

**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**

## 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 morfogênicos 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 elucidção. 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 COUTF-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.

# **1 INTRODUÇÃO**

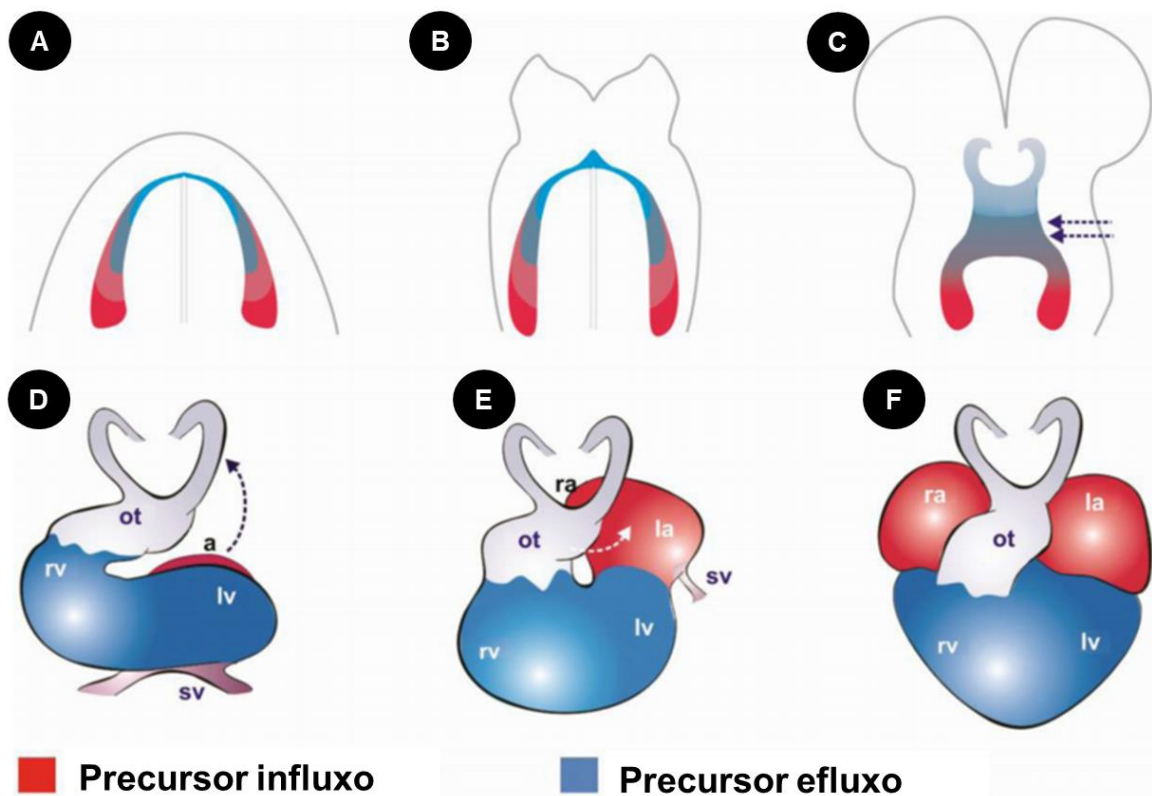
Será apresentada uma breve introdução sobre desenvolvimento cardíaco e especificação das câmaras cardíacas para contextualização deste estudo.

### **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 ativados por ligantes que regulam a expressão de genes-alvo, sendo sua principal função mediar à 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 $\alpha$* ), receptor órfão RAR-relacionado alfa (*ROR $\gamma$* ), *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 ( *$\beta$ -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  $\alpha$ ) 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).

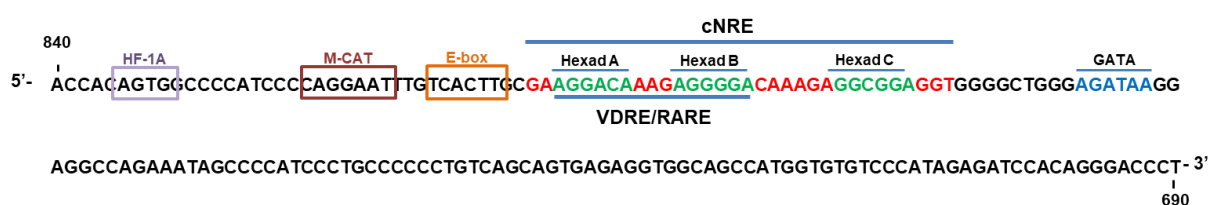
Em face de algumas evidências aqui apresentadas, pode-se reconhecer a importância da regulação gênica mediada por fatores de transcrição no desenvolvimento cardíaco, sendo que alterações na assinatura gênica propiciam o desenvolvimento de doenças cardíacas congênitas (41,42). O fenótipo exuberante observado 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 espaçada (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.

## **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](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](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 $\alpha$ -hydroxylase gene (CYP7A1). *J Lipid Res*. 2000 Jan;41(1):1–11.