i> -Luc pGL3 + p-Babe Puromicina positivos.....	46
3.4.3	Ensaio funcional dos clones positivos de <i>SMyHC III</i> -Luc +p-Babe Puromicina.....	46
3.4.4	Quantificação do número de cópias do gene repórter da Luciferase nos clones da linhagem permanente HEK293- <i>SMyHC III</i> -Luc pGL3 por qPCR.....	47
3.5	Ensaio de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP).....	47

3.5.1	Transfecção da linhagem HEK 293-SMyHCIII-Luc pGL3 com COUPTF-II FLAG.....	47
3.5.2	Sonicação de HEK 293-SMyHCIII-Luc.....	47
3.5.3	Ensaio de ChIP.....	48
3.6	Análise estatística.....	49
3.7	Embriões de camundongos	49
3.8	Imunofluorescência.....	49
3.9	Imunohistoquímica “Whole mount”.....	50
3.10	Ensaio de co-imunoprecipitação e Western Blot (WB).....	51
3.11	Análise de sintenia em sequências promotoras de codorna, camundongo, <i>zebrafish</i> e humano.....	52
4	RESULTADOS	55
4.1	cNRE é necessário para que o promotor <i>SMyHC III</i> dirija a expressão de GFP no átrio	56
4.1.2	cNRE é suficiente para mudar o padrão de expressão de um promotor ventricular para atrial	57
4.1.3	Cada héxade possui a capacidade de alterar o padrão de atividade do promotor <i>SMyHC III</i>	59
4.1.4	COUPTF-II interage com o promotor <i>SMyHC III</i>, porém é um potente repressor	61
4.2	Receptores nucleares que modulam a atividade do promotor <i>SMyHC III</i> via cNRE	65
4.2.1	Receptor Órfão RAR- relacionado α (<i>RORα</i>) e o cNRE	66
4.2.2	Receptor Nuclear Subfamília 1 Grupo D Membro 2 (<i>Reverbβ</i>) e o cNRE	67
4.2.3	Receptor Relacionado a Estrógeno α (<i>ERRα</i>) e o cNRE	67
4.2.4	Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomos (<i>PPAR</i>) e o cNRE	68
4.2.5	Receptor do hormônio tireoidiano (<i>TRα</i> e β) e o cNRE	71
4.2.6	Receptor de Retinoide X/ Receptor de Vitamina D (<i>RXR/ VDR</i>) e o cNRE	72
4.2.7	A proteína homeodomínio de classe Iroquois (<i>Irx4</i>) / <i>RXR</i> e o cNRE	74

4.3	COUPTF-II interage fisicamente com Receptor de Andr3geno (AR) e Receptor de Glicocorticoide (GR).....	75
4.4	AR 3 repressor, por3m age sinergicamente com COUPTF-II para aumentar a atividade do promotor <i>SMyHC III</i>	79
4.5	GR ativa o promotor <i>SMyHC III</i> independente de cNRE.....	82
5	DISCUSS3O	88
5.1	cNRE, elemento regulat3rio necess3rio e suficiente para dirigir a atividade do promotor <i>SMyHC III</i> no 3trio cruzando a barreira de esp3cie.....	89
5.2	COUPTF-II e AR interagem sinergicamente para regular a atividade do promotor <i>SMyHC III</i> de modo dependente do cNRE.....	93
6	CONCLUS3O.....	97
	REFERENCIAS*.....	99

1 INTRODUÇÃO

Será apresentada uma breve introdução sobre desenvolvimento cardíaco e especificação das câmaras cardíacas para contextualização deste estudo.

1.1 O desenvolvimento cardíaco

O desenvolvimento do coração, primeiro órgão funcional em vertebrados, se inicia logo após a gastrulação, onde dois campos laterais anteriores no mesoderma esplâncnico recebem estímulos intercelulares positivos e negativos (fator de crescimento de fibroblasto 8 (*Fgf 8*), proteína morfogenética óssea 2 (*BMP 2*) e *Wnt 1,3 e 8*) que determinam o chamado “mesoderma pré-cardíaco”. Estes sinais resultam, eventualmente, na ativação transcricional de reguladores do fenótipo cardíaco como *Nkx2.5*, *GATA4*, *Mef2C* e *Tbx5* (1–3). Esses dois campos migram de modo anterior e lateral, a partir da linha primitiva, dando origem ao crescente cardíaco que, ao migrar rapidamente em direção à porção medial do embrião (sentido ântero-posterior) forma o tubo cardíaco, que já funciona como uma bomba peristáltica vital na distribuição de nutrientes e oxigênio. Esta estrutura, ainda primitiva, é composta por uma camada interna de endocárdio, uma camada intermediária, a geleia cardíaca, e o manto cardíaco na camada mais externa (1,4,5).

Estudos de mapa de destino determinaram, a partir da relação espaço-temporal de precursores cardíacos e a expressão de retinaldeído-desidrogenase 2 (*Raldh2*), que a porção anterior (efluxo) do crescente cardíaco dará origem ao ventrículo e ao conus arteriosus, enquanto a região posterior (influxo) dará origem ao átrio e ao seio venoso (Fig. 1) (4,6–11).

Nos estágios posteriores do desenvolvimento, o coração primitivo sofrerá movimentos morfogenéticos de *looping* para direita e a convergência, que consiste na migração dos átrios e do seio venoso para a porção superior do coração, e por fim, o encaixamento em cunha com o posicionamento dos coxins do tronco cardíaco entre os primórdios das valvas mitral e tricúspide, dando origem à estrutura cardíaca final, composta por quatro câmaras (Fig. 1) (5,12,13). O crescimento do tubo cardíaco, essencial para etapas descritas anteriormente, se dá pela adição de progenitores indiferenciados do mesoderma lateral na porção caudal do tubo cardíaco e pela incorporação de precursores do mesoderma esplâncnico ao pólo cranial do mesmo (9).

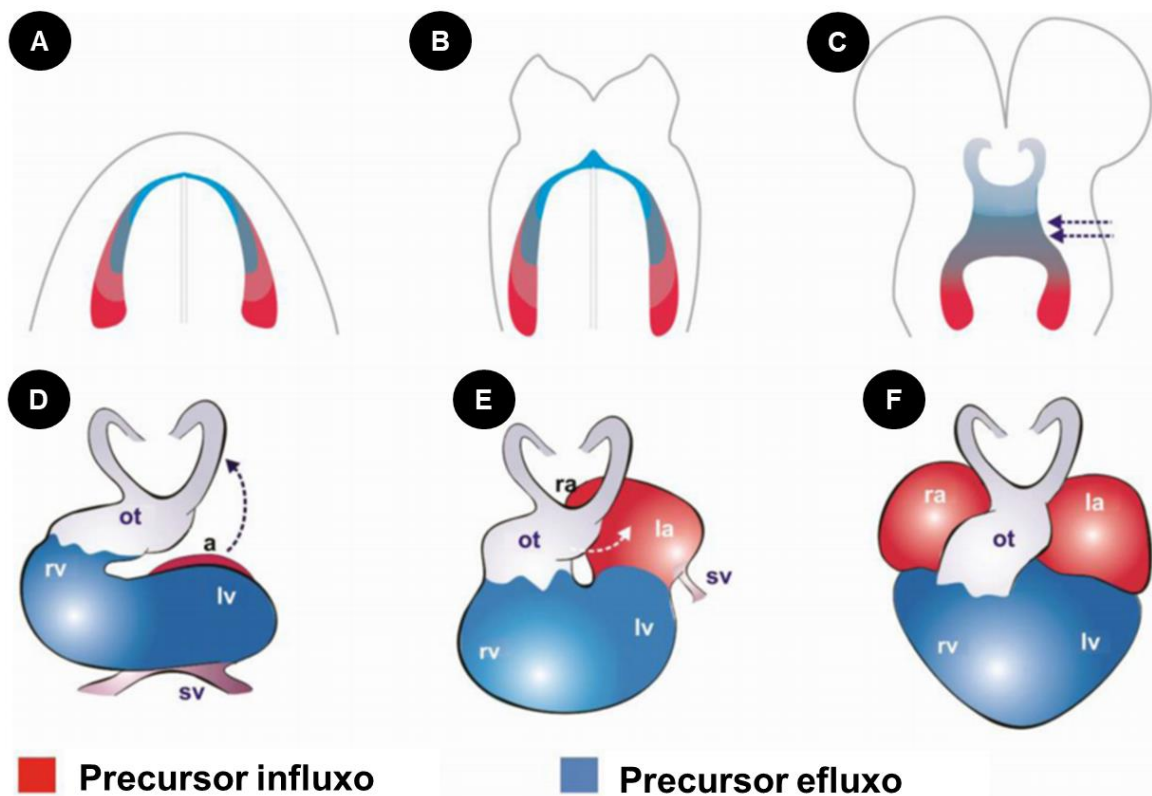


Figura 1: Representação esquemática da sequência de movimentos morfogênicos necessários à formação do coração.

(A e B) A migração cranial bilateral dos progenitores cardíacos que darão origem ao crescente cardíaco (campo cardíaco) destacado em vermelho o precursor da região de influxo, enquanto a região em azul corresponde ao precursor de efluxo. (C) Migração medial do crescente cardíaco dando origem ao coração tubular já passível de batimentos cardíacos. (D-E) Subseqüentes movimentos morfogênicos iniciado com o *looping* à direita (D) e alongação do coração tubular em formato de "S", com posterior movimento convergente onde a estrutura sino-atrial é movida dorso-cranial sobre a estrutura de efluxo (E), que por fim dará origem a configuração final do coração composto por quatro câmaras cardíacas (F). (ot) trato de saída; (a) átrio; (rv) ventrículo direito; (lv) ventrículo esquerdo; (sv) seio venoso; (ra) átrio direito; (la) átrio esquerdo. Modificado de (14).

1.2 Receptores nucleares e o desenvolvimento cardíaco

Como mencionado, o desenvolvimento cardíaco é um evento complexo e regulado pela expressão diferencial de receptores nucleares e/ou fatores de transcrição nas células que compõem o coração. Os receptores nucleares compreendem uma ampla família de fatores de transcrição que regulam a expressão de genes-alvo, sendo sua principal função mediar a resposta transcricional, em células-alvo a partir da interação com sequências específicas no DNA (15–17). Os receptores nucleares podem ser subdivididos em três tipos gerais: o tipo 1 inclui os receptores esteroides clássicos como receptor de andrógenos (*AR*), estrógenos (*ER*), progesterona (*PR*), glicocorticoide (*GR*) e receptor de mineralocorticoide (*MR*). O tipo 2 inclui os receptores nucleares que dimerizam com o Receptor de Retinoide X (*RXR*), como os receptores de vitamina D (*VDR*), hormônio tireoidiano (*TR*), ácido retinoico (*RAR*) e receptores de ativadores da proliferação de peroxissomos (*PPAR*). O tipo 3 são receptores nucleares órfãos, como o fator de crescimento nervoso B (*NGFI-B*), fator nuclear hepático 4 alfa (*HNF4 α*), receptor órfão RAR-relacionado alfa (*ROR γ*), *COUPTF-II* (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor II), para os quais ainda não foram descritos ligantes (17,18).

A contribuição singular de fatores de transcrição ao desenvolvimento cardíaco pode ser ilustrada tomando como exemplo os fatores de transcrição proteína de ligação GATA 4 (*Gata-4*), fator de transcrição T-box 5 (*Tbx-5*) e *COUPTF-II*, expressos nas regiões de influxo cardíaco (19–22). Evidências de estudos com *knock-in* e *knockout* demonstraram que a ausência de *Gata-4*, por exemplo, resulta em *cardia bifida* (dois corações independentes) em embriões de camundongo, além de reduzido número de cardiomiócitos (1). Já *Tbx5* foi demonstrado como fator de transcrição importante para o processo de diversificação das câmaras cardíacas, pois animais transgênicos com a expressão dirigida por um promotor ventricular (*β -MyHC*) apresentaram redução na expressão do gene ventricular *Mlc2v*, além de resultar em falha na trabeculação (23,24).

O receptor nuclear *COUPTF-II* representa um dos mais bem caracterizados receptores nucleares dentro de sua classe, sendo altamente conservado em metazoários, e desempenhando um papel fundamental durante o desenvolvimento e homeostase em diferentes organismos. *COUPTF-II* age como repressor ou ativador da atividade transcricional de genes-alvo, promovendo a diferenciação celular, proliferação, migração, sobrevivência e comunicação intercelular (25,26). Camundongos nocaute para *COUPTF-II* morrem antes do

estágio de 10.5 dpc devido ao crescimento retardado da cabeça e por problemas no coração, principalmente no átrio, seio venoso e nas veias cardinais (27), evidenciando o seu papel para a formação do coração e do sistema vascular (19,27–30). Recentemente, COUPTF-II foi descrito como sendo suficiente e essencial para determinar o destino atrial de células cardíacas, e sua ablação no coração gerou a ventricularização do átrio, culminando em aumento do tamanho celular, desenvolvendo túbulos t organizados, além das células adquirirem propriedades elétricas características de células ventriculares. Portanto, COUPTF-II controla a determinação da identidade celular entre átrio e ventrículo (31).

Irx-4, *Mlc2-V* e *Hrt-2* são expressos especificamente nos compartimentos de efluxo cardíaco (4,32,33). O gene Iroquois Homeobox 4 (*Irx4*) é um mediador da diferenciação ventricular, e apesar de seu mutante possuir desenvolvimento normal, este apresenta cardiomiopatia hipertrófica, que cursa com função contrátil comprometida, além da expressão aumentada de genes atriais (fator natriurético atrial e actina esquelética α) no ventrículo, demonstrando que apesar de não ser um gene suficiente para determinar a formação do ventrículo, *Irx4* é necessário ao estabelecimento dos genes que darão origem ao progenitor ventricular (34–36). A deleção da isoforma ventricular da miosina de cadeia leve (*Mlc2-V*) é letal ao desenvolvimento embrionário, sendo que os embriões apresentam anormalidades sarcoméricas que culminam em cardiomiopatia dilatada, além de significativa redução na fração de ejeção do ventrículo esquerdo, evidenciando sua função na manutenção da contratilidade cardíaca e morfogênese ventricular (37–39). Outro exemplo pode ser visto na mutação condicional do fator de transcrição Hairy-related 2 (*Hrt-2*) em cardiomiócitos, que resulta na atrialização ventricular devido à expressão de genes atriais no ventrículo, fato este que compromete na contração cardíaca, além de gerar problemas morfológicos na torção do ventrículo direito. Também foi demonstrado que esse fator de transcrição interage com GATA reprimindo sua atividade (40).

Em face de algumas evidências aqui apresentadas, pode-se reconhecer a importância da regulação gênica mediada por fatores de transcrição no desenvolvimento cardíaco, sendo que alterações na assinatura gênica propiciam o desenvolvimento de doenças cardíacas congênitas (41,42). O fenótipo exuberante observado nas mutações dos fatores de transcrição envolvidos na cardiogênese e na especificação das câmaras dificulta identificar, em nível celular, os elementos básicos que conferem a identidade das células que compõe o coração. Logo, sequências promotoras tecido-específicas e elementos *cis*-regulatórios capazes de recapitular o padrão de expressão gênica durante o desenvolvimento têm sido utilizados como estratégia

na compreensão dos eventos moleculares envolvidos na cardiogênese. Um exemplo promissor da aplicação de elementos regulatórios no estudo do desenvolvimento cardíaco é o *enhancer* de camundongo *Smarcd3* presente desde a etapa de gastrulação, e que foi utilizado como estratégia para identificar a assinatura gênica de células progenitoras cardíacas, o promotor ventricular da miosina de cadeia pesada (*vmhc*) com expressão restrita ao ventrículo e que tem sua expressão prevenida no átrio através dos elementos de ligação de Nkx2.5, enquanto sua expressão no ventrículo é mediada pelos elementos de ligação do fator de transcrição homeobox paired- related 2 (Prx2/So8)-like ou o promotor da miosina lenta de cadeia pesada III (*SMyHC III*) com atividade átrio-específica e objeto de estudo deste trabalho (42–45).

1.3 O promotor atrial do gene *SMyHC III*

Homólogo ao gene *AMHC1* que codifica a cadeia pesada de miosina atrial em galinhas, o gene codificador da miosina lenta de cadeia pesada III (*SMyHC III*) é expresso em corações de embriões de codorna em desenvolvimento (7,45). Nos estágios iniciais do desenvolvimento cardíaco, observa-se expressão ao longo de todo o tubo cardíaco, porém durante as etapas que caracterizam a especificação das câmaras cardíacas (seis dias de desenvolvimento em embrião de codorna) *SMyHC III* se torna um gene de expressão átrio-específica (45). A fim de identificar a sequência regulatória mínima para dirigir a expressão atrial do gene *SMyHC III*, Wang et al. clonaram a região 5' *upstream* (8.5 kb) do gene para dirigir a expressão da enzima cloranfenicol acetiltransferase (CAT). Ao realizarem deleções sistemáticas ao longo do fragmento de 8.5 kb e compararem a atividade do repórter em células atriais e ventriculares de codorna, foi possível identificar que uma região de 840 pb era a menor sequência do promotor que induzia maior expressão atrial de CAT e menor expressão de CAT nos ventrículos (45). Ao dissecar melhor esta região, este mesmo grupo identificou que uma sequência de 160 pb entre -840 e -680 seria um *enhancer* átrio-específico em embriões de codorna (45), designando-o como domínio regulatório atrial 1 (ARD1). Posteriormente, vários elementos *cis*-regulatórios foram encontrados no promotor *SMyHC III*, incluindo HF-1A, M-CAT, E-box, elemento de resposta à vitamina D (VDRE) ou ácido retinoico (RARE) e um sítio GATA (45). A partir da deleção e mutação do domínio regulatório de 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 retinoico (VDRE/RARE) (22).

Tal elemento, VDRE/RARE, quando ligado a um promotor heterólogo em um vetor retroviral direcionava a expressão gênica de CAT, de modo preferencial, no átrio de embriões de galinha, porém seus respectivos receptores, VDR e RAR, inibiam a expressão do gene repórter em cultura ventricular, mas não nos cardiomiócitos atriais, sugerindo-se para este elemento a regulação da expressão átrio-específica (22,45). Além disso, esse estudo sugeriu que os elementos HF-1A, M-CAT e E-box contidos no ARD1 não eram necessários para a expressão câmara-específica do gene *SMyHC III*, mas que as sequências envolvidas em sua propriedade átrio-específica estavam dentro dos 40 pb que incluem o VDRE/RARE (45). Essa região de 40 pb está contida dentro de um fragmento de 72 pb mais distais do promotor de 840 pb do gene o qual é requerido para a restrição atrial do *SMyHC III* (45) (Fig. 2).

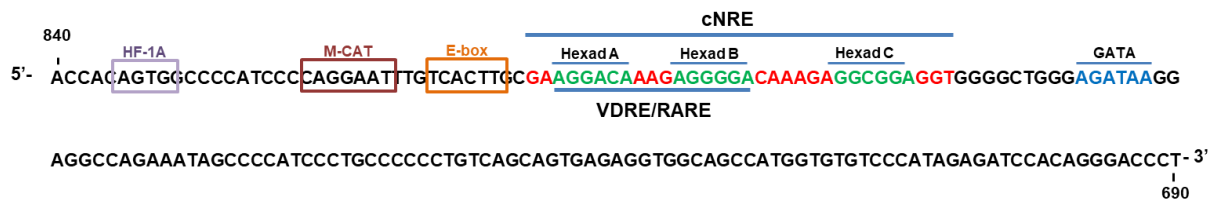


Figura 2: Representação esquemática da região -840 a -680 do promotor do gene *SMyHC III*.

Foram destacados o elemento dual de resposta a vitamina D e ao RA (VDRE/ RARE) por Wang et al. (1996) e a nova região de 32 pb (cNRE) proposta pelo nosso grupo como elemento regulatório para a atividade atrial específica do promotor composta pelas héxades A, B e C. Também foram destacados outros elementos *cis*-regulatórios presentes ao longo da sequência de DNA.

Camundongos transgênicos foram gerados com o promotor de 840 pb, porém com os 72 pb mais distais deletados, ligado ao gene repórter da fosfatase alcalina humana (HAP), e foi observada a liberação da expressão do gene repórter nos ventrículos e, simultaneamente, redução considerável da expressão atrial, de modo que o coração apresentou uma coloração ubíqua indiscriminada (46). A coloração indiscriminada observada nos átrios e ventrículos indica que sequências fora do fragmento de 72 pb controlam uma expressão que não distingue entre as câmaras cardíacas, ou seja, controladores positivos e negativos dentro do fragmento de 72 pb atuam sobre uma expressão cardíaca basal para torná-las atrial específica (46). Dada a importância do fragmento de 72 pb na ativação atrial-específica e repressão ventricular da expressão de *SMyHC III* foi realizada uma análise de bioinformática para buscar por potenciais sítios de ligação a receptores nucleares, que revelou a presença de um elemento

complexo de receptores nucleares (cNRE) de 32 pb. Foram realizados ensaios de *gel-shift* utilizando sondas para RXR, RAR, VDR e PPAR e os resultados indicaram que o cNRE carregava sítios de interação direta com esses receptores nucleares (46).

O elemento complexo de receptores nucleares (cNRE), proposto pelo nosso grupo de pesquisa, consiste em um elemento regulatório gênico, estruturalmente formado por três héxades (A, B e C) que foram identificadas a partir do cálculo da energia de ligação dos monômeros de RXR, RAR e VDR com o cNRE. A modelagem dessas interações foi importante para proposição da estrutura tripartida deste elemento regulatório que também possibilita a interação com dímeros de receptores nucleares numa disposição distal (A+B), proximal (B+C) ou espaçado (A+C) (dados não apresentados) (46–48) (Fig. 2).

Apesar dos avanços de nosso grupo no entendimento estrutural, ainda não estava esclarecido os mecanismos moleculares mediados pelo cNRE na especificação atrial da atividade do promotor do gene *SMyHC III*. Logo, neste trabalho utilizamos o cNRE e o receptor nuclear COUPTF-II como paradigma ao entendimento da especificação atrial em nível gênico.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi elucidar os mecanismos moleculares necessários a atividade atrial seletiva do promotor do gene *SMyHC III* através do cNRE.

2.1 Objetivos específicos

- Validar a sequência do cNRE como elemento regulatório essencial a atividade atrial seletiva dirigida pelo promotor do gene *SMyHC III*;
- Verificar a interação entre o promotor e COUPTF-II, visto sua importância para determinar a identidade atrial;
- Verificar a versatilidade do cNRE fora do contexto do promotor do gene *SMyHC III*;
- Identificar os receptores nucleares dependentes do cNRE para regular a atividade do promotor do gene *SMyHC III*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto de doutorado foi executado utilizando-se das técnicas descritas a seguir.

3.1 Construção dos plasmídeos

3.1.1 *SMyHC III* Δ cNRE pGL3

O plasmídeo com a deleção da região do cNRE do promotor do gene *SMyHC III* (*SMyHC III* Δ cNRE- Luc pGL3) foi gerado a partir de uma reação de mutagênese. Neste procedimento, uma reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies), na presença de 10 ng de DNA molde *SMyHC III*-Luc pGL3 e 10 μ M dos oligonucleotídeos senso (5'-
 AGGAATTTGTCACCTTGCGGGGCTGGGAGATAAGGAGGCCAG- 3') e antisense (5'-
 CTGGCCTCCTTATCTCCCAGCCCCGCAAGTGACAAATTCCT- 3'). Após a PCR, 1 μ L da enzima de restrição DpnI foi adicionada ao produto da reação a fim de digerir o DNA parental, com posterior incubação a 37 °C por 2 h e 30 min. Em seguida, o produto desta reação foi utilizado para transformação com bactérias competentes.

3.1.2 5xcNRE pGL3p, 5xcNRE- *vmhc* e 1xcNRE pGL3p

Para a construção do plasmídeo 5xcNRE pGL3p foi utilizada a estratégia de anelamento de oligonucleotídeos senso e antisense. Os oligonucleotídeos foram sintetizados contendo 5 repetições da sequência do cNRE do promotor do gene *SMyHC III* que é composto por 32 pb (GAAGGACAAAGAGGGGACAAAGAGGCGGAGGT). O anelamento foi realizado a partir do aquecimento da reação contendo 80 μ L de água MilliQ estéril e 10 μ L de cada um dos oligonucleotídeos (senso: 5'-
 CTAGGAAGGACAAAGAGGGGACAAAGAGGCGGAGGTGAAGGACAAAGAGGGG
 ACAAAGAGGCGGAGGTGAAGGACAAAGAGGGGACAAAGAGGCGGAGCTGAAGG
 ACAAAGAGGGGACAAAGAGGCGGAGGTGAAGGACAAAGAGGGGACAAAGAGG
 CGGAGGTCTCGAGA- 3' e antisense: 5'-
 GATCTCTCGAGACCTCCGCCTCTTTGTCCCCTCTTTGTCCTTCACCTCCGCCTCTTT
 GTCCCCTCTTTGTCCTTCACCTCCGCCTCTTTGTCCCCTCTTTGTCCTTCACCTCCG
 CCTCTTTGTCCCCTCTTTGTCCTTCACCTCCGCCTCTTTGTCCCCTCTTTGTCCTTC-
 3') a 10 mM por 5 min a 95 °C, seguido por resfriamento lento até temperatura ambiente. O

produto desta etapa foi ligado ao vetor pGL3p (previamente digerido com as enzimas de restrição XhoI e SmaI, gerando extremidades coesivas para ligação direcionada dos oligonucleotídeos anelados) ou com o plasmídeo pTol2-vmhc: GFP (linearizado com XhoI) com auxílio da enzima T4 DNA ligase (New England Biolabs), conforme descrito pelo fabricante. O mesmo procedimento foi adotado para a construção do plasmídeo 1xcNRE pGL3p (previamente digerido com XhoI e NheI), sendo a sequência do oligonucleotídeo senso 5'-CTAGC GAAGGACAAAGAGGGGACAAAGAGGCGGAGGTC-3', e do antisenso 5'-TCGAG ACCTCCGCCTCTTTGTCCCCTCTTTGTCCTTCG-3'. O produto de cada uma das reações de ligação foi utilizado para transformação com bactérias competentes.

3.1.3 *Vmhc-mCherry*

O plasmídeo *vmhc-mCherry* foi gerado a partir do fragmento de 1952 pb *upstream* do gene *vmhc*, conforme descrito por (49). O fragmento de interesse foi amplificado por PCR utilizando DNA genômico de *zebrafish* e clonado no plasmídeo pT2AL200R150G (cedido pelo Dr. Koichi Kawakami) previamente digerido com as enzimas de restrição XhoI e HindIII e purificado com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (Sigma Aldrich), conforme descrito pelo fabricante. A proteína verde fluorescente (GFP) foi substituída por mCherry por meio da digestão e clonagem nos sítios de ClaI e BamHI.

3.1.4 *Tol2-SMyHC III: GFP e Tol2-SMyHC III ΔcNRE: GFP*

A sequência do promotor do gene *SMyHC III* foi digerida com as enzimas de restrição SmaI e HindIII a partir do plasmídeo *SMyHC III-Luc* pGL3 e ligada com T4 DNA ligase (New England Biolabs) ao vetor pT2AL200R150G previamente digerido com as enzimas de restrição XhoI e HindIII e purificado com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (Sigma Aldrich), conforme descrito pelo fabricante. A versão mutante do promotor *Tol2-SMyHC III ΔcNRE: GFP* foi obtida a partir da digestão do plasmídeo *SMyHC III ΔcNRE-Luc* pGL3 e clonada em pT2AL200R150G conforme descrito para *Tol2-SMyHC III: GFP*. O produto de cada reação de ligação foi utilizado para transformação com bactérias competentes.

3.1.5 Mutações específicas na sequência das héxades do Tol2- *SMyHC III*: GFP

As mutações na héxades foram realizadas individualmente com o kit QuikChange II Site-Directed Mutagenesis (Agilent Technologies) conforme descrito pelo fabricante. A reação se deu na presença de 10 ng de DNA molde Tol2-*SMyHC III*: GFP conforme descrito na seção 3.1.1, utilizando os pares de oligonucleotídeos especificados na tabela 1. O produto de cada reação de ligação foi utilizado para transformação com bactérias competentes.

Tabela 1: Oligonucleotídeos senso e antisenso utilizados para a reação de mutagênese nas respectivas héxades.

Mutação	Oligonucleotídeo senso	Oligonucleotídeo antisenso
Mut A	gaGTCGACaagaggggacaaagaggcggaggt	acctccgctctttgtcccctttGTCGACtc
Mut B	cttgcgaaggacaaagTTgggacaaagaggcggag	ctccgctctttgtcccAActttgccttcgcaag
Mut B2	cttgcgaaggacaaagaggTTcaaagaggcggag	ctccgctctttgAAccctctttgccttcgcaag
Mut Bsp	gaaggacaaagaggggaTTaagaggcggaggt	acctccgctcttAAccccctttgtccttc
Mut C	aggggacaaagaTTcggaggtggggctgg	ccagccccacctccgAActttgtcccctc
Mut C2	gaggggacaaagaggTTgaggtggggctgg	ccagccccacctcAAcctctttgtcccctc
Mut C3	gaggggacaaagaggcgTTggtggggctgg	ccagccccaccAAcgctctttgtcccctc
Mut GATA	gaaggacaaagaggggacaaagaggcggaggtggggctgg	GTCGACcccagccccacctccgctctttgtcccctcttct
	gGTCGAC	tc

3.1.6 Transformação de cepas DH5 α de *Escherichia coli*

Uma alíquota de 50 μ L de bactérias termocompetentes da cepa DH5 α de *Escherichia coli* foi mantida no gelo por 30 min, exposta a 2-5 μ L do produto da ligação/ DNA de interesse, gentilmente homogeneizada, incubada por 10 min em gelo, seguido de choque térmico (incubação a 42 °C por 45 s e gelo por 10 min). Após este procedimento, foram adicionados 100 μ L de meio SOC (do inglês, *Super Optimal Broth*, caldo super ideal

composto por 2% de triptona, 0,5% de extrato de levedura, 8,56 mM NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 20 mM de glicose com pH final de 7,0) sem adição de antibiótico e as bactérias foram incubadas a 37 °C por 1 hora a 200 rpm. As células foram plaqueadas em placa de LB ágar (meio de cultura Luria Bertani, preparado com 10 g de peptona, 10 g de NaCl, 5 g de extrato de levedura, 20 g de ágar no volume final de 1 L com pH de 7,2) contendo o antibiótico de seleção específico do plasmídeo utilizado, e incubadas a 37 °C durante a noite. Cerca de 10 colônias de bactérias foram inoculadas, cada uma em 2 mL de LB suplementado com o antibiótico de seleção a 37 °C durante a noite a 200 rpm, e utilizadas para extração de DNA genômico com kit QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), conforme descrito pelo fabricante. Após a extração, realizou-se o sequenciamento com os oligonucleotídeos específicos para confirmar a integridade da sequência desejada e o clone positivo foi mantido em estoque glicerinado a -80 °C (500 µL de glicerol 50% estéril e 500 µL da cultura de bactéria).

3.2 Zebrafish

A espécie *Danio rerio* (*zebrafish*) do tipo selvagem AB, bem como as linhagens transgênicas geradas neste projeto foram mantidas na *facility* localizada no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio, Campinas) ou no caso dos experimentos de expressão transiente também foi utilizada a dependência do biotério de *zebrafish* da Universidade de Melbourne (The University of Melbourne, Austrália) conforme descrito em (50).

3.2.1 Transgenia em *zebrafish*

O acasalamento para obtenção de embriões de *zebrafish* no estágio de uma célula foi realizado conforme descrito em (50). Os ensaios de expressão transiente do promotor do gene *SMyHC III* e seus variantes foram realizados com co-injeção no estágio de uma célula. A solução para microinjeção foi preparada com 125 ng do DNA de interesse, 175 ng de RNA mensageiro da enzima transposase (previamente transcrito a partir do plasmídeo pCS-TP utilizando o kit mMACHINE SP6 (Ambion), conforme descrito pelo fabricante), 1 µL de vermelho de fenol 0,5% e quantidade suficiente de água MilliQ para completar o volume para 5 µL. Todos os plasmídeos utilizados ao longo deste projeto foram microinjetados em, no mínimo, dois experimentos independentes sendo os embriões mantidos

a 28,5 °C conforme descrito em (50), e analisados 48 horas pós-fertilização (hpf), com auxílio de uma lupa NIKON SMZ 25 e confocal Leica SP8.

3.2.2 Linhagem *vmhc-mCherry*

Após a injeção com o plasmídeo *vmhc-mCherry* no estágio de uma célula, conforme descrito em 3.2.1, os embriões positivos foram mantidos como descrito em (50) até a fase adulta. Posteriormente, os peixes foram inter cruzados para obtenção da geração F2 tg: *vmhc-mCherry*, utilizada para obtenção de embriões para o ensaio de expressão transiente com Tol2-*SMyHC III*: GFP ou Tol2-*SMyHC III* Δ cNRE: GFP.

3.3 Transfecção celular para os ensaios de transativação celular

A linhagem HEK293T (célula de rim embrionário humano, modificada com antígeno T de SV40) foi cultivada em meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 2 mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino (Invitrogen) em estufa de 37 °C, com atmosfera umedecida e enriquecida com 5% CO₂. Ao atingirem confluência de 90%, as células foram expostas à solução de tripsina-EDTA 0,25%, plaqueadas à densidade de 2×10^5 células em poços de placas de 12 poços e transfectadas 24 h depois utilizando o protocolo de lipofectamina 2000® (Invitrogen). Para cada poço, foram diluídos 2 μ L de lipofectamina em 50 μ L do meio mínimo Opti-MEM® (Invitrogen). O DNA foi diluído em outro microtubo com 50 μ L de Opti-MEM® na concentração estabelecida experimentalmente (0,25 μ g de AR; 1 μ g de GR α ; 1 μ g de GR β ; 0,1 μ g de COUPTF-II; 0,5 μ g de 1xcNRE pGL3p; 0,25 μ g de 5xcNRE pGL3p; 0,5 μ g de *SMyHC III*-Luc pGL3; 0,5 μ g de *SMyHC III* Δ cNRE- Luc pGL3; 0,1 μ g de CMV- *Renilla*; 0,5 μ g de ROR α ; 0,5 μ g de ERR α ; 0,5 μ g de PPAR α ; 0,5 μ g de PPAR β ; 0,5 μ g de PPAR γ ; 0,5 μ g de TR α ; 0,5 μ g de TR β ; 0,5 μ g de VDR; 0,5 μ g de RXR; 0,5 μ g de Revrb β e pBluescript KS para obter concentração final de 3 μ g de DNA) de acordo com desenho experimental. Foi aplicado um volume de 100 μ L (50 μ L de Opti-MEM® com lipofectamina e 50 μ L de Opti-MEM® com DNA) em cada poço e, após 48 horas, as células foram coletadas de acordo com as instruções do kit *Dual-Glo® Luciferase Assay System* (Promega). A leitura do gene repórter da luciferase de vagalume foi realizada com o auxílio do luminômetro *GloMax® Microplate Reader* (Promega). Ao lisado, foi adicionado o *Dual-*

Glo® Stop & Glo® Reagent, que extingue a reação de luminescência da luciferase de vagalume e fornece substrato para a reação da luciferase de *Renilla*, que então foi medida no luminômetro. A normalização da leitura foi feita através da razão das leituras da luciferase de vagalume pela luciferase de *Renilla*. Quando descrito, 24 h pós-transfecção as células foram expostas aos ligantes dos receptores nucleares nas concentrações estabelecidas experimentalmente (1 μM de ácido retinóico, 100 nM de vitamina D, 1 μM de testosterona, 0,1 μM de dexametasona, 1 μM de rosiglitazona, 1 μM de fenofibrato, 1 μM de GW0742) e então coletadas 24 h após o tratamento. Três experimentos independentes de transativação celular foram realizados, sendo que cada condição experimental foi preparada, com no mínimo, três poços.

3.4 Linhagem celular estavelmente transfectada com *SMyHC III-Luc* pGL3

3.4.1 Co-transfecção dos plasmídeos *SMyHC III-Luc* pGL3 e pBabe Puromicina

Células HEK293, cultivadas de acordo com o descrito para a linhagem HEK293T (item 3.3) foram plaqueadas à densidade de 3×10^6 em placas de 100 mm e, ao atingirem a confluência de aproximadamente 60%, foram co-transfectadas utilizando o reagente PEI (25 kDa Polyethylenimine linear, Polysciences). A transfecção foi realizada com 400 μL de NaCl 150 mM, 25 μg de *SMyHC III-Luc* pGL3 e 5 μg p-Babe puro (Addgene, #1764), e 35 μL de PEI 1mg/mL. Após 16 horas o meio de cultura foi trocado, e a seleção dos clones com puromicina 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi iniciada 48 h após a transfecção por cinco semanas, quando ocorreu a coleta dos clones. Para isso, as placas foram lavadas com PBS 0,1 M pH 7,4, invertidas para destacar as colônias com caneta, cobertas novamente com 10 mL de PBS 0,1 M pH 7,4 e os clones foram coletados com auxílio de uma micropipeta e lupa. Cada clone foi submetido à tripsinização (50 μL de solução de Tripsina- EDTA 0,25% em placa de 96 poços por 5 min a 37 °C), que foi inativada com 120 μL de meio de cultura com puromicina. As células foram dissociadas umas das outras e em seguida transferidas para placas de 24 poços contendo 500 μL de meio de cultura com puromicina até que adquirissem confluência para serem transferidos para uma placa maior.

3.4.2 PCR para seleção dos clones *SMyHC III-Luc* pGL3 + p-Babe Puromicina positivos

Após cada clone atingir a confluência na placa de 60 mm, os mesmos foram lavados com PBS 0,1 M pH 7,4, dissociados com 1 mL Tripsina- EDTA 0,25% por 3 min e depois foi adicionado o mesmo volume de meio de cultura com antibiótico para inativar a tripsina. Metade deste volume foi devolvido para a placa de 60 mm acrescida de meio de cultura com antibiótico e o outro 1 mL de células foi centrifugado a 1500 rpm por 5 min para extração de DNA genômico (gDNA), a ser utilizado na reação de PCR para genotipagem. A extração do gDNA foi realizada com o kit DNeasy® Blood & Tissue Kit (QIAGEN) conforme descrito pelo fabricante. A PCR foi preparada com 1,5 mM MgCl₂; 0,2 mM dNTP; 300 ng DNA; 1x Buffer 5X; 1,5 U GoTaq HotStat (Promega); 0,1 μM Primer RV3 (CTAGCAAATAGGCTGTCCC); 0,1 μM Primer GL2 (CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA) e quantidade suficiente de água MilliQ para completar o volume total da reação de 20 μL. Os ciclos utilizados na PCR foram de 94 °C 1 min por uma vez, 95 °C 1 min, 55 °C 30 s, 68 °C 1 min por 35 vezes e extensão final a 72 °C por 10 min. Os clones que foram classificados como positivos apresentaram um fragmento de aproximadamente 1000 pb no gel de agarose 1 %, uma vez que os primers GL2 e RV3 flanqueiam o sítio de múltipla clonagem onde o promotor do gene *SMyHC III* está inserido. Os clones positivos foram expandidos para uma placa de 100 mm, congelados com meio de cultura com antibiótico acrescido de 5% de DMSO, além de serem analisados num ensaio funcional através da ativação do gene repórter da luciferase dirigida pelo promotor *SMyHC III-Luc* pGL3 e por qPCR para o gene da luciferase.

3.4.3 Ensaio funcional dos clones positivos de *SMyHC III-Luc* +p-Babe Puromicina

Foram plaqueados três poços com 2×10^5 células do clone a ser testado em placas de 12 poços e após 72 h as células foram coletadas de acordo com as instruções do kit *Dual-Glo® Luciferase Assay System* (Promega). A leitura do gene repórter da luciferase de vagalume foi realizada com o auxílio do luminômetro *GloMax® Microplate Reader* (Promega), conforme descrito na seção 3.4. A análise estatística dos resultados foi realizada conforme descrito na seção 3.7.

3.4.4 Quantificação do número de cópias do gene repórter da Luciferase nos clones da linhagem permanente HEK293-SMyHC III-Luc pGL3 por qPCR

As reações de qPCR foram realizadas com 100 ng de cDNA de cada um dos clones positivos da linhagem permanente HEK293-SMyHCIII-Luc. Para a extração do RNA total foi utilizado o TRIzol® Reagent (Sigma Aldrich) conforme sugerido pelo fabricante. O RNA extraído foi utilizado para síntese de cDNA (2 µg de RNA) com a transcriptase reversa do Kit SuperScript®III First-Strand (Invitrogen) conforme protocolo do fabricante. As reações de qPCR foram preparadas em triplicatas com o kit Applied Biosystems® SYBR® Green PCR Master Mix e executadas no equipamento Stratagene®Mx3000P™, conforme descrito pelo fabricante. Para um volume final de 12 µL de reação, foram adicionados 6 µL de SYBR® Green Master Mix, 3 µL da solução estoque dos oligonucleotídeos senso (5'-TCGAAAGAAGTCGGGGAAGC- 3') e antisenso (5'-CGGTTTATCATCCCCCTCGG-3') a 400 nM e 3 µL de cada um dos cDNAs. As reações foram então adicionadas a placas ópticas PCR® Microplate PMI 010-005 (Axygen) e submetidas às seguintes condições de ciclagem: uma etapa inicial de 50 °C por 3 min, seguido de 95 °C por 5min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 45 s e 72 °C por 30 s, seguido de uma etapa final para a construção da curva de melting de 72 °C por 30 s, 95 °C por 1min e 55 °C por 30 s. Foram utilizados como controle positivo diluições do plasmídeo *SMyHC III-Luc* com número de cópias previamente conhecidas (6, 80, 1000 e 10000 cópias) e cDNA de HEK293 com controle negativo.

3.5 Ensaio de Imunoprecipitação da Cromatina (ChIP)

3.5.1 Transfecção da linhagem HEK 293-SMyHCIII-Luc pGL3 com COUPTF-II FLAG

Foram plaqueadas 3×10^6 células do clone 107 da linhagem permanente HEK293-SMyHCIII-Luc pGL3 em placas de 100 mm. As células foram transfectadas com a construção COUPTF-II FLAG, GFP-FLAG ou FLAG vazio conforme descrito na seção 3.5.1. Foram preparadas quatro placas de 100 mm para cada condição experimental.

3.5.2 Sonicação de HEK 293-SMyHCIII-Luc

Nesta etapa, foi adicionado, em cada uma das placas, 27 μ L de formaldeído 37% e incubadas por 10 min para fazer o *crosslinking* e logo em seguida foram adicionados 100 μ L de glicina a 1,375 M por mL de meio de cultura e incubado por 2 min, ambas as etapas a temperatura ambiente. O meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS 0,1 M pH 7,4 gelado. Foi adicionado 5 mL de PBS 0,1 M pH 7,4 gelado e pipetado na placa até que as células se soltassem e o volume foi transferido para um tubo cônico de 50 mL. Cada uma das placas foram lavadas com 3 mL de PBS 0,1 M pH 7,4 gelado e o volume transferido para o tubo cônico correspondente. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido, as células foram ressuspensas em 750 μ L em tampão de lise celular (10 mM de Tris-HCl pH8 1 M, 10 mM de NaCl 5 M, 0,2% de NP40 e inibidor de protease), incubadas por 10 min no gelo e centrifugadas a 3500 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi novamente descartado. Então, foi adicionado 1 mL de tampão de lise nuclear (50mM de Tris-HCl pH8 1M, 10mM EDTA pH8 0,5M, 1% de SDS 10% e inibidor de protease) e incubado por 10 min no gelo. Nesta última etapa foi utilizado agulha de insulina para homogeneizar a amostra com posterior adição de 2,4 mL de ChIP dilution buffer do kit de ChIP utilizado (Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit, 17-295, Millipore®). As amostras foram sonicadas no equipamento Sonics VibraCell™ (24 ciclos de 6 pulsos de 10 s com intervalo de 1 min) e mantidas no gelo ao longo de todo o processo.

3.5.3 Ensaio de ChIP

O experimento de ChIP foi realizado conforme recomendado pelo fabricante (Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Assay Kit, 17-295, Millipore®) com 5 μ g de anticorpo ANTI-FLAG® M2 (Sigma-Aldrich, F3165) ou IgG de coelho. O DNA eluído foi utilizado na PCR. A PCR foi realizada com o kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific- F530S) conforme descrito pelo fabricante utilizando oligonucleotídeos para amplificar a região que contém o cNRE (oligonucleotídeo senso: 5'-GCCACCACAGTGGCCCCATC- 3' e antisenso: 5'- ATTCCCATCCTGTGCCCAA- 3', com fragmento de 346 pb). O ciclo utilizado foi de 98 °C por 30 s, 35 ciclos de 98 °C por 10 s, 69 °C por 30 s, 72 °C por 30 s seguido de uma extensão a 72 °C por 10 min.

3.6 Análise estatística

Foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste *post-hoc* de Bonferroni ou teste *t* não paramétrico quando pertinente. Foram considerados estatisticamente significativos os dados que apresentaram valor de $p < 0,05$, sendo os dados representados em gráficos de dispersão com desvio padrão.

3.7 Embriões de camundongos

Embriões de camundongos foram coletados em 10,5 dpc e estagiados de acordo com (51). Os embriões foram fixados por 12 h a 4 °C em PBS 0,1 M pH 7,4 contendo 4% paraformaldeído (PFA 4%), embebidos em parafina ou desidratados em bateria crescente de metanol (25%, 50%, 75% e 100%) e armazenados em metanol a 100% a -20 °C até a análise. Para inclusão em parafina os embriões foram devidamente lavados com PBS 0,1 M pH 7,4 e desidratados em bateria crescente de etanol (50%, 70%, 80%, 95% e duas vezes em etanol 100%) por 20 min cada etapa, diafanizados com álcool: xilol (1:1 v/v), xilol I e xilol II por 20 min em cada solução, embebidos em parafina: xilol (1:1 v/v), parafina I e parafina II por 1 h cada, e finalmente emblocados em parafina em um suporte adequado para o tamanho da amostra.

3.8 Imunofluorescência

Foram realizados ensaios de imunofluorescência para as proteínas de interesse em cortes coronais de embriões camundongo com espessura de 6 µm. Os cortes foram desparafinizados, reidratados e tiveram os epítomos expostos utilizando a solução Dewaxing & Target Retrieval Buffer 100x Citrate Buffer, pH 6,0 (Spring Bioscience®) diluído para 1x em água MilliQ, conforme descrito pelo fabricante a 79 °C por 20 min em panela de pressão elétrica. Em seguida, os cortes foram lavados com PBS 0,1 M pH 7,4 e o material passou por um bloqueio de peroxidase endógena em metanol (1:99 v/v) por 15 min. Novamente os cortes foram lavados com PBST 0,1 M pH 7,4 e uma etapa de bloqueio com glicina 0,1 M em PBST por 10 min foi realizada para reduzir a autofluorescência. Em seguida, os cortes foram lavados em PBST 0,1 M pH 7,4 e incubados em albumina bovina sérica (BSA) 1% por 30 min, para bloquear ligações inespecíficas do anticorpo primário. O material foi lavado com

PBST 0,1 M pH 7,4 novamente, exposto à solução de anticorpos primários diluídos em Antibody Diluent (Spring Bioscience®) (incubados concomitantemente no caso de dupla marcação) mantido a 4 °C, em câmara úmida durante a noite. No dia seguinte, os cortes foram lavados em PBST 0,1 M pH 7,4 e incubados com os anticorpos secundários (diluição 1:800 v/v em Antibody Diluent (Spring Bioscience®) de Alexa Fluor 488 anti-camundongo (A21121), Alexa Fluor 568 anti-coelho (A20184) ou Alexa Fluor 488 anti-coelho (ab150077)) (incubados simultaneamente para os diferentes epítomos no caso de dupla marcação), durante 1 h, temperatura ambiente, em câmara úmida e escura. Os cortes foram lavados com PBST 0,1 M pH 7,4. O material foi contracorado com DAPI ou Hoechst (1:1000 v/v a partir de estoque a 1 mg/mL) por 10 min e analisado em microscópio confocal Leica SP8. As diluições dos anticorpos primários utilizados foram: Receptor de Andrógeno (AR (1:550 v/v) – ab74272), Receptor de Glicocorticoide (GR (1:400 v/v) – ab2768) e para COUPTF-II (1:150 v/v) - H7147).

3.9 Imunohistoquímica “*Whole mount*”

Os embriões de camundongo foram coletados como descrito na seção 3.8. Quando armazenados em metanol 100% a -20 °C, foram reidratados numa série decrescente de metanol até PBS 0,1 M pH 7,4 por 30 min em cada etapa. Os embriões foram então bloqueados por 4 h em uma solução contendo: 150 µL de DMSO; 150 µL de Triton-X 100; 300 µL de soro de ovelha; 0,03 g de BSA; 0,03 g de saponina e 0,3 g de leite em pó para um volume de 15 mL de PBST 0,1 M pH 7,4. Após esse período os embriões foram incubados com anticorpo primário (COUPTF-II, ab64849, 1:500 v/v) diluído em solução de bloqueio durante toda a noite a 4 °C sob lenta agitação. No dia seguinte, os embriões foram lavados em PBSMT (PBS 0,1 M pH 7,4, 2% de leite em pó e 0,5% de triton-X 100) por 2 vezes de 1 h cada a 4 °C, e depois por mais 3 vezes a temperatura ambiente sob constante agitação. Após as lavagens, os embriões foram incubados com anticorpo secundário HRP anti coelho (Sigma-Aldrich, A6154) na diluição 1:200 v/v em PBSMT durante toda a noite a 4 °C sob constante agitação. Os embriões foram lavados em PBST 0,1 M pH 7,4, e então incubados na solução de revelação contendo 3,3'-tetraidrocloro de diaminobenzidina (DAB) pelo tempo necessário. A revelação da marcação e análise foi realizada na lupa Nikon SMZ25. Para imunofluorescência “*whole mount*” em corações de embriões de camundongos foram realizados os mesmos passos descritos anteriormente nesta seção, porém na etapa após a

lavagem no anticorpo primário foi incubado anticorpo secundário fluorescente correspondente diluído na solução de bloqueio (1:500 v/v) e incubado por 2 h à temperatura ambiente. Foram realizadas lavagens com PBST 5 vezes de 5 min seguida por incubação com DAPI (1:1000 v/v a partir de estoque a 1 mg/mL) por 30 min em PBST. Os corações foram então lavados com PBST 0,1 M pH 7,4 5 vezes de 5 min e fixados em PFA 4% durante a noite e no dia seguinte foram lavados novamente com PBST 0,1 M pH 7,4 e visualizados com auxílio de uma lupa fluorescente.

3.10 Ensaio de co-imunoprecipitação e Western Blot (WB)

Células HEK293T foram plaqueadas na densidade de 3×10^6 células em placas de 100 mm e transfectadas com 12 μ g de FLAG-COUP-TFII ou FLAG-eGFP e pCMV-Receptor de Andrógeno (AR), FLAG-COUP-TFII ou FLAG-vazio e HA- Receptor de Glicocorticoide α (GR α) ou HA- Receptor de Glicocorticoide β (GR β), como descrito na seção 3.5.1. As células foram coletadas 48 h após a transfecção, lavadas com PBS 0,1M pH 7,4; lisadas em tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM (pH 8); NaCl 150 mM; detergente NP40 1%; deoxicolato de sódio 0,5%; SDS 0,1%; coquetel de inibidores de protease; DNaseI 10 μ g/mL e RNaseA 20 μ g/mL) e incubadas em gelo por 20 min, com posterior centrifugação a 14000 rpm por 20 min a 4 °C para remoção de *debris*. A quantificação de proteína total foi realizada com o kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific) conforme descrito pelo fabricante. O lisado total foi incubado com 50 μ L de microesferas ANTI-FLAG® M2 Affinity Agarose Gel (Sigma-Aldrich, A2220) por amostra a 4 °C sob agitação durante toda a noite. As microesferas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM pH 7,0 e NaCl 150 mM) e centrifugadas a 5000 g por 1 min a 4 °C. O complexo proteico foi eluído com 3xFLAG peptide a 150 ng/uL (Sigma-Aldrich, F4799) e incubado por 1h 30min sob agitação a 4 °C. O produto da imunoprecipitação, 50 μ g de extrato total de proteínas de HEK293T foi utilizado para a corrida do gel de eletroforese SDS-PAGE com posterior transferência para uma membrana de nitrocelulose. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com solução de 5% de leite em TBST, e incubadas com anticorpos anti-FLAG (Sigma-Aldrich, F1804, 1:5000 v/v), anti-AR (Abcam, ab74272, 1:500 v/v), anti-COUP-TF-II (Abcam, ab64849, 1:500 v/v), anti-HA (Sigma-Aldrich, H3663, 1:500 v/v) e anti-vinculina (Abcam, ab18058, 1:1000 v/v) a 4 °C sob agitação durante toda noite. No dia seguinte as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com o respectivo secundário conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich, A6154, 1:5000) por 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram

novamente lavadas com TBST e a detecção foi realizada com Pierce TM ECL Western Blotting Substrate® (Thermo Scientific) conforme descrito pelo fabricante.

3.11 Análise de sintenia em sequências promotoras de codorna, camundongo, *zebrafish* e humano

Foram analisadas sequências promotoras de codorna, *zebrafish*, camundongo e humano (Tabela 2), previamente descritas e/ou preditas a partir da atividade de histonas (H3K4me1, H3K4me3 e H3K27ac) (44,52) na região *upstream* do gene da isoforma α da miosina de cadeia pesada (*MyH6*) (<https://genome.ucsc.edu/>) ou, no caso de codorna, do gene da miosina lenta de cadeia pesada III (*SMyHC III*) buscando pela assinatura do cNRE (matrizes das héxades A, B e C, Fig. 3) com auxílio de um site (<https://zlab.bu.edu/~mfrith/possum/>) capaz de detectar *cis*-elementos presentes em sequências de DNA. A matriz de cada uma das héxades foi determinada baseada em suas sequências (vertical) pela presença (10) ou ausência (0) de determinado nucleotídeo (ACGT, horizontal), como demonstrado na figura 3. Uma vez determinada as matrizes foi seguida as orientações disponíveis no site (<https://zlab.bu.edu/~mfrith/possum/>) para a análise.

Héxade A					Héxade B					Héxade C				
	A	C	G	T		A	C	G	T		A	C	G	T
A	10	0	0	0	A	10	0	0	0	G	0	0	10	0
G	0	0	10	0	G	0	0	10	0	G	0	0	10	0
G	0	0	10	0	G	0	0	10	0	C	0	10	0	0
A	10	0	0	0	G	0	0	10	0	G	0	0	10	0
C	0	10	0	0	G	0	0	10	0	G	0	0	10	0
A	10	0	0	0	A	10	0	0	0	A	10	0	0	0

Figura 3: Matrizes das héxades A, B e C, que em conjunto compõem o cNRE, utilizadas para a análise de sintenia nas sequências promotoras de codorna, camundongo, *zebrafish* e humano.

Tabela 2: Sequência das regiões promotoras de codorna, camundongo, *zebrafish* e humano utilizadas para a análise de sintenia do elemento regulatório cNRE (héxade A, B e C).

Região Promotora	Sequência
Codorna (45)	GCCACCACAGTGGCCCCATCCCAGGAATTTGTCACCTTGCGAAGGA CAAAGAGGGGACAAAGAGGGCGGAGGTGGGGCTGGGAGATAAGGA GGCCAGAAATAGCCCCATCCCTGCCCCCTGTCAGCAGTGAGAGG TGGCAGCCATGGTGTGTCCCATAGAGATCCACAGGGACCCTTAGA ACCCCATTGCTCCCCATAGAGCTCTATAGAGTCCATAACACACCCA GAACAAGAGCTGAGGCAGAGCCTGTGGGGCAGAGATTGCTCCCTG TGTCTCTTGTAGGGTTTGCATCAGGTTCTATGGGGCAAGGCCTGTG GGTCTGGGCTTTGGGCACAGGATGGGAATAGTGGGGCAGAGCCTA TGGGGCAGATAATGTTCTATGGAGCAGTGCTTATAGGTAGAGCAG AAAGTTGTGGGGCAGGGTTTATAGGGCAAATCTGTGGGGCACAGT GTGGGAAGTATGGGGCAGAGCTTAAGGGTCTGCTAAGGGATCTAT GGGGCAGAATGGGATTGTCAGGGCACAAACGGGAAGTGGGGGGCA GAGGGTGTCTGCAGAGAAGAATGGGATCTATAGGGCAAAGGGGG TTCTACGTGAGAGAAGGAGAGTTGTGGGGCAGAGGGAGTTCTATG GGATAGAATGGAAACTATTGGGCAGAGTGTGTTCTGTGGAATGGA GCATGGGCCTCCCTATGGGCTCTGTTGTGCGATATGGGGCAGGCTG CGGCCCCCTCCTGTGCCGTCCCTCCCTCCCTCCTTCCAGGAATTTT TTAGGGGAGACAGAAGGGGGCGGGGTGGGGCGGGGGAAAGCAC ATAAAAGCCGTGGGGCAGCAGCAGGATTGGTGTGGGGCAGACA
Camundongo (53)	TCTCTGTCTGACAGCTCTCAGTGCTCCAGCCCCTTATATCCCATCC CATATGCCTGCTGCCTAAATTTGGAGTCCCTCTGCTGGGACCCTCCC TCCCACTTCCCTCCTGTCTGCTCCCTCCTCCTTTGATCCCTTGGCT CTGGAGGTGACAGGAGGACAGCAGGGCCCCAAGGTTTGCCCATGA AAGGTCTGTGCCCCTCGCCCCTCTGGCTCCATGGCCTTTTTTTAGTC CTTGGGCACATTCCTCCTCCCCAAAGGGCCGATGGGCAGATAGAG GAGAGACAGGAGCGTCTCACACCCTCCCTACCCAGGCCCTTA CCTCAGTTATTTTAATCTGAAGG
Zebrafish (43)	GACATTA AAAACTTTTTTGAGAGCTAAAGTGGCAGTGTGCCGATTTA CTTTGAATCTTTTTTTCCCATAGACATTATAAGCATGCTTTTTGTC TATGATGAATAAAAAAAAAAATGTGACTCTTTTTGCAAATTATAAA CAAGCGTTTTATAATGTAGCAAATATATTAATGACAAGTTCAT GCTTGTAATTTGTAATACAAAATGGTATTAGTAAATAACAGATTT TTTATTTAAAGAAAGGGAGAACTAATACTCTAATTTATCAAAGA GACATGAATGTAAGTGAAACAGTAAAGTTGAGTTTCAAAGAGGGG GGGGGGGTCTATTTATAGTGTATCCCTTATATTTTTAAATAATAAA TCTGCACATGCAAAACAATGATAATTTGTTTAAAGATGAAAAAAGC ACTATATTTCAATTAAGGATAACTAACATCAAGCCTAATGCC AGAGCTGTGTTCAATCAATCCAATTTTATTAATAAAACACTTTTC ACAATAATTACTGTTTCAAAGCATTTTTACAGAAGATGCACATTAC TGCATTACAATCAACATCAGAAAAGTAAAGTTTAGTTACCATAAG CCTATTAGTTTTTAATATCTTTAACTAATTAAGTAACTAGTAACGAATAG CCTTTAACAGTTAAAGTTGATATATATAAGCATAGTTAACCTGCAG

	<p>TTATATAGTATATTGGTGATGTCTGTGTGTATGGTCAATCAAGCGT ATTTGTTTGCATCTGATATTCTCAATAGCTGGAAACAGTGAGGCAG GTGTTAGTTGTCTATTTATGGAGATCAACAATAAAGGTCTCATT CTGACCCCAGACCACATTTAACTGCAGATAAACCCCTGCGCCTCCG CTTCTCCCTTACACCCTTATTTGGCTCTGCGTTTGCCTCTATAAAG ATCAGCAGTGGTGTTAGTGAGTCTACAGTTTTCCTCAACTGAGGAG AGATCCAGATCTGAAAAACTCCTGAAAACCATATTCACGATGGGT GATGCTTTAATGGCAG</p>
Humano (53)	<p>CCTTCAGATTAAAAATAACTAAGGTAAGGGCCATGTGGGTAGGGG AGGTGGTGTGAGACGGTCCTGTCTCTCCTCTATCTGCCCATCGGCC CTTTGGGGAGGAGGAATGTGCCCAAGGACTAAAAAAGGCCCTGG AGCCAGAGGGGCGAGGGCAGCAGACCTTTCATGGGCAAACCTCAG GGCTGCTGTCCTCCTGTTCACCTCCAGAGCCAAGGGATCAAAGGAG GAGGAGCCAGGACAGGAGGGATGGGAGGGAGGGTCCCAGCAGAT GACTCCAAATTTAGGCAGCAGGCACGTGGAATGAGCTATAAAGGG GCTGGAGCGCTGAGAGCTGTCAGACCGAGA</p>

4 RESULTADOS

Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos ao longo do desenvolvimento deste projeto.

4.1 cNRE é necessário para que o promotor *SMyHC III* dirija a expressão de GFP no átrio

A fim de verificar a importância do cNRE como sequência regulatória essencial para que o promotor do gene *SMyHC III* dirija a expressão de GFP no átrio, foram realizados ensaios de expressão transiente utilizando embriões de *zebrafish* da linhagem tg: *vmhc-mCherry* para que ficasse clara a delimitação entre as câmaras cardíacas (Fig. 4A e B). Neste experimento, embriões co-injetados com Tol2-*SMyHC III*: GFP, a versão selvagem do promotor, apresentaram mais de 42% dos indivíduos com expressão exclusiva de GFP no átrio e menos de 10% com expressão apenas no ventrículo (Fig. 4C). Já os embriões que foram co-injetados com a forma mutada do promotor (Tol2-*SMyHC III* Δ cNRE: GFP) apresentaram aproximadamente 5% de expressão atrial de GFP, enquanto a expressão apenas no ventrículo foi maior que 46% (Fig. 4C), deixando evidente a relevância do cNRE para a especificidade atrial da expressão de GFP dirigida pelo promotor *SMyHC III*.

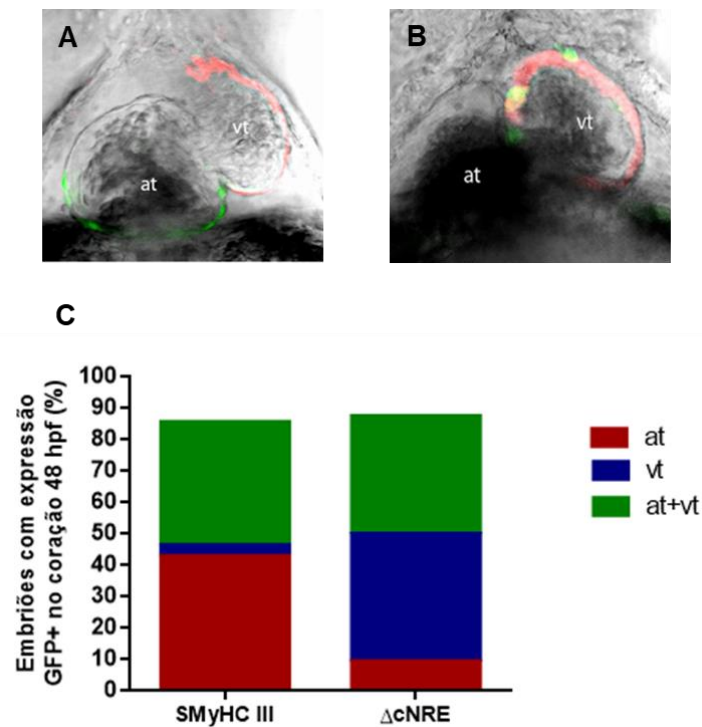


Figura 4: cNRE é um elemento regulatório importante para a atividade atrial do promotor *SMYHC III* em embriões de *zebrafish*.

(A e B) Foi avaliado o padrão de expressão de GFP dirigido pelo promotor *SMYHC III* ou sua versão mutante (*SMYHC III* Δ cNRE) nas câmaras cardíacas 48 hpf. (C) O promotor selvagem dirigiu a expressão de GFP majoritariamente no átrio, enquanto sua versão mutada teve maior porcentagem de embriões expressando GFP no ventrículo, além de acentuada redução da expressão de GFP no átrio. (at) Átrio. (vt) Ventrículo. (at+vt) Átrio e ventrículo.

4.1.2 cNRE é suficiente para mudar o padrão de expressão de um promotor ventricular para atrial

Com a evidência experimental da importância do cNRE como um elemento regulatório do promotor do gene *SMYHC III* para dirigir a expressão atrial de GFP (Fig. 4C), buscou-se verificar se tal capacidade poderia ser transferida para um promotor ventricular. Com este objetivo, a sequência 5xcNRE foi clonada *upstream* da sequência do promotor ventricular *vmhc*. Como esperado, verificou-se que nenhum embrião do grupo controle (DNA Tol2: *vmhc*: GFP) apresentou expressão atrial seletiva de GFP (Fig. 5A-C e I), sendo que 73% dos embriões apresentaram expressão de GFP ventrículo-exclusiva (Fig. 5I), enquanto 27% dos embriões expressaram GFP em ambas às câmaras cardíacas (Fig. 5I). Já o grupo co-injetado com Tol2:5xcNRE-*vmhc*: GFP, apresentou um embrião com expressão atrial de GFP

(Fig. 5D-G e I), houve redução na proporção de indivíduos expressando apenas no ventrículo (maior que 45%) e aumento da expressão de GFP em ambas as câmaras (maior que 53%) (Fig. 5I) quando comparado com o grupo controle (Tol2: *vmhc*: GFP). Estas evidências sugerem que o cNRE é suficiente para alterar o padrão de expressão dirigido por um promotor ventricular para atrial mesmo fora do seu contexto nativo, o promotor do gene *SM γ HC III*.

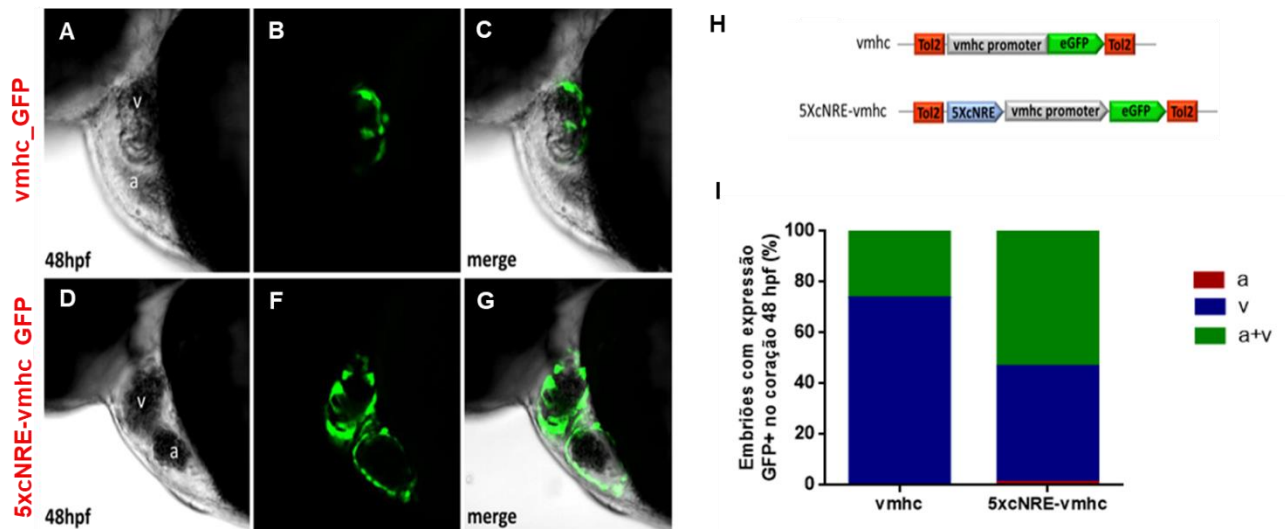


Figura 5: cNRE é suficiente para alterar o padrão de expressão dirigido por um promotor ventricular para atrial.

(A-G) Foram analisados os padrões de expressão de GFP nas câmaras cardíacas de embriões de *zebrafish* co-injetados com o promotor ventricular *vmhc*-GFP ou *5xcNRE-vmhc*-GFP (H) 48 hpf. (I) 60% dos embriões *vmhc*-GFP expressaram GFP apenas no ventrículo, enquanto embriões *5xcNRE-vmhc*-GFP apresentaram aumento na proporção embriões expressando GFP em ambas as câmaras cardíacas quando comparado ao controle, além de ter sido observado um indivíduo com expressão atrial específica de GFP. (a) Átrio. (v) Ventrículo. (a+v) Átrio e ventrículo.

4.1.3 Cada héxade possui a capacidade de alterar o padrão de atividade do promotor *SMyHC III*

Objetivando elucidar quais eram os nucleotídeos críticos ao papel desempenhado pelo cNRE, foi avaliado o efeito de mutações nas héxades A, B e C, além dos nucleotídeos que separam as héxades B e C (Bsp), bem como o sítio de ligação a fatores de transcrição GATA no padrão de expressão de GFP dirigido pelo promotor *SMyHC III*. Verificou-se que a mutação na héxade A (Mut A) resultou no aumento (> 60%) da expressão de GFP em ambas as câmaras cardíacas e redução no átrio (> 10%) comparado ao grupo controle (*SMyHC III*) com aproximadamente 40% de indivíduos com expressão de GFP nas mesmas categorias analisadas (Fig. 5), ou seja, a mutação gerou a perda de estimuladores atriais e repressores ventriculares. Após a transversão dos dois primeiros nucleotídeos na héxade B (Mut B) foi observado o dobro do número de embriões (> 20% versus <10%) expressando GFP no ventrículo, bem como um aumento expressivo em ambas as câmaras cardíacas (> 70% versus < 40%). Porém na câmara atrial houve redução no número de embriões expressando GFP (< 20% versus > 40%) quando comparado aos indivíduos controle (*SMyHC III*) (Fig. 6) indicando a perda de ativadores atriais e repressores ventriculares. A mesma estratégia de mutação foi realizada nos dois últimos nucleotídeos da héxade B (mut B2), no entanto, nenhum embrião apresentou expressão de GFP nas câmaras cardíaca (átrio ou ventrículo) (Fig. 7C), porém foi observada expressão de GFP em outros tecidos, como por exemplo, no músculo esquelético e vesícula óptica (Fig. 7A-B), ou seja, houve a perda de um importante estimulador cardíaco (ativador atrial e repressor ventricular). Já a transversão nos dois primeiros nucleotídeos do mutante Bsp (Mut Bsp) resultou na mesma porcentagem de embriões com alteração na expressão de GFP no ventrículo apresentada pelo Mut B, assim como o padrão observado no átrio com redução na expressão de GFP quando comparado ao grupo controle (< 30% versus > 40%) (Fig. 6). Os indivíduos com transversão nos dois primeiros nucleotídeos da héxade C (Mut C) apresentaram acentuada redução na expressão de GFP no átrio (30% versus >50% no controle) devido à perda de um potencial ativador atrial. No entanto, a expressão ventricular demonstrou um aumento de quatro vezes (40% versus controle <10%), pois houve a perda de um potencial repressor ventricular. Resultado semelhante foi obtido no grupo com mutação nos dois últimos nucleotídeos desta mesma héxade (Mut C3) com aproximadamente 30% dos embriões expressando GFP no ventrículo (Fig. 6). Os indivíduos expressando GFP em ambas as câmaras cardíacas no Mut C não houve diferença quanto à porcentagem de embriões na mesma condição comparados ao grupo

controle (*SMyHC III*), porém o grupo Mut C3 apresentou redução (20% versus < 40%), enquanto outro grupo de mutante com transversão no segundo e terceiro nucleotídeo da héxade C (Mut C2) apresentou expressiva alteração na mesma câmara cardíaca (> 60% versus < 40%) (Fig. 6). Também foi avaliada a importância de GATA no contexto do promotor *SMyHC III*, pois este domínio de ligação é sabido ser importante para interação de fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento cardíaco (54). Assim, a mutação no domínio GATA resultou na grande redução da expressão de GFP no átrio (< 10% versus controle > 40%), aumento no ventrículo (< 40% versus controle <10%), além de aumento na porcentagem de indivíduos expressando GFP em ambas as câmaras cardíacas (< 60% versus controle <40%), resultado da perda de ativadores atriais e repressores ventriculares.

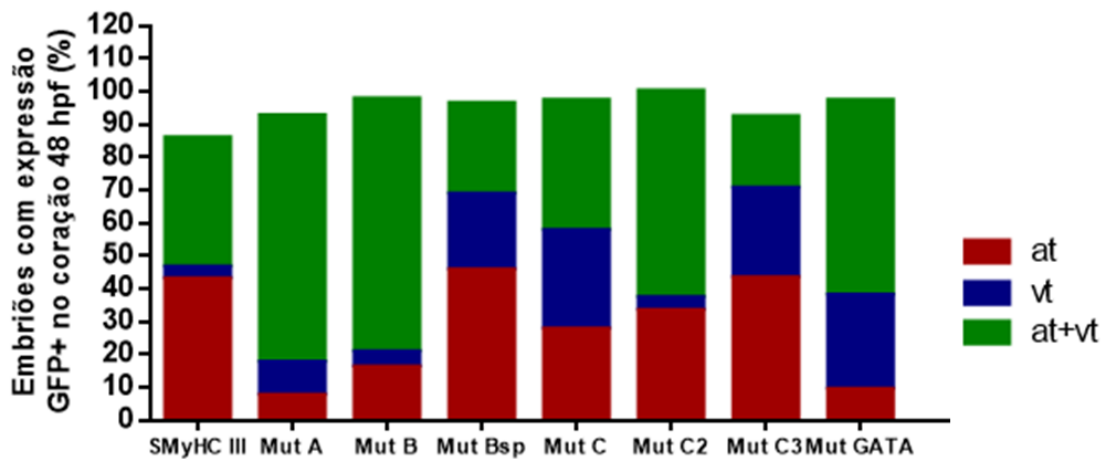


Figura 6: As héxades exercem diferentes alterações na expressão cardíaca de GFP dirigida pelo promotor *SMyHC III* em embriões de *zebrafish*.

Embriões de *zebrafish* foram co-injetados com diferentes construções do promotor *SMyHC III* carregando mutações pontuais específicas e analisados 48 hpf, e foi observado que todas as mutações testadas alterou, de alguma forma, o padrão de expressão de GFP dirigido pelo promotor nas câmaras cardíacas. (at) Átrio. (vt) Ventrículo. (at+vt) Átrio e ventrículo.

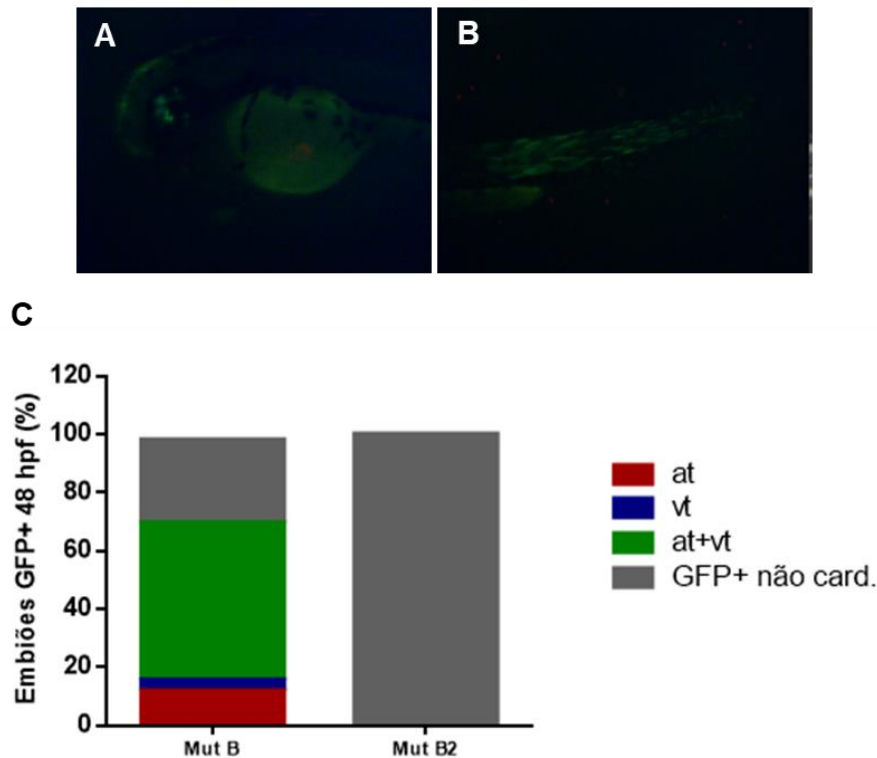


Figura 7: A mutação nos dois últimos nucleotídeos da héxade B (Mut B2) eliminou a expressão de GFP dirigida pelo promotor *SMyHC III* no coração de embriões de *zebrafish*.

Embriões de *zebrafish* foram co-injetados com diferentes construções do promotor *SMyHC III* carregando mutações pontuais específicas (Mut B e Mut B2) e analisados 48 hpf. Foi observado que no grupo Mut B2 a expressão de GFP foi eliminada das câmaras cardíacas quando comparado ao Mut B (C), embora não tenha afetado a expressão de GFP em outros tecidos, como vesícula óptica (A) ou musculatura esquelética (B). (at) átrio. (vt) ventrículo. (at+vt) Átrio e ventrículo.

4.1.4 COUPTF-II interage com o promotor *SMyHC III*, porém é um potente repressor

COUPTF-II é um fator de transcrição importante para a determinação da identidade celular entre átrio e ventrículo (31), com expressão atrial específica (Fig. 8A-C), e, portanto, um forte candidato para regular a atividade do promotor do gene *SMyHC III* através do cNRE. A fim de testar essa hipótese, realizou-se imunoprecipitação da região promotora de *SMyHC III* que contém o cNRE e foi verificada a interação positiva de COUPTF-II (Fig. 9A). Para compreender qual a resposta de interação gerada por COUPTF-II sob o promotor de *SMyHC III*, foram realizados ensaios de transativação em células expressando o promotor inteiro (*SMyHC III*), o promotor sem o cNRE (*SMyHC III* Δ cNRE) e o promotor contendo

cinco cópias do cNRE (5xcNRE) e co-transfectadas com diferentes concentrações de COUPTF-II. As concentrações de 250 ng a 2 µg exerceram repressão sob a atividade do promotor do gene *SMyHC III* (Fig. 9B). Interessantemente, na ausência do cNRE a concentração de 100 ng de COUPTF-II ativou a atividade do promotor, diferente do observado com o promotor nativo que não alterou a atividade basal do mesmo (Fig. 9C). Nas células co-transfectadas com 5xcNRE foi observado repressão da atividade do promotor independente da concentração de COUPTF-II utilizada (Fig. 9D).

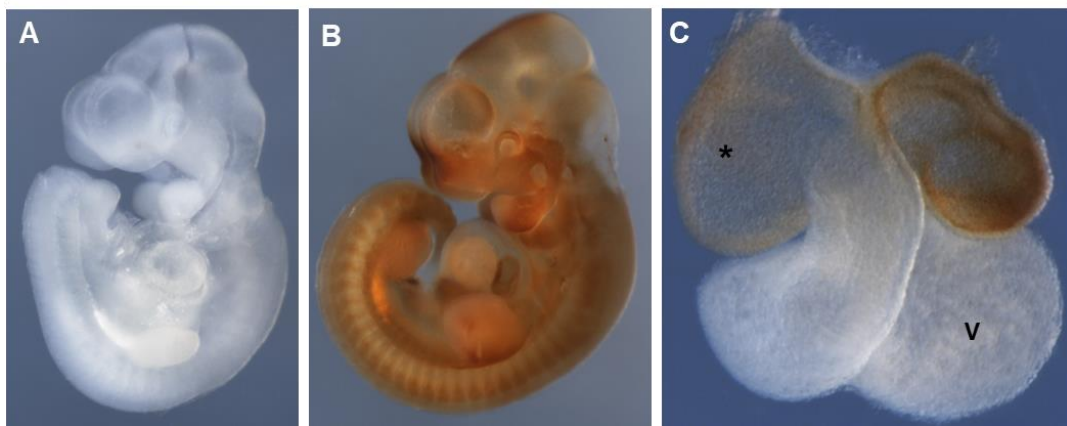


Figura 8: Expressão átrio-específica de COUPTF-II em embrião de camundongo.

Imunohistoquímica “*Whole mount*” para COUPTF-II em embrião de camundongo no estágio de 10.5 dpc. (A) Embrião de camundongo controle para a marcação de COUPTF-II no estágio de 10.5 dpc. (B) Expressão de COUPTF-II no embrião de 10.5 dpc. (C) Expressão de COUPTF-II no coração após a dissecação do embrião (B) evidenciando a marcação atrial. (*) átrio, (V) ventrículo.

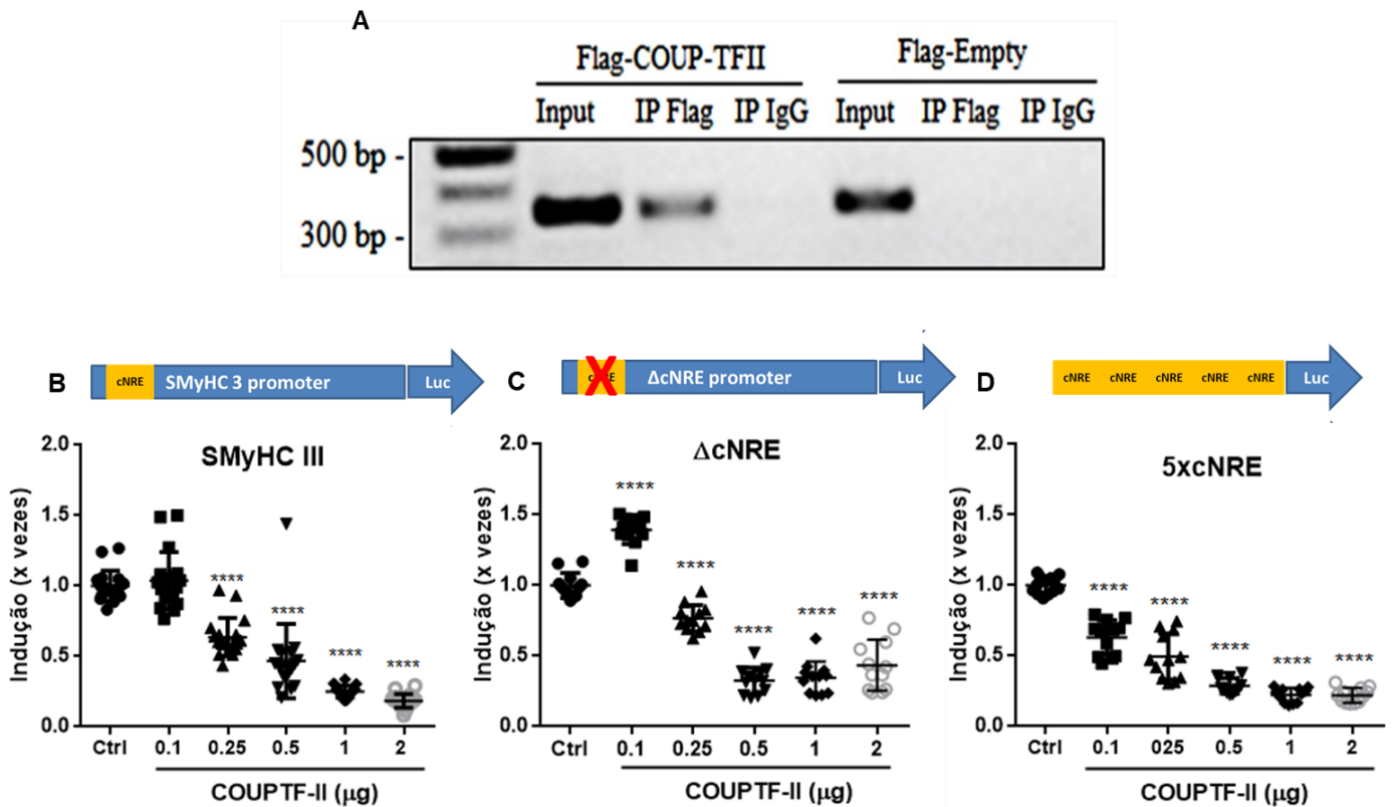


Figura 9: COUPTF-II interage com o promotor do gene *SMYHC III* reprimindo sua atividade.

(A) Imagem representativa do gel de agarose 1% com o produto da PCR após o ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) demonstrando a interação de COUPTF-II com o promotor *SMYHC III* a partir do fragmento de 350 pb que contém a sequência do cNRE. (B- D) Gráficos representando os ensaios de ativação do promotor via luminescência da luciferase, evidenciando papel repressor e dose-dependente de COUPTF-II sob a atividade do promotor *SMYHC III* (B) assim como na condição de ausência do cNRE (C) e de 5xcNRE (D). Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni com $p < 0,05$. **** $p < 0,0001$.

A relevância da sequência do cNRE no contexto de COUPTF-II ficou evidente no experimento utilizando a estratégia de COUPTF-II fusionado à proteína 16 (p16) do Vírus Herpes Simples (VP16). VP16 contém duas regiões de forte ativação capaz de ativar a transcrição *in vivo* de modo independente das características do gene, fato este que permite concluir, baseado nos resultados, o potencial repressor/ ativador de um determinado gene (55). Como esperado, neste experimento o promotor *SMYHC III* foi ativado independente da concentração de DNA de COUPTF-II VP16 (Fig. 10A), já na ausência da sequência do cNRE (*SMYHC III* ΔcNRE) a atividade do promotor só foi ativada na concentração de 1 μg de

COUPTF-II VP16 (Fig. 10B), possivelmente porque passou a interagir com outros domínios de ligação na sequência do DNA.

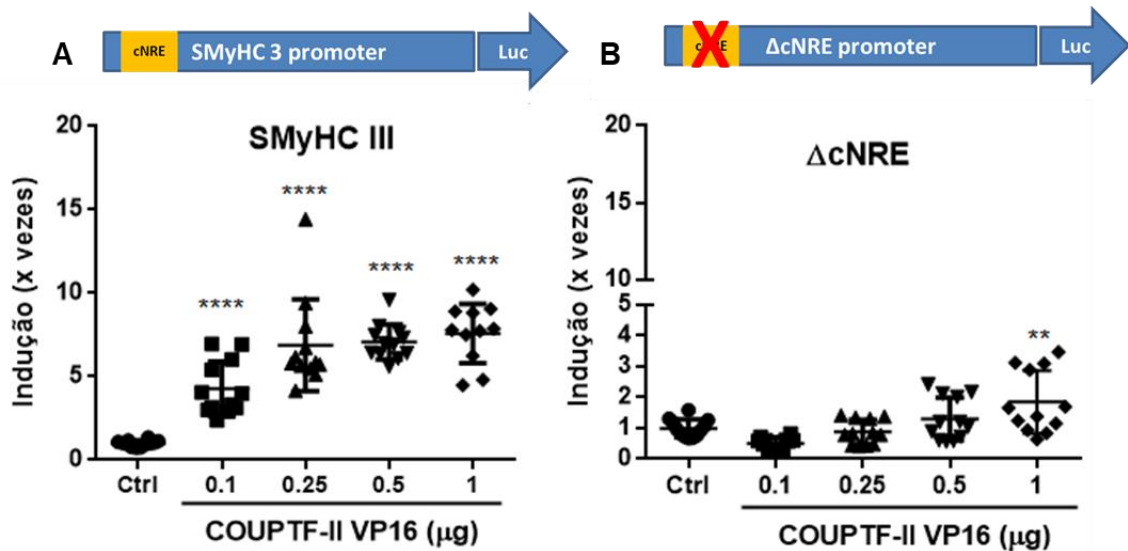


Figura 10: COUPTF-II V16 depende do cNRE para ativar a atividade do promotor do gene *SMYHC III*.

(A- B) Gráficos representando os ensaios de ativação do promotor via luminescência da luciferase, deixando evidente o potencial ativador de COUPTF-II (A), além de sua dependência da sequência do cNRE (B) para que haja aumento na atividade do promotor *SMYHC III* quando fusionado ao VP16. Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni com $p < 0,05$. **** $p < 0,0001$.

Apesar das vantagens experimentais da linhagem HEK293T, sabe-se que há expressão endógena de COUPTF-II nessas células (Fig. 11A). Assim, para verificar qual era o comportamento endógeno de COUPTF-II foi utilizada a estratégia de co-transfecção com seu dominante negativo COUPTF-II TV2, que não possui o domínio de ligação ao DNA, mas que é capaz de dimerizar (Fig. 11B-D) (56). Assim, era esperado que COUPTF-II TV2 interagisse com o COUPTF-II endógeno impedindo o de se ligar ao DNA deixando evidente a resposta gerada pelo COUPTF-II transfectado (Fig. 9B). A partir deste experimento utilizando as diferentes construções do promotor (*SMYHC III*, *SMYHC III ΔcNRE* ou *5xcNRE*) foi demonstrado que COUPTF-II endógeno é um repressor, e, portanto a ativação observada na co-transfecção de 100 ng de COUPTF-II com *SMYHC III ΔcNRE* pGL3 foi consequência genuína da interação do COUPTF-II transfectado (Fig. 9C).

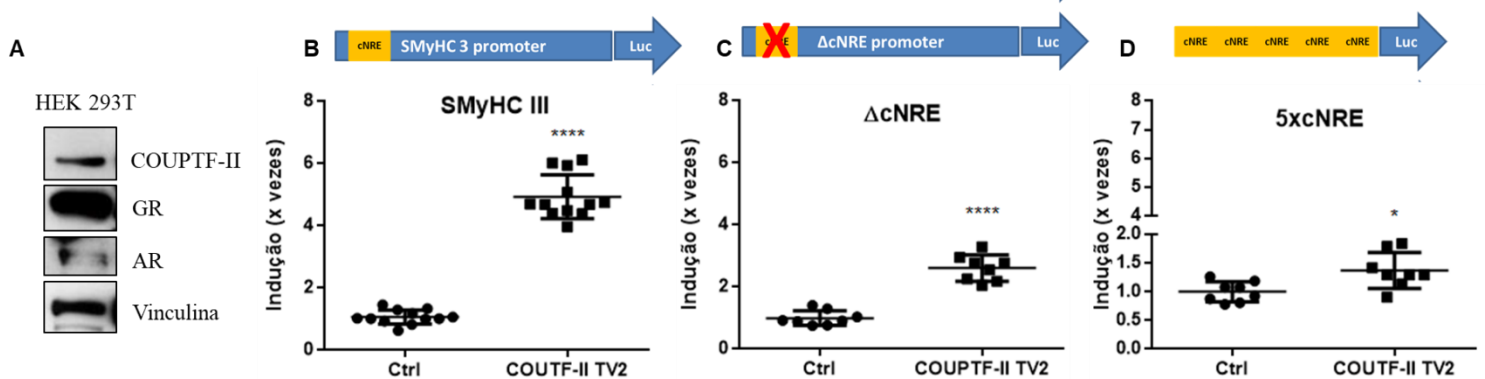


Figura 11: COUPTF-II endógeno da linhagem HEK293T é repressor.

(A) Imagem representativa do Western Blot para detecção da proteína endógena de COUPTF-II, AR e GR em HEK293T. (B- D) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor via luminescência da luciferase co-transfectados com COUPTF-II TV2, os resultados suportam que COUPTF-II endógeno é um agente repressor. Teste t não paramétrico com $p < 0,05$. **** $p < 0.0001$, * $p 0.0112$.

4.2 Receptores nucleares que modulam a atividade do promotor *SMycHC III* via cNRE

Em vista do papel repressor exercido por COUPTF-II, um receptor nuclear, sob promotor do gene *SMycHC III*, buscamos testar outros membros da superfamília de receptores nucleares com o objetivo de identificar outros genes que pudessem modular a atividade do promotor de *SMycHC III* na presença (*SMycHC III*- Luc pGL3) ou ausência do cNRE (*SMycHC III* ΔcNRE pGL3), além da repetição de cópias (5xcNRE pGL3p), visto que se trata de um elemento regulatório do promotor como evidenciado nos experimentos com *zebrafish* (Fig. 4C).

4.2.1 Receptor Órfão RAR- relacionado α ($ROR\alpha$) e o cNRE

Na condição de transfecção concomitante de *SMyHC III* e $ROR\alpha$, verificou-se aumento da atividade do promotor quando comparado à condição controle (*SMyHC III*) (Fig. 12A). No entanto, na ausência do cNRE houve repressão da atividade do promotor (Fig. 12B) e não houve alteração na atividade basal do promotor quando $ROR\alpha$ e 5xcNRE pGL3p foram transfectados simultaneamente (Fig. 12C). Portanto, o cNRE demonstrou ser um elemento regulatório necessário para a ativação do promotor *SMyHC III* na presença de $ROR\alpha$, e que apenas o cNRE não é suficiente para mudar o estado de atividade basal do promotor como demonstrado no grupo co-transfectado com 5xcNRE.

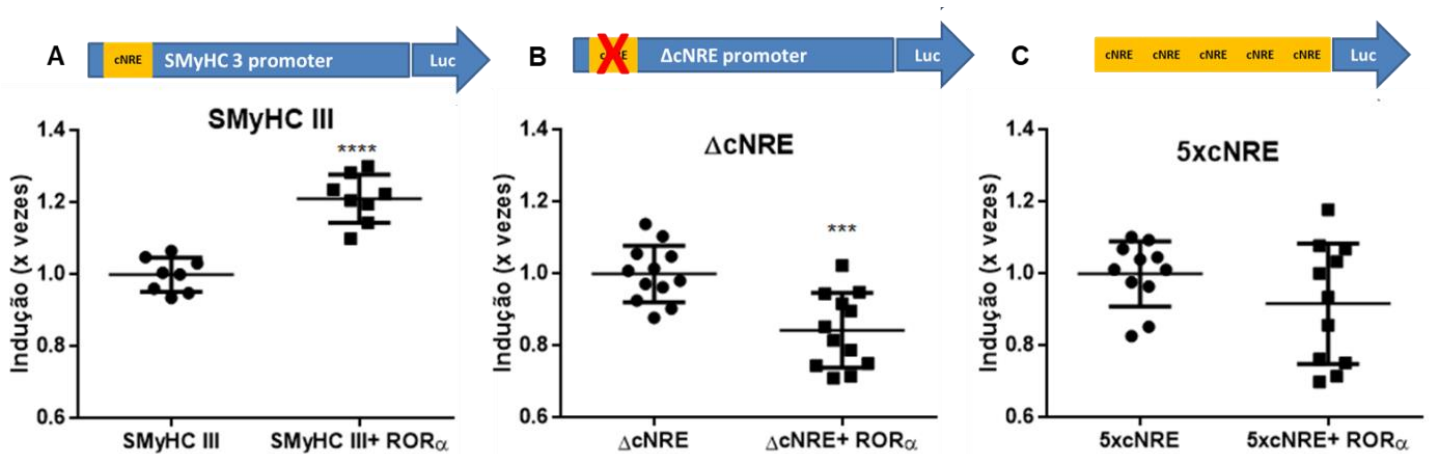


Figura 12: $ROR\alpha$ é capaz de promover a ativação do promotor *SMyHC III* dependente da sequência do cNRE.

(A- C) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor via luminescência da luciferase, sugerindo que $ROR\alpha$ promove ativação da atividade do promotor (A), porém é dependente da sequência do cNRE (B), embora esse elemento regulatório não seja suficiente para gerar resposta pelo $ROR\alpha$ (C). Teste t não paramétrico com $p < 0,05$. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.0004$.

4.2.2 Receptor Nuclear Subfamília 1 Grupo D Membro 2 (*Reverbβ*) e o cNRE

A co-transfecção de *Reverbβ* e *SMyHC III* (Fig. 13A) resultou em aumento na atividade do promotor quando comparado ao grupo controle (*SMyHC III*). No entanto, nenhuma mudança na atividade basal do promotor foi observada nas condições de ausência (Fig. 13B) ou na presença de 5 cópias (Fig. 13C) do cNRE, demonstrando que o cNRE não é um elemento necessário para a ativação do promotor pelo *Reverbβ*.

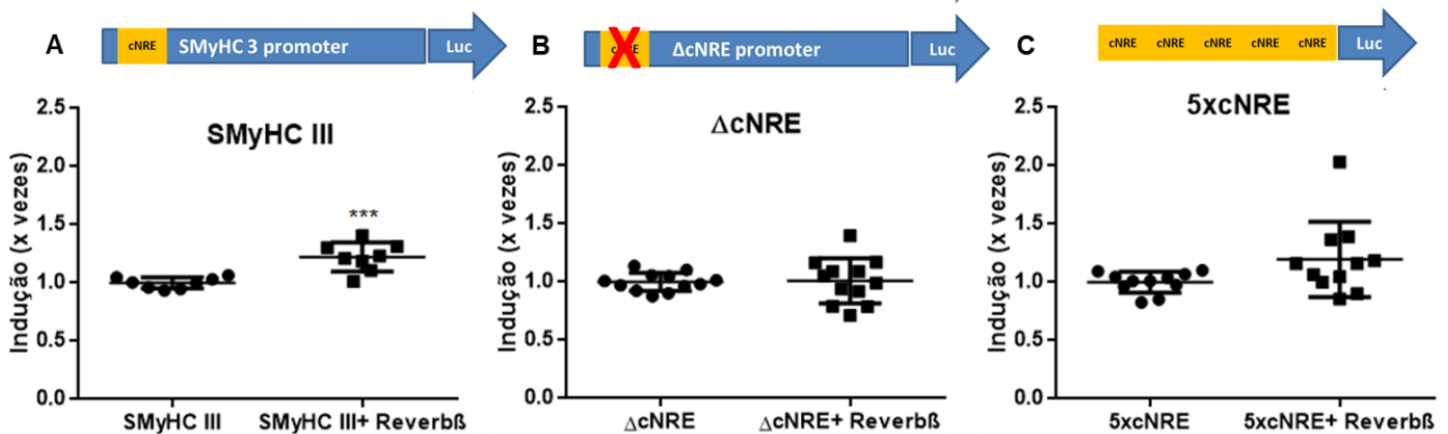


Figura 13: *Reverbβ* ativa o promotor *SMyHC III*, porém não é dependente do cNRE.

(A- C) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor via luminescência da luciferase, sugerindo que o *Reverbβ* é um potencial ativador da atividade do promotor, porém independente da sequência do cNRE (B- C). Teste t não paramétrico com $p < 0,05$. *** $p < 0,0003$.

4.2.3 Receptor Relacionado a Estrógeno α (*ERRα*) e o cNRE

O receptor α relacionado ao estrógeno (*ERRα*) não induziu aumento na atividade do promotor *SMyHC III* quando comparado à condição controle (*SMyHC III*) (Fig. 14A). No entanto, *ERRα* demonstrou necessitar da sequência do cNRE para que esta atividade permaneça no nível basal (Fig. 14B), pois houve repressão da atividade do promotor quando co-transfectado com *SMyHC III ΔcNRE* comparado ao grupo controle. Tal fato é reforçado quando as células foram co-transfectadas com a repetição do cNRE gerando, mais uma vez,

repressão na atividade do promotor, ou seja, o cNRE trata-se de um elemento ativador (Fig. 14C).

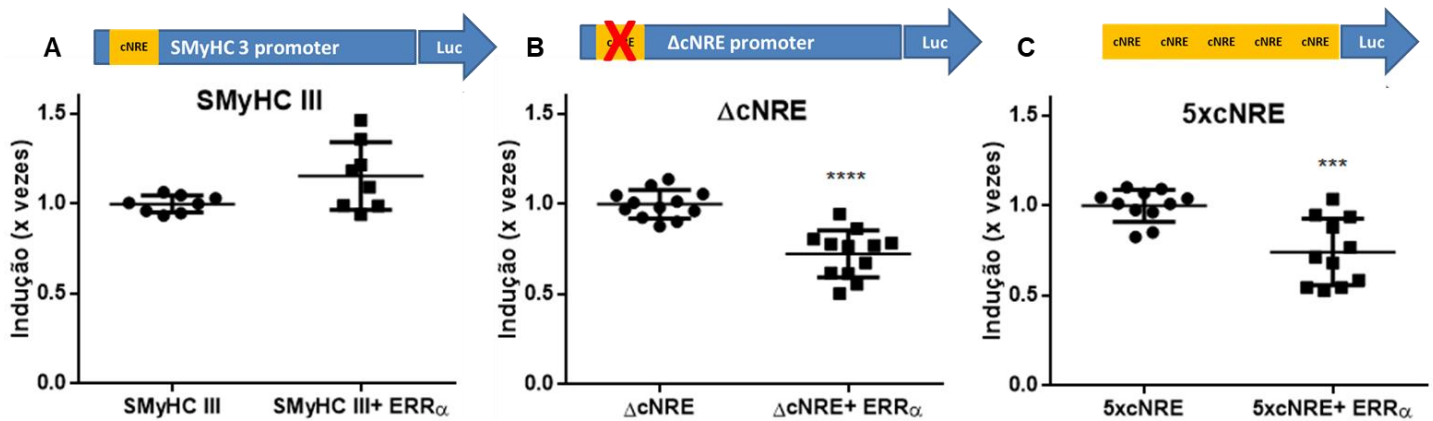


Figura 14: *ERR* α não exerce efeito sobre a atividade do promotor.

(A- C) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor via luminescência da luciferase, sugerindo que *ERR* α não é capaz de promover ativação na atividade do promotor (A), embora a sequência do cNRE seja necessária para que esta atividade permaneça no nível basal (B). Porém, apenas o cNRE não foi suficiente para gerar resposta de pelo *ERR* α (C). Teste t não paramétrico com $p < 0,05$. **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.0005$.

4.2.4 Receptores Ativados por Proliferador de Peroxissomos (*PPAR*) e o cNRE

Também foram testadas as isoformas α , β e γ dos receptores ativados por proliferador de peroxissomos (*PPAR*). *PPAR* α ativou as diferentes construções do promotor *SMycHC III* (*SMycHC III*, *SMycHC III* Δ cNRE e 5xcNRE) quando comparadas às respectivas condições controle de modo independente do ligante fenofibrato (Fig. 15A-C). O *PPAR* β também promoveu a ativação do promotor quando co-transfectado com *SMycHC III* independente do ligante GW0742 (Fig. 15D). O grupo co-transfectado com *SMycHC III* Δ cNRE também ativou o promotor (Fig. 15E), porém na presença do ligante GW0742 esse efeito foi menor quando comparado ao grupo *SMycHC III* (Fig. 15D). No grupo co-transfectado com 5xcNRE foi observada ativação do promotor (Fig. 15F), embora menor quando comparado aos grupos *SMycHC III* e *SMycHC III* Δ cNRE, no entanto, na presença do ligante a atividade do promotor é

reprimida (Fig. 15F). *PPAR γ* quando co-transfectado com *SMyHC III* não gerou alteração na atividade basal do promotor (Fig. 15G). Já o grupo co-transfectado com *SMyHC III Δ cNRE* teve uma resposta significativa de ativação apenas na ausência de rosiglitazona (Fig. 15H). A condição co-transfectada com 5xcNRE não apresentou mudança no perfil de ativação do promotor, enquanto na presença do ligante houve repressão quando comparado ao grupo controle (Fig. 15I). Portanto, a família de *PPAR* não necessita da sequência do cNRE para ativar a atividade do promotor, já que nas condições co-transfectadas com *PPAR α* ou *PPAR β* e *SMyHC III Δ cNRE* houve aumento na atividade do promotor comparado aos respectivos grupos controle. Além disso, apenas a sequência do cNRE (5xcNRE) foi suficiente para ser ativado por *PPAR α* e *PPAR β* , ou seja, comportando-se como uma sequência ativadora. No entanto, de modo geral, o *PPAR γ* não demonstrou ser candidato para regular a atividade do promotor, pois independente da construção co-transfectada não houve nenhuma ou pouca alteração da atividade basal do promotor comparado aos grupos co-transfectados com *PPAR α* e *PPAR β* .

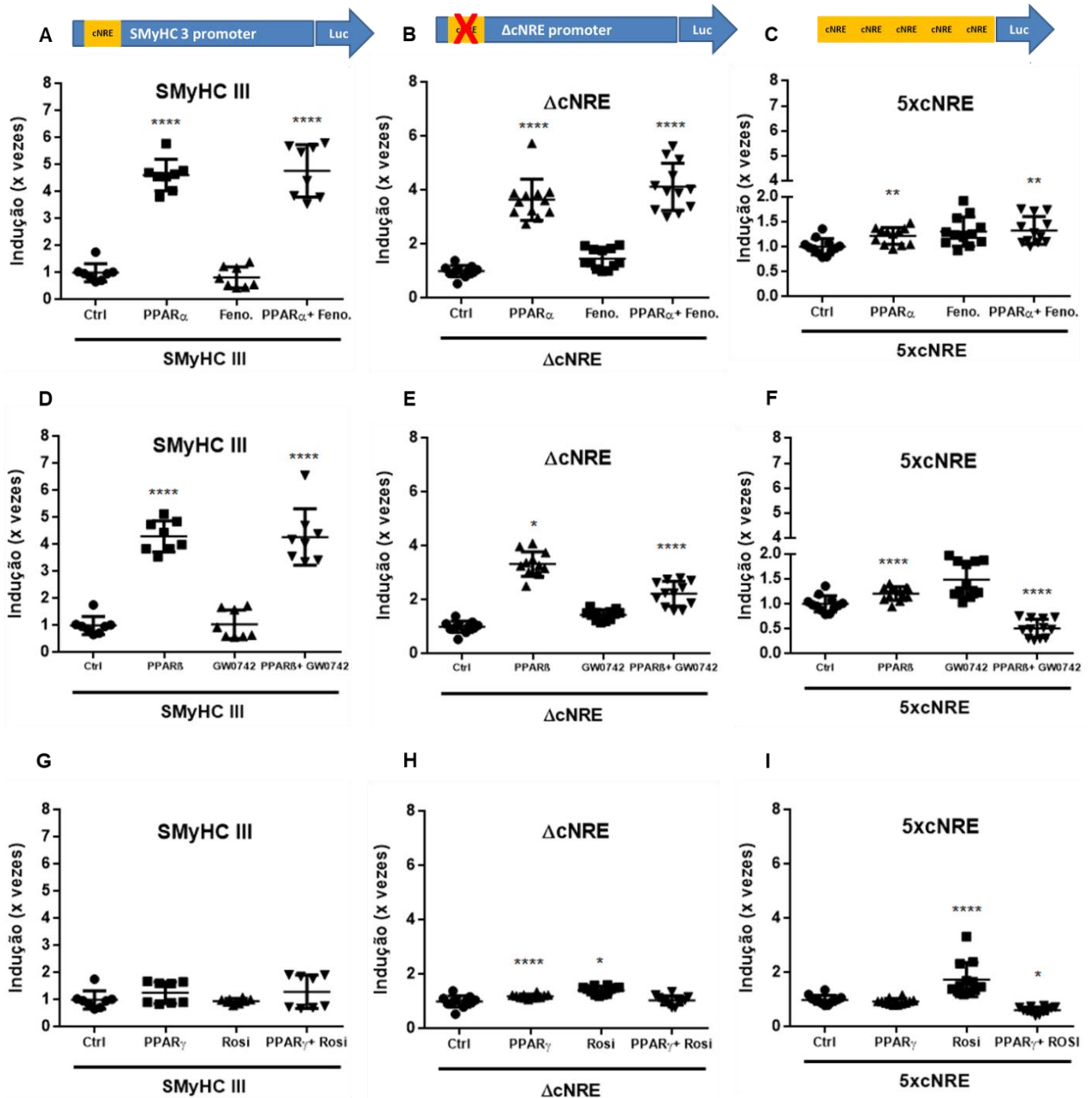


Figura 15: Ensaio de transativação em HEK293T co-transfectadas com diferentes construções do promotor *SMMyHC III* na presença de *PPAR α* , *PPAR β* ou *PPAR γ* e os respectivos ligantes.

(A- I) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor via luminescência da luciferase, sugerindo que tanto *PPAR α* quanto *PPAR β* são capazes de promover o aumento na atividade do promotor independente dos respectivos ligantes, bem como da sequência do cNRE (A- F). Enquanto o *PPAR γ* só apresentou aumento na atividade do promotor na ausência do cNRE sem o ligante (H) ou repressão quando co-transfectado com 5xcNRE e na presença de rosiglitazona. Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni com $p < 0,05$. **** $p < 0,0001$.

4.2.5 Receptor do hormônio tireoidiano ($TR\alpha$ e β) e o cNRE

Evidenciou-se aumento na atividade do promotor *SMyHC III* quando co-transfectado com o receptor do hormônio tireoidiano α ($TR\alpha$) na presença ou ausência da testosterona (ligante endógeno), porém a resposta na presença do ligante é menor quando comparado com grupo co-transfectado apenas com $TR\alpha$ (Fig. 16A). O mesmo foi observado no grupo co-transfectado com *SMyHC III* Δ cNRE (Fig. 16B). Quando as células foram co-transfectadas com 5xcNRE foi observado ativação do promotor apenas na presença de testosterona (Fig. 16C). $TR\beta$ ativa o promotor *SMyHC III* apenas na ausência do ligante (Fig. 16D). Nas células que foram co-transfectadas com o promotor *SMyHC III* Δ cNRE não foi observada ativação do promotor na presença ou ausência do ligante (Fig. 16E), assim como quando co-transfectado com 5xcNRE (Fig. 16F). Portanto, o cNRE não demonstrou ser um elemento necessário para a atividade do promotor mediada pelos receptor nucleares tireoidianos.

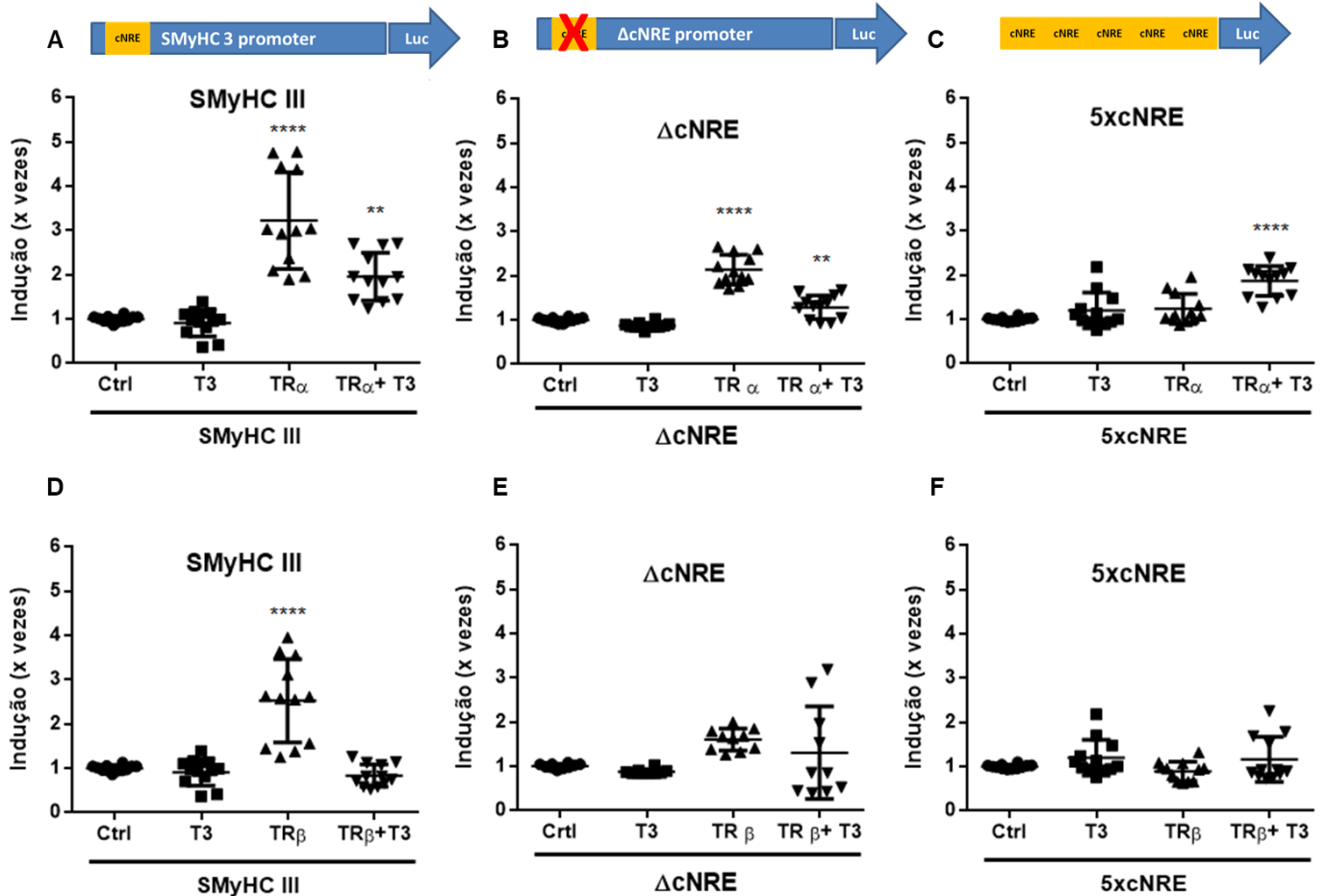


Figura 16: *TRα* e *TRβ* ativam a atividade do promotor SMMyHC III independente da presença da seqüência do cNRE ou de testosterona.

(A-F) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor via luminescência da luciferase, evidenciando que *TRα* e *TRβ* são capazes de promover a ativação do promotor (A e D), e que para tal não é necessário a presença do cNRE, bem como da testosterona (B e E). Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni com $p < 0,05$. **** $p < 0.0001$.

4.2.6 Receptor de Retinoide X/ Receptor de Vitamina D (*RXR/ VDR*) e o cNRE

A presença de RXR, assim como do heterodímero RXR/VDR resultou no aumento da atividade do promotor *SMMyHC III* (Fig. 17A), um evento também visto na ausência de cNRE (Fig. 17B), permitindo concluir que o cNRE não é um elemento necessário à ativação do

promotor mediada por estes receptores. Na condição co-transfectada com 5xcNRE, houve repressão da atividade do promotor, ou seja, o cNRE não é suficiente para que seja gerada resposta de ativação por RXR e/ou VDR (Fig. 17C), mesmo na presença de vitamina D (Fig. 17F). Quando a atividade de RXR foi avaliada na presença de vitamina D o promotor foi ativado em ambas as construções, *SMyHC III* (Fig. 17D) e *SMyHC III ΔcNRE* (Fig. 17E), porém com maior resposta de ativação na ausência do cNRE, assim, na presença de vitamina D, o cNRE age como uma sequência com característica repressora da atividade do promotor. Já o grupo experimental co-transfectado com o heterodímero na presença da vitamina D não houve alteração na atividade basal promotor na presença (*SMyHC III*) ou ausência do cNRE (*SMyHC III ΔcNRE*) (Fig. 17E) quando comparado aos respectivos grupos controle do promotor não tratado com vitamina D. Portanto, pode-se afirmar que o cNRE não é um elemento regulatório necessário para a atividade do promotor na presença de RXR e/ ou VDR com ou sem o ligante.

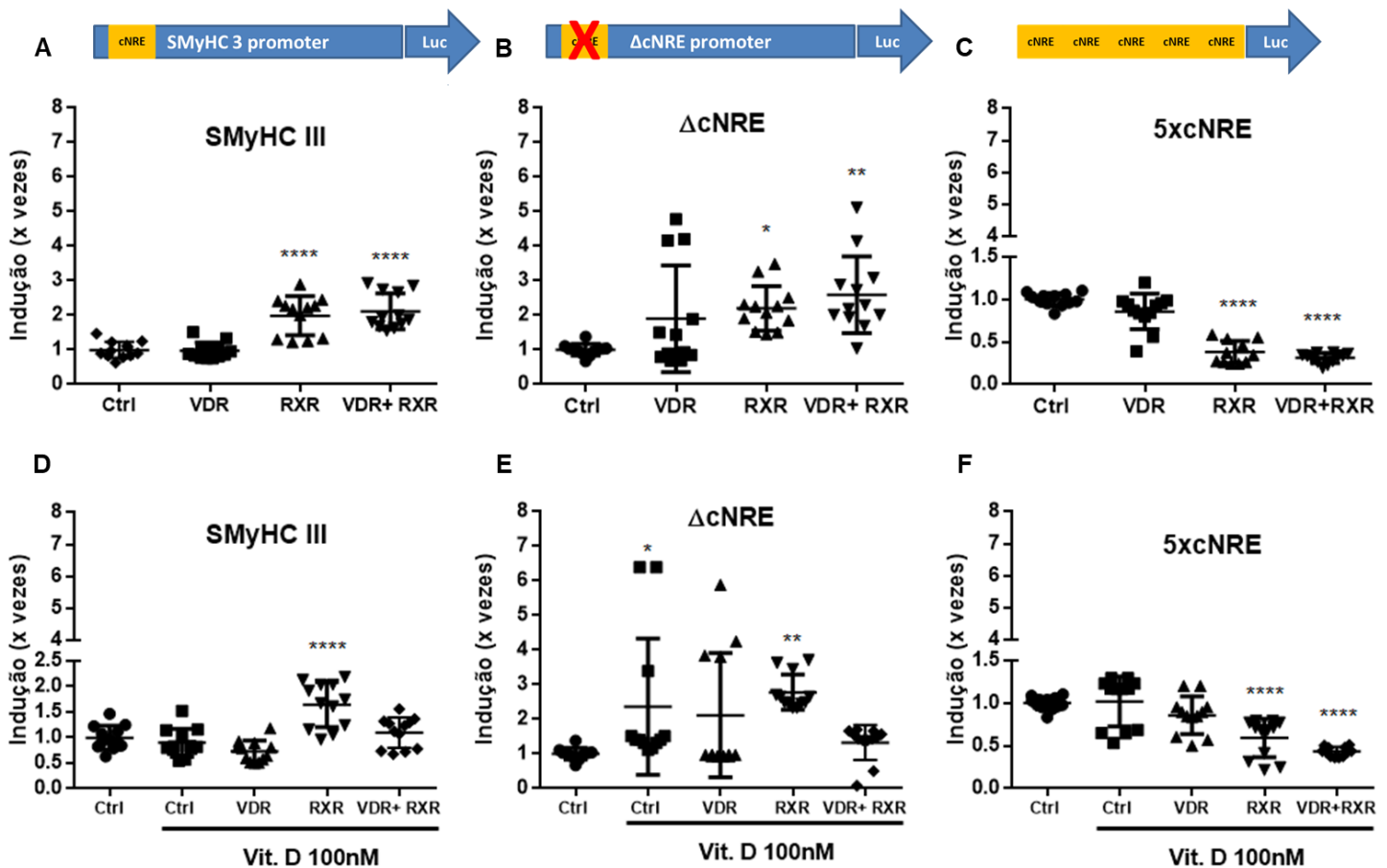


Figura 17: RXR e/ou VDR promovem aumento da atividade do promotor mesmo na ausência do cNRE.

(A- F) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor via luminescência da luciferase, sugerindo que RXR não depende do cNRE para ativar o promotor, assim com RXR+VDR na ausência da vitamina D. Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni com $p < 0,05$. ***** $p < 0,0001$.

4.2.7 A proteína homeodomínio de classe Iroquois (*Irx4*) / RXR e o cNRE

O promotor *SMyHC III* é ativado por *Irx4*, assim como pelo heterodímero *RXR/Irx4*, porém apenas o *RXR* não foi suficiente para ativar o promotor (Fig. 18A). O mesmo foi observado quando as células foram co-transfectadas com *SMyHC III* Δ cNRE, no entanto, neste grupo experimental *RXR* foi capaz de ativar a atividade do promotor, ou seja, a sequência do cNRE possui atividade repressora quando se trata deste receptor nuclear (Fig. 18B). Já o grupo 5xcNRE na presença de *Irx4* ou *RXR/Irx4* acarretou na ativação da atividade

da luciferase, o que não foi observado apenas com *RXR* (Fig. 18A). Os resultados permitem concluir que o cNRE não é necessário para a atividade do promotor quando as células são co-transfectadas com *Irx4* ou *RXR/Irx4*, embora a atividade do promotor observada tenha sido menor quando comparado ao grupo co-transfectado com o promotor nativo.

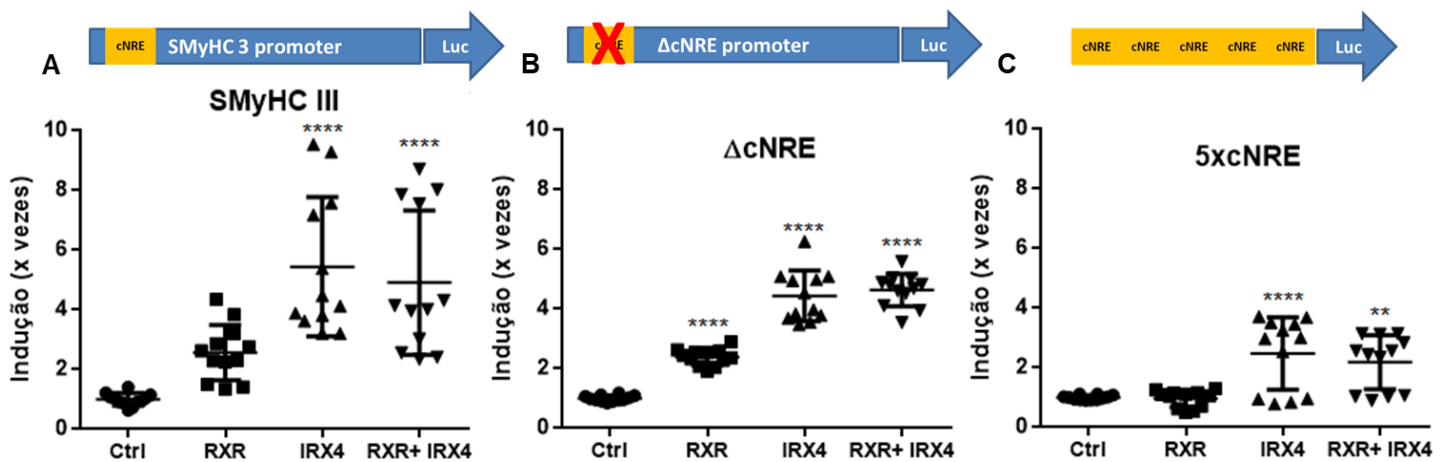


Figura 18: *Irx4* e/ou *RXR* não necessitam do cNRE para aumentar a atividade do promotor *SMyHC III*.

(A- C) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor via luminescência da luciferase, sugerindo que *Irx4*, bem como *Irx4+RXR* são capazes de promover o aumento na atividade do promotor independente do cNRE. Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni com $p < 0,05$. **** $p < 0.0001$.

4.3 COUPTF-II interage fisicamente com Receptor de Andrógênio (AR) e Receptor de Glicocorticoide (GR)

Os membros da superfamília de receptores nucleares testados, de modo geral, não apresentaram ativação na modulação da atividade do promotor dependente da sequência do cNRE, e COUPTF-II se mostrou repressor na atividade do promotor. Assim, visto a importância de COUPTF-II para a especificação das câmaras cardíacas buscamos outros genes que pudessem interagir com COUPTF-II para promover a ativação do promotor do gene da *SMyHC III* utilizando espectrometria de massas (57), e identificamos o Receptor de Andrógênio (AR) (58), Receptor de Glicocorticoide (GR) (59) e a via de p53 como novos

ligantes para COUPTF-II, um achado posteriormente validado por co-immunoprecipitação (Fig. 19A- C).

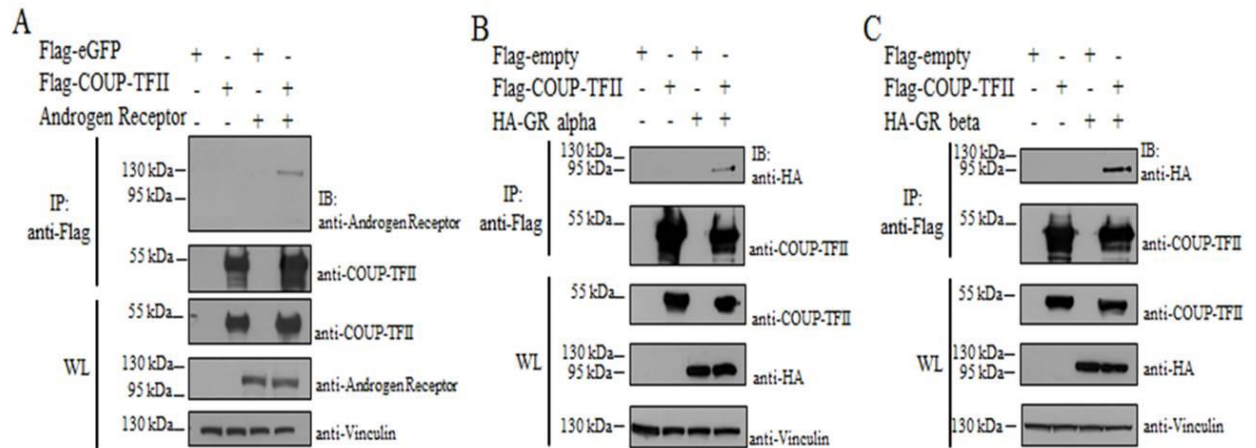


Figura 19: COUPTF-II interage fisicamente com AR, GR α e GR β .

Imagem representativa do Western Blot para AR ou HA após a co-immunoprecipitação com anticorpo anti-FLAG das células HEK293T co-transfectadas com FLAG-COUP-TFII ou FLAG-eGFP e (A) pCMV-Receptor de Andrógênio (AR), FLAG-COUP-TFII ou FLAG-vazio e (B) HA-GR α ou (C) HA-GR β suportando que é possível a interação entre COUPTF-II e AR ou GR.

Também foram realizadas imunofluorescência para AR (Fig. 20) e GR (Fig. 21) em embrião de camundongo 10.5 dpc para verificar o padrão de expressão nas câmaras cardíacas, e ambos os receptores nucleares demonstraram expressão tanto no ventrículo quanto no átrio (60–62). AR foi expresso no núcleo (Fig. 20G e I), enquanto GR apresentou marcação tanto citoplasmática quanto nuclear, sendo a última no formato de pequenos grânulos possivelmente *speckles* nucleares (Fig. 21J e L) (63).

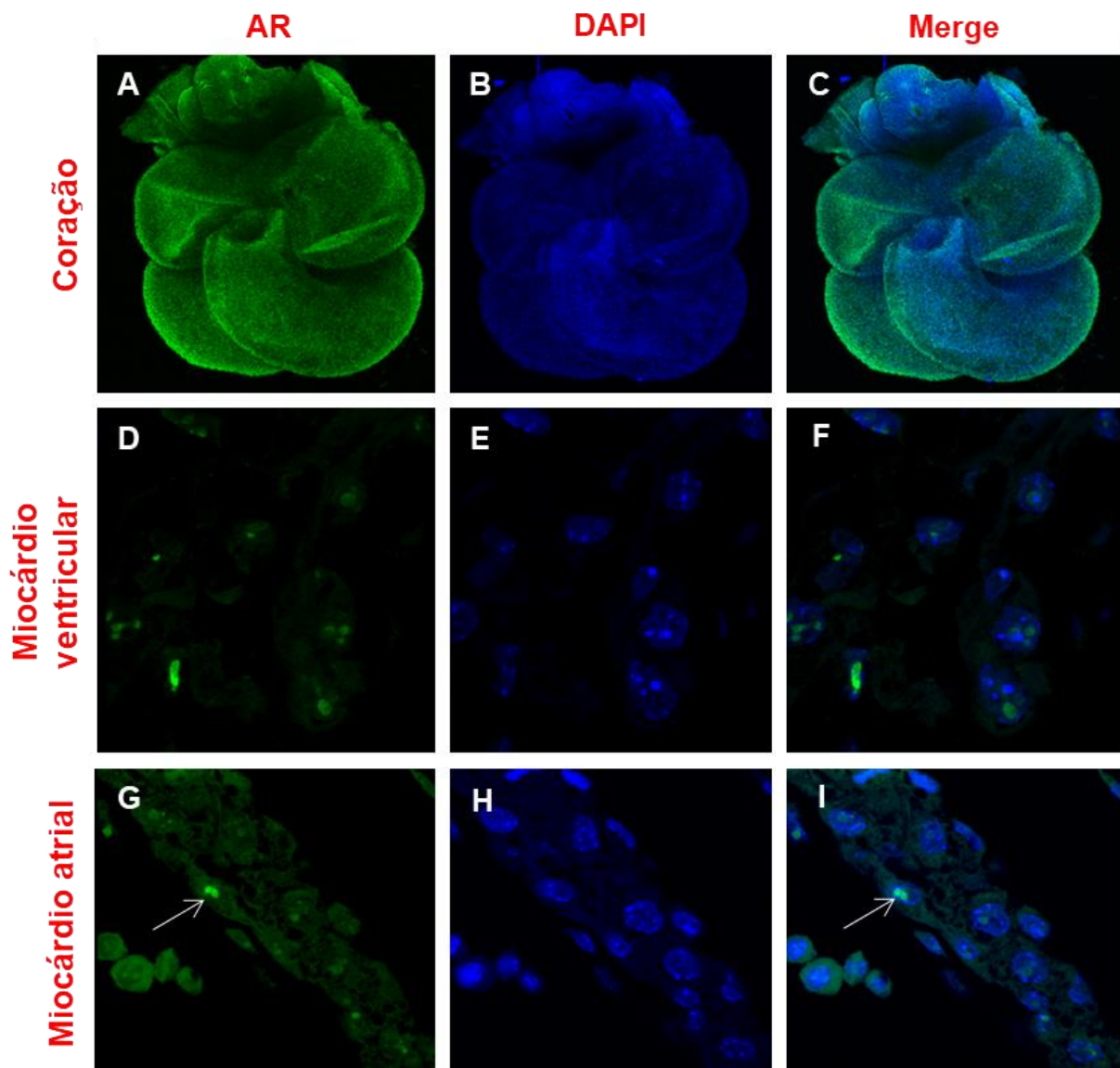


Figura 20: AR é expresso no núcleo das células de ambas às câmaras cardíacas.

Imunofluorescência para AR em embrião de camundongo no estágio de 10.5 dpc. (A- C) Imunofluorescência “*Whole mount*” em coração de embrião de camundongo no estágio de 10.5 dpc ou (D- F) em cortes coronais em embrião no mesmo estágio de desenvolvimento revelando a expressão nuclear de AR (seta), bem como sua expressão em ambas as câmaras cardíacas. (A- C) Imagens adquiridas no confocal SP8 Leica no aumento de 5x e (D- I) no aumento de 63x.

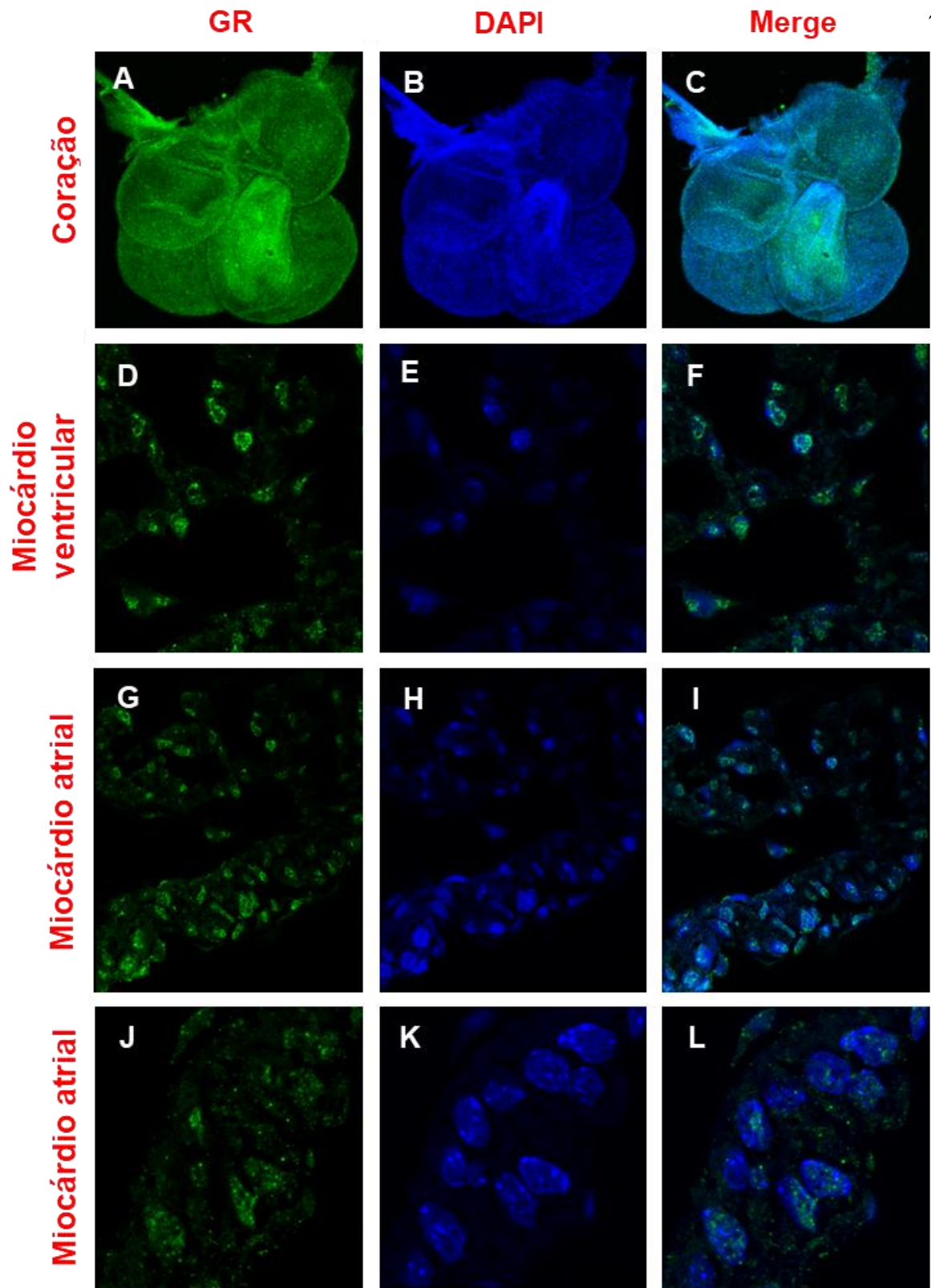


Figura 21: GR é expresso no núcleo e no citoplasma das células de ambas às câmaras cardíacas.

Imunofluorescência para GR em embrião de camundongo no estágio de 10.5 dpc. (A- C) Imunofluorescência “*Whole mount*” em coração de embrião de camundongo no estágio de 10.5 dpc mostrando que GR é expressão tanto no núcleo de células do átrio (L) quanto no ventrículo (F). Todas as imagens foram adquiridas no confocal SP8 Leica em diferentes aumentos (A- C) aumento de 5x, (D- F e J- L) no aumento de 63x, enquanto (G- I) no aumento de 40x.

Além da validação da interação de COUPTF-II e AR por co-imunoprecipitação (Fig. 19A), também foi verificada a colocalização de ambos as proteínas por imunofluorescência em coração e embrião de camundongo (Fig. 22A-C).

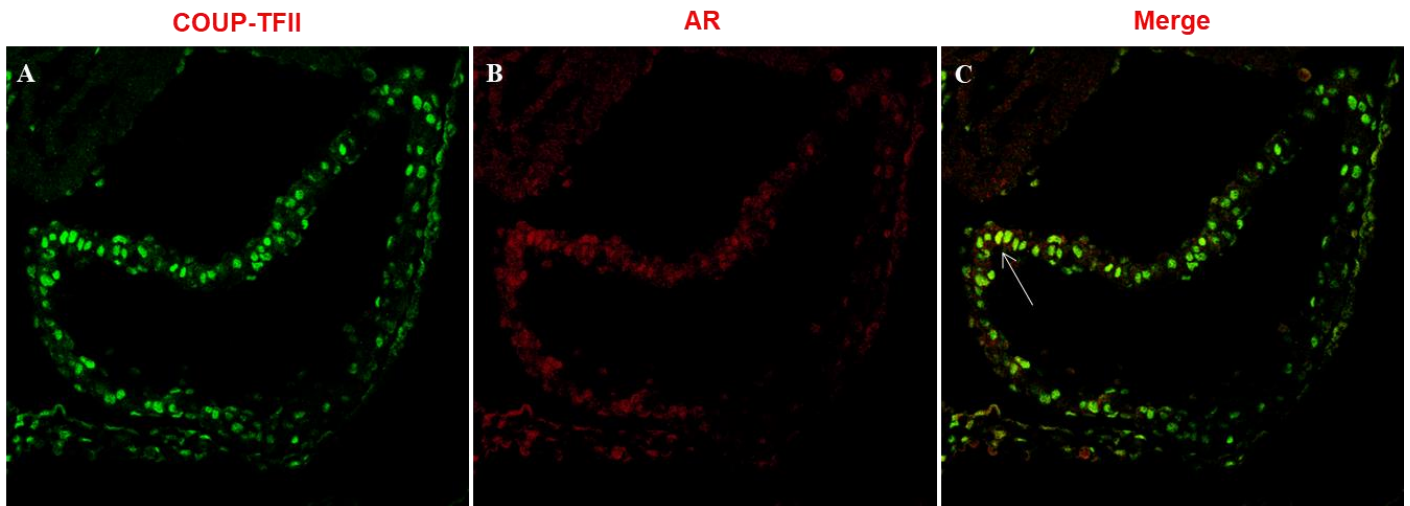


Figura 22: COUPTF-II e AR colocalizam-se no núcleo de células atriais.

Imunofluorescência para COUPTF-II (A) e AR (B) em embrião de camundongo no estágio de 10.5 dpc. (C) Foi observado co-localização de ambos os receptores nucleares no núcleo de células atriais (seta). As imagens foram adquiridas no confocal SP8 Leica no aumento de 40x.

4.4 AR é repressor, porém age sinergicamente com COUPTF-II para aumentar a atividade do promotor *SMyHC III*

Verificamos que AR, assim como COUPTF-II, reprimiu a atividade do promotor (Fig. 23A) e demonstrou necessitar, até mesmo para reprimir, da sequência do cNRE (Fig. 23B), pois quando co-transfectado com *SMyHC III* Δ cNRE não foi observado alteração na atividade basal do promotor, fato que ocorreu apenas na concentração de 2 μ g de DNA de AR (Fig. 23B).

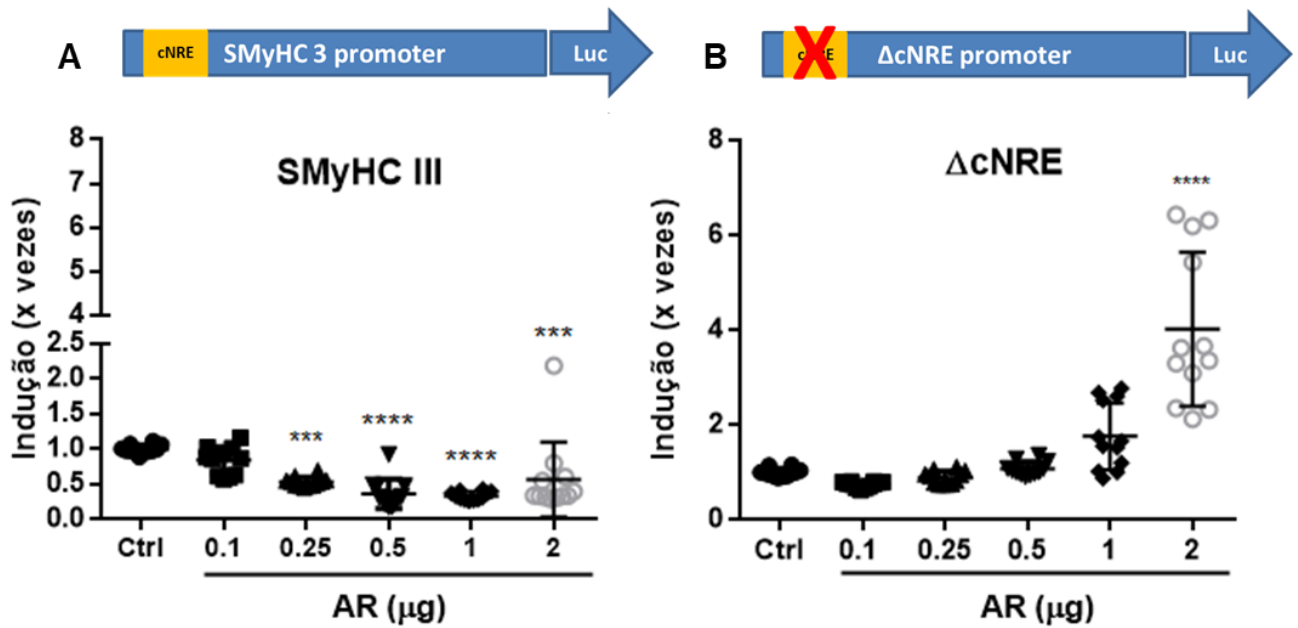


Figura 23: AR reprime a atividade do promotor do gene *SMYHC III*.

(A e B) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor via luminescência da luciferase numa curva dose-resposta de AR, evidenciando que AR reprime a atividade do promotor selvagem independente da concentração de DNA utilizada (A), e na ausência do cNRE só houve alteração da atividade basal do promotor na concentração de 2 μg de AR (B). Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni, valor de $p < 0,05$. **** $p < 0.0001$.

Entretanto, os ensaios de transativação a partir da co-transfecção de AR e COUPTF-II evidenciaram uma interação sinérgica entre os dois repressores o que resultou na ativação do promotor (*SMYHC III*), mas tal fato só ocorreu quando utilizada as concentrações de 250 ng de AR e 100 ng ou 250 ng de COUPTF-II (Fig. 24A). No entanto, na ausência da sequência do cNRE este efeito sinérgico não foi observado, ou seja, o cNRE é um elemento regulatório fundamental para tal (Fig. 24B).

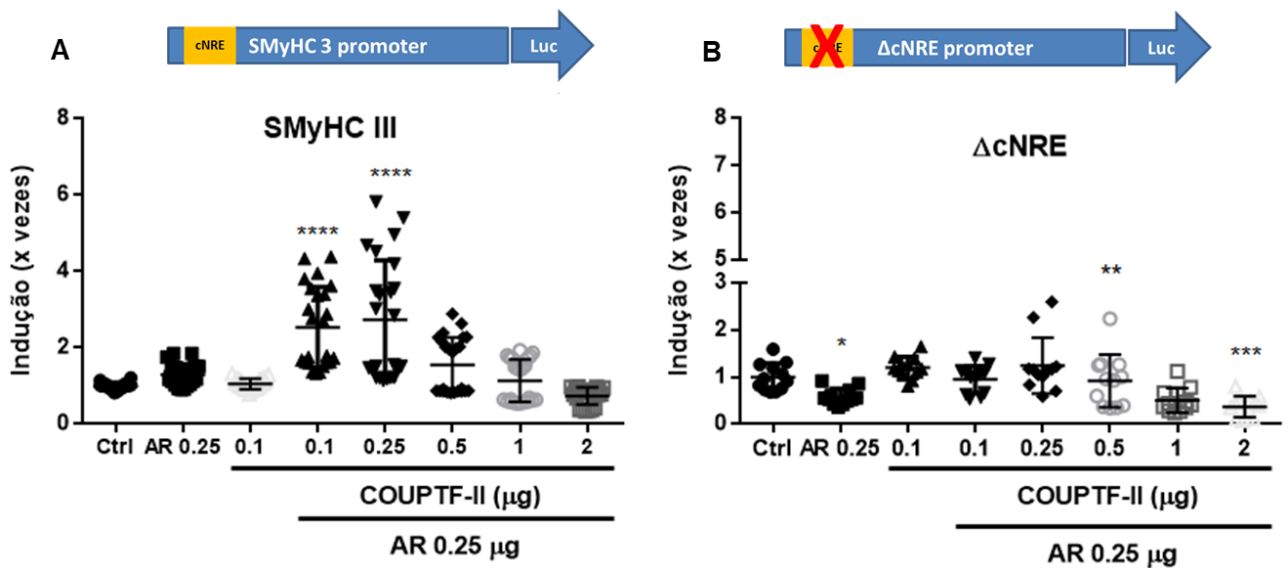


Figura 24: COUPTF-II e AR, ambos repressores, interagem sinergicamente para ativar a atividade do promotor do gene *SMYHC III*.

(A e B) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor sob concentração fixa de AR, porém variando a concentração de COUPTF-II via luminescência da luciferase evidenciando que COUPTF-II e AR interagem sinergicamente para prover o aumento da atividade do promotor, e que esse fenômeno é dependente do cNRE. Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni com $p < 0,05$. **** $p < 0.0001$.

Um fato importante observado sobre o AR foi que na presença de 1 μ M testosterona (seu ligante endógeno), AR tornou-se um potente ativador do promotor, de modo independente do cNRE (Fig. 25A e B). Além disso, o sinergismo observado entre COUPTF-II e AR na ativação do promotor foi potencializado na presença do ligante (Fig. 25A e B), embora sob essa condição o cNRE não tenha sido sequência chave, já que o *SMYHC III* Δ cNRE pGL3 também foi ativado. Comparando as respostas de atividade entre *SMYHC III* e *SMYHC III* Δ cNRE não houve diferença, demonstrando, mais uma vez, que na presença da testosterona o cNRE não é necessário para que ocorra a interação sinérgica entre COUPTF-II e AR (Fig. 25C).

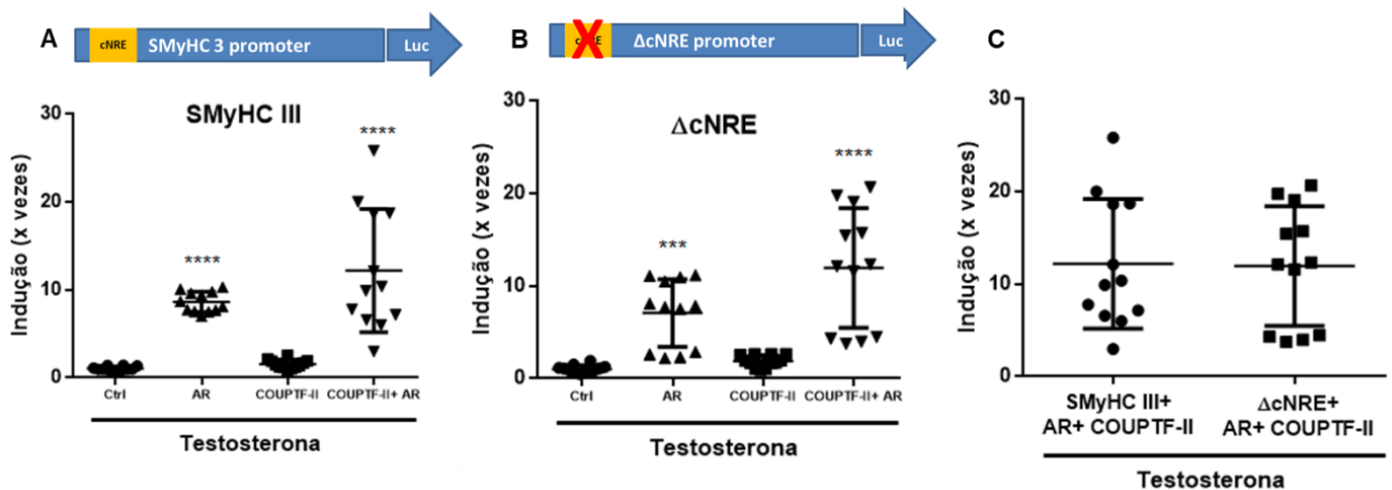


Figura 25: Testosterona potencializa o sinergismo entre COUPTF-II e AR na ativação da atividade do promotor do gene *SMYHC III*.

(A- B) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor co-transfectados com AR e COUPTF-II na presença de testosterona via luminescência da luciferase evidenciando que o sinergismo entre os dois repressores foi potencializado pelo ligante, (C) e que neste caso não depende do cNRE para que haja aumento da atividade do promotor *SMYHC III*. Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni (A e B) e (C) teste t não paramétrico com $p < 0,05$. **** $p < 0.0001$.

4.5 *GR* ativa o promotor *SMYHC III* independente de cNRE

Foram realizados ensaios de transativação celular em HEK293T com co-transfecção do promotor (*SMYHC III* ou *SMYHC III* Δ cNRE) ao longo de concentrações crescentes de *GR α* ou *GR β* . *GR α* foi capaz de promover a ativação do promotor nativo (*SMYHC III*) a partir da concentração de 1 μ g de DNA (Fig. 26A). Quando co-transfectado com a versão mutada do promotor (*SMYHC III* Δ cNRE) a ativação ocorreu apenas na concentração de 2 μ g de DNA (Fig. 26B). Na presença do ligante dexametasona a resposta de ativação foi potencializada (Fig. 26D-E) quando comparado ao grupo não tratado, e em ambos os grupos, na presença ou ausência de dexametasona, o cNRE não se apresentou como sequência importante para a atividade do promotor (Fig. 26C e F).

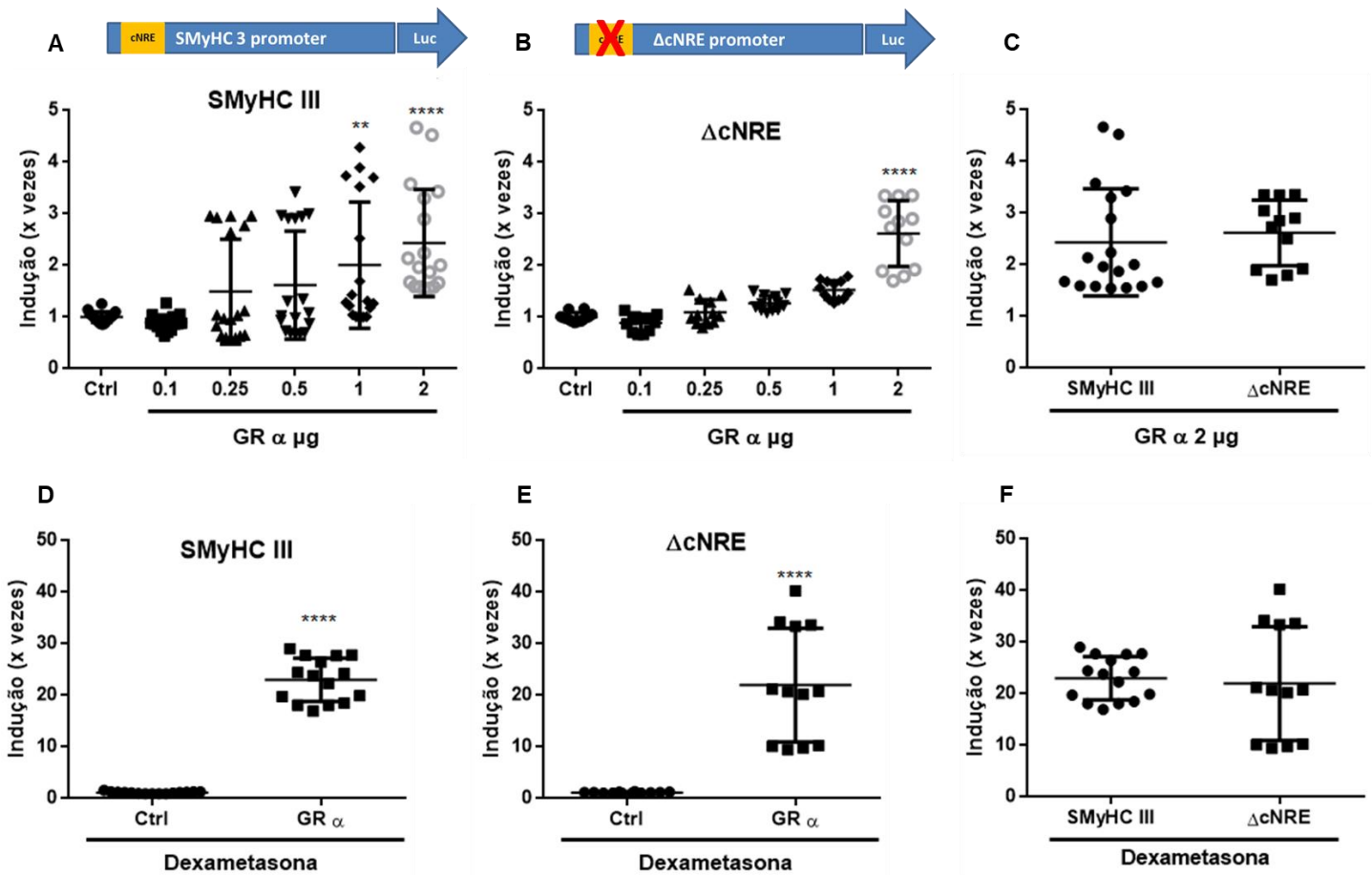


Figura 26: $GR\alpha$ é capaz de ativar a atividade do promotor do gene *SMYHC III* e a ação é potencializada pela dexametasona.

(A- B e D- E) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor co-transfectados com $GR\alpha$ na presença (D- E) ou ausência de dexametasona (A- B) via luminescência da luciferase evidenciando que $GR\alpha$ é capaz de aumentar a atividade do promotor de modo independente do cNRE (C), e tal atividade é potencializada na presença do ligante (D- E), também independente do cNRE (F). Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni (A e B) e (C- F) teste t não paramétrico com $p < 0,05$. **** p < 0.0001.

$GR\beta$ também foi capaz de ativar o promotor nativo (*SMYHC III*) (Fig. 27A), mas a partir da concentração de 1 μg de DNA e do promotor mutado (*SMYHC III* $\Delta cNRE$) apenas na concentração de 2 μg de DNA (Fig. 27B). A sequência do cNRE se mostrou necessária para a ativação observada, uma vez que na sua ausência houve repressão da atividade do promotor quando comparado ao controle (*SMYHC III*) (Fig. 27C).

Na presença de dexametasona não houve diferença na atividade do promotor quando comparado ao grupo não tratado com o ligante (Fig. 27D), diferente do observado no grupo experimental co-transfectado com *SMyHC III* Δ cNRE que foi ativado na presença do ligante quando comparada a mesma condição na ausência do ligante (Fig. 27E). No entanto, a partir da comparação de ambas as versões do promotor sob o efeito da dexametasona não houve diferença na sua atividade (Fig. 27F), portanto o cNRE não é um elemento regulatório necessário para a atividade observada na presença do ligante.

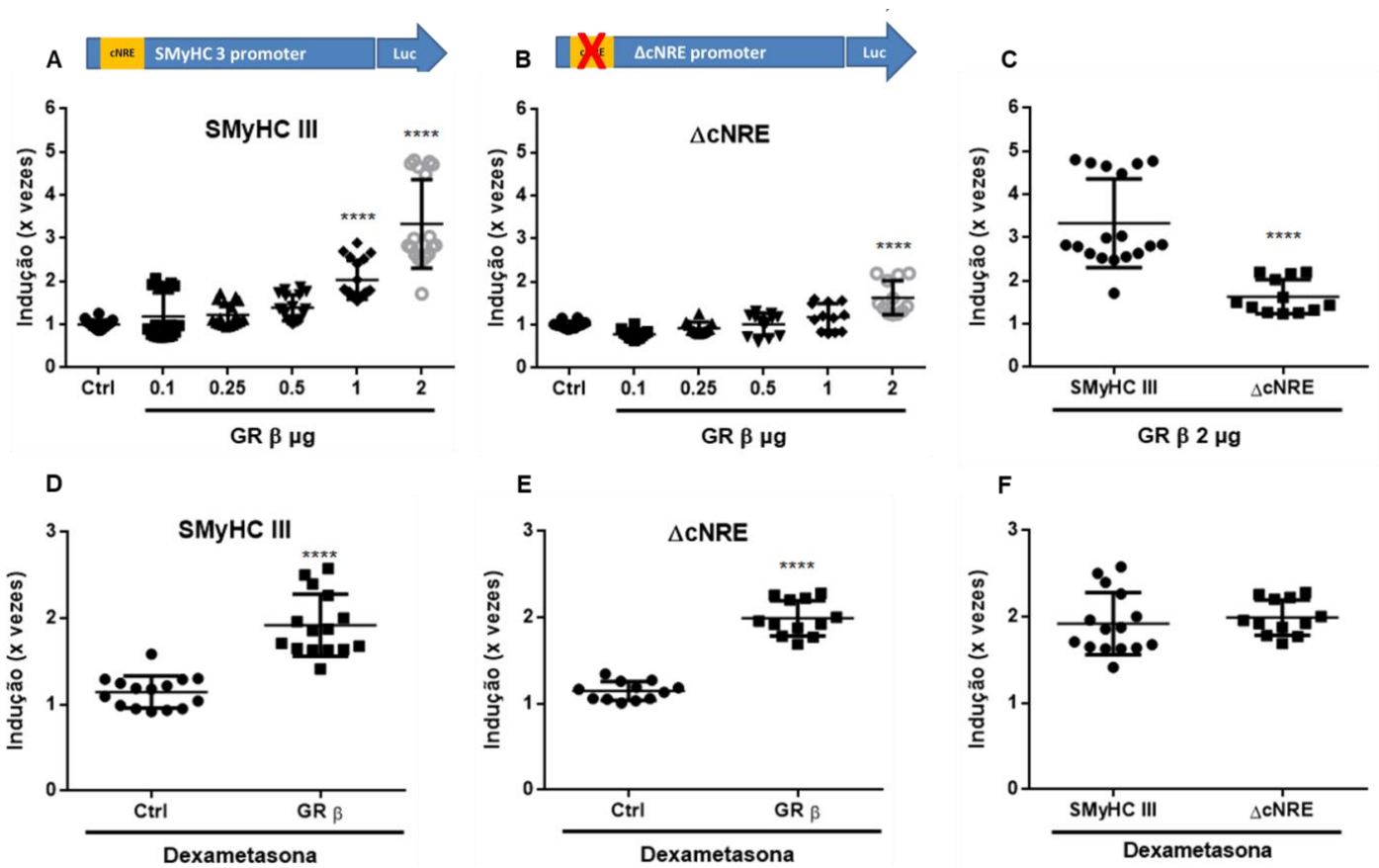


Figura 27: $GR\beta$ é capaz de ativar a atividade do promotor do gene *SMyHC III*.

(A- B e D- E) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor co-transfectados com $GR\beta$ na presença (D- E) ou ausência de dexametasona (A- B) via luminescência da luciferase. Tal experimento evidenciou que $GR\beta$ foi capaz de aumentar a atividade do promotor e que esta foi dependente do cNRE (C), porém o ligante não exerce nenhum efeito potencializador dependente do cNRE (F). Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni (A e B) e (C- F) teste t não paramétrico com $p < 0,05$. **** $p < 0.0001$.

Também foi verificada, por meio de ensaio de transativação celular, o efeito da interação entre COUPTF-II e *GRα* ou *GRβ* sob o promotor do gene *SMyHC III*. Utilizando a estratégia de co-transfecção com concentração crescente de *GRα* e concentração fixa de COUPTF-II foi observado que, independente da presença do cNRE, o promotor tem a atividade aumentada em todas as concentração de *GRα* utilizadas (Fig. 28A e B), diferente do que havia sido observação quando as células foram co-transfectadas apenas com o promotor (*SMyHC III* ou *SMyHC III ΔcNRE*) e *GRα* (Fig. 26A e B), ou seja, COUPTF-II exerce influência importante sob o promotor quando combinado com *GRα*, e essa interação foi potencializada quando as células foram tratada com dexametasona (Fig. 28C e D). No entanto, na presença da dexametasona, apesar do *SMyHC III ΔcNRE* ser ativado essa resposta é menor quando comparado ao *SMyHC III* (Fig. 28E). Portanto, neste contexto, o cNRE foi importante para a potencialização da atividade do promotor, embora não tenha sido necessário já que houve ativação independente da presença deste elemento regulatório.

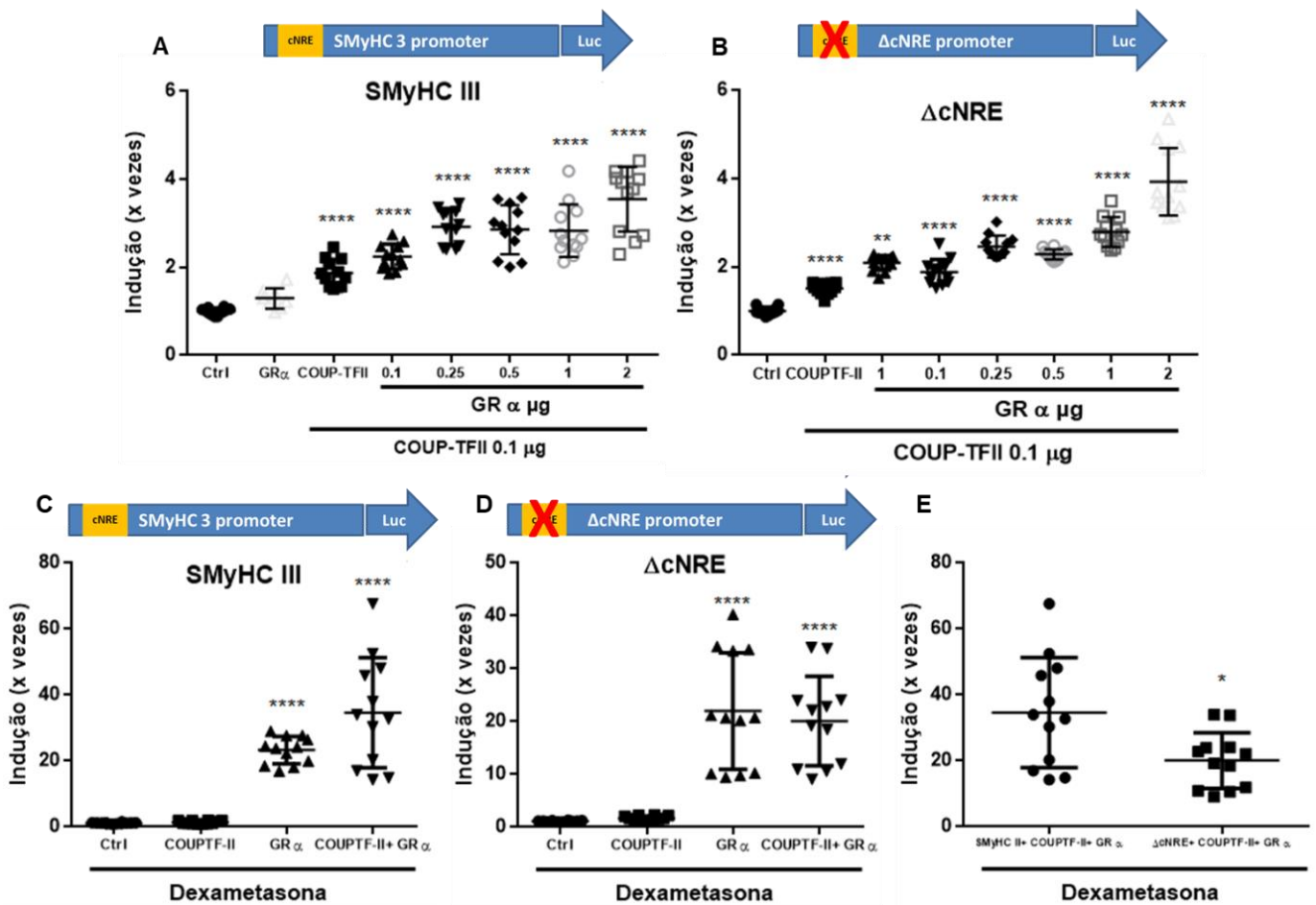


Figura 28: Combinação entre COUPTF-II e GR α ativa o promotor do gene *SMYHC III* independente do cNRE.

(A- D) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor co-transfectados com GR α e COUPTF-II na presença (C- D) ou ausência de dexametasona (A- B) via luminescência da luciferase evidenciando que a combinação entre os dois receptores nucleares aumentou a atividade do promotor independente do cNRE (A- B). Além disso, a atividade foi potencializada pela dexametasona. (C- D) No entanto, a ausência do cNRE fez com que a potencialização exercida pelo ligante fosse menor comparado ao promotor selvagem na mesma condição (E). Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni (A- D) e (E) teste t não paramétrico com $p < 0,05$. **** $p < 0.0001$.

A interação entre GR β e COUPTF-II também foi capaz de promover a ativação do promotor em todas as concentrações de GR β utilizadas (Fig. 29A e B) independente do cNRE, assim como observado para GR α (Fig. 28A e B). A combinação de ambos os receptores nucleares e dexametasona também potencializou o aumento na atividade do promotor independente do cNRE (Fig. 29C- E). Portanto, a ação combinada observada entre GR β e

COUPTF-II sob o promotor não necessita do cNRE, pode ser potencializada pela dexametasona, embora a ação seja menor quando comparada a atividade exercida sob o promotor pelo GR α combinado com COUPTF-II e ligante (Fig. 28C e D).

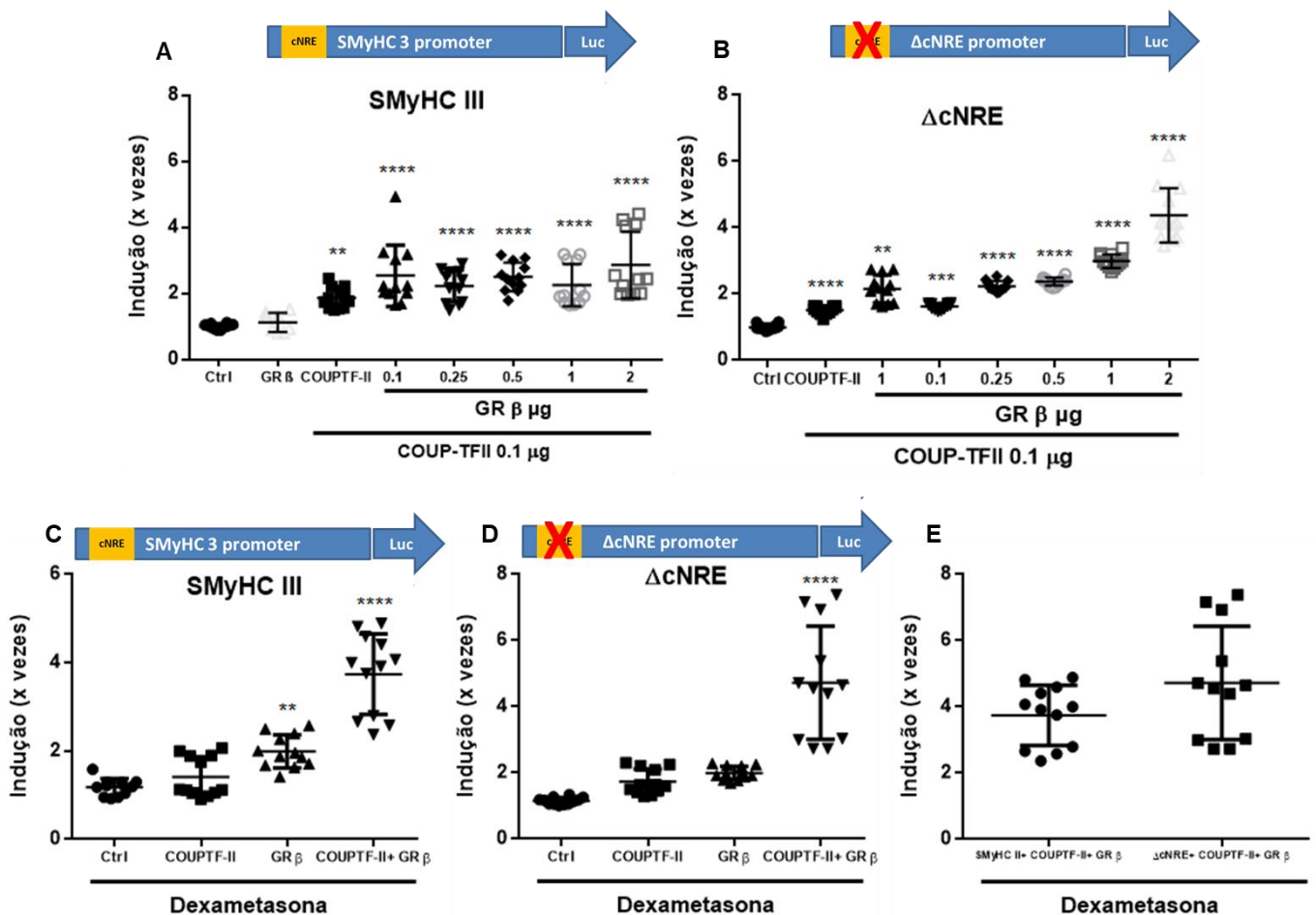


Figura 29: Combinação entre COUPTF-II e GR β ativa o promotor do gene *SMyHC III* independente do cNRE.

(A- D) Gráficos representando os ensaios de ativação com as diferentes construções do promotor co-transfectados com GR β e COUPTF-II na presença (C- D) ou ausência de dexametasona (A- B) via luminescência da luciferase. Foi evidenciado que a combinação entre os dois receptores nucleares foi capaz de aumentar a atividade do promotor independente do cNRE (A- B), e que tal atividade foi potencializada pelo ligante de GR α (C- D), apesar de ser independente do cNRE (E). Teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste post-hoc de Bonferroni (A- D) e (E) teste t não paramétrico com $p < 0,05$. **** $p < 0,0001$.

5 DISCUSSÃO

Nesta seção serão discutidos os resultados obtidos correlacionando-os com a literatura disponível sobre o tema, bem como fundamentando as hipóteses que foram construídas ao logo deste projeto.

5.1 cNRE, elemento regulatório necessário e suficiente para dirigir a atividade do promotor *SMyHC III* no átrio cruzando a barreira de espécie

O desenvolvimento cardíaco é um evento complexo que requer uma combinação refinada entre regulação gênica e movimentos morfogenéticos para a formação de uma estrutura com quatro câmaras cardíacas (1–3,6,9,64). Neste trabalho, caracterizamos o elemento complexo de receptores nucleares (do inglês, complex Nuclear Receptor Element, cNRE), um novo elemento regulatório que é necessário para dirigir a atividade do promotor de um gene atrial de codorna de modo específico no contexto cardíaco (*SMyHC III*) (45), além de ser suficiente para alterar o padrão de expressão dirigido por um promotor ventricular numa direção atrial. Observamos que a regulação atrial seletiva mediada pelo cNRE cruza a barreira de espécies, salientando a importância deste novo elemento na regulação gênica subjacente à especificação das câmaras cardíacas durante o desenvolvimento embrionário.

Wang e colaboradores (22) postulavam que o elemento VDRE/RARE era responsável pela repressão ventricular do promotor do gene *SMyHC III*, mas o que determinava sua atividade atrial carecia de elucidação (22,45,65). A fim de identificar a sequência responsável pela ativação atrial do promotor do gene *SMyHC III*, nosso grupo realizou uma análise na sequência do promotor em busca de potenciais sítios de ligação à receptores nucleares, e assim identificamos e caracterizamos o elemento complexo de receptores nucleares (cNRE) que, ao ser validado experimentalmente, nos permitiu propor uma expansão do motivo rico em purinas no sentido 3' do modelo previamente proposto por Wang et al composto por 17 nucleotídeos (22,45,65) para um novo elemento de 32 pb organizado em héxades A, B e C como sequência responsável pela atividade atrial do promotor, o cNRE (Fig. 2).

O *zebrafish* é um modelo amplamente utilizado em biologia do desenvolvimento, dado o fácil acesso a um grande número de embriões para injeção, rápido desenvolvimento quando comparado ao modelo de camundongo, além da transparência do embrião, que favorece a utilização de técnicas de imagem (66). Valendo-nos dessas vantagens, adotamos este modelo para caracterizar funcionalmente o cNRE. Verificamos que o cNRE é necessário para dirigir a expressão de GFP no átrio (Fig. 4), além de ser suficiente para alterar o padrão de atividade de

um promotor ventricular específico (*vmhc*) na direção atrial (Fig. 5) (43), evidenciando sua versatilidade e corroborando a hipótese de que este elemento regulatório é chave para a especificidade atrial da ativação do promotor de *SMyHC III*.

Ensaio biofísicos realizados por nosso grupo demonstraram que o cNRE apresenta uma organização em héxades (A,B e C) (Fig. 2). Em face dessas observações e da importância do cNRE evidenciada nos ensaios de transgenia, buscou-se identificar quais regiões no cNRE eram críticas à sua atividade. Para esta finalidade, foram realizadas mutações pontuais na sequência do cNRE (*Tol2-SMyHC III: GFP*) e a expressão transiente de GFP em embriões de *zebrafish* foi analisada (67–71). Ao mutarmos as sequências das héxades A (Mut A), B (Mut B) ou GATA (Fig. 6), observamos diminuição da expressão atrial de GFP e aumento da expressão em ambas as câmaras. Este resultado sugere que a informação contida nas héxades A, B é necessária à ativação atrial mediada pelo cNRE que, quando mutada, leva à perda de um potencial ativador atrial e de um repressor ventricular. A mutação na região espaçadora das héxades A e B (Mut Bsp) gerou um aumento no número de indivíduos expressando GFP no ventrículo, possivelmente, devido à perda de um repressor ventricular, assim como observado nos mutantes Mut C e Mut C3 (Fig. 6). Já o mutante Mut C2 apresentou aumento da expressão de GFP em ambas as câmaras cardíacas, porém sem alteração no padrão de expressão individual de GFP no átrio e no ventrículo, ou seja, houve a perda de um elemento que permitia diferenciar a expressão de GFP entre ambas as câmaras (Fig. 6).

Interessantemente, na mutação B2 (Mut B2), que consiste na transversão dos dois últimos nucleotídeos da héxade B, houve eliminação total da expressão cardíaca de GFP no coração (átrio e ventrículo), embora tenha sido observada a expressão de GFP em outros tecidos (musculatura esquelética e vesícula óptica), ou seja, apesar da mutação o plasmídeo ainda era funcional (Fig. 7). Este achado nos dá indícios de que houve a perda de um estimulador cardíaco (ativador atrial e repressor ventricular) importante para a atividade do promotor.

No passado, nosso grupo utilizou a mesma estratégia de mutação nas héxades do cNRE (Mut A, B e C) para avaliar o padrão de expressão da fosfatase alcalina humana (HAP) em camundongos. A mutação na héxade B resultou na expressão de HAP tanto no átrio quanto no ventrículo sugerindo que houve a perda de um potencial repressor ventricular presente no cNRE, de forma similar ao aqui observado com *zebrafish*. Já a mutação na héxade

C (Mut C) induziu completa eliminação da expressão de HAP, sugerindo a perda de um ativador atrial relevante à atividade do promotor, similar ao observado com o Mut B2 em *zebrafish*. Porém, às mutações realizadas na héxade A (Mut A) e héxade Bsp (Mut Bsp) não alteraram o padrão de expressão de HAP, ou seja, continuaram sendo seletivamente atriais (dados não apresentados). Portanto, a partir dos experimentos de transgenia realizados tanto em *zebrafish* quanto em camundongo podemos concluir que ambos os modelos compartilham as propriedades da héxade B, um importante repressor da atividade ventricular, assim como observado na héxade C. Entretanto, a característica dual apresentada pela héxade A, ativador atrial e repressor ventricular é exclusiva de *zebrafish*. De modo geral, podemos afirmar que o cNRE, independente do modelo animal utilizado, trata-se de um elemento regulatório com potencial para ativador atrial e repressor ventricular.

Utilizando camundongo como modelo experimental foi observado que, assim como nos embriões de codorna, a atividade do promotor é átrio-específica (11,45), fato este que difere dos embriões de *zebrafish* que também expressam GFP dirigido pelo promotor do gene *SMyHC III* no sistema nervoso central e musculatura esquelética, por exemplo (dado não apresentado). Tal inespecificidade em teleóstes é compreensível, pois se trata de, aproximadamente, 200 milhões de anos de diferença na linha evolutiva entre codorna e *zebrafish*. *Zebrafish* passou por uma duplicação do genoma, permitindo que pudesse ocorrer a divisão das funções dos genes em parálogos levando a uma neo-funcionalização ou inativação dos mesmos, fato este que reflete diretamente na plasticidade da atividade de regiões regulatórias (72,73). Portanto, era esperado, como consequência evolutiva, diferença no padrão de atividade do promotor do gene *SMyHC III*, mas ainda assim este promotor foi capaz de cruzar a barreira de espécie e recapitular o padrão de atividade no coração, sendo preferencialmente atrial no contexto cardíaco.

Apesar do promotor do gene *SMyHC III* não ser conservado, este apresenta atividade semelhante em codorna, camundongo e *zebrafish*, ou seja, existe uma assinatura, o cNRE, que é comum a esses organismos para que o mesmo promotor possa dirigir a expressão de um gene repórter seletivamente no átrio. A partir desta hipótese, foram realizadas análises de sintenia em sequências promotoras de *zebrafish*, camundongo e humano, previamente descritas e/ou preditas a partir da atividade de histonas (H3K4me1, H3K4me3 e H3K27ac) (44,52) na região *upstream* do gene da isoforma α da miosina de cadeia pesada 6 (MyH6). Nesta análise, observamos a presença das héxades (A, B e C) nos diferentes promotores, embora não se apresentem na mesma disposição (héxades A, B e C, respectivamente)

encontrada no promotor de do gene *SMYHC III* em codorna. A compreensão do papel da assinatura no cNRE nestas sequências irá depender de experimentos de deleção para avaliar se há mudanças no padrão de atividade dirigido por essas regiões promotoras, previstas, a princípio, como sendo ativas no coração (Fig. 30A-E).

O conjunto desses dados nos permite propor que o cNRE, por meio de suas héxades carrega informações que lhe conferem ambas as atividades: de ativador atrial e de repressor ventricular. Adicionalmente, os dados sugerem que o cNRE tem potencial para ser classificado como uma sequência universal capaz de regular a expressão gênica de modo atrial seletivo em diferentes organismos modelos.

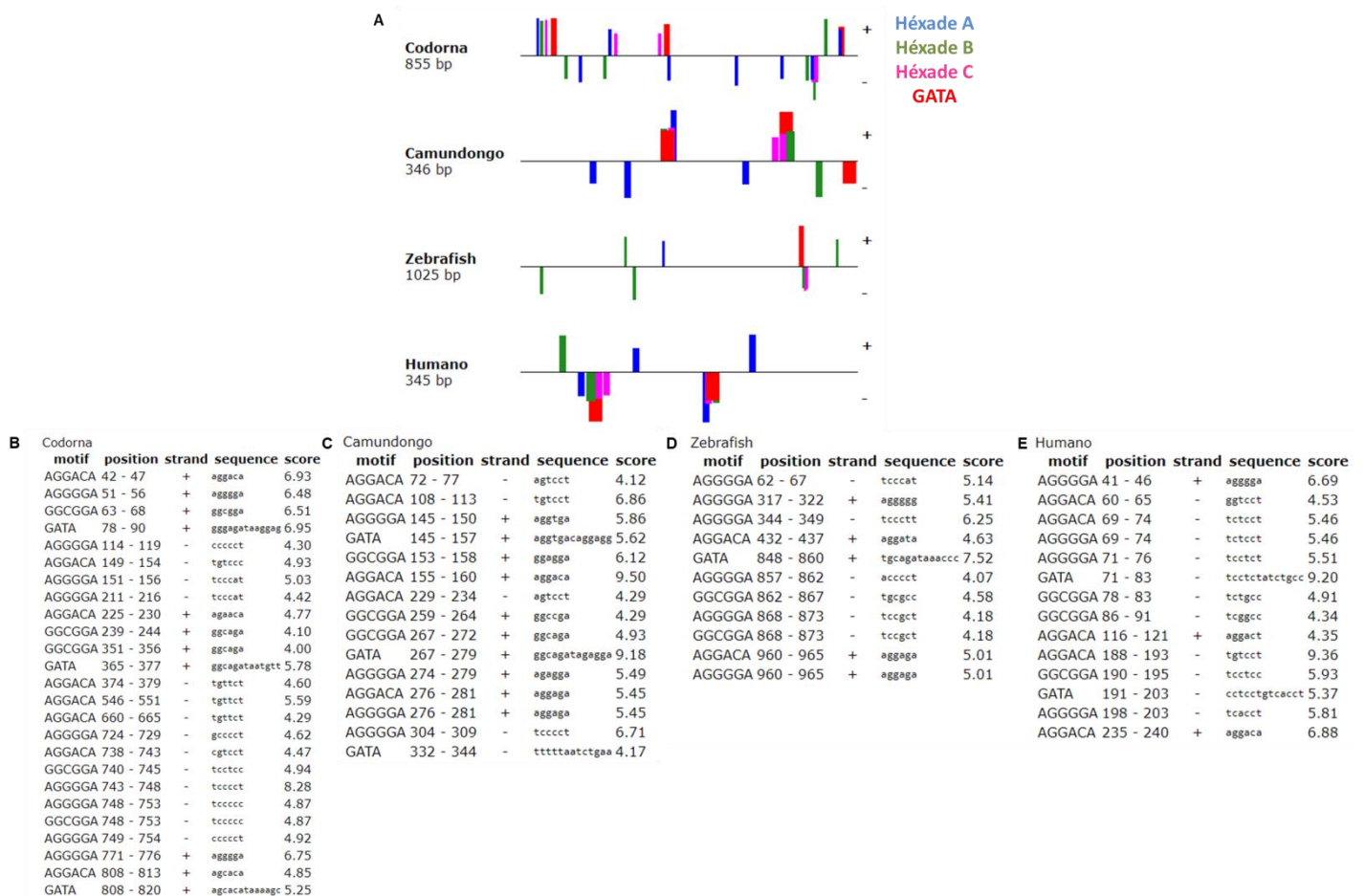


Figura 30: Análise de sintenia buscando pela assinatura das héxades que compõem o cNRE em sequências promotoras de codorna, camundongo, zebrafish e humano.

(A) Representação gráfica das assinaturas de cada uma das héxades (código de cores) encontradas nas diferentes sequências promotoras utilizadas. (B-E) Descrição de cada uma das posições, bem como sua característica quanto à orientação, posição e sequência em cada um dos genomas utilizados (5'-3').

5.2 COUPTF-II e AR interagem sinergicamente para regular a atividade do promotor *SM_yHC III* de modo dependente do cNRE

Os dados obtidos no desenvolvimento deste projeto e o conhecimento adquiridos pelo laboratório sobre o promotor do gene *SM_yHC III* ao longo dos anos confirmaram a importância do cNRE (necessário e suficiente) como elemento regulatório para que a atividade do promotor fosse dirigida seletivamente no átrio, porém ainda não estava claro o mecanismo pelo qual tal característica se dava. Assim, com o objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos na especificidade atrial dirigida pelo promotor utilizamos o receptor nuclear COUPTF-II como estratégia para decifrar quais os fatores de transcrição necessários, já que COUPTF-II, além de ser expresso de modo átrio-específico (Fig. 8) também foi descrito como sendo essencial para a determinação da identidade atrial (31,58,74).

Demonstramos por ChIP-PCR que COUPTF-II interage com o promotor do gene *SM_yHC III* na região que contém o cNRE (Fig. 9A). Os ensaios de transativação celular com as diferentes construções do promotor (*SM_yHC III*, *SM_yHC III ΔcNRE* e *5xcNRE*) ao longo de concentrações crescentes de COUPTF-II deixaram evidente o seu comportamento repressor (Fig. 9B-D). No entanto, na concentração de 100 ng de COUPTF-II, quando co-transfectado com a versão mutada do promotor (*SM_yHC III ΔcNRE*), houve ativação na atividade do promotor (Fig. 9C), talvez por interagir com outro potencial sítio de ligação ao longo da sequência do promotor, embora um sítio fraco, já que apenas em baixa concentração houve a resposta de ativação. Como estratégia para validar essa resposta foi utilizado a versão dominante negativo de COUPTF-II (COUPTF-II TV2), experimento este que deixou claro o papel repressor de COUPTF-II endógeno (HEK293T) (Fig. 11B-D), ou seja, o DNA transfectado promoveu, de fato, a ativação do promotor. Também foram transfectadas concentrações crescentes de COUPTF-II fusionado a proteína viral VP-16 (COUPTF-II VP-16) que possui poder de ativação independente do gene em questão, com *SM_yHC III pGL3* e *SM_yHC III ΔcNRE pGL3* (Fig. 10). E como esperado, COUPTF-II VP-16 foi capaz de ativar o promotor nativo em todas as concentrações utilizadas (Fig. 10A), fato não observado com a versão mutada do promotor deixando evidente, mais uma vez, a necessidade da sequência do cNRE (Fig. 10B). O conjunto destes resultados contrasta com a literatura, pois apesar de COUPTF-II ser um gene-chave (necessário e suficiente) para a determinação da identidade atrial/ ventricular por regular a expressão de genes diferencialmente expressos entre essas duas câmaras cardíacas, regulando positivamente a expressão dos genes atriais e suprimindo os

ventriculares, como *Tbx5*, *Hey2*, *Irx4* e *Mlc2v*, o mesmo reprimiu a atividade do promotor do gene *SMyHC III*, provavelmente por competir com outros elementos responsivos (31,59). Tal fato nos direcionou a buscar por possíveis correguladores que, em conjunto com COUPTF-II promovessem a atividade do promotor atrial foco deste trabalho e, por este motivo, testamos diferentes receptores nucleares que fazem parte da grande família de receptores nucleares (75–77). No entanto, nenhum dos genes testados foi capaz, de modo dependente do cNRE, ativar o promotor do gene *SMyHC III* (Fig. 12-18).

Diante deste cenário foi realizado a análise por espectrometria de massas (dado não apresentado) para identificar potenciais candidatos para regular a atividade do promotor do gene *SMyHC III* em cooperação com COUPTF-II, o que resultou na identificação do Receptor de Andrógeno (AR) e do Receptor de Glicocorticoide (GR) (57–59). Até o presente momento, a interação entre COUP-TFII e AR só havia sido reportada na literatura como repressora no contexto de câncer de próstata, não havendo nenhuma evidência de sua importância no desenvolvimento cardíaco. É importante ressaltar que AR é expresso no coração de camundongo e pode ser detectado a partir de 10.5 dias pós-coito (dpc) até 16 dias pós-natal, fase caracterizada pela morfogênese e maturação do órgão (62). Experimentos *in vitro* de *knockdown* de AR ou o uso de compostos anti-androgênicos evidenciaram inibição da cardiogênese, além de animais nocaute apresentarem redução na razão tamanho corpóreo e massa do coração, função ventricular comprometida, alteração eletrofisiológica atrial devido à desregulação na sinalização de cálcio e desenvolvimento de anormalidades cardíacas, ou seja, AR é um potencial candidato para regular a atividade do promotor do gene *SMyHC III*, positivamente, em conjunto com COUPTF-II (62,78). Já a interação entre COUPTF-II e GR foi descrita como sendo importante para o metabolismo intermediário de glicocorticoides no processamento da glicose, do colesterol, e no catabolismo de compostos químicos, mas sem nenhum indício de sua participação na determinação da identidade atrial apesar de diversos estudos (*in vivo* e *in vitro*) sugerirem que a sinalização de GR é essencial para o desenvolvimento e função do coração, principalmente quanto à sua estrutura e maturação funcional (58,59,79,80). O nocaute cardíaco-específico de GR resultou em morte prematura (média de 7 meses de idade), que estava associada a hipertrofia cardíaca, dilatação do ventrículo esquerdo, disfunção sistólica ou trombose atrial (3 meses de idade) que podem ter contribuído de modo isolado ou em conjunto para a falha do órgão (79–81). Todavia, nenhum estudo focou na importância de AR ou GR durante o desenvolvimento cardíaco ou na influência de ambos durante a etapa de especificação das câmaras atriais e ventriculares.

Assim, utilizando ensaios de transativação celular em HEK293T testamos tanto *AR* quanto *GR* como potenciais candidatos para regular a atividade do promotor do gene *SMyHC III* em cooperação com COUPTF-II.

Primeiramente, co-transfectamos concentrações crescentes de *AR* com a versão nativa (*SMyHC III*) e mutada do promotor (*SMyHC III ΔcNRE*) e demonstramos seu potencial repressor dependente do cNRE até mesmo para reprimir a atividade do promotor, pois só em concentrações maiores de *AR* (2 μg) houve ativação na ausência do elemento regulatório por, possivelmente, interagir com outros potenciais sítios de ligação ao longo da sequência do promotor, apesar de fracos (Fig. 23). No entanto, a combinação entre *AR* e COUPTF-II, num sinergismo entre dois repressores foi capaz de, na concentração de 250 ng de *AR* e 100 ou 250 ng de COUPTF-II (Fig. 24), ativar o promotor sendo essa cooperação dependente do cNRE, visto que na ausência deste elemento a atividade do promotor permaneceu em níveis basais (Fig. 24). Tal sinergismo, demonstrado pela primeira vez neste trabalho pode ser consequência da interação proteína-proteína entre COUPTF-II e *AR* (Fig.19, 22e 24), provavelmente facilitada por ambos necessitarem do mesmo domínio de ligação ao DNA, o cNRE (82). A interação entre COUPTF-II e *AR* é potencializada na presença do ligante de *AR*, testosterona, porém nesta condição o cNRE não é mais um elemento fundamental (Fig. 25), ou seja, o ligante é capaz de transpor qualquer necessidade desta sequência pela ativação ou aumento na expressão de fatores de transcrição como *Mesp1/2*, *Gata4*, *Mef2c* e *Nkx2.5* importantes para o desenvolvimento cardíaco

Também foi investigado o efeito de *GR* (*GRα* e *GRβ*) sob o promotor (*SMyHC III* e *SMyHC III ΔcNRE*), e ambos são capazes de ativar o promotor de modo dependente do cNRE (Fig. 26 e 27), já que no experimento de co-transfecção com *SMyHC III ΔcNRE* e *GRα* ou *GRβ* não houve repressão da atividade do promotor, mas a ativação só foi observada na concentração de 2 μg de DNA (Fig. 26 e 27). Na presença da dexametasona, ligante de *GRα*, a ativação é intensificada quando comparado com o controle na mesma condição de modo independente do cNRE, mesmo quando transfectado com *GRβ* que não possui o domínio de ligação ao ligante (do inglês, ligand-binding domain, LBD) (Fig. 26 e 27) (59).

Avaliamos a relação entre COUPTF-II e *GR* (*GRα* e *GRβ*) sob a atividade do promotor na sua versão nativa (*SMyHC III*) e mutada (*SMyHC III ΔcNRE*) (Fig. 28 e 29), e foi constatado que há ativação do promotor de modo independente do cNRE em todas as concentrações de *GR* utilizadas, e na presença de dexametasona essa resposta é aumentada,

embora o efeito seja menor quando comparado ao controle na mesma condição experimental (Fig. 28 e 29). Tal resposta pode ser justificada pelo fato de GR e COUPTF-II influenciarem na ativação transcricional um do outro, pois quando COUPTF-II está ligado ao promotor recruta a ligação de GR que irá interferir de modo positivo na expressão gênica, fato este que gera uma relação complexa entre esses dois receptores nucleares (59,77,82).

Portanto, este estudo mostra a relação entre dois repressores (COUPTF-II e AR) que interagem sinergicamente para promover a ativação do promotor de modo dependente do cNRE, um elemento regulatório aqui apresentado como necessário e suficiente para que a atividade do promotor do gene *SMyHC III* seja dirigida de modo seletivo no átrio. Também foi demonstrado que esta relação pode ser intensificada na presença da testosterona, porém o cNRE não é mais necessário, possivelmente por permitir o recrutamento de outros mecanismos moleculares como, por exemplo, aumento na expressão de fatores de transcrição como *Mesp1/2*, *Gata4*, *Mef2c* e *Nkx2.5* (78). Assim, COUPTF-II e AR são receptores nucleares propostos como peças fundamentais no mecanismo de regulação da atividade atrial seletiva do promotor do gene *SMyHC III*, sendo essa atividade mediada pelo cNRE.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados neste estudo, conclui-se que:

- A sequência do cNRE é necessária para dirigir a expressão atrial de GFP em *zebrafish*;
- O cNRE é suficiente para alterar o padrão de expressão dirigido por um promotor ventricular (*vmhc*) para atrial mesmo fora do contexto nativo do promotor do gene *SMyHC III*;
- COUPTF-II interage com o promotor do gene *SMyHC III*, e portanto, está apto a regular a atividade do promotor;
- O Receptor de Andrógeno e COUPTF-II, individualmente, são repressores da atividade do promotor, porém quando co-transfectados interagem sinergicamente para promover a ativação do promotor *SMyHC III*. Contudo, para que haja tal atividade o cNRE se mostra como elemento regulatório fundamental;
- O cNRE é um elemento dual exercendo função repressora ou ativadora dependente do cenário celular que lhe apresentado, observação esta reforçada com os ensaios de expressão transiente das mutações pontuais na sequência das héxades realizadas em *zebrafish*;
- O promotor do gene *SMyHC III* é capaz de transpor a barreira de espécies e regular, de forma análoga, a expressão atrial tanto em camundongo (dado não apresentado) quanto em peixes teleósteos, embora sua sequência não seja conservada;
- As análises de sintenia na região promotora do gene *MyH6* de camundongo, *zebrafish* e humano indicaram presença do cNRE, fato este que nos permiti dizer que genes com expressão seletiva no átrio podem ter evoluído, de maneira independente e paralela, para incorporar a assinatura do cNRE em seus promotores.

REFERENCIAS*

1. Brand T. Heart development: Molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol.* 2003;258(1):1–19.
2. Kelly RG, Buckingham ME, Moorman AF. Heart fields and cardiac morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2019 Sep 24];4(10). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25274757>
3. Lin Q, Schwarz J, Bucana C, Olson EN. Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* (80-). 1997 May 30;276(5317):1404–7.
4. Xavier-Neto J, Rosenthal N, Silva FA, Matos TG, Hochgreb T, Linhares VL. Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation. *Genesis* [Internet]. 2001 Nov [cited 2018 Mar 7];31(3):97–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11747199>
5. MOORMAN AFM, CHRISTOFFELS VM. Cardiac Chamber Formation: Development, Genes, and Evolution. *Physiol Rev* [Internet]. 2003 Oct [cited 2018 Mar 7];83(4):1223–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14506305>
6. Simões-Costa MS, Vasconcelos M, Sampaio AC, Cravo RM, Linhares VL, Hochgreb T, et al. The evolutionary origin of cardiac chambers. *Dev Biol* [Internet]. 2005 Jan 1 [cited 2018 Jul 3];277(1):1–15. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160604006645?via%3Dihub>
7. 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* [Internet]. 1994 Apr [cited 2018 Mar 7];120(4):871–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7600964>
8. Hochgreb T, Linhares VL, Menezes DC, Sampaio AC, Yan CYI, Cardoso W V, et al. A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. *Development* [Internet]. 2003 Nov 15 [cited 2018 Mar 7];130(22):5363–74. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.00750>

*De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. 2003 [cited 2016 May 30]. Available from: https://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

9. Xavier-Neto J, Trueba SS, Stolfi A, Souza HM, Sobreira TJP, Schubert M, et al. An Unauthorized Biography of the Second Heart Field and a Pioneer/Scaffold Model for Cardiac Development. In: *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press Inc.; 2012. p. 67–105.
10. Moss JB, Xavier-Neto J, Shapiro MD, Nayeem SM, McCaffery P, Dräger UC, et al. Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Dev Biol* [Internet]. 1998 Jul 1 [cited 2018 Mar 7];199(1):55–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160698989114>
11. Xavier-Neto J, Neville CM, Shapiro MD, Houghton L, Wang GF, Nikovits W, et al. A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart. *Development* [Internet]. 1999;126(12):2677–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331979>
12. Christoffels VM, Habets PEMH, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH, et al. Chamber Formation and Morphogenesis in the Developing Mammalian Heart. *Dev Biol* [Internet]. 2000 Jul 15 [cited 2018 Mar 7];223(2):266–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10882515>
13. Miquerol L, Kelly RG. Organogenesis of the vertebrate heart. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 Sep 18];2(1):17–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23799628>
14. Xavier-Neto J, Sousa Costa ÂM, Figueira ACM, Caiaffa CD, Amaral FN do, Peres LMC, et al. Signaling through retinoic acid receptors in cardiac development: Doing the right things at the right times. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech*. 2015;1849(2):94–111.
15. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* [Internet]. 1995 Dec 15 [cited 2018 Mar 7];83(6):835–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521507>
16. Aranda A, Pascual A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol Rev* [Internet]. 2001 Jul [cited 2018 Mar 7];81(3):1269–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11427696>

17. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. Vol. 108, Cell. Cell Press; 2002. p. 465–74.
18. McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai M-J, O'Malley BW. Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions Proceedings of Xth International Congress on Hormonal Steroids, Quebec, Canada, 17–21 June 1998. J Steroid Biochem Mol Biol [Internet]. 1999 Apr [cited 2018 Jul 3];69(1–6):3–12. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076098001447>
19. Pereira FA, Yuhong Q, 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.
20. Plageman TF, Yutzey KE. Differential expression and function of Tbx5 and Tbx20 in cardiac development. J Biol Chem [Internet]. 2004 Apr 30 [cited 2018 Mar 7];279(18):19026–34. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M314041200>
21. Rosenthal N, Xavier-Neto J. From the bottom of the heart: anteroposterior decisions in cardiac muscle differentiation. Curr Opin Cell Biol [Internet]. 2000 Dec [cited 2018 Mar 7];12(6):742–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11063942>
22. Wang GF, Nikovits W, Schleinitz M, 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 [Internet]. 1998;18(10):6023–34. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109188&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
23. Liberatore CM, Searcy-Schrick RD, Yutzey KE. Ventricular Expression of tbx5 Inhibits Normal Heart Chamber Development. Dev Biol [Internet]. 2000 Jul 1 [cited 2019 Sep 22];223(1):169–80. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160600997483>
24. Plageman TF, Yutzey KE. T-box genes and heart development: Putting the 'T' in heart. Dev Dyn [Internet]. 2005 Jan [cited 2019 Sep 22];232(1):11–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15580613>

25. Lin F-J, Qin J, Tang K, Tsai SY, Tsai M-J. Coup d'Etat: an orphan takes control. *Endocr Rev* [Internet]. 2011 Jun [cited 2018 Mar 7];32(3):404–21. Available from: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/er.2010-0021>
26. Wu S-P, Yu C-T, Tsai SY, Tsai M-J. Choose your destiny: Make a cell fate decision with COUP-TFII. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2016 Mar [cited 2019 Sep 20];157:7–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26658017>
27. 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* [Internet]. 1995 Jun [cited 2018 Mar 7];53(1–6):503–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7626501>
28. Takamoto N, You L-R, Moses K, Chiang C, Zimmer WE, Schwartz RJ, et al. COUP-TFII is essential for radial and anteroposterior patterning of the stomach. *Development* [Internet]. 2005 May 23 [cited 2018 Mar 7];132(9):2179–89. Available from: <http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.01808>
29. Li L, Xie X, Qin J, Jeha GS, Saha PK, Yan J, et al. The nuclear orphan receptor COUP-TFII plays an essential role in adipogenesis, glucose homeostasis, and energy metabolism. *Cell Metab* [Internet]. 2009 Jan 7 [cited 2018 Mar 7];9(1):77–87. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1550413108003872>
30. Wu S pin, Cheng CM, Lanz RB, Wang T, Respress JL, Ather S, et al. Atrial Identity Is Determined by a COUP-TFII Regulatory Network. *Dev Cell*. 2013;25(4):417–26.
31. Wu S, Cheng C-M, Lanz RB, Wang T, Respress JL, Ather S, et al. Atrial Identity Is Determined by a COUP-TFII Regulatory Network. *Dev Cell* [Internet]. 2013 May 28 [cited 2019 Mar 29];25(4):417–26. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580713002463>
32. Bruneau BG. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis. *Circ Res* [Internet]. 2002 Mar 22 [cited 2018 Mar 7];90(5):509–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11909814>
33. MOORMAN AFM, CHRISTOFFELS VM. Cardiac Chamber Formation: Development, Genes, and Evolution. *Physiol Rev* [Internet]. 2003;83(4):1223–67. Available from: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00006.2003>

34. Bao Z. Regulation of Chamber-Specific Gene Expression in the Developing Heart by *Irx4*. *Science* (80-) [Internet]. 1999 Feb 19 [cited 2019 Sep 22];283(5405):1161–4. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.283.5405.1161>
35. Bruneau BG, Bao ZZ, Fatkin D, Xavier-Neto J, Georgakopoulos D, Maguire CT, et al. Cardiomyopathy in *Irx4*-deficient mice is preceded by abnormal ventricular gene expression. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2001 Mar 1 [cited 2019 Sep 22];21(5):1730–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238910>
36. Bruneau BG, Bao Z-Z, Tanaka M, Schott J-J, Izumo S, Cepko CL, et al. Cardiac Expression of the Ventricle-Specific Homeobox Gene *Irx4* Is Modulated by *Nkx2-5* and *dHand*. *Dev Biol* [Internet]. 2000 Jan 15 [cited 2019 Sep 22];217(2):266–77. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001216069995489>
37. O’Brien TX, Lee KJ, Chien KR. Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1993 Jun 1 [cited 2019 Sep 22];90(11):5157–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8506363>
38. Huang C, Sheikh F, Hollander M, Cai C, Becker D, Chu P-H, et al. Embryonic atrial function is essential for mouse embryogenesis, cardiac morphogenesis and angiogenesis. *Development* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2019 Sep 22];130(24):6111–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14573518>
39. Chen J, Kubalak SW, Minamisawa S, Price RL, Becker KD, Hickey R, et al. Selective Requirement of Myosin Light Chain 2v in Embryonic Heart Function. *J Biol Chem* [Internet]. 1998 Jan 9 [cited 2019 Sep 22];273(2):1252–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9422794>
40. Xin M, Small EM, van Rooij E, Qi X, Richardson JA, Srivastava D, et al. Essential roles of the bHLH transcription factor *Hrt2* in repression of atrial gene expression and maintenance of postnatal cardiac function. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007 May 8 [cited 2019 Sep 22];104(19):7975–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17468400>
41. Singh AR, Sivadas A, Sabharwal A, Vellarikal SK, Jayarajan R, Verma A, et al. Chamber Specific Gene Expression Landscape of the Zebrafish Heart. Xu X, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Jan 27 [cited 2019 Sep 18];11(1):e0147823. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0147823>

42. Paige SL, Plonowska K, Xu A, Wu SM. Molecular Regulation of Cardiomyocyte Differentiation. *Circ Res* [Internet]. 2015 Jan 16 [cited 2019 Oct 9];116(2):341–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25593278>
43. Jin D, Ni TT, Hou J, Rellinger E, Zhong TP. Promoter analysis of ventricular myosin heavy chain (vmhc) in zebrafish embryos. *Dev Dyn* [Internet]. 2009 Jul [cited 2019 Mar 29];238(7):1760–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517572>
44. Yuan X, Song M, Devine P, Bruneau BG, Scott IC, Wilson MD. Heart enhancers with deeply conserved regulatory activity are established early in zebrafish development. *Nat Commun* [Internet]. 2018 Dec 26 [cited 2019 Oct 9];9(1):4977. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41467-018-07451-z>
45. Wang GF, Nikovits W, Schleinitz M, 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.
46. Matos TG de F, Xavier-Neto J. Identificação de elementos regulatórios que controlam a expressão atrial-específica do transgene SMyHC3-HAP em camundongos [Internet]. 2002 [cited 2018 Mar 7]. Available from: http://bdpi.usp.br/single.php?_id=001275758
47. 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* [Internet]. 1993 Jan 5 [cited 2019 Mar 29];268(1):591–600. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8380169>
48. Mader S, Chen JY, Chen Z, White J, Chambon P, Gronemeyer H. The patterns of binding of RAR, RXR and TR homo- and heterodimers to direct repeats are dictated by the binding specificities of the DNA binding domains. *EMBO J* [Internet]. 1993 Dec 15 [cited 2019 Mar 29];12(13):5029–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8262045>
49. Zhang R, Xu X. Transient and transgenic analysis of the zebrafish ventricular myosin heavy chain (vmhc) promoter: an inhibitory mechanism of ventricle-specific gene expression. *Dev Dyn* [Internet]. 2009 Jun [cited 2019 Mar 29];238(6):1564–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19322764>

50. Westerfield M. *The Zebrafish Book: A guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*. 4 ed. Oregon I of NU of, editor. Institute of Neuroscience. University of Oregon; 2000.
51. Downs KM, Davies T. Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development* [Internet]. 1993 Aug [cited 2019 Oct 10];118(4):1255–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8269852>
52. Catarino RR, Stark A. Assessing sufficiency and necessity of enhancer activities for gene expression and the mechanisms of transcription activation. *Genes Dev* [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2019 Sep 24];32(3–4):202–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29491135>
53. Molkenin JD, Jobe SM, Markham BE. Alpha-myosin heavy chain gene regulation: delineation and characterization of the cardiac muscle-specific enhancer and muscle-specific promoter. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 1996 Jun [cited 2019 Oct 24];28(6):1211–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8782063>
54. Stefanovic S, Christoffels VM. GATA-dependent transcriptional and epigenetic control of cardiac lineage specification and differentiation. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2015 Oct [cited 2019 Oct 11];72(20):3871–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26126786>
55. Hendrik R. A. Jonker, Rainer W. Wechselberger, Rolf Boelens, Gert E. Folkers * and, Kaptein R. Structural Properties of the Promiscuous VP16 Activation Domain†. 2004 [cited 2019 Mar 29]; Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/bi0482912>
56. Tomoko YAMAZAKI, Jun-ichi SUEHIRO, Hideki MIYAZAKI, Takashi MINAMI, Tatsuhiki KODAMA KM and TW. The COUP-TFII variant lacking a DNA-binding domain inhibits the activation of the Cyp7a1 promoter through physical interaction with COUP-TFII. *Biochem J*. 2013;357:345–57.
57. Bárbara Santos Pires Da Silva. *O papel dos Receptores Nucleares na Especificação Atrial*. Universidade de São Paulo; 2013.

58. Song C-H, Lee HJ, Park E, Lee K. The chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor II negatively regulates the transactivation of androgen receptor in prostate cancer cells. *PLoS One* [Internet]. 2012 [cited 2019 Oct 31];7(11):e49026. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23145053>

59. De Martino MU, Alesci S, Chrousos GP, Kino T. 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* [Internet]. 2004 Jun [cited 2019 Oct 29];1024:72–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15265774>

60. Oakley RH, Cruz-Topete D, He B, Foley JF, Myers PH, Xu X, et al. Cardiomyocyte glucocorticoid and mineralocorticoid receptors directly and antagonistically regulate heart disease in mice. *Sci Signal* [Internet]. 2019 Apr 16 [cited 2019 Nov 2];12(577). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30992401>

61. Ren R, Oakley RH, Cruz-Topete D, Cidlowski JA. Dual role for glucocorticoids in cardiomyocyte hypertrophy and apoptosis. *Endocrinology*. 2012 Nov 1;153(11):5346–60.

62. Pedernera E, Gómora MJ, Meneses I, De Ita M, Méndez C. Androgen receptor is expressed in mouse cardiomyocytes at prenatal and early postnatal developmental stages. *BMC Physiol* [Internet]. 2017 Aug 14 [cited 2019 Oct 25];17(1):7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28806941>

63. Eggert M, Michel J, Schneider S, Bornfleth H, Baniahmad A, Fackelmayer FO, et al. The Glucocorticoid Receptor Is Associated with the RNA-binding Nuclear Matrix Protein hnRNP U. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Nov 7 [cited 2019 Sep 20];272(45):28471–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353307>

64. Habets PE, Moorman AF, Christoffels VM. Regulatory modules in the developing heart. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2003;58(2):246–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12757861>

65. Wang GF, Nikovits W, 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.

66. Meyers JR. Zebrafish: Development of a Vertebrate Model Organism. *Curr Protoc Essent Lab Tech*. 2018 May 1;16(1).
67. Kague E, Weber C, Fisher S. Mosaic Zebrafish Transgenesis for Evaluating Enhancer Sequences. 2010;(Figure 1):1–3.
68. Clark KJ, Urban MD, Skuster KJ, Ekker SC. Transgenic zebrafish using transposable elements. *Methods Cell Biol* [Internet]. 2011 [cited 2018 Jul 4];104:137–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21924161>
69. Kawakami K. Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol* [Internet]. 2007 [cited 2018 Jul 4];8 Suppl 1(Suppl 1):S7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18047699>
70. Suster ML, Kikuta H, Urasaki A, Asakawa K, Kawakami K. Transgenesis in Zebrafish with the Tol2 Transposon System. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ) [Internet]. 2009 [cited 2018 Jul 4]. p. 41–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19504063>
71. Fisher S, Grice EA, Vinton RM, Bessling SL, Urasaki A, Kawakami K, et al. Evaluating the biological relevance of putative enhancers using Tol2 transposon-mediated transgenesis in zebrafish. 2006;1(3):1297–305.
72. Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Kelly PD, Chu F, et al. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes. *Genome Res*. 2000;10(12):1890–902.
73. Furutani-Seiki M, Wittbrodt J. Medaka and zebrafish, an evolutionary twin study. Vol. 121, *Mechanisms of Development*. 2004. p. 629–37.
74. 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* [Internet]. 1999 Apr 15 [cited 2018 Mar 7];13(8):1037–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10215630>

75. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schittq5 G, Umesono K, et al. The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade. *Cell* [Internet]. 1995 [cited 2018 Jul 2];83:835–9. Available from: [https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674\(95\)90199-X.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749590199X%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/pdf/0092-8674(95)90199-X.pdf?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2F009286749590199X%3Fshowall%3Dtrue)
76. Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* [Internet]. 2003 Feb 15 [cited 2018 Jul 3];116(Pt 4):585–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538758>
77. Litchfield LM, Klinge CM. Multiple roles of COUP-TFII in cancer initiation and progression. Vol. 49, *Journal of Molecular Endocrinology*. 2012.
78. Al Madhoun AS, Voronova A, Ryan T, Zakariyah A, McIntire C, Gibson L, et al. Testosterone enhances cardiomyogenesis in stem cells and recruits the androgen receptor to the MEF2C and HCN4 genes. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2019 Oct 30];60:164–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23598283>
79. Oakley RH, Cidlowski JA. Glucocorticoid signaling in the heart: A cardiomyocyte perspective. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2015;153:27–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.03.009>
80. Severinova E, Alikunju S, Deng W, Dhawan P, Sayed N, Sayed D. Glucocorticoid Receptor-Binding and Transcriptome Signature in Cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc*. 2019 Mar 19;8(6).
81. Cruz-Topete D, Oakley RH, Carroll NG, He B, Myers PH, Xu X, et al. Deletion of the Cardiomyocyte Glucocorticoid Receptor Leads to Sexually Dimorphic Changes in Cardiac Gene Expression and Progression to Heart Failure. *J Am Heart Assoc*. 2019 Aug 6;8(15).
82. Stroup D, Chiang JYL. HNF4 and COUP-TFII interact to modulate transcription of the cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1). *J Lipid Res*. 2000 Jan;41(1):1–11.