



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
LABORATÓRIO DE FARMACOLOGIA MOLECULAR

JUANA BOTTEGA WOITECHUMAS

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA DOMINÂNCIA NEGATIVA NA SÍNDROME DE
RESISTÊNCIA AO HORMÔNIO TIREOIDEANO:**

- I. GENES REGULADOS NEGATIVAMENTE PELO RECEPTOR DE HORMÔNIO TIREOIDEANO;**
- II. GENES REGULADOS PELOS RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE
PEROXISSOMA**

Brasília
2010

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

JUANA BOTTEGA WOITECHUMAS

**MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA DOMINÂNCIA NEGATIVA NA SÍNDROME DE
RESISTÊNCIA AO HORMÔNIO TIREOIDEANO:**

**I. GENES REGULADOS NEGATIVAMENTE PELO RECEPTOR DE HORMÔNIO TIREOIDEANO;
II. GENES REGULADOS PELOS RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE
PEROXISSOMA**

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como Requisito Parcial à Obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Marie Togashi

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha
Neves

Brasília
2010

JUANA BOTTEGA WOITECHUMAS

MECANISMOS MOLECULARES ENVOLVIDOS NA DOMINÂNCIA NEGATIVA NA SÍNDROME DE RESISTÊNCIA AO HORMÔNIO TIREOIDEANO: I. GENES REGULADOS NEGATIVAMENTE PELO RECEPTOR DE HORMÔNIO TIREOIDEANO; II. GENES REGULADOS PELOS RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMA

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como Requisito Parcial à Obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Marie Togashi

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

Aprovado em 23 de agosto de 2010

Banca Examinadora

Profa. Dra. Marie Togashi (Presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe
Universidade de Brasília

Dra. Rutnéia de Paula Pessanha
Ministério da Saúde

Dr. Gustavo Barcelos Barra
Laboratório Sabin (Membro Suplente)

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dedico este trabalho à minha mãe que sempre esteve ao meu lado me incentivando a nunca desistir dos meus sonhos e objetivos.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus por me mostrar que nada acontece por acaso. Tudo tem seu propósito. A cada dia Ele me ensina o quanto a vida é preciosa e o quanto devemos lutar para buscarmos nossa felicidade.

À minha mãe que sempre esteve ao meu lado. Seu amor e sua vontade de viver me motivaram e me motivam a seguir em frente, mesmo quando tudo parece perdido. Tudo que sou devo a você.

Ao meu amor, Odilon, por apoiar e incentivar minhas escolhas, mesmo que para isso tenhamos que ficar menos tempo juntos. Sua compreensão e amor foram fundamentais para cada conquista.

Ao professor Francisco pela oportunidade de aprender e a questionar.

À professora Marie, minha orientadora. Obrigada pelas orientações.

Ao eterno professor Luiz e à minha querida amiga Cristina pela sabedoria, incentivo e carinho que sempre tiveram comigo. O respeito que eu tenho por vocês estará em minha vida para sempre. Meus dias teriam sido tristes se eu não tivesse a convivência de vocês.

À professora Andrea pelo incentivo de persistir nos experimentos. Tenho grande admiração em como a pesquisa é importante para você.

Às quatro anjinhas que eu encontrei em minha vida: Silvia, Karime, Angélica e Cíntia. Muito obrigada pelo apoio e otimismo sempre. Vocês foram e são um presente que eu ganhei ao entrar no laboratório. Suas amizades são mais que especial para mim. Suas palavras me confortaram, incentivaram e me fizeram persistir. Vocês não imaginam como eu sou agradecida por ter conhecido vocês.

Ao Gustavo, Lara e Patrícia meu imenso agradecimento. Vocês fizeram renascer em mim a vontade em aprender e trabalhar com biologia molecular. Excelentes professores e eternos amigos. Muito obrigada pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos.

Aos amigos e amigas especiais que conheci no laboratório: Júlia, Carolina, Jacqueline, Mariana, Tainá, Mayta, Elaine, Igor, Jaqueline, Sarah e Marina. Foi um prazer poder conviver com vocês. Meus dias foram muito mais alegres, pois tinha vocês por perto.

À Rilva pelo aprendizado, pela vivência, pela experiência e pelo carinho. Sua paciência, ajuda e colaboração foram essenciais em cada dia de trabalho.

À Dra. Adriana Lofrano pelo incentivo e convivência. Além de excelente profissional, você é uma pessoa muito querida que tenho um enorme carinho e admiração.

À Dra. Ana Carolina, Dra. Rutnéia e Dr. Gustavo por aceitarem participar da banca examinadora de minha pesquisa. É uma grande honra e satisfação para mim.

Obrigada de todo o meu coração a cada pessoa fundamental e inesquecível em minha vida. Nunca me esquecerei de vocês.

Devia ter amado mais
 Ter chorado mais
 Ter visto o sol nascer
 Devia ter arriscado mais
 E até errado mais
 Ter feito o que eu queria fazer...
 Queria ter aceitado
 As pessoas como elas são
 Cada um sabe alegria
 E a dor que traz no coração...
 O acaso vai me proteger
 Enquanto eu andar distraído
 O acaso vai me proteger
 Enquanto eu andar...
 Devia ter complicado menos
 Trabalhado menos
 Ter visto o sol se pôr
 Devia ter me importado menos
 Com problemas pequenos
 Ter morrido de amor...
 Queria ter aceitado
 A vida como ela é
 A cada um cabe alegrias
 E a tristeza que vier...
 O acaso vai me proteger
 Enquanto eu andar distraído
 O acaso vai me proteger
 Enquanto eu andar...
 Devia ter complicado menos
 Trabalhado menos
 Ter visto o sol se pôr...

Epitáfio – Titãs
 Composição: Sérgio Brito

"Valeu a pena? Tudo vale a pena
 Se a alma não é pequena.
 Quem quer passar além do Bojador
 Tem que passar além da dor.
 Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
 Mas nele é que espelhou o céu"

(Fernando Pessoa)

RESUMO

A Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoideano (SRHT) é uma patologia caracterizada pela resposta reduzida dos tecidos-alvo ao hormônio tireoideano (HT). Ocorre comumente devido a mutações em um alelo do gene do receptor do hormônio tireoideano β (TR β) que codifica para um TR mutante, o qual inibe a função do TR β wt, fenômeno conhecido como dominância negativa. Em genes regulados positivamente pelo T₃, o mecanismo molecular de dominância negativa tem sido bastante estudado. Porém, o mecanismo com que esta ocorre em genes cuja transcrição é reprimida por T₃ precisa ser melhor elucidado. Estudos indicam que o PPAR é capaz de se dimerizar com o TR e inibir seletivamente a atividade transcricional exercida pelos TRs por competição com o RXR na ligação ao DNA e que o TR também é capaz de inibir a atividade transcricional exercida pelo PPAR. O mecanismo dessa inibição não está bem esclarecido. O primeiro objetivo do presente estudo foi investigar o mecanismo molecular do efeito dominante negativo exercido pelo mutante TR β -F451X, em genes regulados negativamente pelo T₃ e a importância da dimerização nesse fenômeno. Essa mutação é encontrada em pacientes com SRHT que apresentam severo retardo mental, distúrbio no desenvolvimento da fala e hiperatividade. Nossos resultados mostraram que o mutante F451X exerce dominância negativa sobre TR β nativo em promotor de TRH e AP-1. Observamos que o TR β ₁ wt e os mutantes F451X e G345R, outro mutante da síndrome, se heterodimerizam com o RXR em TRH e essa dimerização parece ser importante para que o efeito de dominância negativa em TRH seja observado. Essa heterodimerização não foi observada em AP-1, porém ocorre dominância negativa, sugerindo que outro mecanismo diferente da heterodimerização esteja envolvido no fenômeno. O segundo objetivo foi investigar a presença de dominância negativa do TR β ₁ wt e TR β ₁ F451X em genes regulados pelo receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR). Observamos que o TR β ₁ wt na proporção 1:5 e o mutante F451X na proporção 1:1 apresentaram inibição da ação do PPAR γ e que a dimerização e a interação com correpressores parece ser importante para a ocorrência da dominância negativa sobre PPAR em DR1.

Palavras-chave: Síndrome de Resistência aos Hormônios Tireoideanos; receptores nucleares; dominância negativa; receptor de hormônio tireoideano; receptor ativado por proliferadores de peroxissoma.

ABSTRACT

The Syndrome of Resistance to Thyroid Hormone (RTH) is a disease characterized by reduced response of target tissues to thyroid hormone (TH). Commonly occurs due to mutations in one allele of the thyroid hormone receptor β (TR β), which encodes a TR mutant, which inhibits the function of TR β wt, a phenomenon known as a dominant negative. In positively regulated genes by T3, the molecular mechanism of negative dominance has been well studied. However, the mechanism through which this occurs in genes whose transcription is repressed by T3 needs to be better elucidated. Studies indicate that PPAR is able to dimerize with TR and selectively inhibit the transcriptional activity exerted by TRs by competing with RXR on DNA binding and that the TR is also able to inhibit the transcriptional activity exerted by PPAR. The mechanism of this inhibition is not clear. The first objective of this study was to investigate the molecular mechanism of the effect exerted by the dominant negative mutant TR β -F451X in genes negatively regulated by T3 and the importance of dimerization in this phenomenon. This mutation is found in patients with RTH who have severe mental retardation, developmental disorder of speech and hyperactivity. Our results showed that the mutant F451X TR β exerts dominant negative effect on native TRH promoter and AP-1. We observed that the TR β 1 wt and the mutants G345R and F451X, another mutant of the syndrome, if heterodimerize with RXR on HRT and this dimerization appears to be important for the effect of dominant negative TRH is observed. This heterodimerization was not observed in AP-1, but is dominant negative, suggesting that another mechanism different from that heterodimerization is involved in the phenomenon. The second objective was to investigate the presence of dominant negative TR β 1 wt TR β 1 F451X and in genes regulated by receptor activated by peroxisome proliferators (PPAR). We observed that wt TR β 1 in proportion 1:5 and 1:1 F451X mutant inhibited the action of PPAR γ and that dimerization and interaction with corepressors seems important for the occurrence of the dominant negative effect on PPAR in DR1.

Key words: Syndrome of resistance to thyroid hormone; nuclear receptors; dominant negative; thyroid hormone receptor; receptor activated by peroxisome proliferators.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. A superfamília dos RNs inclui 48 membros.....	23
Figura 02. Elementos responsivos ao TR (TREs): repetição direta (DR4), palíndromo invertido (F2 ou IP6) e palíndromo (Pal).....	24
Figura 03. Estrutura geral dos receptores nucleares, com a representação dos domínios funcionais.....	26
Figura 04. Estrutura linear representando os domínios funcionais dos receptores nucleares e suas funções.....	27
Figura 05. Domínio de ligação ao DNA de receptores nucelares.....	28
Figura 06. Representação em fitas do LBD do rTR β	30
Figura 07. Produtos protéicos dos genes do TR α e do TR β (THRA e THRB).....	31
Figura 08. Representação esquemática do mecanismo de ação do receptor do hormônio tireoideano.....	35
Figura 09. Regulação da expressão gênica do TR em um TRE positivo em três situações.....	37
Figura 10. Ilustração modelo das diferentes funções do SMRT no elemento positivo (pTRE) e negativo (nTRE).....	38
Figura 11. Heterodímeros PPAR-RXR se ligam a sequências específicas de DNA no promotor de genes-alvo.....	40
Figura 12. Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide.....	45
Figura 13. Representação esquemática para o entendimento dos diferentes fenótipos encontrados na Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoideano (SRHT).....	47
Figura 14. Localização das mutações no gene do TR β associados com a SRHT....	48
Figura 15. Estrutura cristalográfica do LBD do TR β wt mostrando os aminoácidos da superfície de ligação ao N-CoR e o posicionamento da hélice 12 (H12).....	51
Figura 16. O mutante TR β_1 -F451X exerce efeito dominante negativo em TRE-F2.....	63
Figura 17. Repressão do TR β_1 wt e mutante na ausência do ligante em TRE-F2.....	64
Figura 18. O mutante TR β_1 -F451X exerce efeito dominante negativo em TRE-DR4.....	65

Figura 19. TR β_1 -F451X exerce efeito dominante negativo sobre TR β_1 wt em promotor TRH.....	67
Figura 20. Ativação do TR β_1 wt e mutante na ausência do ligante em TRH.....	67
Figura 21. TR β_1 -F451X exerce efeito dominante negativo em AP-1.....	69
Figura 22. Ativação do TR β_1 wt e mutante na ausência do ligante em AP-1.....	69
Figura 23. A dimerização pelo LBD é importante para se ter efeito dominante negativo em promotor TRH.....	71
Figura 24. Não há aparente contribuição da superfície de dimerização do DBD para que haja o efeito dominante negativo em promotor TRH.....	72
Figura 25. Efeito aditivo de mutações na superfície de dimerização do LBD e DBD na repressão em promotor TRH.....	73
Figura 26. Efeito dominante negativo em AP-1 é dependente da dimerização.....	74
Figura 27. A heterodimerização de TR ocorre em F2 e TRH, mas não em AP-1.....	75
Figura 28. TR β_1 wt não exerce dominância negativa no PPAR γ em DR1 na proporção 1:1.....	76
Figura 29. TR β_1 wt exerce dominância negativa no PPAR γ em DR1 na proporção 1:5.....	77
Figura 30. TR β_1 -F451X exerce dominância negativa no PPAR γ em DR1.....	78
Figura 31. TR β_1 -L422R/F451X não exerce dominância negativa no PPAR γ em DR1.....	79
Figura 32. O mutante TR β_1 -I280R/F451X não exerce dominância negativa no PPAR γ em DR1.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AF-1- Função de ativação 1

AF-2- Função de ativação 2

AP-1- promotor da collagenase humana

β -Gal- Beta-galactosidase

CoA- Coativador

CoR- Correpessor

DBD- Domínio de ligação ao DNA

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

EMSA- Ensaio de alteração da mobilidade eletroforética (gel *shift*)

F2 ou IP-6- Elemento responsivo de TR cuja sequência AGGTCA apresenta-se em formato de palíndromo invertido espaçado por 6 nucleotídeos.

F451X- Mutação do TR em que os aminoácidos a partir da fenilalanina na posição 451 estão deletados.

G345R- Mutação do TR onde a glicina na posição 345 foi substituída pela arginina

GH- Hormônio do crescimento

H1 a H12 - Representa as 12 alfa hélices do receptor

HPT- Eixo Hipotálamo-Pituitária-Hipófise

HRE- Sequência de nucleotídeos que contém o elemento responsivo ao hormônio

HT- Hormônio tireoideano

hTR β 1- Isoforma beta 1 do receptor do hormônio tireoideano humano

IC₅₀- Concentração onde se obtém metade da inibição máxima

L422R- Mutação do TR onde a leucina 422 foi substituída pela arginina

LBD- Domínio de ligação ao ligante

Luc- Gene que codifica a luciferase

MTB- Maquinaria de transcrição basal

NCoR- Correpessor de receptores nucleares

nTRE- Elemento responsivo negativo

PPAR- Receptor ativado por proliferadores peroxissomais

PPARE- Elemento responsivo ao receptor ativado por proliferadores peroxissomais composto por duas repetições diretas da sequência consenso AGGTCA espaçado por 1 nucleotídeo

PPAR γ 1, 2 ou 3- Isoformas gama 1, 2 ou 3 do receptor ativado por proliferadores peroxissomais,

pTRE- Elemento responsivo positivo ao hormônio tireoideano

RHT- Resistência ao hormônio tireoideano

RN- Receptor nuclear

RNA- Ácido ribonucleico

Rosi- Rosiglitazona

RXR- Receptor do ácido retinoide X

SMRT- Mediador do silenciamento do receptor do ácido retinóico e do receptor do hormônio tireoideano

SRHT - Síndrome de Resistência aos Hormônios Tireoideanos

T3- 3,5,3'-tri-iodotironina

T4- 3,5,3',5'-tetra-iodo-L-tironina

TR - Receptor do hormônio tireoideano

TR wt – *wild type*, receptor do hormônio tireoideano nativo sem mutações, selvagem

TRE- Elemento responsivo ao hormônio tireoideano

TREPAL- Seqüência correspondente a um palíndromo da seqüência AGGTCA

TRH- Hormônio liberador de tireotropina

TSH- Hormônio estimulador da tireóide

TZD- Tiazolidinadiona

SUMÁRIO

1. Introdução	18
2. Apresentação do tema e justificativa	18
3. Objetivos	21
3.1 Objetivo geral.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4. Revisão de Literatura	22
4.1 Receptores Nucleares.....	22
4.1.1 Classificação dos receptores.....	22
4.1.2 Domínios funcionais.....	26
4.2 Receptor de Hormônio Tireoideano (TR).....	30
4.2.1 O hormônio tireoideano.....	32
4.2.2 Mecanismo molecular de ação do hormônio tireoideano.....	33
4.3 Regulação da transcrição gênica pelos TRs.....	35
4.3.1 Genes regulados positivamente pelo T ₃	36
4.3.2 Genes regulados negativamente pelo T ₃	37
4.4 Receptor ativado por peroxissoma (PPAR).....	39
4.4.1 Isoformas.....	40
4.4.1.1 PPAR alfa.....	40
4.4.1.2 PPAR beta/delta.....	41
4.4.1.3 PPAR gama.....	42
4.5 Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoideano.....	44
4.5.1 Base molecular da SRHT.....	46
4.5.2 Dominância negativa.....	48
4.6 TR e PPAR.....	52
5. Materiais e Métodos	53
5.1 Plasmídeos utilizados.....	53
5.2 Purificação de plasmídeos.....	54
5.3 Cultura de Células.....	54
5.4 Transfecção por eletroporação e ensaio de gene repórter.....	55
5.4.1 Transfecção por eletroporação.....	55
5.4.2 Tratamento – curvas dose resposta.....	56
5.4.3 Detecção de atividade de luciferase.....	57

5.4.4 Detecção de atividade β -Galactosidase.....	57
5.4.5 Cálculo da Taxa de Ativação e Repressão.....	58
5.5 Ensaio de alteração de mobilidade em gel (<i>electrophoretic mobility shift assay, EMSA ou Gel Shift</i>).....	59
5.5.1 Tradução <i>in vitro</i> de TRs.....	59
5.5.2 Eletroforese.....	60
6. Resultados	62
6.1 Efeito Dominante Negativo de mutante de SRHT sobre TR β_1 nativo em Elemento Responsivo Regulado Positivamente por T ₃	62
6.1.1 TR β_1 -F451X em Elemento Responsivo F2/IP6.....	62
6.1.2 TR β_1 -F451X em Elemento Responsivo DR4.....	64
6.2 Efeito Dominante Negativo do mutante F451X de SRHT sobre TR β_1 nativo em Elemento Responsivo Regulado Negativamente por T ₃	65
6.2.1 TR β_1 -F451X em promotor de TRH.....	66
6.2.2 TR β_1 -F451X em promotor de AP-1.....	68
6.3 Importâncias da dimerização para a dominância negativa.....	70
6.3.1 Efeito de mutantes de dimerização no promotor TRH.....	70
6.3.2 Efeito de mutantes de dimerização no promotor AP-1.....	73
6.3.3 Dimerização em F2, TRH e AP-1.....	75
6.4 Influência do mutante F451X da SRHT em genes regulados por PPAR gama.....	76
7. Discussão	81
8. Conclusão	86
9. Referências	87

1. INTRODUÇÃO

2. APRESENTAÇÃO DO TEMA E JUSTIFICATIVA

A Síndrome de Resistência aos Hormônios Tireoideanos (SRHT) é uma patologia caracterizada pela resposta reduzida dos tecidos-alvo ao hormônio tireoideano (HT). Refetoff e cols., em 1967, foram os primeiros a descrever essa síndrome em dois indivíduos que apresentavam bócio, surdo-mudez e atraso na idade óssea. Os níveis séricos de HT eram elevados, contrastando com os sintomas do hipotireoidismo (1,2,3). Nos indivíduos que apresentavam a SRHT não foi encontrado defeito na síntese do hormônio tireoideano, e sim um quadro bioquímico, que se caracterizava por níveis elevados de T_3 e T_4 na presença do hormônio estimulador da tireóide (TSH) elevado ou inapropriadamente normal, devido a uma falha na supressão da secreção do TSH, característico da sensibilidade reduzida (3,4).

Após 20 anos do primeiro relato, a base molecular da SRHT foi elucidada e se deve, em grande parte, a anormalidades na isoforma β do receptor de hormônio tireoideano (TR). Os TRs são membros da superfamília de receptores nucleares e medeiam as ações do hormônio tireoideano. Os TRs agem como fatores de transcrição dependentes de ligante e aumentam ou diminuem a expressão dos genes alvo, dependendo dos elementos responsivos (RE) localizados nos promotores dos genes permitindo que sejam regulados de forma positiva ou negativa, respectivamente (5). Os TRs se ligam a seqüências específicas de DNA, denominadas elementos responsivos ao HT (TREs), que estão localizadas próximo do sítio onde se inicia a transcrição dos genes regulados pelo HT na forma de monômeros, homodímeros (TR/TR), e heterodímeros com o receptor X de retinóides (TR/RXR). (6).

Na maioria dos indivíduos com SRHT, mutações em um alelo do gene do TR β resultam na expressão de um TR mutante que inibe a função do TR nativo (wt), fenômeno conhecido como dominância negativa. Em genes regulados positivamente pelo T_3 , o mecanismo molecular da dominância negativa está bem estudado e envolve a dimerização do TR mutado com o TRwt ou com RXR sobre o DNA.

Porém, o conhecimento sobre como isso ocorre em genes cuja transcrição é reprimida por T_3 ainda necessita ser investigado.

Resultados prévios, realizados no laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade de Brasília, em promotores de hormônio estimulador da tireoide (TSH), hormônio liberador da tireotropina (TRH) e colagenase (AP-1) que são regulados negativamente pelo T_3 , sugerem que a dimerização está envolvida na dominância negativa do TR mutante da SRHT quando este regula a transcrição no promotor do TSH. Por outro lado, no promotor do TRH e no sítio AP-1, o efeito dominante negativo não foi observado. Esses resultados contrastam com os dados da literatura, pois acreditava-se que todos os genes regulados pelo T_3 sofreriam a dominância negativa (9).

De forma semelhante aos TRs, os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) também se heterodimerizam com o RXR para se ligar ao DNA. A família do PPAR compõe-se de três importantes isoformas, PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ , que estão envolvidas no controle do crescimento, diferenciação e proliferação celular, além de ter um papel no controle do metabolismo de carboidratos e lipídeos. Nos últimos anos, novas funções foram atribuídas às isoformas do PPAR, sendo implicadas em doenças metabólicas como dislipidemia, aterosclerose, *diabetes mellitus* e câncer (12,13,15,16). Estudos indicam que os PPARs são capazes de dimerizar com o TR e inibir seletivamente a atividade transcricional exercida pelos TRs por competição com o RXR na ligação ao DNA (11) e que mutantes de TR descritos na SRHT se heterodimerizam com PPAR γ *in vitro* inibindo a ligação entre PPAR γ ao seu elemento responsivo, de forma independente de T_3 e RXR (11,16), exercendo desta forma um efeito dominante negativo em PPAR. Um exemplo do efeito dominante negativo de mutante de SRHT é o mutante Delta337T que altera a sinalização do PPAR α no coração em tecido cardíaco no qual o TR e o PPAR α regulam independentemente o metabolismo cardíaco (17).

Baseados nesses resultados preliminares referentes à dominância negativa em promotores reprimidos por T_3 , realizamos experimentos de interação *in vitro* do TR com os promotores negativos, para verificarmos a formação de monômeros, homodímeros ou heterodímeros nesses promotores. Para avaliarmos o papel da dimerização na dominância negativa nos promotores de TRH e AP-1, utilizamos mutantes que atrapalham a dimerização do TR tanto no domínio de ligação ao DNA

(DBD) como no domínio de ligação ao ligante (LBD), previamente relatados por outros autores (10). Na segunda parte deste trabalho, visamos verificar a interferência de TR mutante da SRHT no PPAR em elemento responsivo regulado positivamente por este. Baseamo-nos em relatos de estudos que demonstraram que o TR β mutado pode reprimir a atividade transcricional do PPAR γ (11) e que o PPAR pode se dimerizar com o TR.

Na SRHT não ocorre o *feedback* negativo do T₃ em TSH e TRH e a presença de um alelo mutado do receptor do TR β é suficiente para interferir sobre o alelo normal e se observar esse efeito. O mecanismo molecular de como essa dominância negativa ocorre ainda não está bem esclarecido e precisa ser estudado para que no futuro novos medicamentos possam corrigir esse efeito. O PPAR apresenta características semelhantes ao TR, como heterodimerização com o RXR e ligação a elementos responsivos positivos organizados em repetições diretas. Estudos relatam que o TR pode interferir na ação do PPAR e vice-versa. O mecanismo molecular também não está bem esclarecido e as implicações dessas interferências em aspectos clínicos ainda não foram correlacionados.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o mecanismo molecular do efeito dominante negativo exercido pelos TR β mutantes encontrados em pacientes na SRHT, nos genes regulados negativamente pelo T₃ e nos genes regulados pelo PPAR.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo 1:

Identificar se o mutante TR β ₁ F451X exerce dominância negativa sob TRs nativos em genes regulados negativamente por T₃ (sítio AP-1 do promotor da collagenase e no promotor do gene TRH); e

Identificar a interferência funcional dos mutantes que atrapalham a dimerização em LBD (3XLBD), em DBD (4XDBD) ou em ambos os domínios LBD E DBD (3XLBD/4XDBD) em relação ao TR β ₁ wt no complexo AP-1 e no promotor do gene TRH.

Objetivo 2:

Investigar a presença da dominância negativa em genes regulados positivamente pelo PPAR γ .

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 RECEPTORES NUCLEARES

4.1.1 Classificação dos receptores nucleares

Os receptores nucleares (RNs) são fatores de transcrição regulados por ligantes que variam de hormônios lipofílicos, vitaminas, dieta rica em lipídeos e outros sinais intracelulares (18). Em virtude da atividade dependente de ligante, os receptores nucleares servem como uma interface entre o ambiente celular e todo o corpo e o nosso genoma (12), e se ligam diretamente em sequências específicas no DNA, os elementos responsivos ao hormônio (HREs) (19). Os HREs geralmente estão localizados na região promotora dos genes alvos e são específicos para cada tipo de receptor. Um HRE típico possui duas cópias imperfeitas de um hexanucleotídeo AGGTCA ou suas variantes, separadas por uma lacuna de nucleotídeos distintos. Essas cópias podem estar arranjadas em diferentes orientações, com espaçamento e sequências flanqueadoras diferentes e os receptores nucleares ao se associarem aos HREs podem formar monômeros, homodímeros ou heterodímeros (6,20).

Os RNs são classificados em três subgrupos baseados em seus ligantes fisiológicos e potenciais funções. A primeira classe é a de receptores endócrinos, a segunda, de receptores órfãos adotados e a terceira de receptores órfãos verdadeiros (Figura 01).



Figura 01. **A superfamília dos RNs inclui 48 membros.** Os ligantes naturais estão descritos à direita. Os receptores endócrinos (em rosa, os receptores esteroidais que atuam como homodímeros; e em lilás, os receptores que se heterodimerizam com o RXR) e os receptores órfãos adotados sensores de lipídeos (em amarelo) que têm sua importância fisiológica estabelecida. A função fisiológica dos receptores órfãos adotados enigmáticos (em verde) e dos receptores órfãos verdadeiros (em azul) ainda não foi definida. Adaptado de Sonoda, 2008 (20).

A primeira classe de receptores é a de receptores endócrinos que atuam como receptores com alta afinidade a hormônios e vitaminas e podem ser subdivididos em receptores heterodiméricos e os receptores para hormônios esteroidais. Entre os receptores heterodiméricos está o receptor do hormônio tireoideano, do ácido retinoico (retinoic acid receptor, RAR) e da vitamina D (vitamin D receptor, VDR) e são essenciais para o controle da homeostase e do sistema endócrino. Na ausência do hormônio (aporeceptores), estão localizados predominantemente no núcleo celular, em solução ou ligados ao HRE associados a outro receptor nuclear, o receptor retinoide X (RXR) (6,20,21). Os aporeceptores, comumente ativos, podem estimular ou reprimir a expressão de genes com os quais estão associados. Geralmente os genes alvos estimulados pela ação do hormônio são reprimidos pelo aporeceptor e os genes alvos reprimidos pela ação do hormônio são estimulados pelo aporeceptor.

Os receptores heterodiméricos ligam-se preferencialmente a repetições diretas (Direct Repeats, DRs) do hexâmero AGGTCA (AGGTCA(n)AGGTCA). A especificidade da ligação é determinada pelo número de bases (n) que separa cada

hexâmero. A DR do TR é a DR-4, pois está espaçada por 4 nucleotídeos quaisquer. Além das DRs, existem elementos responsivos na forma de palíndromos não espaçados (AGGTCATGACCT), o TREpal (22) ou palíndromos invertidos e espaçados por 6 bases (TGACCT(n6)AGGTCA), o F2 (23). Aproximadamente 30 elementos responsivos ao TR (TREs) naturais foram identificados, sendo que a maioria é DR-4, seguido pelo F2 e mais raramente o TREpal (24). DR-4 é descrito como o principal sítio para a interação do heterodímero TR-RXR, enquanto os homodímeros TR-TR aparentemente se ligam de forma mais eficiente ao palíndromo invertido, F2 (25) (Figura 02).

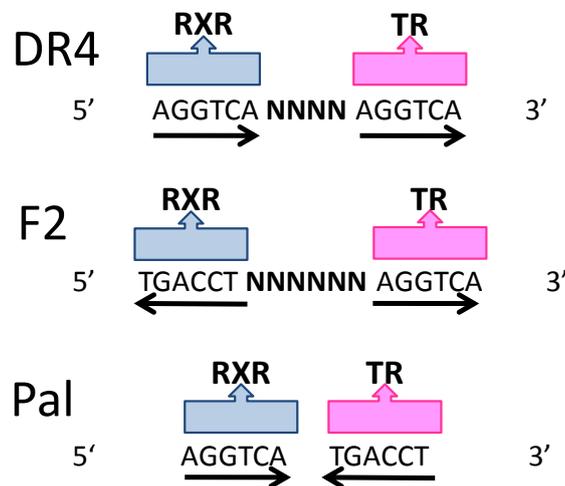


Figura 02. **Elementos responsivos ao TR (TREs): repetição direta (DR4), palíndromo invertido (F2 ou IP6) e palíndromo (Pal).** O N indica o número de nucleotídeos entre os hexâmeros. Adaptado de Barra, 2004 (26).

Quando o receptor dessa subclasse se liga ao hormônio (holoreceptor), observa-se a formação de heterodímeros com o RXR e a dissociação das proteínas corressoras e a associação com as coativadoras que medeiam a estimulação ou repressão dos genes alvos (27,28).

Os receptores para hormônios esteroidais incluem os receptores dos esteróides glicocorticoides (GRs), mineralocorticoides (MRs), androgênios (ARs), estrogênio (ER) e progesterona (PR). Na ausência do ligante, esses receptores estão associados em um complexo com proteínas de choque térmico (*heat shock*

proteins - HSPs) no citoplasma e, em alguns casos, no núcleo da célula. A ligação do hormônio dissocia os receptores desse complexo e induz a formação de homodímeros que se dirigem ao núcleo onde se ligam aos seus respectivos HREs, geralmente um palíndromo, espaçado por 3 bases (AGAACA(n3)TGTTCT), regulando a transcrição. Uma vez ligados diretamente ou indiretamente ao DNA, o complexo hormônio-receptor estimula ou reprime a transcrição (27,28,29).

A segunda classe de receptores compreende os receptores órfãos adotados, que foram identificados originariamente baseados na homologia de sua sequência com os receptores endócrinos. Quando esses receptores foram descobertos não se conheciam os seus ligantes, por isso foram denominados de receptores órfãos. Posteriormente, com a identificação dos ligantes endógenos para alguns desses receptores, eles foram “de-orfanizados” e passaram a ser chamados de receptores órfãos adotados. A identificação de um derivado da vitamina A, o ácido 9-cis retinoico, como um ligante de alta afinidade pelo RXR representou a primeira adoção verdadeira de um receptor órfão (30). Essa classe atua como heterodímeros com o RXR e alguns desses heterodímeros podem ser ativados por ligantes do RXR (permissivo), embora outros não possam (não permissivos) (31). São exemplos de receptores órfãos adotados os receptores ativados por proliferadores peroxissomais, (PPARs α , β e γ), o receptor do derivado do ácido retinóico, ácido 9-cis-retinoico (RXR), o receptor X hepático (LXR), receptor X do pregnano (PXR), receptor X farsenoide (FXR) e os receptores órfãos enigmáticos. Os receptores órfãos enigmáticos são receptores que o ligante já foi identificado, mas o papel de sua regulação dependente de ligantes para os processos fisiológicos não foi definido. Estão incluídos os receptores relacionados ao estrogênio β e γ (ERR β e γ), receptor órfão relacionado ao retinoide α e β (ROR α e β), receptor constitutivo de androstenona (CAR), fator esteroideogênico 1 (SF-1), o receptor hepático homólogo 1 (LRH-1) e o fator nuclear hepatocitário 4 α (HNF4 α) (20).

A terceira classe engloba os receptores órfãos verdadeiros. Nessa classe os ligantes naturais ou sintéticos ainda não foram identificados e é possível que os receptores não sejam regulados por eles, mas sim, por modificações ou combinações covalentes em sua estrutura, pelo nível de sua própria expressão ou ainda pela disponibilidade de coativadores (20).

4.1.2 Domínios Funcionais

Os RNs são definidos por uma organização estrutural comum, caracterizada por domínios funcionais, entre elas a região amino-terminal (domínio A/B), o domínio de ligação ao DNA (DBD, domínio C), a região de dobradiça (*hinge*, domínio D), a região carboxi-terminal ou domínio de ligação ao ligante (LBD, domínio E) e, em alguns RNs, o domínio F (32) (Figura 03).

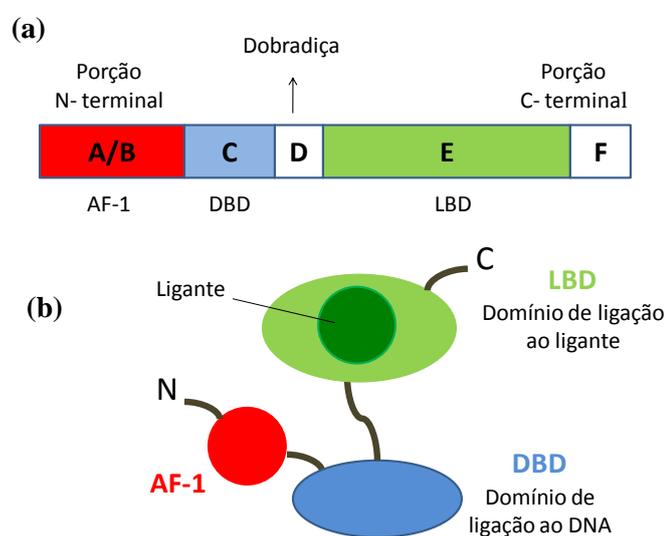


Figura 03. **Estrutura geral dos receptores nucleares, com a representação dos domínios funcionais.** (a) Estrutura primária, com a representação da região amino-terminal (domínio A/B, em que se encontra o domínio função de ativação 1 ou AF-1, implicado na transativação independente do ligante), domínio de ligação ao DNA (DBD, domínio C), região de dobradiça (*hinge*, domínio D), região carboxi-terminal ou domínio de ligação ao ligante (LBD, domínio E), e domínio F. (b) Estrutura secundária, com a representação das regiões amino (N) e carboxi-terminais (C), AF-1, DBD e LBD. Adaptado de Glass, 2006 (33).

Os domínios funcionais de todos os TRs apresentam uma organização semelhante da encontrada nos receptores nucleares: domínio amino-terminal (domínio A/B), domínio central de ligação ao DNA (DBD) que contém dois “dedos de zinco”, região de dobradiça (*Hinge*) contendo o sinal de localização celular, domínio de ligação ao ligante ou hormônio (LBD) e região carboxi-terminal (Figura 04). Esses

domínios e regiões apresentam múltiplas funções e os seus respectivos nomes representam as funções atribuídas inicialmente a eles (24).

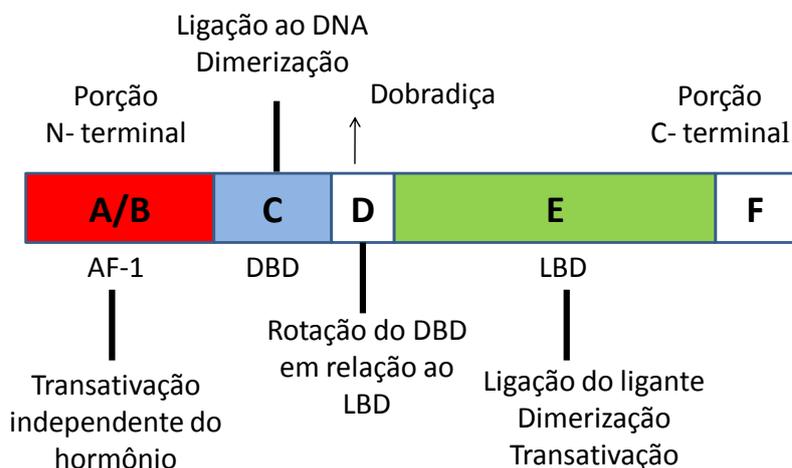


Figura 04. **Estrutura linear representando os domínios funcionais dos receptores nucleares e suas funções.** A/B, domínio amino-terminal; DBD/C, domínio de ligação ao DNA, hinge/D, região de dobradiça; LBD/E, domínio de ligação ao ligante; e F, região carboxi-terminal. Adaptado de Barra, 2004 e Glass, 2006 (26,33).

Domínio amino-terminal (domínio A/B): apresenta função de ativação transcricional independente do ligante, conhecida como função de ativação 1 (AF-1) que pode operar de forma autônoma. Essa região tem tamanho variável e sequências diferentes entre as isoformas do TR além de apresentarem capacidade de interação com coativadores, como o fator transcricional IIB. Essa capacidade de interação com coativadores na ausência do ligante pode contribuir para uma ativação independente do ligante em genes alvo regulados positivamente. Estudos demonstraram também que esse domínio pode interagir com o mediador do silenciamento do receptor do ácido retinoico e do receptor do hormônio tireoideano (SMRT), mas podem bloquear o recrutamento de outros componentes do complexo correpressor (24,34,35).

Domínio de ligação ao DNA (DBD): a estrutura é muito conservada em toda superfamília e sua principal função é a ligação ao DNA. Ela apresenta uma

sequência específica de reconhecimento dos HREs entre os diferentes membros da superfamília dos receptores nucleares além de ser uma região responsável pela dimerização do receptor. O DBD é localizado na porção central do TR e tem dois “dedos de zinco” independentes, cada um composto de quatro resíduos de cisteína coordenados por um íon de zinco. A integridade de cada dedo de zinco é crítica, pois substituições de resíduos de cisteína ou deleções comprometem a ligação do receptor ao DNA e, portanto, afeta a atividade transcricional. Os dois dedos de zinco são separados por uma sequência de 15 a 17 aminoácidos. Três aminoácidos da base do primeiro dedo representam a região chamada de caixa P (P-box,) e são responsáveis pelo reconhecimento do elemento responsivo específico para cada receptor, enquanto que uma sequência de cinco aminoácidos localizada entre a primeira e a segunda cisteína na base do segundo dedo é denominada de caixa D (D-box), que é importante para a dimerização do receptor (36,37,38). P-box é assim chamada por estar em posição proximal do domínio, já a D-box está em posição distal (Figura 05) (6).

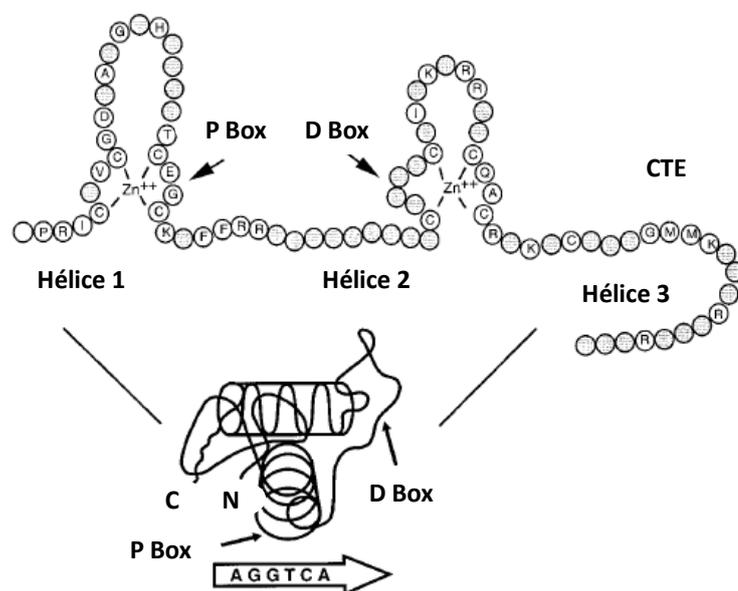


Figura 05. **Domínio de ligação ao DNA de receptores nucleares.** Diagrama dos dois dedos de zinco e da extensão carboxi-terminal (CTE). Cada dedo de zinco é composto por quatro resíduos de cisteína coordenados por um íon de zinco. A hélice 1 contém a região P Box envolvida na discriminação do elemento responsivo. Aminoácidos no segundo dedo de zinco, região D Box, formam a interface de dimerização. Adaptado de Aranda, 2001 (39).

Região de dobradiça (*Hinge*): essa região não é muito bem conservada entre os diferentes receptores e age como uma dobradiça conectando o DBD ao LBD, permitindo assim o movimento de rotação do DBD e possibilitando que o TR se ligue nos TREs com diferentes orientações. A *Hinge*, em muitos casos, protege o sinal de localização nuclear, além de conter resíduos cujas mutações podem abolir a interação do receptor nuclear com os correpressores (39,40).

Domínio de ligação ao ligante ou hormônio (LBD): esse domínio está localizado na região carboxi-terminal e é menos conservado que o DBD. Possui várias funções como homo e heterodimerização do receptor, ligação ao ligante ou hormônio, interação com as proteínas de choque térmico, atividade transcricional dependente de ligante, interação com coativadores e correpressores e a repressão transcricional revertida pelo hormônio. O LBD possui um região denominada função de ativação 2 (AF-2), que é responsável pela ativação transcricional dependente de ligante. Após a ligação do ligante, AF-2 passa a se interagir com coativadores permitindo a formação do complexo protéico envolvido na ativação da transcrição (41).

A estrutura cristalográfica do LBD de muitos receptores nucleares já foi determinada, inclusive a estrutura do LBD do TR ligado ao hormônio (Figura 06) (42,43). O LBD do TR é formado por 12 α -hélices conservadas e 4 folhas β -pregueadas organizadas em três camadas. Após a ligação do hormônio tireoideano, ocorre o dobramento da hélice 12 sobre as hélices 3, 4 e 5 criando uma superfície hidrofóbica que favorece a interação com coativadores e impede a ligação com correpressores (44).

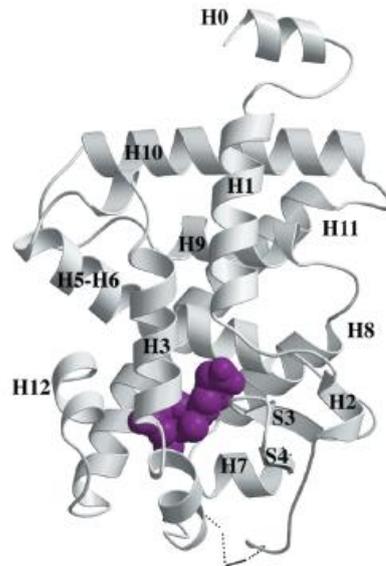


Figura 06. **Representação em fitas do LBD do rTR β** . As 12 α -hélices, numeradas de 1 a 12 (H1 a H12), e o ligante (em roxo) encontra-se dentro do bolso de ligação (*binding pocket*) no LBD. Adaptado de Wagner et al, 1995 (45).

4.2 RECEPTOR DO HORMÔNIO TIREOIDEANO

Os TRs agem como fatores de transcrição dependentes do ligante que aumentam ou diminuem a expressão dos genes alvo. Para aumentar a expressão de genes alvo os promotores dos genes devem conter elementos regulados de forma positiva e para diminuir a expressão de genes alvo os promotores dos genes devem conter elementos regulados de forma negativa (5,7,46).

Existem dois genes que codificam os TRs, TR α (gene *THRA*) e TR β (gene *THRB*), localizados nos cromossomos 17 e 3, respectivamente. Os TRs são homólogos celulares do oncogene viral erb-A. Cada gene produz por *splicing* alternativo ou utilização de promotores distintos, várias isoformas de TRs: TR α_1 , TR α_2 , TR α_3 , TR $\Delta\alpha_1$, TR $\Delta\alpha_2$, TR β_1 , TR β_2 , TR β_3 e TR $\Delta\beta_3$. Dessa forma, as diferentes isoformas do TR são α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e β_3 , sendo que somente α_1 , β_1 , β_2 e β_3 se ligam ao hormônio. As isoformas α_2 e α_3 diferem da α_1 em sua região carboxi-terminal, enquanto TR $\Delta\alpha_1$ e TR $\Delta\alpha_2$ são versões truncadas do TR α_1 e TR α_2 , respectivamente. Inícios alternativos no RNA mensageiro (messenger RNA, mRNA) do TR α_1

fornece outras isoformas e uma delas é o p43. Essa isoforma parece regular a transcrição gênica mitocondrial por ser um receptor presente nas mitocôndrias (26,44). A isoforma α_2 , por não se ligar ao T_3 pode inibir a transcrição mediada por $TR\alpha_1$ ou $TR\beta_1$ e uma possibilidade dessa inibição pode ser devida a uma competição com a ligação aos TREs e com a formação de heterodímeros com RXR (28). As isoformas β_1 , β_2 e β_3 diferem em sua região amino-terminal (47) (Figura 07).

TR α (THRA)		Receptor funcional	Ligaçã ao T3	Ligaçã ao DNA	Formação de Heterodímero	Ação
TR α -1		+	+	+	+	Normal
TR $\Delta\alpha$ -1		-	-	-	+	Antagonismo dominante negativo
TR α -2		-	-	+	+/-	Antagonismo fraco
TR $\Delta\alpha$ -2		-	-	-	+	Antagonismo dominante negativo
Mitocondrial						
p43		+	+	+	+	Normal
p28		-	+	-	?	Normal
TR β (THRB)						
TR β -1		+	+	+	+	Normal
TR β -2		+	+	+	+	Normal
TR β -3		+	+	+	+	Normal
TR $\Delta\beta$ -3		-	+	-	+	Antagonismo dominante negativo

Figura 07. **Produtos protéicos dos genes do TR α e do TR β (THRA e THRB).** As cores representam regiões idênticas ou divergentes resultante do *splicing* alternativo do mRNA. O DBD está representado pelas regiões em preto. Adaptado de Basset, 2003 (48).

A expressão dos mRNAs das isoformas dos TRs variam com o desenvolvimento e com a diferenciação celular e são expressos de forma específica nos diversos tecidos em humanos. Ainda que em níveis diferentes, os mRNAs do $TR\alpha_1$, $TR\alpha_2$ e $TR\beta_1$ são expressos em quase todos os tecidos: o $TR\alpha_1$ é abundante nos músculos esqueléticos, gordura marrom e coração, o $TR\alpha_2$ é abundante no cérebro e o $TR\beta_1$ está expresso em grande quantidade no fígado, rim e cérebro. O $TR\beta_2$ é expresso principalmente na glândula pituitária e em outras áreas do cérebro e em ratos, o $TR\beta_3$ no fígado, rim e pulmão, enquanto que o $TR\Delta\beta_3$ no músculo

esquelético, coração, baço e cérebro (47,49,50). O $TR\Delta\alpha_1$ e o $TR\Delta\alpha_2$ são encontrados principalmente no epitélio do intestino delgado, pulmão e durante os estágios precoces do desenvolvimento (8,51).

4.2.1 O Hormônio Tireoideano

Os hormônios tireoideanos (HTs) são conhecidos por apresentar papel importante em inúmeros processos biológicos, como desenvolvimento, diferenciação e crescimento celular (24). São essenciais desde o período da embriogênese e maturação fetal dos vertebrados até a vida adulta (54). Seus efeitos afetam o sistema cardiovascular, pulmonar, neuromuscular, o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos e a regulação da temperatura corporal (53). Além disso, participam da síntese e da degradação de muitos fatores de crescimento e hormônios, o que resulta em outros efeitos secundários (19).

Os HTs são produzidos e secretados pela glândula tireóide. A principal forma secretada é a 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (tiroxina ou T_4) e uma menor quantidade é secretada como 3,5,3'-triiodotironina (T_3), a forma ativa do hormônio. O total plasmático de T_4 é cerca de 45 vezes maior que o de T_3 (90nM e 2nM, respectivamente) (24). A principal fonte de produção de T_3 ocorre através da conversão de T_4 em T_3 por meio da 5' desiodação de T_4 nos tecidos periféricos promovidos por enzimas denominadas desiodases (26). Três tipos de desiodases (D1-3) estão envolvidas na conversão do hormônio tireoideano e mutações nessas enzimas podem explicar alguns mecanismos de resistência ao hormônio tireoideano (3,54,55).

Por apresentarem uma alta ligação às proteínas plasmáticas, apenas uma pequena quantidade de T_3 e T_4 secretado encontra-se livre no sangue. A maior quantidade destes que está ligada a essas proteínas assegura uma distribuição regular do hormônio nos tecidos alvos. A entrada e a saída do hormônio nas células ocorrem principalmente por meio de transportadores específicos e uma menor parcela, por difusão passiva (56).

O mecanismo de ação dos HTs começa no núcleo celular no qual participam receptores nucleares aos quais o hormônio se ligará. Esses receptores específicos são conhecidos como receptores do hormônio tireoideano (TRs) que, uma vez ativados pela ligação ao hormônio, podem promover na célula a resposta à ação hormonal. Esse mecanismo é conhecido como mecanismo clássico ou genômico, ou seja, a maioria dos efeitos do HT ocorre via regulação transcricional de genes regulados pelo TR α ou TR β . Entretanto, existem evidências de que os HTs podem exercer alguns de seus efeitos via mecanismos não genômicos, ou seja, que ocorrem em frações de segundos e não são inibidos pela adição da cicloheximida, substância que bloqueia a síntese protéica. Por essa via, os HTs ativam a calmodulina, a captação de glicose, as cinases e a modulação do transporte de cálcio. Esse efeito pode estar localizado na membrana plasmática ou na mitocôndria (57,58). Demonstrou-se que o T₄, de uma forma mais intensa que o T₃, ativa a cascata de sinalização da MAP cinase (*mitogen-activated protein kinase*), que por sua vez fosforila o TR em resíduos de serina localizados no DBD (59).

O eixo hipotálamo-pituitária/hipófise-tireoide (eixo HPT), é fundamental para a regulação da síntese e secreção dos hormônios tireoideanos por meio do mecanismo de *feedback* negativo. O hormônio liberador da tireotropina (TRH) é produzido no núcleo paraventricular do hipotálamo e estimula, no lobo anterior da hipófise, a liberação das subunidades α e β da tireotropina (hormônio estimulador da tireoide – TSH). Por sua vez, o TSH estimula a glândula tireóide a produzir os HTs. A expressão e produção de TRH e TSH são elevadas quando os níveis de HT são baixos e suprimidas quando os níveis de HT são altos. Ocorre, dessa forma, uma menor liberação de HT quando a produção de TRH e TSH está inibida pela presença de T₃ (60).

4.2.2 Mecanismo molecular de ação do hormônio tireoideano

A estrutura tridimensional do TR é modificada quando ocorre a ligação ao HT. Nos genes que são positivamente regulados pelo HT, os TRs não ligados suprimem a transcrição basal destes genes pela interação com fatores de transcrição basal como o TFIIV e TFIID, que são componentes chaves da maquinaria de transcrição

basal (MTB), podendo inibir a montagem do complexo de pré-iniciação da transcrição no promotor (61) e também pela interação com uma classe de proteínas nucleares correpressoras como o correpressor do receptor nuclear (NCoR) e o mediador do silenciador do receptor de HT e retinoides (SMRT). Foi demonstrado que os correpressores podem formar complexos com outros repressores como o SIN3 e complexo de desacetilase das histonas (HDAC). A desacetilação da histona tem um papel crucial na repressão basal pelo complexo correpressor/TR não ligado (5). Isto ocorre porque a estrutura da cromatina local se mantém de uma forma mais condensada e reprime a transcrição basal (62).

A ligação do T_3 no TR provoca uma alteração na conformação do TR, aumenta a ocupação do TRE pelos heterodímeros TR/RXR, libera o complexo correpressor e recruta coativadores como os coativadores do receptor de esteróide (SRC-1, SRC-2 e SRC-3), o complexo de proteína que interage com o receptor de vitamina D/proteína associada ao TR (complexo DRIP-TRAP), proteína 1 que interage com GR (GRIP), proteína associada ao cointegrador p300/CBP) e o fator associado a p300/CBP (pCAF), todos com atividade acetiltransferase (63). Essa atividade de acetiltransferase promove a acetilação das histonas, relaxando a cromatina o que facilita a interação deste complexo com os componentes da maquinaria de transcrição basal no promotor dos genes alvo (62). Além de acetilar as histonas, os coativadores são capazes de acetilar outras proteínas como o fator de transcrição p53 e fatores de transcrição basal como TFIIE-TFIIF e isso pode contribuir para um aumento da atividade transcricional (Figura 08) (60).

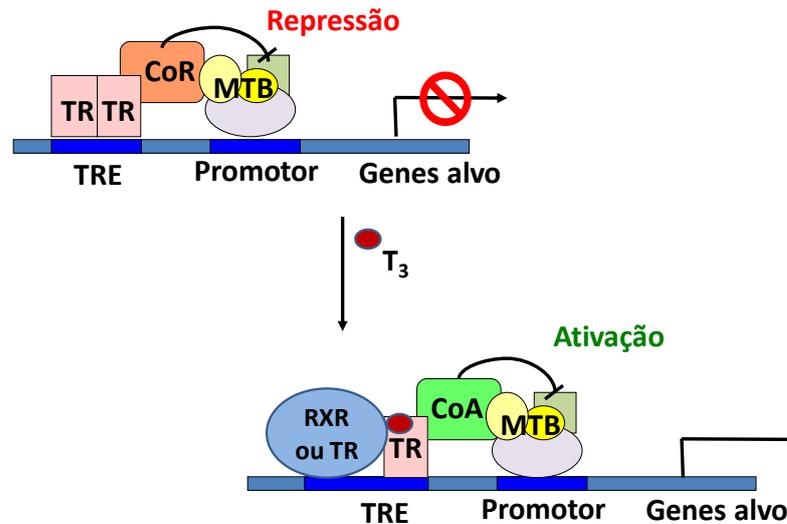


Figura 08. **Representação esquemática do mecanismo de ação do receptor do hormônio tireoideano.** Na ausência de T_3 , o TR encontra-se ligado ao TRE como homodímero ou heterodímero associado a proteínas correpressoras, que compactam a cromatina na região promotora e inibem a maquinaria de transcrição basal (MTB). A ligação do T_3 ao TR promove uma mudança conformacional, dissociando os homodímeros (TR/TR), favorecendo a associação de heterodímeros (TR/RXR). Essa mudança conformacional induz a liberação dos correpressores e o recrutamento de proteínas coativadoras ao TR, que relaxam a cromatina na região promotora e recrutam a MTB, ativando a transcrição de genes alvo. Adaptado de Barra et al, 2004 (26).

4.3 REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA PELOS TRS

O fato de que o TR altera os níveis de transcrição gênica, tanto na ausência como na presença de T_3 , tem importantes implicações na ação do hormônio tireoideano (51). Em contraste com os receptores esteroidais que são transcricionalmente inativos na ausência do ligante, os TRs sem ligantes podem se ligar aos TREs e modular a transcrição de genes alvos. Os TRs sem ligantes podem reprimir a transcrição basal em TREs regulados positivamente (64,65,66). Por outro lado, os TRs podem ativar a transcrição de genes regulados negativamente como a subunidade α do hormônio glicoprotéico, TSH e TRH (67,68).

A base molecular do mecanismo de retroalimentação negativa sobre a hipófise e o hipotálamo é a repressão clássica do TR nos genes do TSH (hipófise) (79) e do TRH (hipotálamo) (80).

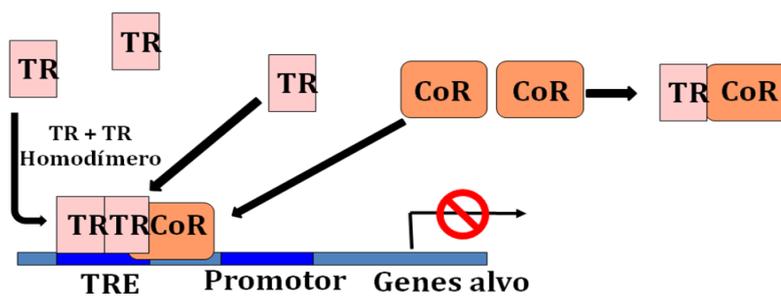
4.3.1 Genes Regulados positivamente pelo T_3

Aproximadamente 30 TREs naturais foram identificados. Dentre eles, os principais genes regulados positivamente são o DR4 e F2 (24). Para os genes regulados positivamente, quando o TR não está presente na célula ou não possui capacidade funcional, observa-se uma transcrição residual dos genes-alvo (figura 9.a). Quando o TR não está ligado ao HT, encontra-se ligado ao TRE reprimindo ou silenciando a transcrição basal, pois está associado às proteínas correpressoras (figura 9.b) (71). Já quando o TR está ligado ao HT ocorre uma dissociação do TR dos co-repressores e uma interação com proteínas coativadoras, ativando assim a expressão gênica (figura 9.c) (63).

(a) Gene responsivo ao HT na ausência do TR



(b) Efeito supressivo do TR não ligado



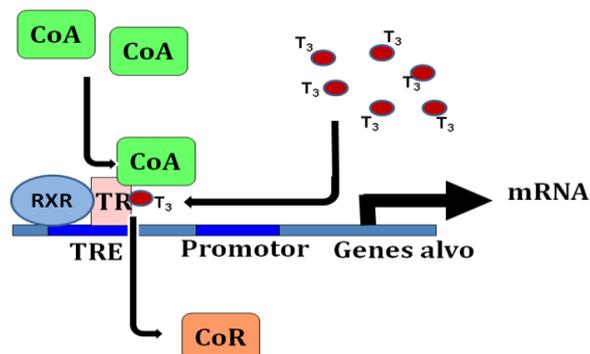
(c) Efeito positivo do complexo TR/RXR ativado pelo T_3 

Figura 09. **Regulação da expressão gênica do TR em um TRE positivo em três situações.** (a) Na ausência do TR há transcrição basal; (b) O TR ligado ao TRE como homodímero ou heterodímero com RXR na ausência do ligante se associa ao correpressor (CoR) e exerce um efeito supressivo nos genes positivamente regulados pelo TRE; (c) A formação do complexo TR/ T_3 resulta na dissociação do CoR, ocupação do TRE pelos heterodímeros TR/RXR e recrutamento do coativador (CoA) e consequente amplificação da transcrição dos genes positivamente regulados pelo TRE. Adaptado de Refetoff S e Weiss RE, 1997 (72).

4.3.2 Genes regulados negativamente pelo T_3

A transcrição regulada positivamente por T_3 está bem caracterizada. Entretanto, em genes regulados negativamente a atividade transcricional pode ser ativada na ausência do hormônio ou pela diminuição do hormônio (73). Esse mecanismo de regulação negativa ainda não foi muito bem elucidado.

Entre os genes regulados negativamente pelo T_3 estão o TRH e o TSH ($TSH\alpha$ e $TSH\beta$). O mecanismo de regulação desses genes tem sido extensivamente estudado, pois são pontos críticos para o controle do *feedback* do eixo HPT. Sugere-se que as regiões nesses genes que são responsivas ao T_3 estão localizadas na região proximal do promotor (68,74), entretanto a ligação do TR a esses genes é fraca e é incerto se a regulação do TR ocorre por ligação direta ao DNA ou por interação proteína-proteína com outros cofatores. Um exemplo é a inibição da atividade de AP-1 (um fator de transcrição heterodimérico composto por c-jun e c-fos) pelo TR (75).

As mudanças precisas na acetilação das histonas e as alterações resultantes na estrutura da cromatina que ocorrem durante a regulação negativa pelos HTs não estão bem caracterizadas. Enquanto correpressores aumentam a transcrição basal dos genes TRH e TSH quando o TR não está ligado ao T_3 (68,76), em alguns casos os coativadores podem, paradoxalmente, estar envolvidos na repressão de genes regulados negativamente pelo T_3 . Tal fato foi observado em camundongos *knock out* do gene que codifica o coativador SRC-1 e camundongos que apresentam uma mutação na hélice 12, E457A (essa mutação no TR impede a interação com coativadores), e apresentam uma falha na regulação do TSH (77,78). Da mesma forma, mutações no TR que impedem a ligação do TR com proteínas co-ativadoras p160 suprimem a repressão mediada pelo T_3 no promotor do TSH α , mas não impedem a ativação da transcrição mediada pelo TR na ausência do T_3 (79). No caso do SMRT, este pode atuar como correpressor nos pTREs (TREs regulados positivamente) e como coativador nos nTREs (TREs regulados negativamente). Possivelmente, o complexo formado nesses dois elementos responsivos poderia adotar diferentes conformações, resultando em diferentes contribuições no complexo de iniciação transcrricional. Observou-se anteriormente que a sensibilidade do complexo TR-SMRT às proteases é diferente e depende do elemento responsivo em que o complexo é formado (Figura 10) (80).

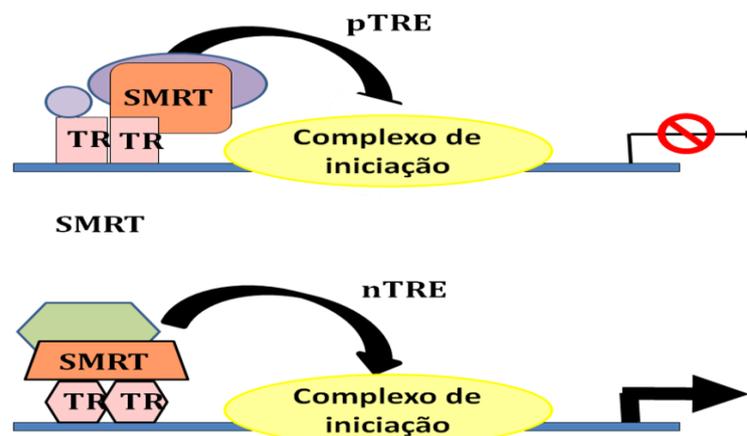


Figura 10. **Ilustração modelo das diferentes funções do SMRT no elemento positivo (pTRE) e negativo (nTRE).** Na ausência do ligante, o TR na forma de homodímero (como na figura) ou heterodímero com RXR se liga ao pTRE. O SMRT é recrutado juntamente com outros polipeptídeos inibindo a maquinaria de transcrição basal. Por outro lado, quando o TR está ligado ao nTRE na ausência do hormônio, o SMRT também está presente, porém o complexo TR-SMRT assume uma conformação diferente, que recruta outras proteínas que

estimulam o complexo de iniciação transcricional e ativam a transcrição. Adaptado de Berghagen et al, 2002 (80).

Outro exemplo de regulação negativa promovida pelo TR é o seu efeito sobre o promotor da superóxido dismutase-1 (SOD-1), uma enzima que age no metabolismo de espécies reativas de oxigênio. O promotor da SOD-1 é ativado pelo TR não ligado e a presença de T_3 reprime sua transcrição por interação do DBD do TR com um elemento inibitório no próprio promotor da SOD-1. Além disso, é necessária a interação do TR com co-repressores para ativar a transcrição da SOD-1 na ausência de T_3 e a interação com coativadores para a repressão na presença de T_3 (81).

4.4 RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES PEROXISSOMAIS

Existem três isoformas do PPAR: PPAR α , PPAR β/δ e PPAR γ . Cada isoforma é codificada por um gene distinto e todas atuam como heterodímero com o RXR (82). O primeiro membro encontrado, o PPAR α , foi identificado como alvo de uma classe de drogas anti-hiperlipemiantes conhecidas como fibratos e compostos xenobióticos que induzem a proliferação de peroxissomos hepáticos (83,84).

Os ligantes de PPAR são moléculas capazes de ativar uma ou mais isoformas, podendo exercer atividade seletiva ou não. Os ligantes endógenos do PPAR identificados são ácidos graxos poliinsaturados, prostaglandinas e leucotrienos (14). Duas classes de drogas, as tiazolidinadionas e os fibratos, exercem suas atividades ligando-se ao PPAR γ e ao PPAR α , respectivamente (15).

Assim como no TR, os PPARs formam heterodímeros com o RXR ligados a sequências específicas de DNA localizadas na região regulatória ou promotora dos genes, mesmo na ausência de ligante. Na presença de ligantes agonistas, os PPAR-RXR ativam a transcrição de genes regulados positivamente (6,20,85). Essas sequências específicas às quais os PPAR-RXR se ligam são conhecidas como elementos responsivos ao PPAR (PPARE), compostas de repetições diretas da

sequência consenso AGGTCA separadas por um único nucleotídeo, conhecido como DR-1 (Figura 11).

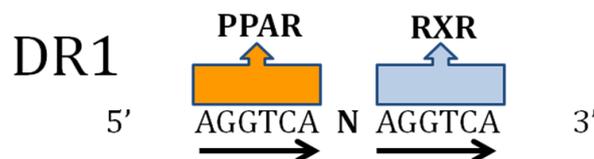


Figura 11. **Heterodímeros PPAR-RXR se ligam a sequências específicas de DNA no promotor de genes-alvo.** DR-1, repetições diretas da sequência consenso AGGTCA separadas por um único nucleotídeo. Adaptado de Glass et al, 2006 (33).

4.4.1 Isoformas

4.4.1.1 PPAR alfa

O PPAR α controla a expressão de muitos genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos (AG), vias de β -oxidação peroxissomal e mitocondrial, catabolismo de triglicerídeos, formação de acil CoA, assim como a ω -oxidação mitocondrial e cetogênese (86). É altamente expresso em tecidos com elevadas taxas de catabolismo de ácidos graxos e atividade peroxissomal, tais como coração, rim, fígado, tecido adiposo marrom e intestino (82). O PPAR α também está presente em células endoteliais, musculares lisas e macrófagos da parede vascular, e nessas últimas, parece ter efeito anti-inflamatório e antiaterogênico (84,87).

Durante o jejum, quando ocorre o aumento da utilização de ácidos graxos livres, a expressão e atividade do PPAR α promovem um aumento da β -oxidação. Isso acontece, pois os ácidos graxos liberados do tecido adiposo e transportados para o fígado ativam o PPAR α resultando em oxidação de AG, aumento da gliconeogênese e da cetogênese, que são críticos para a adaptação do jejum (12).

De fato, quando camundongos com a deleção do gene que codifica o PPAR α são alimentados a vontade eles apresentam uma pior tolerância ao jejum e desenvolvem hipoglicemia, hipocetonemia, hiperlipidemia, hipotermia e deposição de ácidos graxos no fígado (88,89).

Nos músculos esqueléticos a perda do PPAR α é relativamente branda, sugerindo que o PPAR β/δ e talvez outros fatores possam compensá-la (90). Entretanto, PPAR α e alguns outros fatores são induzidos após o exercício físico em humanos (91). O PPAR α também é importante para a regulação favorável do metabolismo de lipoproteínas e estudos clínicos em humanos indicam que agonistas do PPAR α além de serem efetivos na correção da dislipidemia, também reduzem a morbidade e mortalidade cardiovascular (84). Em concordância com os efeitos do PPAR α observados em estudos *in vitro* e em modelos animais, a ativação do receptor pelos fibratos, que são utilizados na prática clínica para o tratamento da hipertrigliceridemia, resultam em redução das concentrações plasmáticas de triglicerídeos, supressão da saciedade e melhora da resistência à insulina e apesar disso, esses últimos achados sobre resistência à insulina não podem ser generalizados para os humanos (20,92).

No coração, que deriva em cerca de 70% da energia dos lipídeos em adultos, a expressão do PPAR α está correlacionada com a transição do feto para o adulto (93) e tem sua regulação reduzida (*down regulated*) durante a hipertrofia cardíaca quando ocorre a diminuição dos metabólitos fetais, principalmente dos carboidratos e da oxidação dos ácidos graxos (94).

4.4.1.2 PPAR beta/delta

O PPAR β/δ , também conhecido como PPAR δ , parece ser mais semelhante ao PPAR α que o PPAR γ em relação à oxidação de gorduras (90). Embora seja dentre as isoformas dos PPARs, a menos caracterizada, apresenta ampla expressão tecidual e atua como sensor de ácidos graxos poliinsaturados e partículas lipoprotéicas, como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (95).

A ativação do PPAR δ promove a oxidação de ácidos graxos na mitocôndria, o gasto de energia e a termogênese. Esses conhecimentos a respeito do papel desse

receptor na homeostase energética aumentaram o interesse do seu estudo em animais transgênicos. Observou-se que camundongos deficientes em PPAR δ estão mais predispostos à diabetes e à resistência insulínica, ao passo que a super expressão do receptor em sua forma ativa no tecido adiposo ou no músculo esquelético protege o camundongo contra obesidade, resistência insulínica, esteatose hepática e dislipidemia induzida por dietas hiperlipídicas (12). Além disso, esses animais apresentam uma predominância de fibras musculares esqueléticas de contração lenta e melhora da capacidade aeróbica (96).

Os agonistas do PPAR δ estão sendo extensivamente estudados com o objetivo de aumentar a lipoproteína de alta densidade, HDL, em pacientes com dislipidemia aterogênica. Além de reduzir triglicerídeos e aumentar o HDL, tais ligantes têm suprimido a obesidade e a resistência insulínica induzidas pela dieta em vários modelos animais. Os agonistas do PPAR δ , assim como os agonistas do PPAR α e PPAR γ , suprimem a expressão de genes inflamatórios em macrófagos e também suprimem o desenvolvimento de aterosclerose em modelos animais (87).

4.4.1.3 PPAR gama

O gene que codifica o PPAR γ origina três RNAs mensageiros: PPAR γ_1 , PPAR γ_2 , PPAR γ_3 (97). Diversos tipos celulares como os adipócitos, pneumócitos, células endoteliais do cólon, bexiga, mama e próstata expressam baixos níveis de PPAR γ_1 , enquanto que o PPAR γ_2 é expresso seletivamente e em altos níveis no tecido adiposo (82,85).

O PPAR γ é alvo das tiazolidinadionas (TZDs), que são agonistas desse receptor. As TZDs são utilizadas como sensibilizadores insulínicos no tratamento do *Diabetes Mellitus* tipo 2 (DM2) além de poderem atuar na terapia para outras condições associadas à resistência insulínica, incluindo esteatose hepática não alcoólica, síndrome de ovários policísticos e lipodistrofias (98).

A isoforma γ do receptor é um regulador importante da adipogênese e é mais abundantemente expresso no tecido adiposo. Os mecanismos de ação e o local da sensibilização à insulina pelas TZDs envolvem o PPAR γ na ativação dos adipócitos, no aumento do acúmulo de lipídeos pelos adipócitos e no aumento da secreção de

sensibilizadores da insulina como a adiponectina. Estudos em tecidos específicos de camundongos transgênicos com deleção no gene que codifica o PPAR γ indicam que os receptores no fígado e no músculo esquelético também contribuem para o benefício total dos efeitos das TZDs, apesar da baixa expressão do PPAR γ nesses tecidos (99). Os camundongos com a deleção seletiva no fígado apresentaram dislipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia e aumento da adiposidade (100) e os camundongos com a deleção seletiva no músculo esquelético resultou em hiperglicemia, resistência insulínica no próprio músculo esquelético e também no tecido adiposo e no fígado. O tratamento com TZDs não melhorou a captação de glicose estimulada por insulina, porém melhorou a hiperglicemia, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia desses animais. Esses achados indicam que, embora a ação das TZDs sobre o tecido adiposo e o fígado seja suficiente para normalizar vários parâmetros metabólicos associados à resistência insulínica, o PPAR γ expresso no músculo esquelético, mesmo que em níveis muito baixos, é importante para a homeostase da glicose e é um possível sítio de ação das TZDs (101).

Consistente com os dados de estudos envolvendo modelos animais, em que a perda parcial da função do receptor, por meio da deleção heterozigota do *PPAR γ* , resulta em melhora da sensibilidade insulínica (102), demonstrou-se que o PPAR γ também tem um papel importante na adipogênese e homeostase metabólica em humanos. Em um polimorfismo do *PPAR γ* no qual no receptor resultante uma prolina foi substituída por uma alanina na posição 12 (Pro12Ala) do PPAR γ 2, está associado à proteção de ganho de peso corporal, aumento da sensibilidade insulínica e diminuição do risco de DM2 (103). Em contraste, a substituição de uma prolina por uma glicina na posição 115 (Pro115Gln) do PPAR γ 2 está associado à obesidade e à resistência insulínica (99). Esses estudos genéticos sugerem que um modulador do PPAR γ pode exibir um melhor perfil de sensibilização à insulina do que um agonista total (20).

O PPAR γ também é abundantemente expresso em macrófagos de pacientes com lesão aterosclerótica da aorta e é ativado por uma lipoproteína pró-aterogênica, a LDL oxidada (87). Ligantes do PPAR γ diminuem a aterosclerose em camundongos, enquanto que a perda da função do PPAR γ em células da medula óssea promove a aterosclerose. A atividade antiaterogênica do PPAR γ em macrófagos envolve efeitos anti-inflamatórios, assim como a ativação de

transportadores reversos do colesterol. Os efeitos cardiovasculares das TZDs em pacientes diabéticos ainda são controversos (104).

4.5 A SÍNDROME DE RESISTÊNCIA AO HORMÔNIO TIREOIDEANO (SRHT)

A Síndrome de Resistência ao Hormônio Tireoideano (SRHT) ocorre com igual frequência em ambos os sexos e apresenta ampla distribuição geográfica e étnica (105). É caracterizada pela reduzida resposta dos tecidos alvos ao HT, apesar das elevadas concentrações séricas de T_3 e T_4 livres, associada a um TSH elevado ou inapropriadamente normal. Refetoff e cols., em 1967, foram os primeiros a descrever a síndrome clínica de resistência ao HT em dois indivíduos que apresentavam bócio, surdo-mudez e atraso na idade óssea. Os níveis séricos de HT eram elevados, contrastando com os sintomas de hipotireoidismo. A administração de HT exógeno não produziu o efeito metabólico esperado e também não suprimiu o TSH estimulado pelo TRH (1,106).

Ocorre uma resposta reduzida ao HT pelos tecidos periféricos e hipófise resultando em um *feedback* negativo anormal do T_3 no TSH/TRH. Essa resposta reduzida promove sinais, sintomas e anormalidades laboratoriais que são características da SRHT (Figura 12).

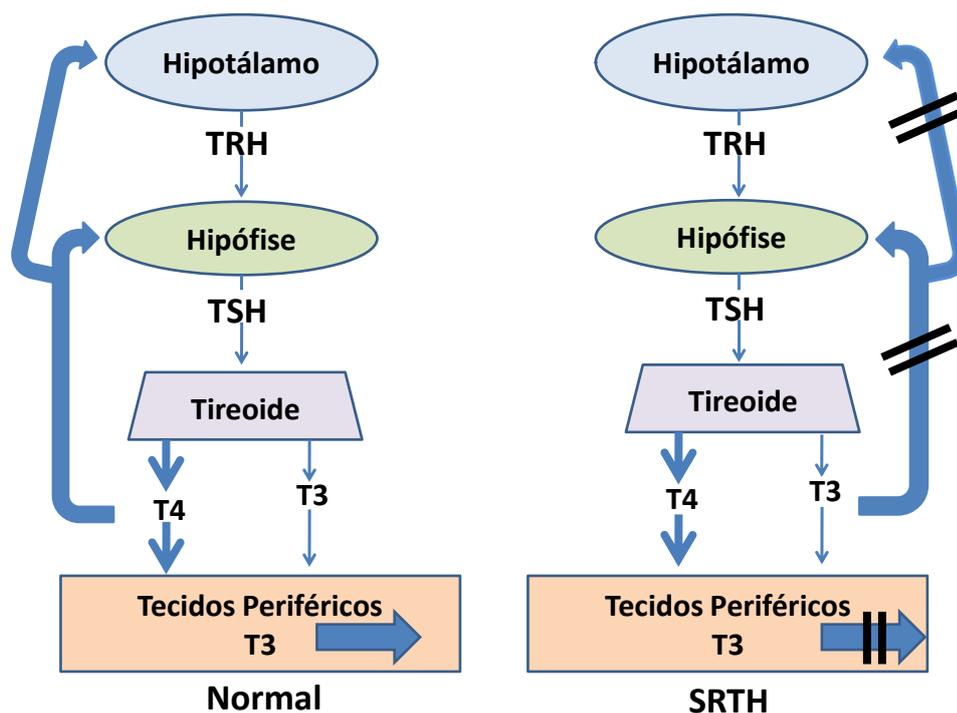


Figura 12. **Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.** Em condições normais, o hipotálamo secreta TRH, o qual estimula a hipófise a produzir TSH que, por sua vez, estimula a tireoide a produzir principalmente T₄. T₄ é metabolizado nos tecidos periféricos em T₃. O HT faz um *feedback* negativo no hipotálamo e na hipófise. A ação do HT na hipófise e nos tecidos periféricos ocorre quando T₃ se liga ao seu receptor. Na SRHT, o *feedback* está inibido devido à sensibilidade reduzida na hipófise ao HT, resultando em um TSH elevado com uma secreção elevada de T₄. Os tecidos periféricos também apresentam sensibilidade reduzida ao HT na SRHT. Adaptado de Carvalho e Ramos, 2004 (107).

O fenótipo da SRHT é bastante variável, tanto entre famílias, como entre membros da mesma família com mutações idênticas do TR β . A maioria dos pacientes apresenta sintomas leves a moderados. Esta variabilidade na manifestação clínica se deve, em parte, à severidade da resistência hormonal, da efetividade dos mecanismos compensatórios, da presença de fatores genéticos moduladores e dos efeitos de tratamentos anteriores (108,109).

A reduzida sensibilidade ao HT na SRHT pode variar em severidade. Entretanto, existem características clínicas comumente encontradas na síndrome que são bócio, retardo do crescimento, níveis séricos elevados de T₃ e T₄ livres, níveis normais ou discretamente elevados de TSH, o qual responde ao TRH e ausência dos sintomas comuns e das alterações metabólicas provocadas pelo

excesso de HT. Cerca de metade dos pacientes com SRHT apresentam alguma diminuição na capacidade de aprendizado, com ou sem hiperatividade, e déficit de atenção (3). Em crianças a ocorrência da síndrome com déficit de atenção é extremamente rara (1).

A SRHT tem sido subdividida em dois tipos principais: Resistência Generalizada ao Hormônio Tireoideano e Resistência Isolada Hipofisária e de Tecidos Periféricos ao Hormônio Tireoideano (4). Como a maioria dos pacientes é eumetabólico com TSH próximo do normal, eles são classificados como portadores de resistência generalizada, ou seja, o defeito é compensado pela elevação dos níveis de HT, uma vez que a resposta tanto na pituitária quanto nos tecidos periféricos é diminuída (110). Um número menor de indivíduos é definido como portador da resistência isolada hipofisária e de tecidos periféricos ao HT, cuja sensibilidade periférica aos HTs é preservada, e assim, os pacientes apresentam sinais de hipermetabolismo como taquicardia e agitação pelos elevados níveis circulantes de T_3 (111).

4.5.1 Base Molecular da SRHT

Vários estudos relataram que os indivíduos afetados são heterozigotos para mutações no gene $TR\beta$ (112,113) e o padrão de herança da SRHT é geralmente autossômico dominante (OMIM # 188570). Vários estudos relataram que os indivíduos afetados são heterozigotos para mutações no gene $TR\beta$, não havendo até o presente, relatos de mutações no $TR\alpha$ (112,113).

É interessante notar que os membros heterozigotos da família com SRHT que possuíam apenas um alelo do $TR\beta$ deletado apresentaram dados clínicos e laboratoriais normais. Essa observação sugere que uma única cópia do $TR\beta$ é suficiente para a função normal (Figura 13). A importância da atividade de dominância negativa por um mutante do TR depende, em parte, dos níveis de expressão do receptor mutado. Por exemplo, um paciente que é homozigoto para a mutação em ambos os alelos do $TR\beta$ apresenta uma severa SRHT e retardo mental

(115), em contraste, seus parentes que têm mutações em apenas um alelo do TR β apresentam uma branda SRHT.

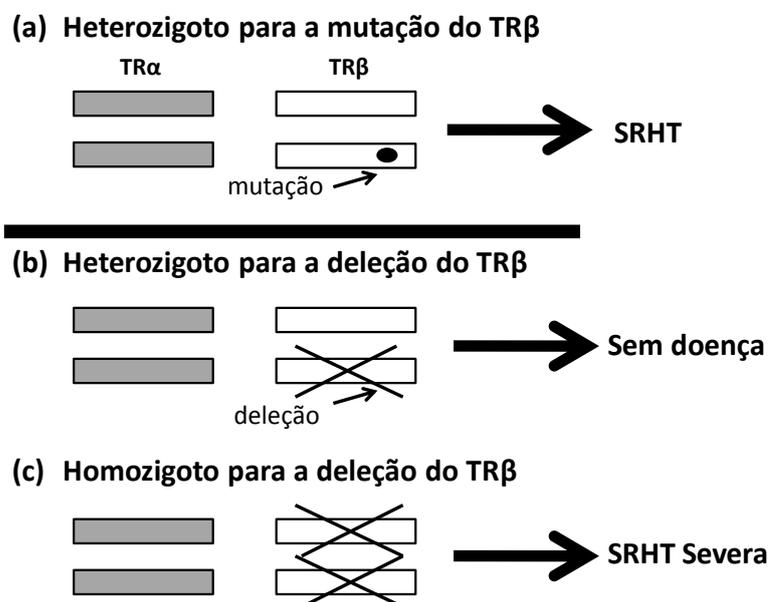


Figura 13. **Representação esquemática para o entendimento dos diferentes fenótipos encontrados na Síndrome de Resistência ao Hormônio Tiroideano (SRHT).** (a) A mutação em um dos alelos do TR β provoca um fenótipo de SRHT; (b) A deleção em um dos alelos do TR β não altera o fenótipo, ou seja, não provoca a SRHT; (c) A deleção de ambos os alelos do TR β provoca um fenótipo de severa SRHT. Adaptado de Yen PM, 2001 (24).

Entretanto, a transmissão com padrão de herança autossômica recessiva (OMIM # 274300) foi identificada em indivíduos provenientes de famílias com casamentos consangüíneos. Nestes a análise genética de uma das famílias mostrou que os membros afetados apresentavam deleções completas de ambos os alelos TR β e TR α normal (114). Análises do gene do TR β em uma família com SRHT mostrou que os membros afetados eram homozigotos para a deleção para a região codificadora do TR β (114). Apesar da completa perda da expressão do TR β , esta foi compatível com a vida.

Atualmente foram identificadas diferentes mutações em mais de 5000 pessoas pertencentes à cerca de 500 famílias (118). Na maioria das famílias, as mutações se devem a substituições de um único nucleotídeo, resultando na substituição por outro aminoácido gerando um códon de parada e nas outras famílias, a deleção ou inserção de nucleotídeos produz uma mutação que altera o

quadro de leitura (erro de enquadramento ou *frameshift*) (105). A sequência do cDNA é importante em pacientes com SRHT em que não foi encontrada nenhuma mutação em seus genomas. Mutações somáticas no gene TR β foram identificadas em dois adenomas hipofisários produtores de TSH (117).

A maioria das mutações descritas foram encontradas em três regiões “*hot spots*” (Figura 14) localizadas no LBD entre os exons 8 e 10 do TR β , resultando em receptores com afinidade de ligação ao T₃ reduzida ou mínima (112,118,119,120,121).

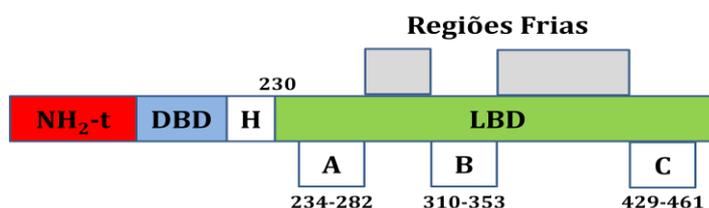


Figura 14. **Localização das mutações no receptor do TR β associados com a SRHT.** As mutações encontradas no TR β ocorrem agrupadas em três áreas do domínio de ligação ao T₃. As posições dos aminoácidos, onde as mutações foram encontradas, estão indicados nos quadrados (A, B, C). As regiões frias de 28 e 75 aminoácidos não contém mutações que causam SRHT. Adaptado de Carvalho e Ramos, 2004 (107).

4.5.2 Dominância Negativa

Os TR β mutantes interferem com a função dos TRs normais, um fenômeno denominado dominância negativa. A dominância negativa ocorre quando uma mutação no receptor interfere com a função normal desse mesmo receptor nativo. Ao invés de ser produzido o efeito da proteína nativa sintetizada, ocorre um silenciamento desta. Essa atividade de dominância negativa produzida pelo receptor mutado depende, em parte, do nível de expressão desse receptor mutado (24). Os receptores mutantes continuam capazes de se ligar ao TRE e dimerizar com TRs normais ou RXRs, desta forma competindo e bloqueando a ligação dos TRs normais

ao TRE. As características de dimerização dos TR β mutantes têm um papel importante na mediação da atividade dominante negativa (122,123).

Três mecanismos potenciais têm sido propostos para explicar a atividade de dominância negativa dos receptores mutados. O primeiro é a competição entre o receptor mutado e o receptor normal pela ligação à sequência de DNA. O segundo é a formação de um heterodímero funcionalmente inativo entre o receptor mutado e o receptor normal. Portanto, a ligação do mutante do TR ao DNA e a sua capacidade de dimerização com o RXR são importantes na inibição da dominância negativa (124), pois ambos os mecanismos acarretam numa falha da regulação transcricional pelo T₃ e também bloqueiam a regulação transcricional pelo T₃ em receptores normais (24).

O terceiro é a transcrição limitada por cofatores (125). Como mencionado anteriormente, aproximadamente 15% das famílias com SRHT não possuem mutações no TR β sugerindo que outros cofatores de transcrição envolvidos na ação do HT sejam responsáveis pela resistência hormonal nesses casos (126). Yoh, *et al* (1997) estudou a interação do correpressor SMRT com TRs mutantes. Ele observou que os TRs mutantes apresentaram um defeito na dissociação com o SMRT. Em geral, a liberação deste correpressor está associada à afinidade de ligação do mutante ao T₃ e nesses casos, na presença de T₃ a dominância negativa se dá por não ocorrer a dissociação do correpressor. Os autores também demonstraram que mutações na região de dobradiça que abolem a interação do TR com SMRT diminuíram o efeito dominante negativo (127). Safer e col. (1998) demonstraram que os TRs dominantes negativos interagem com maior afinidade com correpressores, de forma que a ligação do hormônio não promoveria a dissociação do correpressor e impediria a ativação da transcrição (128,129). Tagami e Jamenson (1998), também encontraram um resultado semelhante em relação ao NCoR e TRs mutantes. Já Liu, *et al* estudou a interação de mutantes do TR com o correpressor NCoR e com o coativador SRC-1. Um mutante da região AF-2 com atividade dominante negativa foi capaz de se dissociar do NCoR na presença de T₃, mas foi incapaz de se associar ao coativador SRC-1. Esses achados de inabilidade de dissociação dos TRs com correpressores e de inabilidade de interação com coativadores podem resultar em complexos de TR que não são ativados pelo ligante levando a um efeito de dominância negativa (130).

Estudos demonstraram que cofatores como o SRC-1 podem não só modular a ação dos TR β normais, mas também a dos mutantes e de forma específica para determinado tecido (tecido dependente), o que explicaria a acentuada variabilidade na SRHT nos diferentes tecidos de um mesmo indivíduo ou entre indivíduos com a mesma mutação no gene do TR β . Essa variação tecidual e individual ocorre devido à combinação de múltiplos fatores, como a distribuição tecido dependente das isoformas do TR, a ação dos coativadores e o ambiente da região promotora dos genes regulados pelo T₃ (131,132,133).

Na resistência generalizada ao HT são encontrados mutantes do TR β que interferem com a função do TR β nativo, tanto nos elementos regulados positivamente quanto nos regulados negativamente (134).

Uma das mutações encontradas no TR β é a que altera o resíduo de fenilalanina para um códon de parada resultando na deleção de 11 aminoácidos na região carboxi-terminal (F451X), assim o mutante resultante não possui a hélice (H) 12. Isso resulta em um receptor sem afinidade pelo T₃, com capacidade de se ligar aos TREs e de formar heterodímeros com o RXR. Por não possuir a H12, o F451X (Figura 15) liga-se fortemente ao correpressor SMRT, estando impossibilitado de dissociar-se desse e de associar-se com coativadores, portanto impedindo a ativação da transcrição gênica. Essa mutação foi detectada em uma menina japonesa de 6 anos de idade, heterozigota para a mutação e que apresentava resistência generalizada e severos sintomas clínicos da síndrome, incluindo retardo mental, déficit de atenção, distúrbios no desenvolvimento da fala e hiperatividade, o que demonstra que esta mutação exerce um forte efeito dominante negativo (135,136).

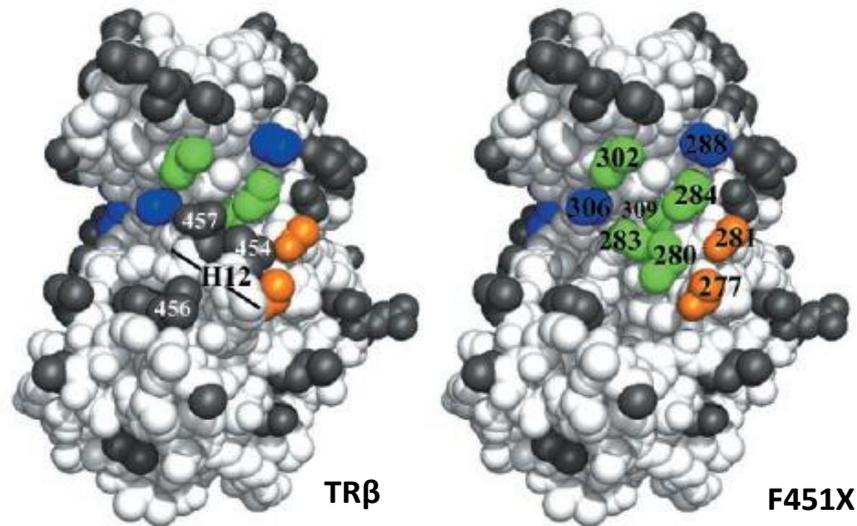


Figura 15. **Estrutura cristalográfica do LBD do TR β nativo mostrando os aminoácidos da superfície de ligação ao N-CoR e o posicionamento da hélice 12 (H12).** A figura à direita mostra o mutante F451X que não possui os 11 aminoácidos (aminoácidos 451 a 461) que compõe a H12. Em comparação ao TR β nativo, no mutante F451X, a superfície de ligação ao correpressor fica exposta. Fonte: Marimuthu et al, 2002 (137).

Outra mutação encontrada em alguns pacientes com SRHT é a mutação G345R que altera o resíduo de glicina para arginina. Esta substituição modifica a carga da proteína e determina a perda da afinidade do TR ao T₃, mas não afeta a capacidade do TR de se ligar aos TREs e de formar heterodímeros com RXR. Os membros das famílias afetadas são heterozigotos e, portanto, o G345R atua como dominante negativo suprimindo a ativação transcricional do TR normal sobre os genes responsivos ao T₃. Embora esta mutação resulte em um defeito severo no receptor e na sua função, pacientes que possuem esta mutação são relativamente normais e tem crescimento normal. Esses pacientes apresentavam características bioquímicas de hipertireoidismo e tiveram como principais sintomas clínicos o retardo mental e o aumento da glândula tireóide (110).

4.6 TR E PPAR

Estudos têm demonstrado que a atividade do PPAR pode ser modulada positiva ou negativamente por outros receptores nucleares como o TR. Nesses estudos, o PPAR liga-se efetivamente ao TR formando um heterodímero capaz de se ligar ao DNA (16).

É interessante observar que o TR mutado também pode interferir na função do PPAR. A modulação da atividade do PPAR α , β/δ e γ pelo TR β é amplamente abordada em estudos funcionais com mutantes do TR, e tem auxiliado na compreensão de sinais de disfunções metabólicas verificadas na SRHT.

O emprego de mutantes do TR com características de dominância negativa, especialmente do mutante TR β_1 PV tem sido amplamente pesquisado. Nesse receptor, encontrado na SRHT, há a inserção de um único nucleotídeo (insC XX) no exon XX que modifica o quadro de leitura gerando um receptor com uma hélice 12 modificada a partir do resíduo 448 composta de 14 aminoácidos. Um estudo demonstrou que o mutante TR β_1 PV heterodimeriza-se com PPAR γ *in vitro* e inibe a ligação entre PPAR γ e seu elemento responsivo, de forma independente de T₃ e RXR (11). O TR mutante pode formar heterodímeros com PPAR ou com RXR ou formar homodímeros de mutantes. Esses heterodímeros podem também ligar-se ao DNA e competir com os heterodímeros PPAR-RXR. O mecanismo molecular envolvido nessa dominância negativa não está esclarecido.

Estudos mostram que o mutante do TR β_1 , $\Delta 337T$ (deleção de treonina na posição 337) exerce efeito dominante negativo em PPAR α no coração, alterando a expressão do receptor nuclear. Esse resultado indica que as respostas dos ligantes de PPAR α podem ser influenciadas pelo hormônio tireoideano e pela função do TR (17).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 PLASMÍDEOS UTILIZADOS

Para a realização dos experimentos foram utilizados os vetores de expressão, plasmídeos pCMX, pCMX-TR β ₁, pCMX-RXR α e pCDNA3-PPAR γ . A transcrição do RNA codificado por este cDNA é controlada pelo promotor do citomegalovírus (CMV) e do promotor T7. O CMV permite a expressão desses RNAs em células de mamíferos e o promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7 permite a expressão desses RNAs em um sistema de transcrição e tradução *in vitro*. Por ação nesses promotores, há expressão das proteínas codificadas por esse plasmídeos. Os detalhes da construção desses plasmídeos foram descritos anteriormente (138,139)

Foram utilizadas construções de plasmídeos que codificam o TR β ₁ com mutações específicas em diferentes regiões do DNA. São esses: pCMX- TR β ₁-G345R, pCMX- TR β ₁-F451X, pCMX- TR β ₁-L422R, pCMX- TR β ₁-L422R/F451X, pCMX- TR β ₁-I280R/F451X, pCMX- TR β ₁-3XLBD (L400R, L422R e M423R), pCMX- TR β ₁-4XDBD (D104A, Y117A, R120A e D177A) e pCMX- TR β ₁-4XDBD/3XLBD.

O mutante G345R, mutante da SRHT, no qual a glicina na posição 345 foi substituída por arginina, não se liga ao T₃. Sua capacidade de interagir com os coativadores é abolida por não poder efetuar a transição de receptor não-ligado para ligado com T₃. Interage com correpressores.

O mutante F451X possui a deleção dos 11 últimos aminoácidos do TR β ₁, a partir da fenilalanina na posição 451. Trata-se de uma mutação natural do TR, descrita na SRHT em que a H12 está ausente e apresenta baixa afinidade pelo T₃, sendo incapaz de se associar aos coativadores, mas interagindo fortemente com correpressores (81,137).

No caso do mutante L422R, e mutante L422R/F451X, a leucina na posição 422 é importante para homo e heterodimerização do TR. A mutação nesse aminoácido, L422R, diminui essa capacidade de dimerização do TR e pode afetar a estabilidade dos dímeros (140). O duplo mutante L422R/F451X não se dimeriza, mas se liga fortemente a correpressores, enquanto o duplo mutante I280R/F451X não se dimeriza e não interage com coativadores ou correpressores (141).

Construções que contêm o gene repórter luciferase dirigido pelo promotor mínimo (seqüência de -32nt a +45nt) do promotor da timidina cinase (TK) do vírus herpes simplex e as seqüências dos TREs foram utilizadas. Os genes repórteres pUC19-IP6-Luc, pUC19-DR4-Luc, pUC19-Pal-Luc e pUC19-DR1-Luc foram gentilmente doados pelo Dr. Jonh D. Baxter do Diabetes Research Center, The Methodist Hospital Research Institute, Houston, E.U.A.

Os genes repórteres pUC19-AP1 e pUC19-TRH-Luc foram doados pelo Dr. Peter Kushner do Departamento de Medicina, Divisão de Endocrinologia e Metabolismo da Universidade da Califórnia em San Francisco, San Francisco, E.U.A.

Para a normalização da transfecção, foi utilizado o plasmídeo pCMV- β gal (Clontech laboratories, Inc.), que contém o gene que codifica a enzima β -galactosidase dirigido pelo promotor do citomegalovírus, com atividade constitutiva.

5.2 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

Plasmídeos foram transformados em cepas de *E.coli* DH5 α competentes. Para amplificação, uma única colônia transformada proliferou em meio de cultura LB (5g de extrato de levedura, 10g de triptona e 10g de NaCl em 1L de água destilada) contendo o antibiótico de resistência, sob agitação, a 37°C, por 16h. As células foram, então, coletadas por centrifugação a 5.000 rpm e os plasmídeos purificados pelo protocolo modificado de lise alcalina (142).

5.3 CULTURA DE CÉLULAS

Foram utilizadas células mesangiais humanas, obtidas da *American Type Cultured Collection* (ATCC), EUA. O cultivo celular foi realizado em placas para cultura de tecidos de 148 cm² (Corning), em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) adicionado de 10% de soro fetal bovino, 2mM de

glutamina, 50U/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina, em incubadora Sanyo com 5% de CO₂ a 37°C.

5.4 TRANSFEÇÃO POR ELETROPORAÇÃO E ENSAIO DE GENE REPÓRTER

5.4.1 Transfecção por eletroporação

A atividade transcricional dos TRs e PPARs foi avaliada por meio de ensaio de gene repórter em cultura de células de mamíferos, as células mesangiais humanas.

O método de transfecção/introdução dos plasmídeos utilizado nas células mesangiais foi a eletroporação. Esse método consiste na aplicação de pulsos de correntes elétricas a uma suspensão de células para geração de poros nas membranas citoplasmática e nuclear permitindo a entrada do DNA plasmidial de interesse.

As células mesangiais foram tripsinizadas, coletadas por centrifugação (2.000 rpm por 5 min) e suspendidas em solução de PBS contendo 0,1% de dextrose, 0,1g/L de cálcio na concentração de 2×10^7 células/mL. O vetor de expressão, o vetor-repórter e pCMV-βgal foram adicionados à suspensão de células. A mistura foi transferida para cuvetas de eletroporação (BioRad) e eletroporada em aparelho gerador de pulsos (Bio-Rad) a 350V e 700µF. Em seguida, foi acrescentado meio de cultura à suspensão de células eletroporadas e estas foram transferidas para placas de 24 poços (0,5 mL/poço), tratadas com os ligantes de interesse e incubadas por 24h a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, as células foram lavadas com PBS e lisadas em 100µL de tampão de lise (Promega®).

5.4.2 Tratamento – curvas dose-resposta

As transfecções para construção das curvas dose-resposta para o TR β 1 nativo e F451X em F2, DR-4, TRH e AP-1; 3XLBD, 4XDBD e 3XLBD/4XDBD em TRH e AP-1; e para o PPAR γ , TR β 1 nativo, F451X, L422R, L422R/F451X e I280R/F451X em DR1 foram realizadas de acordo com o protocolo descrito no item Método de Transfecção e Ensaio da Atividade da Enzima Luciferase. As células foram tratadas com concentrações crescentes de T₃ que variaram de 10⁻¹⁰M a 10⁻⁵M ou com concentrações crescentes de rosiglitazona que variaram de 10⁻⁹M a 10⁻⁵M. A partir das leituras da luciferase obtidas, foi calculada a taxa de ativação, em F2, DR1 e DR4, ou a porcentagem de repressão, em TRH e AP-1, e com esses valores as curvas foram construídas.

Os ensaios de cotransfecção e gene repórter luciferase foram realizados em células mesangiais tratadas com veículo e concentrações crescentes de T₃ mediada pela adição de 0,5 μ g do vetor de expressão do TR β wt, mutante ou TR β wt + mutante (0,5 μ g + 0,5 μ g ou 0,5 μ g + 2,5 μ g) em células mesangiais. As células foram co-trasfectadas com 2,0 μ g do vetor para o gene repórter F2, DR4, TRH e AP-1 e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou concentrações crescentes de T₃ (10⁻¹⁰M a 10⁻⁶M). A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção.

Nos ensaios com PPAR, as células foram transfectadas com 1,5 μ g do vetor de expressão do PPAR γ , TR β 1 wt ou cotransfectadas com PPAR γ e TR β wt na proporção de 1:1 (1,5 μ g:1,5 μ g) e 3,0 μ g do vetor para o gene repórter DR1 (DR1-Luc) em células mesangiais. O tratamento consistiu de veículo (DMSO ou DMSO/ETOH na proporção 2:3, v/v) e concentrações crescentes de rosiglitazona (10⁻⁹M a 10⁻⁵M) e/ou T₃ (10⁻⁹M a 10⁻⁵M). A atividade da luciferase foi medida após 24h com a lise das células, e os números representam a taxa de ativação do respectivo receptor tratado com rosiglitazona ou T₃ ou com ambos em relação ao receptor tratado com veículo.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos 3 vezes.

5.4.3 Detecção de atividade de luciferase

A atividade de luciferase foi determinada por meio do *Luciferase Assay System* (Promega), de acordo com as instruções do fabricante em luminômetro (Tuner) ou contador de luminescência (1450 Microbeta Jet, Perkin Elmer).

A luciferase cataliza a conversão de luciferina em oxiluciferina, e essa reação resulta em emissão de luz que pode ser quantificada. Em ensaios de gene repórter, quando há aumento da atividade transcricional no promotor do gene repórter, esta é proporcional à atividade detectada de luciferase.

5.4.4 Detecção de atividade de β -galactosidase

A atividade da enzima β -galactosidase (β -Gal) foi determinada pela utilização dos reagentes para detecção de quimoluminescência, *Galacto-Light™ Reaction Buffer Diluent with Galacton® Substrate* e *Light Emission Accelerator-II* (Applied Biosystems) ao lisado celular, de acordo com as instruções do fabricantes. A quantificação foi feita em contador de luminescência (1450 MicroBeta JET, Perkin Elmer).

O plasmídeo que codifica a β -galactosidase, pCMV- β Gal, uma vez inserido em células de mamíferos é dirigido por um promotor que faz com que a enzima seja constitutivamente expressa. Como a maioria das células de mamíferos em cultura expressa níveis muito baixos de β -Gal, a atividade enzimática detectada é função da expressão do DNA plasmidial, ou seja, da eficiência do procedimento de transfecção. Desta forma, a determinação da atividade de β -Gal monitora a eficiência da transfecção e permite normalizar a leitura da atividade da luciferase entre as diferentes transfecções.

5.4.5 Cálculo da taxa de ativação e repressão

Taxa de ativação:

Foram utilizados os valores da leitura da luciferase dos experimentos tratados com T₃ ou rosiglitazona ou ambos e divididos pelo valor da leitura dos experimentos tratados com veículo, DMSO absoluto ou etanol contendo 10% de DMSO.

$$\text{Taxa de ativação} = \frac{\text{Leitura da luciferase (T}_3 \text{ e/ou rosiglitazona)}}{\text{Leitura da luciferase (veículo)}}$$

Esses cálculos foram realizados nas transfecções com os elementos responsivos positivos F2, DR1 e DR4.

Taxa de Repressão:

Foi utilizado para os experimentos com os elementos responsivos negativos, TRH e AP-1. A percentagem dos valores da leitura com T₃ foi calculada, assumindo-se que o valor da leitura com veículo era de 100%, e então, subtraiu-se de 100 o valor encontrado.

$$\text{Taxa de repressão} = 100 - \frac{(\text{Leitura da luciferase c/ T}_3 \times 100)}{\text{Leitura da luciferase s/ T}_3 \text{ (controle)}}$$

Esses cálculos também foram realizados nas curvas dose-resposta em TRH e AP-1, porém não se subtraíram de 100 e foi denominado de % ativação.

$$\% \text{ de ativação} = \frac{(\text{Leitura da luciferase c/ T}_3 \times 100)}{\text{Leitura da luciferase s/ T}_3 \text{ (controle)}}$$

Para calcular o percentual da taxa de repressão [Repressão (% TR nativo)] foi assumido que a taxa de repressão do TRβ₁ nativo era 100% e a partir dessa correlação calculou-se a percentagem para as outras taxas de repressão.

Nos elementos responsivos negativos também foi calculado o percentual da leitura da luciferase (% Leitura da Luciferase), em que os valores da leitura da luciferase do TRβ₁ nativo sem T₃ como sendo 100% e a partir dessa correlação calculamos a percentagem para outras leituras foram considerados.

5.5 ENSAIO DE ALTERAÇÃO DE MOBILIDADE EM GEL (*EMSA* OU *GEL SHIFT*)

O EMSA ou gel shift é uma técnica utilizada para se estudar a interação entre DNA e proteína. Esse procedimento pode determinar a especificidade de ligação de uma proteína ou uma mistura de proteínas a fragmentos de DNA (oligonucleotídeos).

Os oligonucleotídeos utilizados nesse experimento foram:

Sequência F2 (IP6) como controle positivo

5'- AGCTTATTGACCCCAGCTGAGGTCAAGTTACG -3'

5'- CGTAACTTGACCTCAGCTGGGGTCAATAAGCT -3'

Sequência TRH (sítio 4)

5'- GCGCCCCCTCCCCGCTGACCTCACAGGCGCCGCGTCTCCA -3'

5'- TGGAGACGCGGCGCCTGTGAGGTCAGCGGGGAGGGGGCGC -3'

Sequência AP-1 Colagenase

5'- AGTCATGAGTCAGACACCTCTGGC -3'

5'- GCCAGAGGTGTCTGACTCATGACT -3'

5.5.1 Tradução *in vitro* de TRs

Os TR β_1 wt e mutantes (F451X, G345R, L422R) foram sintetizados *in vitro* utilizando-se *TNT T7 Quick Couple Transcription/Translation kit* (Promega) na presença de [³⁵S]-Met. (Perkin Elmer) de acordo com as instruções do fabricante.

De forma resumida, os plasmídeos contendo o cDNA que codifica o TR β_1 wt humano, os TR β_1 mutantes e o RXR α humano nativo regulados pelo promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7 foram adicionados a um sistema que contém toda a maquinaria necessária para a transcrição e tradução de proteínas (Kit TNT T7). Esse sistema contém a RNA polimerase do bacteriófago T7, ribonucleotídeos, inibidor de RNase em um lisado de reticulócitos de coelho suplementado com 40 μ M ZnCl₂ e aminoácidos, com exceção da metionina. A [³⁵Met] (Perkin Elmer) é

adicionada no momento da reação com a finalidade de obter receptores radioativamente marcados.

A eficiência da tradução *in vitro* dos [³⁵Met]TRs foi checada por meio de eletroforese a 100-150V em gel de poliacrilamida a 10% contendo SDS (dodecil sulfato de sódio). O gel foi, então, colocado em uma solução fixadora (contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético glacial) durante 10 min, transferido para uma solução amplificadora (Amplify, GE Healthcare Life Sciences) por 10 min e secado a vácuo a 80°C por 40 min em aparelho Gel Dryer acoplado à bomba de vácuo (BioRad). O gel seco foi submetido à autorradiografia, utilizando-se filme radiográfico (Kodak O-Mat Blue (XB) film) e posteriormente revelado.

5.5.2 Eletroforese

Para visualização dos homodímeros, 2 µL de [³⁵S]-TRs mutantes ou nativos foram adicionados a uma reação contendo 40 ng de oligonucleotídeos F2, TRH ou AP-1, 1 µg de poli(dIdC) (GE Healthcare Life Sciences) em tampão de ligação contendo NaH₂PO₄ 10 mM, MgCl₂ 1 mM, EDTA 0,5 mM, NaCl 20 mM, glicerol e monotioglicerol 0.1%, em um volume total de 20 µL. Para visualização dos heterodímeros, adicionou-se à reação acima descrita, 4 µL de RXRα sintetizado *in vitro* mas não marcado radioativamente. As reações foram tratadas com veículo ou T₃ 10⁻⁶M e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos.

Após esse período, cada reação foi aplicada em gel de poliacrilamida a 5% em TAE (6,7 mM de Tris-base pH 7,5, 1 mM de EDTA e 3,3 mM de acetato de sódio) que foi previamente submetido à eletroforese em sistema vertical de eletroforese (Hofer Inc.) a 4°C por 30 min a 200V (pré corrida). A separação dos complexos foi feita a 4°C por 150 min a 240V em tampão TAE. Nessas condições, os complexos de proteínas que não se ligaram ao DNA, permanecem intactos e não são afetados pela eletroforese. Isto ocorre devido ao fato de que a carga do complexo proteína-DNA é fornecida pelo DNA que se encontra em seu estado nativo.

Após a eletroforese, o gel foi fixado em solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético por um período de 30 minutos e transferido para solução

amplificadora (Amplify), por 30 min. A seguir, o gel foi secado por 90 min, exposto a filme radiográfico e, posteriormente, revelado.

6. RESULTADOS

Primeiramente, com o objetivo de se avaliar a eficiência com que o mutante de TR β ₁, F451X, exerce seu efeito dominante negativo sobre TR β ₁ nativo, foram realizados ensaios de cotransfecção transiente em células mesangiais utilizando-se os vetores de expressão do TR β ₁ nativo, do mutante, do vetor repórter luciferase contendo TRE-F2/IP6 ou TRE-DR4 e do vetor pCMV- β Gal como controle de eficiência de transfecção. A repressão exercida pelo mutante em TR β ₁ nativo foi comparada em TRE-F2/IP6, elemento regulado positivamente pelo T₃.

Posteriormente, visando o entendimento do mecanismo de dominância negativa em elemento responsivo regulado negativamente pelo T₃, foram realizadas transfecções com o TR β ₁ nativo e/ou mutante em vetor repórter de luciferase contendo promotor TRH e AP-1.

6.1 EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DE MUTANTE DE SRHT SOBRE TR β ₁ WT EM ELEMENTO RESPONSIVO REGULADO POSITIVAMENTE POR T₃.

As figuras 16 e 18 apresentam os gráficos com as taxas de ativação transcricional relativa mediada por TR β ₁ wt e/ou mutante F451X, nas proporções 1:1 e 1:5 (μ g de TR β ₁wt: μ g de TR β mutante) em elemento responsivo positivo TRE-F2 ou TRE-DR4, em curvas de resposta com concentrações crescentes de T₃.

6.1.1 TR β ₁-F451X em Elemento Responsivo TRE-F2

Na figura 16, observa-se que, quando comparada à atividade transcricional relativa do TR β ₁ wt na concentração de 10⁻⁶M de T₃, houve redução da atividade deste na presença de F451X na razão 1:1 e 1:5, 74 % e 78%, respectivamente (26% e 22% aproximadamente de atividade relativa máxima do TR β ₁ wt, respectivamente). A figura 17 representa a repressão do TR β ₁ wt e mutante na

ausência do ligante em TRE-F2 pela razão luciferase/ β gal. O TR β_1 wt apresenta repressão transcricional menor na ausência do ligante em relação ao mutante F451X.

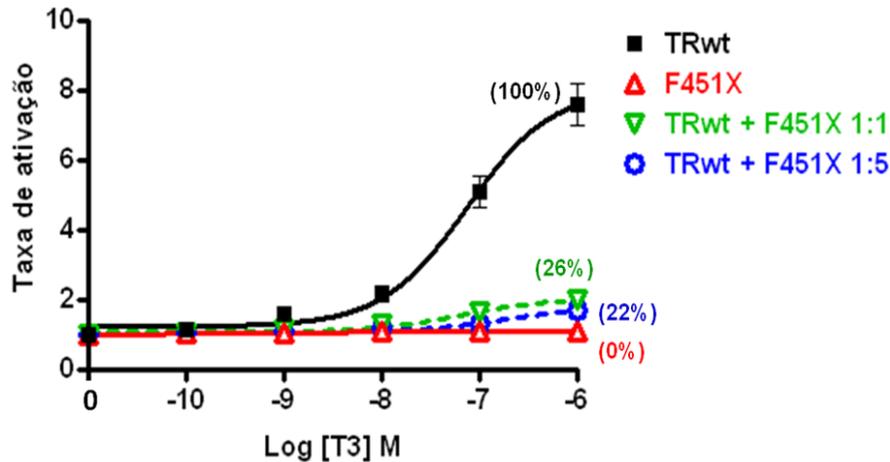


Figura 16. **O mutante TR β_1 -F451X exerce efeito dominante negativo em TRE-F2.** Células mesangiais foram transfectadas com 0,5 μ g do vetor de expressão do TR β wt ou F451X ou TR β wt:F451X na proporção de 1:1 (0,5 μ g: 0,5 μ g) ou 1:5 (0,5 μ g : 2,5 μ g), 2,0 μ g do vetor repórter TRE-F2-Luc e tratadas com concentrações crescentes de T3 (10^{-10} M a 10^{-6} M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a ativação máxima considerando TR β_1 wt=100%; n=3.

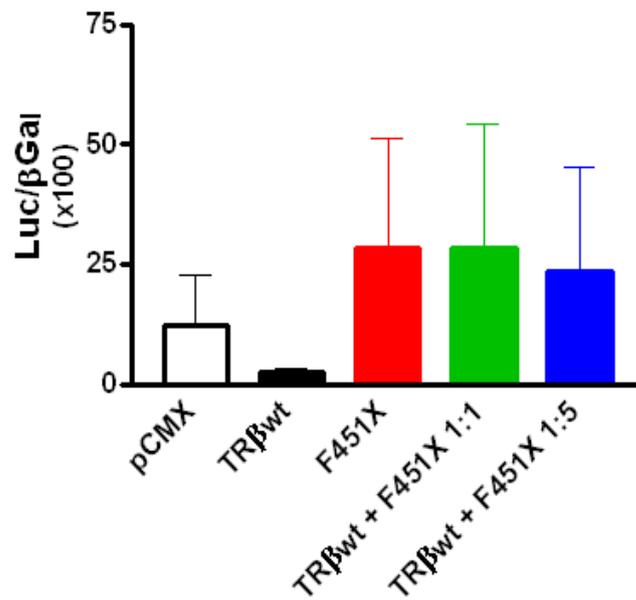


Figura 17. **Repressão do TR β_1 wt e mutante na ausência do ligante em TRE-F2.** Células mesangiais foram transfectadas com 0,5 μ g do vetor de expressão do TR β_1 wt ou F451X ou TR β wt:F451X na proporção de 1:1 (0,5 μ g : 0,5 μ g) ou 1:5 (0,5 μ g : 2,5 μ g), 2,0 μ g do vetor repórter F2-Luc e 2,0 μ g de CMV- β Gal e tratadas com veículo por 24hrs. Dados apresentados na forma de atividade de Luciferase normalizada por atividade de β -galactosidase; n=3.

6.1.2 TR β_1 -F451X em Elemento Responsivo TRE-DR4

Considerando-se a taxa de ativação do TR β_1 wt na concentração de 10^{-6} M como 100%, observa-se que a presença de F451X na razão 1:1 e 1:5 em relação ao TR reduziu a atividade do TR β_1 wt para aproximadamente 76% e 65%, respectivamente, correspondendo a aproximadamente 24% e 26%, respectivamente, de redução da atividade máxima em relação ao TR β_1 wt (Figura 18).

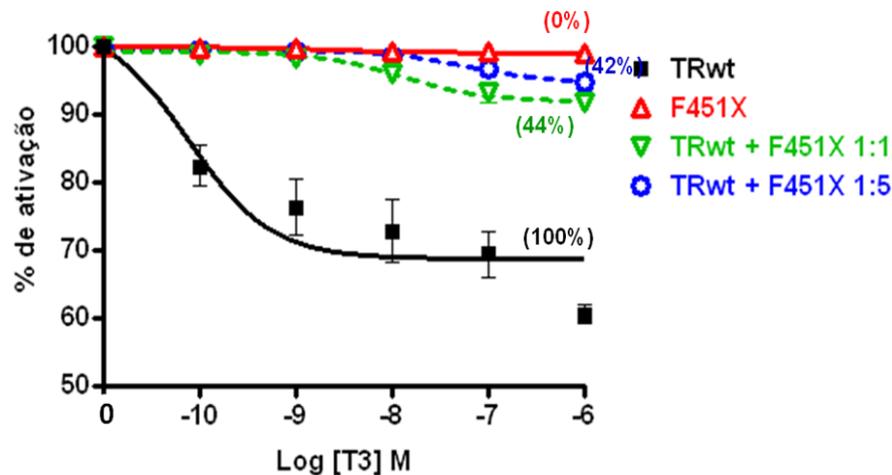


Figura 18. **O mutante TR β_1 -F451X exerce efeito dominante negativo em TRE-DR4.** Células mesangiais foram transfectadas com 0,5 μ g do vetor de expressão do TR β_1 wt ou F451X ou TR β wt:F451X na proporção de 1:1 (0,5 μ g : 0,5 μ g) ou 1:5 (0,5 μ g : 2,5 μ g), 2,0 μ g do vetor repórter TRE-DR4-Luc e tratadas com concentrações crescentes de T3 (10^{-10} M a 10^{-6} M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a ativação máxima considerando TR β_1 wt=100%; n=3.

Juntos, esses resultados confirmam o efeito dominante negativo do TR β_1 -F451X em TR β_1 wt na proporção de 1:1 e 1:5 nos elementos responsivos positivos TRE-F2 e TRE-DR4.

6.2 EFEITO DOMINANTE NEGATIVO DO MUTANTE F451X DA SRHT SOBRE TR β_1 WT EM ELEMENTO RESPONSIVO REGULADO NEGATIVAMENTE POR T $_3$

Confirmada a repressão exercida por TR β_1 -F451X na ação do TR β_1 wt em elementos responsivos regulados positivamente por T $_3$, avaliou-se, em seguida, a capacidade do mesmo mutante de exercer o efeito dominante negativo nos genes regulados negativamente pelo T $_3$. Foram realizados experimentos de cotransfecção

transiente e ensaio de gene repórter utilizando-se o gene da *LUC* dirigido pelos promotores do TRH e AP-1 nas proporções de 1:1 e 1:5 (μg de TR β_1 : μg de TR β_1 -F451X) em curvas dose-resposta com concentrações crescentes de T₃ (Figuras 19 a 22).

6.2.1 TR β_1 -F451X em promotor de TRH

Na figura 19, ao se considerar a repressão máxima dada por TR β_1 wt a 10^{-6}M de T₃ como 100%, observa-se que na presença do TR β_1 -F451X, a repressão exercida pelo TR β_1 wt é abolida (0% de repressão). Na razão de 1:1 e 1:5 de TR β_1 wt:TR β_1 -F451X ocorre a redução da repressão do TR β_1 wt para aproximadamente de 24% e 22%, respectivamente.

A figura 20 representa a ativação do TR wt e mutante na ausência do ligante em TRH luciferase/ βgal . O TR β_1 wt apresenta ativação transcricional maior na ausência do ligante em relação ao mutante em TRH. Na ausência do ligante, o TR β_1 wt está associado à coativadores o que não ocorre com o mutante TR β_1 F451X que não se associa à coativadores.

Portanto, o mutante F451X exerce efeito dominante negativo em TR β_1 wt na repressão do promotor do TRH.

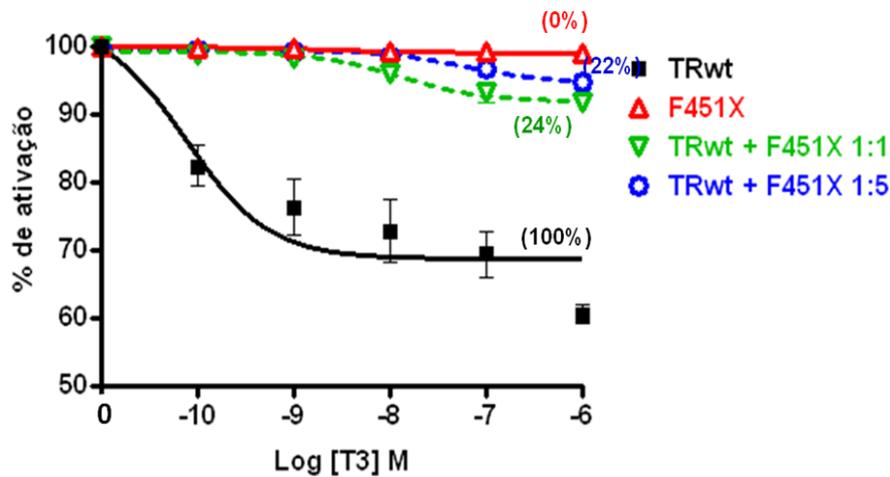


Figura 19. **TR β_1 -F451X exerce efeito dominante negativo sobre TR β_1 wt em promotor TRH.** Células mesangiais foram transfectadas com 0,5 μ g do vetor de expressão do TR β_1 wt ou TR β_1 -F451X ou TR β_1 wt:TR β_1 -F451X na proporção de 1:1 (0,5 μ g : 0,5 μ g) ou 1:5 (0,5 μ g : 2,5 μ g), 2,0 μ g do vetor repórter TRH-Luc e tratadas com concentrações crescentes de T3 (10^{-10} M a 10^{-6} M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a repressão máxima considerando TR β_1 wt=100%; n=3.

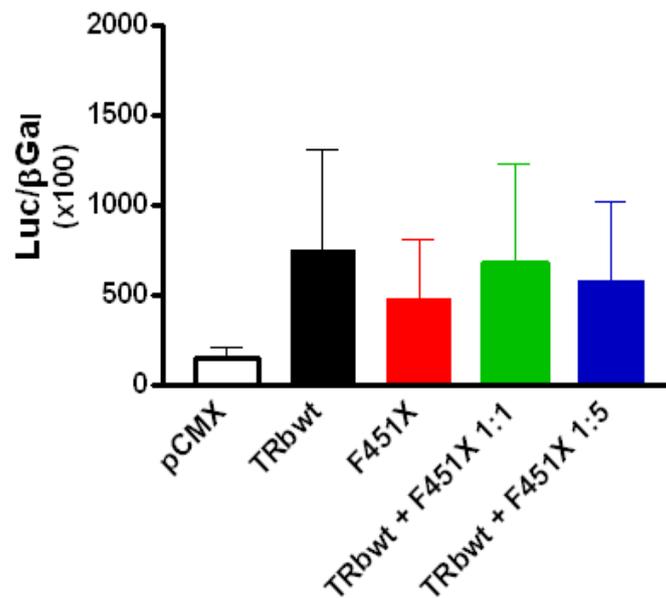


Figura 20. **Ativação do TR β_1 wt nativo e mutante na ausência do ligante em TRH.** Células mesangiais foram transfectadas com 0,5 μ g do vetor de expressão do TR β_1 wt ou TR β_1 -F451X ou TR β_1 wt:TR β_1 -F451X na proporção de 1:1 (0,5 μ g : 0,5 μ g) ou 1:5 (0,5 μ g : 2,5 μ g), 2,0 μ g do vetor repórter TRH-Luc e 2,0 μ g de CMV- β Gal e tratadas com veículo por 24hrs. Dados apresentados na forma de atividade de Luciferase normalizada por atividade de β -galactosidase. n=3

Portanto, o mutante F451X exerce efeito dominante negativo em TR β_1 wt na repressão do promotor do TRH.

6.2.2 TR β_1 -F451X em promotor de AP-1

Foram investigados também os efeitos do mutante TR β_1 -F451X no promotor da colagenase, mais especificamente no elemento AP-1 desse promotor.

Considerando a atividade do TR β_1 wt na concentração de 10^{-6} M de T₃ como 100%, observa-se que o mutante não conseguiu reprimir a transcrição do AP-1, assim como foi observado no promotor TRH (Figura 21).

Na figura 21, observa-se que o TR β_1 -F451X, não exerce seu efeito repressor com T₃ (0% de repressão). Na razão de 1:1 e 1:5 ocorre a redução da repressão do TR β_1 wt para aproximadamente 45% e 43% respectivamente, na mesma concentração de 10^{-6} M de T₃ (Figura 21).

A figura 22 representa a ativação do TR β_1 wt e mutante TR β_1 -F451X na ausência do ligante em AP-1 luciferase/ β gal. O TR β_1 wt apresenta ativação transcricional menor na ausência do ligante em relação ao mutante TR β_1 -F451X em TRH.

Conclui-se que em AP-1, o mutante TR β_1 -F451X exerce efeito dominante negativo sobre TR β_1 wt, abolindo a repressão exercida por TR β_1 wt dependente de T₃.

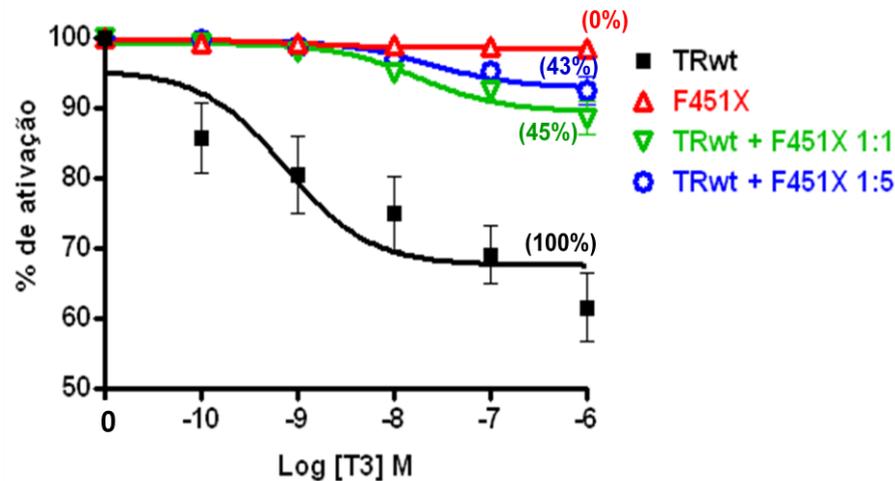


Figura 21. **TR β_1 -F451X exerce efeito dominante negativo em AP-1.** Células mesangiais foram transfectadas com 0,5 μ g do vetor de expressão do TR β_1 wt ou TR β_1 -F451X ou TR β_1 wt:TR β_1 -F451X na proporção de 1:1 (0,5 μ g: 0,5 μ g) ou 1:5 (0,5 μ g : 2,5 μ g), 2,0 μ g do vetor repórter AP-1-Luc e tratadas com concentrações crescentes de T3 (10^{-10} M a 10^{-6} M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a repressão máxima considerando TR β_1 wt=100%; n=3.

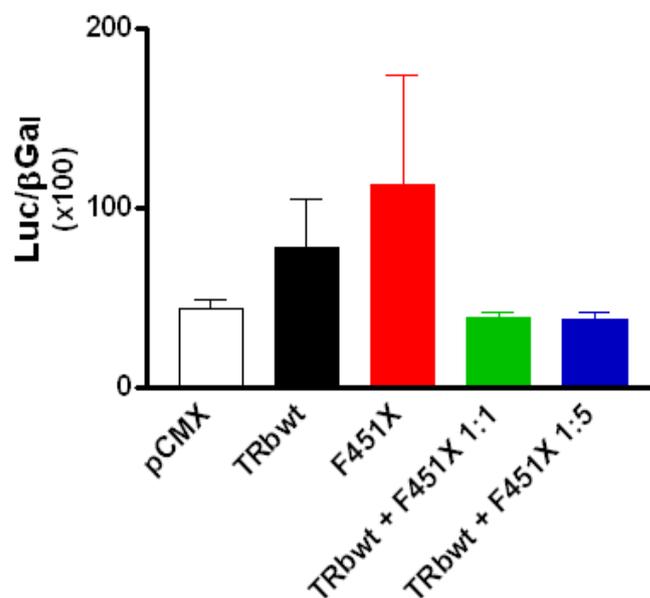


Figura 22. **Ativação do TR nativo e mutante na ausência do ligante em sítio AP-1.** Células mesangiais foram transfectadas com 0,5 μ g do vetor de expressão do TR β_1 wt ou TR β_1 -F451X ou TR β_1 wt: TR β_1 -F451X na proporção de 1:1 (0,5 μ g: 0,5 μ g) ou 1:3 (0,5 μ g : 2,5 μ g), 2,0 μ g do vetor repórter AP-1-Luc e 2,0 μ g de CMV- β Gal e tratadas com veículo por 24hrs. Dados apresentados na forma de atividade de Luciferase normalizada por atividade de β -galactosidase; n=3.

Os resultados obtidos para TRH e AP-1, sugerem que TR β_1 -F451X exerce efeito dominante negativo sobre o receptor TR β_1 wt.

Observados esses efeitos, perguntamo-nos se a dimerização é importante para que ocorra a dominância negativa. Para isso usamos duas estratégias: (i) realizamos transfecções e ensaios de gene repórter com mutantes que atrapalham a dimerização do TR tanto em LBD (3XLBD) como em DBD (4XDBD) quanto em ambos os domínios LBD e DBD (3XLBD/4XDBD) em promotor TRH e AP-1; e (ii) utilizamos a técnica de ensaio de alteração de mobilidade em gel (EMSA) para detectarmos a formação de monômeros e heterodímeros diretamente nas sequências de oligonucleotídeos dos promotores estudados.

6.3 IMPORTÂNCIA DA DIMERIZAÇÃO PARA A DOMINÂNCIA NEGATIVA

6.3.1 Efeito de mutantes de dimerização no promotor do TRH

Decidimos, então, examinar a importância da dimerização do TR em promotor de TRH utilizando o mutante 3XLBD. Há uma tripla mutação no LBD, nos resíduos Leu 400 para Arg (L400R), Leu 422 para Arg (L422R) e Met 423 para Arg (M423R), que não permite que o TR se dimerize pelo LBD.

Na figura 24, considerando a repressão do TR β_1 wt como 100%, observa-se que o mutante teve uma repressão máxima de aproximadamente 57%. Além disso, o IC₅₀ do mutante 3XLBD (IC₅₀= 874,3x10⁻¹¹M) foi aproximadamente 440 vezes maior do que o do TR β_1 nativo (IC₅₀= 1,951x10⁻¹¹M), mostrando que uma dose muito maior de T₃ é necessária para a repressão no promotor do TRH.

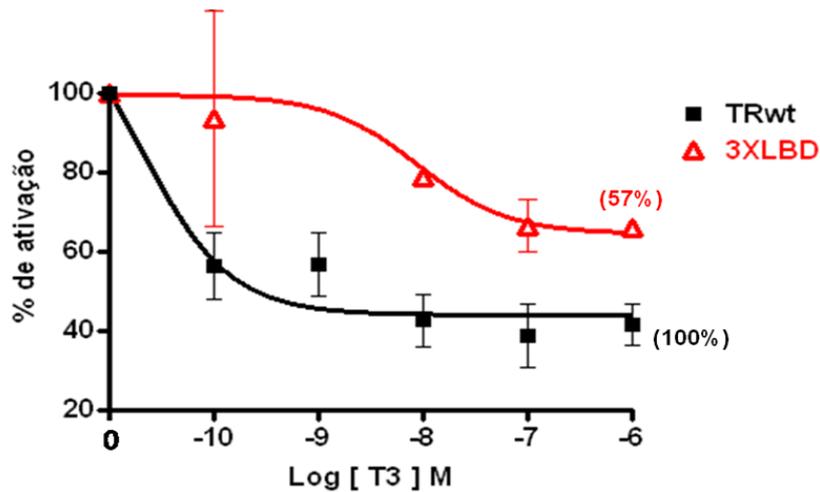


Figura 23. **A dimerização pelo LBD é importante para se ter efeito dominante negativo em promotor TRH.** Células mesangiais foram transfectadas com 1,0 μg do vetor de expressão do $\text{TR}\beta_1$ wt ou 3XLBD, 4,0 μg do vetor repórter TRH-Luc e tratadas com concentrações crescentes de T3 (10^{-10}M a 10^{-6}M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a repressão máxima considerando $\text{TR}\beta_1$ wt=100%; n=3.

Quando se analisou o mutante 4XDBD, que possui quatro mutações, D104A, Y117A, R120A e D177A, que não permitem que o TR se dimerize pelo DBD, observou-se um resultado diferente do mutante 3XLBD. Na figura 25, a repressão da transcrição pelo promotor do TRH conduzida por esse mutante não mostrou diferença entre a curva dose-resposta quando comparada ao do $\text{TR}\beta_1$ wt. Considerando-se a repressão do $\text{TR}\beta_1$ nativo na concentração de 10^{-6}M de T_3 como 100%, observa-se que o mutante 4XDBD apresentou a mesma repressão máxima.

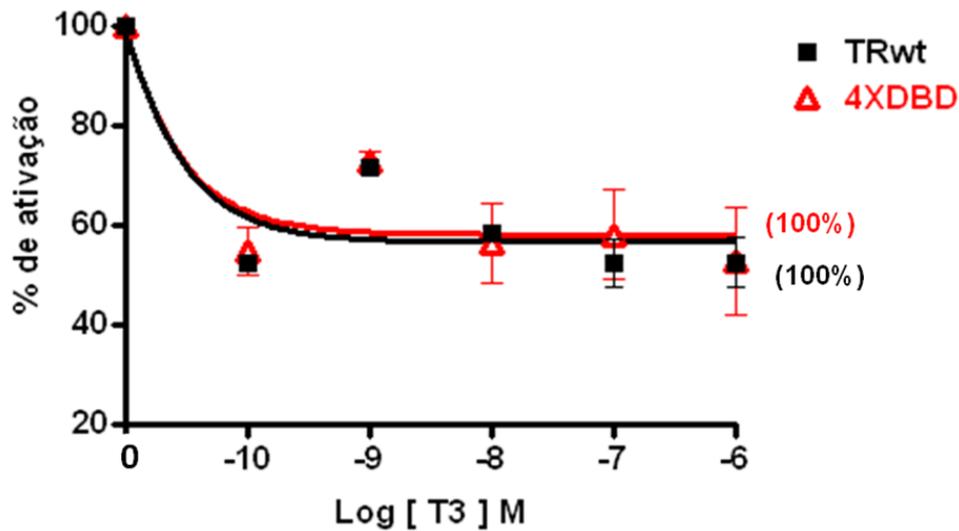


Figura 24. Não há aparente contribuição da superfície de dimerização do DBD para que haja o efeito dominante negativo em promotor TRH. Células mesangiais foram transfectadas com 1,0 μg do vetor de expressão do TR β_1 wt ou 4XDBD, 4,0 μg do vetor repórter TRH-Luc e tratadas com concentrações crescentes de T3 (10^{-10}M a 10^{-6}M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a repressão máxima considerando TR β_1 wt=100%; n=3.

Por outro lado, na figura 26, quando se utilizou o mutante 3XLBD/4XDBD, que possui mutações que não permitem a dimerização do TR tanto pelo LBD como pelo DBD, observou-se que o mutante reprimiu a transcrição no promotor do TRH em 29%, considerando-se a repressão máxima de TR β_1 wt como 100% na concentração de 10^{-6}M de T $_3$.

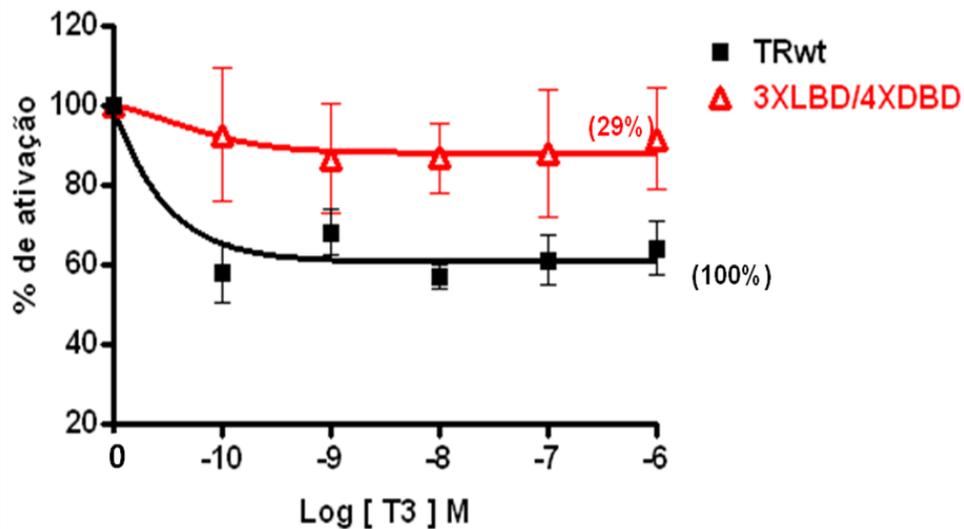


Figura 25. **Efeito aditivo de mutações na superfície de dimerização do LBD e DBD na repressão em promotor TRH.** Células mesangiais foram transfectadas com 1,0 μg do vetor de expressão do TR β_1 wt ou 3XLBD/4XDBD, 4,0 μg do vetor repórter TRH-Luc e tratadas com concentrações crescentes de T3 (10^{-10}M a 10^{-6}M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a repressão máxima considerando TR β_1 wt=100%; n=3.

A combinação desses resultados sugerem que, no promotor do TRH, TR regula a transcrição por dimerização, utilizando principalmente o LBD. Apesar de, aparentemente, a atividade transcricional do mutante 3XDBD ser comparável a do TR β_1 wt, observamos que há um efeito aditivo dessas mutações em DBD quando associado a mutações no LBD (mutante 3XLBD/4XDBD).

6.3.2 Efeitos de mutantes de dimerização no promotor do AP-1

Na figura 26, vimos o efeito dos mutantes de dimerização no sítio AP-1, que é um sítio no promotor da collagenase onde o TR atua também através de um mecanismo negativo. O mutante 3XLBD teve uma repressão máxima de 60.43%

somente na dose de 10^{-6} M de T_3 , em relação a $TR\beta_1$ wt (100%) Nas concentrações de 10^{-10} M a 10^{-7} M, não foi observada nenhuma repressão. Com esses resultados, pode-se inferir que mutações na superfície de dimerização do LBD acarretam em uma menor resposta ao T_3 em promotor AP-1.

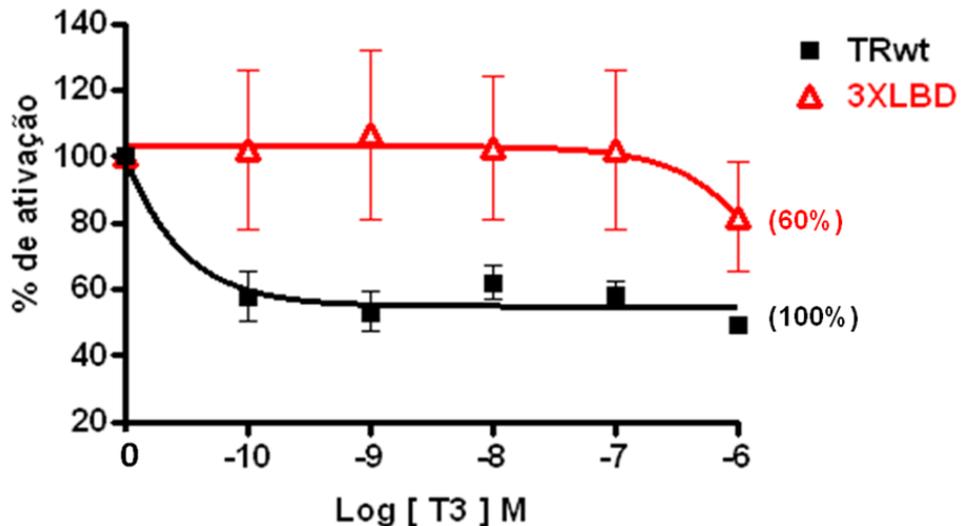


Figura 26. **Efeito dominante negativo em AP-1 é dependente da dimerização.** Células mesangiais foram transfectadas com 1,0 μ g do vetor de expressão do $TR\beta_1$ wt ou 3XLBD/4XDBD, 4,0 μ g do vetor repórter AP-1-Luc e tratadas com concentrações crescentes de T_3 (10^{-10} M a 10^{-6} M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a repressão máxima considerando $TR\beta_1$ wt=100%; n=3.

Os resultados obtidos para TRH e AP-1 sugerem que a dimerização pelo LBD é importante na dominância negativa sobre $TR\beta_1$ wt .

6.3.3 DIMERIZAÇÃO EM F2, TRH E AP-1

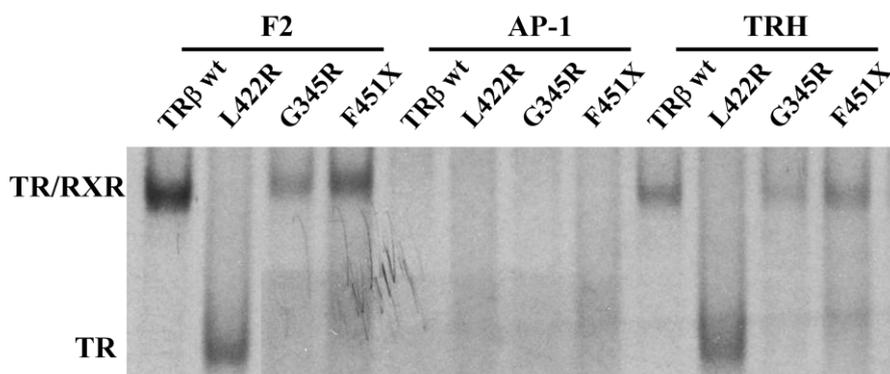


Figura 27. **A heterodimerização de TR ocorre em TRE-F2 e TRH, mas não em AP-1.** Reações contendo 2 μ L de [35 S]-TRs wt ou mutantes e 4 μ L de RXR α e traduzidos *in vitro*, 40 ng de oligonucleotídeos TRE-F2, TRH ou AP-1, 1 μ g de poli(dIdC) e tampão de ligação em volume total de 20 μ L foram tratadas com veículo ou 10^{-6} M de T_3 e submetidos à eletroforese em gel de poli(acrilamida) nativo. Gel foi submetido a secagem e à exposição em filme radiográfico.

Com o EMSA foi possível observar a formação de heterodímeros (TR β_1 wt/RXR ou TR β_1 mutante/RXR) e monômeros em genes regulados positivamente pelo T_3 (TRE-F2) que será o controle positivo para TR β_1 wt e em genes regulados negativamente pelo T_3 (TRH e AP-1).

Na figura 27, observamos que o TR β_1 -F451X e o TR β_1 -G345R se heterodimerizam com RXR em elemento responsivo regulado positivamente como o TRE-F2 e com o elemento regulado negativamente TRH. Essa dimerização não foi observada em AP-1.

Em TRH, os resultados sugerem que a dominância negativa ocorre pela heterodimerização do mutante com o RXR, pois observamos dominância negativa nos ensaios de gene repórter.

Em AP-1, confirmamos que o heterodímero TR/RXR não se liga diretamente à essa sequência de nucleotídeos .

6.4 INFLUÊNCIA DO MUTANTE TR β ₁-F451X DA SRHT EM GENES REGULADOS POR PPAR GAMA

Como citado anteriormente, o TR wt e seus mutantes podem interferir com a função de PPAR. Foram feitos experimentos para investigar a interferência de mutantes do TR sobre o PPAR. Inicialmente foi testada a influência do TR β ₁ wt e o mutante TR β ₁-F451X da SRHT sobre PPAR γ em seu elemento responsivo positivo DR1, quando ativado por seu ligante sintético rosiglitazona (rosi).

Na Figura 28, observa-se que as curvas dose-resposta de PPAR γ tratado com rosi e TR β ₁ wt:PPAR na proporção de 1:1 tratado somente com rosi ou com rosi e T₃ se sobrepõe. O TR β ₁ wt não exerceu efeito dominante negativo sobre o PPAR γ nessas condições. Em DR-1, o TR β ₁ wt e PPAR γ :TR β ₁ wt na proporção 1:1 são tratados com T₃ também não há atividade transcricional. Ou seja, a ativação transcricional nesse PPARE é responsiva somente à ativação de PPAR com rosi.

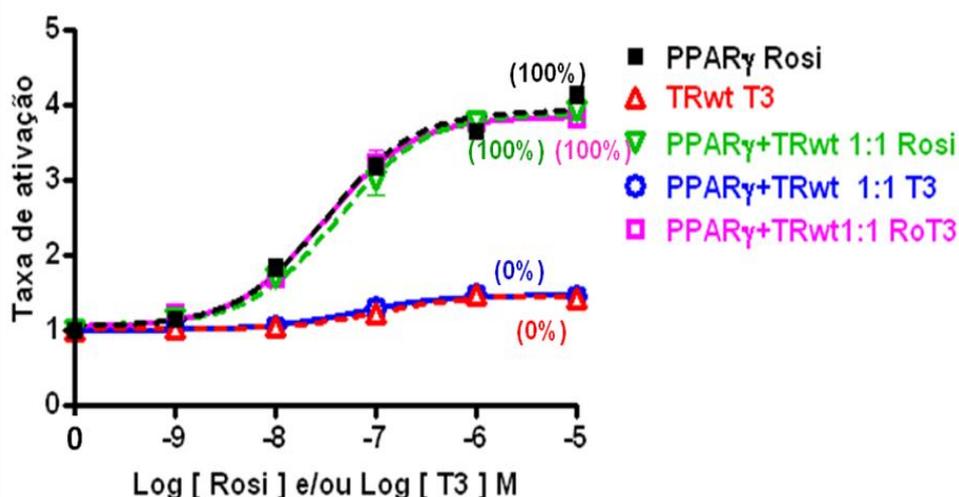


Figura 28. TR β ₁ wt não exerce dominância negativa no PPAR γ em DR1 na proporção 1:1. Células mesangiais foram transfectadas com 1,5 μ g do vetor de expressão do PPAR γ ou TR β ₁ wt ou PPAR γ :TR β ₁ wt na proporção de 1:1 (1,5 μ g: 1,5 μ g) ou 1:5, 3,0 μ g do vetor repórter DR1-Luc e tratadas com concentrações crescentes de rosiglitazona e/ou T₃ (10⁻⁹M a 10⁻⁵M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a repressão máxima considerando PPAR γ =100%; n=3.

Como o resultado obtido não reproduziu os dados observados na literatura de que o TR β_1 interfere na atividade de PPAR γ , decidimos testar uma proporção cinco vezes maior de TR β_1 wt (Fig. 29) em relação a PPAR γ .

Observamos nesse gráfico que, considerando a taxa de ativação máxima atingida pelo PPAR γ na concentração de 10^{-5} M de rosiglitazona como 100%, observamos que PPAR γ :TR β_1 wt na proporção 1:5 tratado com rosi ou com rosi e T $_3$ apresentaram aproximadamente 78% e 71%, respectivamente, de ativação máxima. Esses resultados indicam que o TR β_1 wt exerceu efeito dominante negativo sobre o PPAR γ em DR1 somente quando presente em proporção maior do que PPAR γ . Como tal efeito ocorre tanto nos ensaios tratados com rosiglitazona ou rosiglitazona + T $_3$, observamos que é independente da ligação de T $_3$ ao TR.

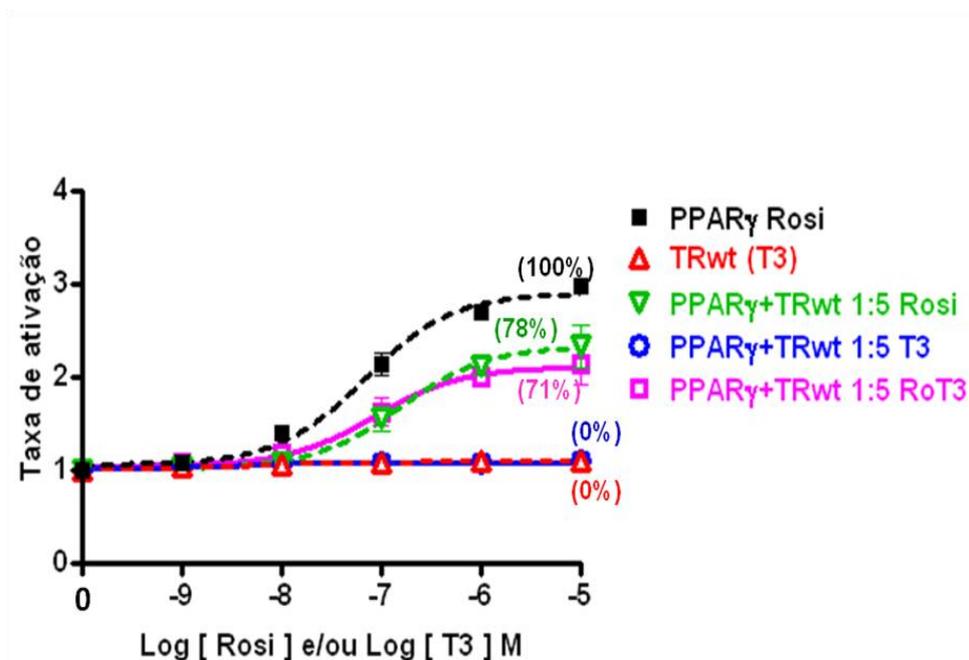


Figura 29. **TR β_1 wt exerce dominância negativa no PPAR γ em DR1 na proporção 1:5.** Células mesangiais foram transfectadas com 1,5 μ g do vetor de expressão do PPAR γ ou TR β_1 wt ou PPAR γ :TR β_1 wt na proporção de 1:5 (1,5 μ g: 7,5 μ g) ou 1:5, 3,0 μ g do vetor repórter DR1-Luc e tratadas com concentrações crescentes de rosiglitazona e/ou T $_3$ (10^{-9} M a 10^{-5} M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a repressão máxima considerando PPAR γ =100%; n=3.

Observamos em seguida, se o efeito exercido pelo mutante TR β_1 -F451X da SRHT seria semelhante ao exercido por TR β_1 wt em PPAR γ .

Na figura 30, observamos que quando a taxa de ativação máxima de PPAR γ a 10^{-5} M de rosi é considerada como 100%, PPAR γ :TR β_1 -F451X na proporção de 1:1 tem sua ativação reduzida para 65,68%. Visto que o TR β_1 -F451X liga-se com baixa afinidade ao T $_3$ e que, conforme observado no gráfico anterior (Figura 29) o efeito dominante negativo do TR é independente de T $_3$, o tratamento com esse hormônio não interfere na repressão, resultando em taxa de ativação máxima semelhante de 66,88%. Ou seja, esses resultados indicam que o mutante TR β_1 -F451X exerceu efeito dominante negativo sobre o PPAR γ em DR1 na proporção de 1:1.

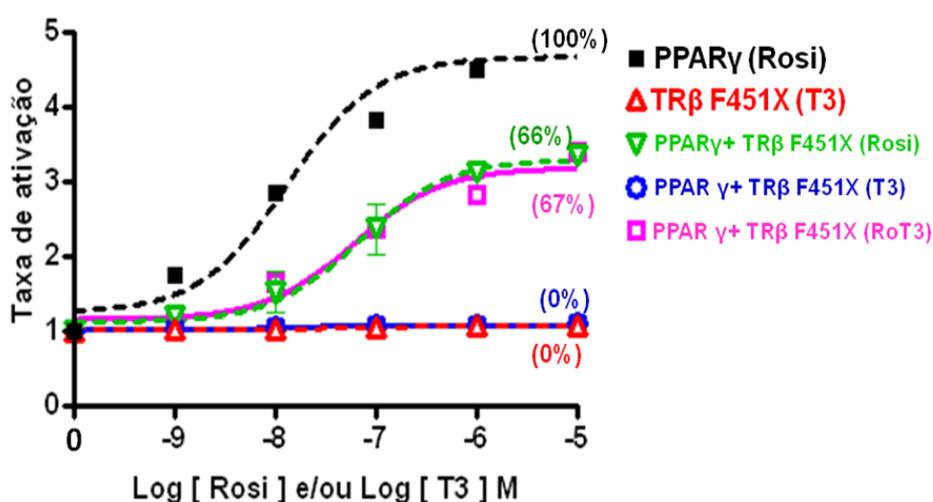


Figura 30. **TR β_1 -F451X exerce dominância negativa sobre PPAR γ em DR1.** Células mesangiais foram transfectadas com 1,5 μ g do vetor de expressão do PPAR γ ou TR β_1 -F451X ou PPAR γ :TR β_1 -F451X na proporção de 1:1 (1,5 μ g: 1,5 μ g) ou 1:5, 3,0 μ g do vetor repórter DR1-Luc e tratadas com concentrações crescentes de rosiglitazona e/ou T $_3$ (10^{-9} M a 10^{-5} M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a repressão máxima considerando PPAR γ =100%; n=3.

Ficamos intrigados ao observar que a proporção de 1:1, PPAR γ :TR β_1 -F451X, teve o mesmo efeito que o PPAR γ :TR β_1 wt na proporção de 1:5. Supomos que seria necessário que houvesse dimerização do TR β_1 -F451X para que ele exercesse seu efeito dominante negativo em PPAR γ , por isso prosseguimos o estudo utilizando o

mutante TR β_1 L422R/F451X. A presença da mutação L422R no TR mutante F451X impediria a dimerização do receptor.

Na figura 31, TR β_1 -L422R/F451X:PPAR γ na proporção de 1:1 perdeu o efeito dominante negativo apresentado por TR β_1 -F451X (Figura 30), sugerindo que a dimerização do receptor é importante para se observar o efeito dominante negativo. O F451X é capaz de exercer o efeito dominante negativo, mas quando perde a capacidade de se dimerizar (mutante TR β_1 -L422R/F451X) o efeito de dominância negativa não é mais observado.

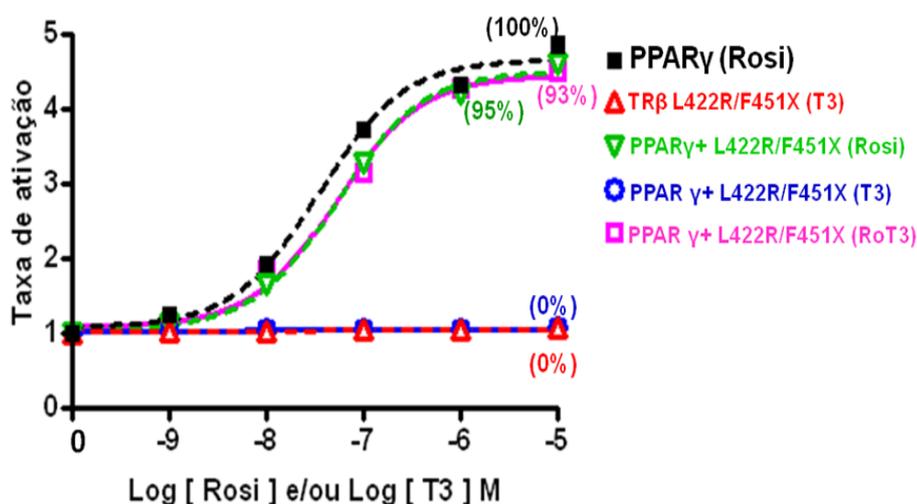


Figura 31. **TR β_1 -L422R/F451X não exerce dominância negativa no PPAR γ em DR1.** Células mesangiais foram transfectadas com 1,5 μ g do vetor de expressão do PPAR γ ou TR β_1 -L422R/F451X ou PPAR γ :TR β_1 -L422R/F451X na proporção de 1:1 (1,5 μ g: 1,5 μ g) ou 1:5, 3,0 μ g do vetor repórter DR1-Luc e tratadas com concentrações crescentes de rosiglitazona e/ou T $_3$ (10^{-9} M a 10^{-5} M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a repressão máxima considerando PPAR γ =100%; n=3.

Tendo o conhecimento de que a dimerização é importante para se observar o efeito dominante negativo, outra mutação foi testada. Verificamos se o recrutamento de correpressores também é importante para observar o efeito de dominância negativa, pois em genes regulados positivamente a interação com correpressores impede a ativação transcricional. Foi utilizado o mutante TR β_1 -I280R/F451X. A

mutação em I280R faz com que o TR perca a capacidade de recrutar correpressores.

Como se pode observar na figura 32, TR β_1 -I280R/F451X:PPAR γ não exerceu efeito sobre a atividade transcricional de PPAR γ em DR1, sugerindo que o recrutamento de correpressores pelo receptor também é importante para que ocorra a dominância negativa.

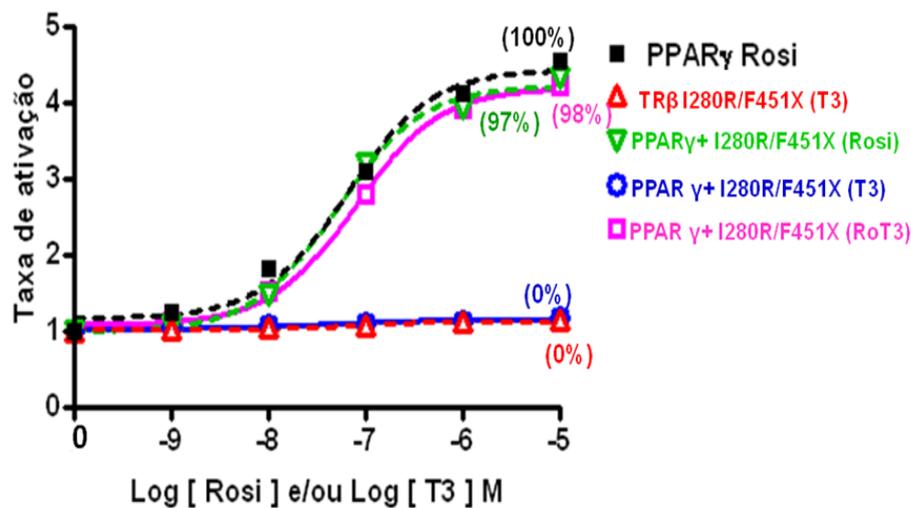


Figura 32. O mutante TR β_1 -I280R/F451X não exerce dominância negativa no PPAR γ em DR1. Células mesangiais foram transfectadas com 1,5 μ g do vetor de expressão do PPAR γ ou TR β_1 -I280R/F451X ou PPAR γ :TR β_1 -I280R/F451X na proporção de 1:1 (1,5 μ g: 1,5 μ g) ou 1:5, 3,0 μ g do vetor repórter DR1-Luc e tratadas com concentrações crescentes de rosiglitazona e/ou T₃ (10⁻⁹M a 10⁻⁵M) por 24hrs. A atividade de luciferase foi medida após lise das células. A taxa de ativação foi calculada com base no valor obtido para o tratamento na presença de veículo para cada transfecção. Os percentuais entre parêntesis no gráfico representam a repressão máxima considerando PPAR γ =100%; n=3.

Juntos, os resultados sugerem que para que o TR β_1 wt ou o mutante TR β_1 -F451X da SRHT consiga atrapalhar a atividade transcricional do PPAR γ , é preciso que este se dimerize com o PPAR γ e recrute correpressores.

7. DISCUSSÃO

A patogenia molecular da SRHT é multifatorial, porém dentre os mecanismos mais importantes destaca-se a competição do receptor mutante e o receptor normal pela interação com as sequências alvo de DNA e a formação de heterodímeros inativos entre o receptor normal e o receptor mutante (125, 143-146).

Apesar da ativação da transcrição regulada por T_3 estar mais bem definida, a atividade repressora dos HTs também exerce uma ação fundamental na regulação de diversos genes envolvidos na diferenciação, proliferação celular e metabolismo. Dentre os genes regulados negativamente, os mais importantes são os genes que codificam o TRH e o TSH. Através do mecanismo de *feedback*, o aumento das concentrações séricas de T_3 e T_4 inibe a expressão de TRH e TSH, em nível hipotalâmico e hipofisário, respectivamente. O T_3 regula negativamente a atividade transcricional destes genes via elementos responsivos negativos (nTREs). O mecanismo molecular envolvido na regulação negativa precisa ser mais bem esclarecido.

Diferente dos elementos responsivos positivos, uma sequência consenso para os nTREs ainda não foi estabelecida. É conhecido que o TR se liga a sequências específicas dentro dos promotores do TRH e TSH e ativa a transcrição na ausência do ligante. O estado ativador é convertido ao repressor com a chegada do hormônio. Este é um processo que envolve um complexo de inúmeras proteínas que modulam a transcrição pela compactação das cromatinas, mudança conformacional do TR interagindo com o DNA e da possibilidade de homodimerização (TR-TR) e heterodimerização (TR/RXR).

Investigamos o efeito dominante negativo do mutante $TR\beta_1$ -F451X em promotores dos genes TRH e AP-1 regulados negativamente pelo T_3 e a importância da dimerização para sua ocorrência.

Confirmamos, inicialmente, conforme observado por outros autores, que o mutante $TR\beta_1$ -F451X não consegue ativar a transcrição e que sua presença juntamente com $TR\beta_1$ wt na proporção de 1:1 e 1:5 prejudica acentuadamente a ação do $TR\beta_1$ wt em TRE-F2 e TRE-DR4 (135,136,143,146).

Observamos que o $TR\beta_1$ -F451X teve atividade transcricional no promotor do TRH, mas não conseguiu reprimir a transcrição (Figura 18 e 19). Uma explicação

pode ser dada pelo fato de que esta mutação se caracteriza pela ligação ávida a correpressores, principalmente o SMRT (128,136) e como nos genes regulados negativamente os correpressores participam da ativação (80,130), o TR β_1 -F451X consegue ativar a transcrição na ausência do hormônio, mas não consegue reprimi-la na presença do hormônio. Há também um impedimento na associação com coativadores, que neste contexto participariam da repressão e, por isso, o TR β_1 -F451X não consegue reprimir a transcrição na presença de T₃. A atividade dominante negativa é diminuída quando a mutação TR β_1 -P214R, que reduz a ligação com correpressor é inserida nos mutantes as SRHT (130). Quando correpressores (SMRT ou NCoR são cotransfectados nos promotores regulados negativamente aumentam a ativação basal na ausência de T₃ (76). Esses achados indicam que correpressores estão envolvidos na patogênese da SRHT e desenvolvem um importante papel no controle dos genes regulados negativamente (147).

Quando cotransfectado com TR β_1 wt, o TR β_1 -F451X reduziu em 56% e 58% a inibição transcricional do TRH, nas proporções 1:1 e 1:5 respectivamente. Isto já foi observado em estudos anteriores (125,145,148,149,150), porém a base para o requerimento de um excesso de receptores mutados e sua relevância para SRHT não é clara. Foram relatadas duas mutações encontradas na SRHT (R429Q e R383H) (147) que exerceram ação dominante negativa sobre o TR β_1 wt no promotor do TRH. É interessante que estas mutações não influenciavam negativamente o TR β_1 wt em elementos responsivos positivos. É possível que sinais clínicos da SRHT, como por exemplo, elevados níveis de HT, sejam indicadores mais sensíveis da inibição do receptor do que nossos ensaios *in vitro* de expressão gênica, devido à natureza artificial desses experimentos, pois existem estudos relatando que a atividade inibitória de receptores mutados, que possuem afinidade reduzida de ligação ao T₃, é eliminada em altas concentrações do hormônio (124,125,134,144).

A dominância negativa também foi observada em relação ao promotor AP-1. O mutante F451X apresentou atividade transcricional neste promotor, mas não conseguiu reprimir a transcrição na presença de hormônio. Para que ocorra a atividade dominante negativa é importante que ocorra a ligação direta do TR mutante ao DNA (10,25). Embora segundo Velasco e col. (2007), a ligação direta ao DNA do TR mutado seja considerada importante, no caso do sítio AP-1 não há essa ligação direta, mas sim a interação com as oncoproteínas c-Jun e c-Fos (10).

Os resultados aqui obtidos contrastam com os observados no laboratório FarMol anteriormente nos quais não se observou o efeito dominante negativo do mutante F451X em TRH e AP-1, em ensaios de gene repórter em células U937 de monócitos de linfoma humano (9). Além disso, foi descrito por Safer e col. (1997) que os mutantes da isoforma TR β_1 , R429Q, R338W e R338L, da resistência hipofisária, apresentaram uma fraca dominância negativa no promotor do TRH, mesmo com excesso de 10 vezes do mutante em relação ao TR wt, mas tiveram uma forte atividade dominante negativa quando expressos na isoforma TR β_2 nos mesmos promotores. Dessa forma, a síndrome causada por essas mutações é limitada aos tecidos, pituitária anterior e hipotálamo, que expressam esta isoforma. Os mutantes da resistência generalizada tiveram atividade dominante negativa similar em ambas isoformas do TR β .

Nossos resultados sugerem que no promotor do TRH, o TR regula a transcrição via dimerização pois o TR β_1 wt, F451X e G345R se heterodimerizam com RXR em TRH. Em AP-1 não foi observada a formação de heterodímeros, embora ocorra a dominância negativa nesse promotor. O LBD pode ser importante para a interação com c-fos e c-jun para observarmos esse efeito dominante negativo. Quando testamos a importância da dimerização em LBD e em DBD, observamos que o domínio LBD parece ser mais importante que o domínio DBD para a dominância negativa, pois a mutação que prejudica a dimerização em DBD (4XDBD) não modificou a eficiência da transcrição mediada por TR β_1 nativo ao contrário da mutação que prejudica a dimerização em LBD (3XLBD) (68).

Os resultados observados precisam ser complementados para que possamos entender melhor o efeito dominante negativo do F451X sobre o TR wt em TRH e AP-1. É importante avaliar o efeito em outras linhagens celulares a fim de verificarmos se a ocorrência da dominância negativa ocorre de forma específica para diferentes tecidos. É interessante investigar como a dominância negativa observada em AP-1, pois confirmamos que nesse elemento não ocorre heterodimerização do TR wt com o RXR diretamente em AP-1. Destaca-se o papel proeminente dos receptores nucleares como anticoncogênicos. Uma vez que os oncogenes *ras* e *src* ativam c-Jun e c-Fos por meio da cascata de ativação da proteína quinase C, o TR exerce o papel contrário, suprimindo a proliferação celular iniciada pelas oncoproteínas. Isto faz com que células que são “down” reguladas pelo TR sejam mais suscetíveis às respostas do fator de crescimento, promotores de tumor e atividade oncogênica.

Mutações nos TRs também podem aumentar a efetividade dos oncogenes (65). Dessa forma, é importante investigar se os TRs ou outros receptores nucleares que possuem atividade anti AP-1 estão mutados ou tiveram sua expressão reduzida em células neoplásicas. Nesse contexto é interessante notar que muitas células de tumor de pulmão carregam uma deleção no cromossomo 3, que codifica o gene do TR β , portanto as pessoas que apresentam essa deleção não possuem o TR β no pulmão, podendo ser um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão (151, 152).

O efeito do mutante TR β_1 -L422R/F451X também deve ser testado em TRH em ensaios de gene repórter para entendermos melhor se a dimerização do F451X com o TR wt é importante para a dominância negativa observada.

Baseado em relatos de que o PPAR se dimeriza com o TR, o segundo objetivo estudado foi a dominância negativa exercida por TR β_1 wt e mutante TR β_1 -F451X da SRHT em PPAR γ em DR1 regulados pelo PPAR γ .

Nossos resultados mostraram que o TR β_1 wt na proporção 1:5 com PPAR γ e o mutante TR β_1 -F451X na proporção 1:1 apresentaram um efeito de dominância negativa no PPAR γ . Uma quantidade de em excesso de TR β_1 wt é necessária para interferir na atividade de PPAR, mas a presença de TR β_1 -F451X na mesma proporção que PPAR é suficiente para inibir sua função.

A dimerização e a interação com correpressores parecem ser importantes, pois não houve dominância negativa dos mutantes TR β_1 -L422R/F451X e TR β_1 -I280R/F451X em PPAR γ , respectivamente. Como citado anteriormente, estudos demonstraram que o mutante do TR β_1 , Δ 337T (deleção de Treonina na posição 337) exerce efeito dominante negativo em PPAR α no coração, alterando a expressão do receptor nuclear. Esses resultados, portanto, indicam que as respostas dos ligantes de PPARs podem ser influenciadas pela função do TR em seus respectivos receptores e isoformas de ação (17). Além disso, um estudo demonstrou que o mutante TR β_1 PV heterodimeriza-se com PPAR γ *in vitro* e inibe a ligação entre PPAR γ e seu elemento responsivo, de forma independente de T₃ e RXR (11).

Mutações em heterozigose que levam à perda de função de receptores TR β e PPAR γ são associadas à SRHT e à resistência insulínica severa, respectivamente. Em cada caso, os receptores mutados inibem a ação de receptores nativos de uma forma dominante negativa. Estudos mostram que o hormônio tireoideano afeta a homeostase da glicose por suas ações no músculo esquelético, no fígado e no

metabolismo oxidativo e não oxidativo da glicose e que o estresse oxidativo na diabetes pode ser regulado de forma dose dependente do hormônio tireoideano (156). Existem evidências que o hipotireoidismo está associado a um aumento do estresse oxidativo e hipercolesterolemia e esse estresse oxidativo é muito maior quando comparado à presença de hormônio tireoideano (157). Em nosso estudo, observamos que tanto o TR β_1 wt como TR β_1 mutantes podem influenciar o receptor PPAR γ de uma maneira dominante negativa podendo desencadear possíveis sinais e sintomas de resistência à insulina.

Sugerimos que novos estudos sejam realizados para compreender como essa interferência se dá em nível molecular e se a interferência do TR β_1 wt e TR β_1 -F451X ocorre por dimerização com o RXR ou com o PPAR γ em DR1 (150). Precisamos comprovar que o mutante TR β_1 -I280R/F451X estava sendo expresso no experimento para elucidarmos a importância da interação com correpressores para a atividade de dominância negativa observada pelo TR β_1 -F451X em PPAR γ (150).

8. CONCLUSÃO

Nossos resultados confirmaram que o mutante F451X prejudicou a ação do TR nativo em F2 e em DR4. Observamos que o mutante exerceu efeito dominante negativo sobre o TR nativo nos promotores TRH e AP-1. Em ensaios *in vivo*, observamos que no promotor TRH e AP-1, o TR nativo regulou a transcrição via dimerização, principalmente utilizando-se do domínio LBD. Em ensaios *in vitro*, vimos que ocorre heterodimerização do TR β_1 wt e mutantes da SRHT com RXR em TRH. Não observamos a formação de heterodímeros em AP-1, o que está de acordo com a literatura de que a dominância negativa neste ocorre por ligação indireta ao DNA.

Em genes regulados por PPAR, verificamos que o TR β_1 wt quando presente em excesso interfere na ativação transcricional de PPAR, mas que o mutante TR β_1 -F451X em proporção semelhante ao PPAR apresentam efeito semelhante de dominância negativa no PPAR γ . Para que esse efeito ocorra, a dimerização e a interação com correpressores parecem ser importantes.

9. REFERÊNCIAS

1. Refetoff S, DeWind LT, DeGroot LJ. Familial syndrome combining deaf-mutism, stippled epiphyses, goiter and abnormality high PBI: possible target organ refractoriness o thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1967;27:279-94.
2. Refetoff, S. Syndromes of thyroid hormone resistance. *Am J Physiol* 1982;243:E88-98.
3. Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ. The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocrine Reviews* 1993;14:248-399.
4. Beck-Peccoz P, Chatterjee VK. The variable clinical phenotype in thyroid hormone resistance syndrome. *Thyroid* 1994;4:225-32.
5. Yen PM. Molecular basis of resistance to thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:327-33.
6. Glass, CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimmers, and heterodimers. *Endocr Rev* 1994;15:391-407.
7. Hu I, Lazar MA. Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:6-10.
8. Flamant, F and Samarut, J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14:85-90.
9. Viana FNM. Síndrome de resistência aos hormônios tireoideanos: Mecanismo molecular da dominância negativa na repressão transcricional induzida pelo hormônio tireoideano [dissertação]. Mestrado em Patologia Molecular: Universidade de Brasília, Brasília; 2006.
10. Velasco LFR. Estudo funcional das formas oligoméricas dos receptores de hormônios tireoidianos $\beta 1$ e a importância da dimerização e ligação ao DNA na Síndrome de Resistência aos Hormônios Tireoidianos [tese]. Doutorado em Patologia Molecular. Universidade de Brasília, Brasília 2005.
11. Araki O, Ying H, Furuya F, Zhu X, Cheng S. Thyroid hormone receptor β mutants: Dominant negative regulators of peroxisome proliferator-activated receptor γ action. *PNAS* 2005;102(45):16251-16256.
12. Evans RM. A transcriptional basis for physiology. *Nat Med* 2004;10:1022-1026
13. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPAR γ . *Cell* 2005;123(6):993-999.

14. Krey G, Braissant O, L'Horsset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997;11:779-791.
15. Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 2005;54:2460-2470.
16. Chu R, Madison LD, Lin Y, Kopp P, Rao MS, Jameson JL, Reddy JK. Thyroid hormone (T3) inhibits ciprofibrate-induced transcription of genes encoding beta-oxidation enzymes: cross talk between peroxisome proliferator and T3 signaling pathways. *Proc Natl Acad USA* 1995;92:11593-11597.
17. Buroker NE, Young ME, Wei C, Serikawa K, Ge M, Ning XH, Portman MA. The dominant negative thyroid hormone receptor beta-mutant $\{\Delta\}337T$ alters PPAR $\{\alpha\}$ signaling in heart. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E453-E460.
18. Nagy L, Schwabe Jw. Mechanism of the nuclear receptor molecular switch. *Trends Biochem Sci* 2004;29:317-24.
19. Ribeiro CRJ, Apriletti JW, West BL, Wagner RL, Fletterick RJ, Schaufele F, et al. The molecular biology of thyroid hormone action. *Ann NY Acad Sci* 1995;758:366-89.
20. Sonoda, J, Pei, L, Evans, RM. Nuclear Receptors: Decoding Metabolic Disease. *FEBS Lett.* 2008;582(1):2-9).
21. Wu Y, Xu B, Koenig RJ. Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. *J Biol Chem* 2001 Feb 9;276(6):3929-36.
22. Mangelsdorf, DJ, Ong, ES, Dyck, JA and Evans, RM. Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 1990a;345:224-229.
23. Baniahmad, A, Steiner, C, Kohne, AC, Renkawitz, R. Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* 1990;61:505-514.
24. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Ver* 2001; 81: 1097-1142.
25. Velasco LF, Togashi M, Walfish PG, Pessanha RP, Moura, FN, Barra, GB, et al. Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor. *J Biol Chem* 2007 Apr 27;282(17):12458-66.

26. Barra GB, Velasco LF, Pessanha RP, Campos AM, Moura FN, Dias SM, et AL. [Molecular mechanism of thyroid hormone action]. *Arq. Bras Endocrinol Metabol* 2004 Feb; 48(1)25-39.
27. Mangelsdorf, DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995;83:841-850.
28. Ribeiro RC, Apriletti, JW, Wagner RL, Feng W, Kushner PJ, Nilsson S, et al. X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1998;65:133-41.
29. Neves FAR, Webb P, Ribeiro RCJ, Baxter, JD. Syndrome of Resistance to glucocorticoid and mineralocorticoid hormones. *Genetics in Endocrinology*, Lippincott Williams & Wilkins 2002.
30. Szanto A, Narkar V, Shen Q, Uray IP, Davies PJ, Nagy L. Retinoid X receptors: X-ploring their (phato)physiological functions. *Cell Death Differ* 2004;11(Suppl 2):S126-43.
31. Shulman AI, Mangelsdorf DJ. Retinoid x receptor heterodimers in the metabolic syndrome. *N Engl J Med* 2005;353:604-15.
32. Robinson-Rechavi M, Escriva Garcia H, Laudet V. The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci.* 2003 Feb 15;116(Pt 4):585-586.
33. Glass CK. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2006 Mar;116(3):556-60.
34. Germain P, et al. Overview of Nomenclature of Nuclear Receptors. *Pharmacological Review* 2006;58:685-704.
35. Yang Z, Hong SH and Privalsky ML. Transcriptional anti-repression. Thyroid hormone receptor beta-2 recruits SMRT corepressor but interferes with subsequent assembly of a functional corepressor complex. *J Biol Chem* 1999;274:37131-37138.
36. Umesono K, Evans RM. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* 1989;57:1139-1146.
37. Rastinejad F, Perlmann T, Evans RM, Sigler PB. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 1995;375:203-211.
38. Nelson CC, Hendy SC, Romaniuk PJ. Relationship between P-box amino acid sequence and DNA binding specificity of the thyroid hormone receptor. The effects of sequences flanking half-sites in thyroid hormone response elements. *J Biol Chem* 1995;270: 16988-16994.

39. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptor and gene expression. *Physiological Reviews* 2001;81:1269-1304.
40. Nascimento AS, Dias SM, Nunes FM, Aparicio R, Ambrosio AL, Bleicher L, et al. Structural rearrangements in the thyroid hormone receptor hinge domain and their putative role in the receptor function. *J Mol Biol* 2006 Jul 14;360(3):586-98.
41. Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* 1996;3:87-94.
42. Moras D, Gronemeyer H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:384-391.
43. Wagner RL, Huber BR, Shiau AK, Kelly A, Cunha Lima ST, Scanlan TS, et al. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 2001 Mar;15(3):398-410.
44. Flamant F, Baxter JD, Forrest D, Refetoff S, Samuels H, Scanlan TS, et al. International Union of Pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors. *Pharmacol Rev* 2006 Dec;58(4):705-11.
45. Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD and Fletterick RJ. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* 1995;378:690-697.
46. Zhang J, Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Ann Rev Physiol* 2000;62:439-66.
47. Lazar, MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endroc Rev* 1993;14:184-93.
48. Basset JHD, Harvery CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor specific nuclear and extra nuclear actions. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003;213(1).
49. Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, et al. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 1989;244:76-9.
50. Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* 2000;20:8329-42.
51. Naar AM, Boutin JM, Lipkin SM, Yu VC, Holloway JM, Glass CK and Rosenfeld MG. The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate

selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* 1991;65:1276-1279.

52. Burrows G, Fisher D, Larsen P. Maternal and fetal thyroids function. *N Engl J Med* 1994; 331:1072-1078.

53. Greenspan, F.S. The thyroid gland in *Basic & Clinical Endocrinology*. F.S, Greenspan and G.J. Stewler, Editors, 1997. Appleton & Lange: Stanford, CT., cap7, p.192-262.

54. Kohrle J: Thyroid hormone transporters in health and disease: advances in thyroid hormone deiodination. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007;21: 173-191.

55. Azevedo M, Barra GB, Medeiros LD, Simeoni LA, Naves LA, Neves, FAR. A Novel Mutation of Thyroid Hormone Receptor Beta (I431V) Impairs Corepressor Release, and Induces Thyroid Hormone Resistance Syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2008;52/8:1304-1312.

56. Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krening EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid metabolism and bioavailability. *Endocr Rev* 2001;22:451-76.

57. Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone. *Thyroid* 1996;6:497-504.

58. Davis, PJ, Leonard, JL, Davis FB. Mechanism of nongenomic actions of thyroid hormone. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2008;29:211-218.

59. Lin HY, Zhang S, West BL, Tang HU, Passaretti T, Davis FB, et al. Identification of the putative MAP kinase docking site in the thyroid hormone receptor-beta 1 DNA-binding domain: functional consequences of mutations at the docking site. *Biochemistry* 2003;42:7571-9.

60. Chiamolera, MI, Wondisford, FE. Minireview: Thyrotropin-Releasing Hormone and the Thyroid Hormone Feedback Mechanism. *Endocrinology* 2009;150(3):1091-1096.

61. Wu Y and Koenig RJ. Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab* 2000;11:207-211.

62. Lewin B. *Genes VIII*: Pearson Prentice Hall 2004.

63. McKenna NJ. Nuclear receptor co-regulators: cellular and molecular biology. *Endocr Ver* 1999;20(3):321-44.

64. Brent GA, Dunn MK, Harney JW, Gulick T, Larsen PR, Moore DD. Thyroid hormone aporeceptor represses T₃-inducible promoters and blocks activity of the retinoic acid receptor. *New Biologist* 1989;1:329-336.
65. Zhang XK, Wills KN, Graupner G, Tzukerman M, Hermann T, Pfahl M. Ligand-binding domain of thyroid hormone receptors modulates DNA binding and determinates their bifunctional roles. *New Biologist* 1991;3:169-181.
66. Balkman C, Ojamaa K, Klein I. Time course of the in vivo effects of thyroid hormone on cardiac gene expression. *Endocrinology* 1992;130:2001-2006.
67. Brent GA, Williams GR, Harney JW, Forman BM, Samuels HH, Moore DD, Larsen PR. Effects of varying the position of thyroid hormone response elements within the rat growth hormone promoter: implications for positive and negative regulation by 3,5,3'-triiodothyronine. *Mol Endocrinol* 1991;5:542-514.
68. Hollenberg AN, Monden T, Flynn TR, Boers ME, Cohen O, Wondisford FE. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol* 1995a;9:540-550.
69. Shupnik MA. Thyroid hormone suppression of pituitary hormone gene expression. *Rev Endocr Metab Disord* 2000;1(1-2):35-42.
70. Guissouma H, Ghorbel MT, Seugnet I, Ouatas T, Demeneix BA. Physiological regulation of hypothalamic TRH transcription in vivo is T₃ receptor isoform specific. *FASEB J* 1998;12(15):1755-64.
71. Hu X, Lazar MA. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 1999;402(6757):93-6.
72. Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol* 2000;20:8329;8342.
73. Oetting A, Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007;21(2):193-208.
74. Bodenner DL, Mroczynski MA, Weintraub BD, et al. A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene. *The Journal of Biological Chemistry* 1991;266:21666-21673.
75. Penasetti F, Caccavelli L, Van de Weerd C et al. Thyroid hormone inhibits the human prolactin gene promoter by interfering with activating protein-1 and estrogen stimulations. *Molecular Endocrinology* 1997;11:986-996.

76. Tagami T, Madison LD, Nagaya T et al. Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Molecular and Cellular Biology* 1997;17:2642-2648.
77. Weiss RE, Xu J, Ning G et al. Mice deficient in the steroid receptor co-activator I (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *The EMBO Journal* 1999;18:1900-1904.
78. Ortiga-Carvalho TM, Shibusawa N, Nikrodhanond A et al. Negative regulation by thyroid hormone receptor requires an intact coactivator-binding surface. *The Journal of Clinical Investigation* 2005;115:2517-2523.
79. Tagami T, Park Y, Jamenson JL. Mechanisms that mediate negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by the thyroid hormone receptor. *J Biol Chem* 1999;274:22345-53.
80. Berghagen H, Ragnhildstveit E, Krogsrud K, Thuestad G, Apriletti J, Saatcioglu F. Corepressor SMRT functions as a coactivator for thyroid hormone receptor TRalpha from a negative hormone response element. *J Biol Chem* 2002;277:49517-49522.
81. Santos GM, Afonso V, Barra GB, Togashi M, Webb P, Neves FA, et al. Negative regulation of superoxide dismutase-1 promoter by thyroid hormone. *Mol Pharmacol* 2006;70(3):793-800.
82. Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, et al. International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors. *Pharmacol Rev* 2006;58(4):726-41.
83. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347(6294):645-50.
84. Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 2006;116:571-580.
85. Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma: a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001;276(41):37731-4.
86. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20(5):649-688.
87. Li AC, Palinski W. Peroxisome proliferator-activated receptors: how their effects on macrophages can lead to the development of a new drug therapy against atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2006;46:1-39.

88. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999;103(11):1489-1498.
89. Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96(13):7473-7478.
90. Muoio DM, MacLean OS, Lang DB, Dohm GL, Kraus WE. Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta. *J Biol Chem* 2002;277(29):26089-26097.
91. Horowitz JF, Leone TC, Feng W, Kelly DP, Klein S. Effect of endurance training on lipid metabolism in women: a potential role for PPARalpha in the metabolic response to training. *Am J Physiol Endocrinol* 2000;279(2):E348-E355.
92. Kim H, Haluzik M, Asghar, Yau D, Joseph JW, Fernandez AM, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment in a transgenic model of type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis. *Diabetes* 2003;52(7):1770-8.
93. Lehmann JJ, Kelly DP. Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002;29(4):339-345.
94. Barger PM, Kelly DP. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 2000;10(6):238-245.
95. Barish GD, Narkar VA, Evans RM. PPAR delta: a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2006;116:590-597.
96. Wang YX, Zhang CL, Yu RT, Cho HK, Nelson MC, Bayuga-Ocampo CR, et al. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPARdelta. *PLoS Biol* 2004;2(10):e294.
97. Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochem Biophys Acta* 2007;1771(8):999-1013.
98. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med* 2004;351(11):1106-18.
99. Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *J Clin Invest* 2006;116:581-9.

100. Gavriola O, Haluzik M, Matsusue K, Cutson JJ, Johnson L, Dietz KR, et al. Liver peroxisome proliferator-activated receptor gamma contributes to hepatic steatosis, triglyceride clearance, and regulation of body fat mass. *J Biol Chem* 2003;278(36):34268-76.
101. Hevener AL, He W, Barak Y, Le J, Bandyopadhyay G, Olson P, et al. Muscle-specific Pparg deletion causes insulin resistance. *Nat Med* 2003;9(12):1491-7.
102. Miles PD, Barak Y, He W, Evans RM, Olefsky JM. Improved insulin-sensitivity in mice heterozygous for PPAR-gamma deficiency. *J Clin Invest* 2000;105(3):287-92.
103. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, et al. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998;20(3):284-7.
104. Krall RL. Cardiovascular safety of rosiglitazone. *Lancet* 2007;369:1995-6.
105. Refetoff S, Dumitrescu AM. Syndromes of reduced sensitivity to thyroid hormone: genetic defects in hormone receptors, cell transporters and deiodination 2007;21(2):277-305.
106. Refetoff S, DeGroot LJ, Bernard B, DeWind LT. Studies of a sibship with apparent hereditary resistance to the intracellular action of thyroid hormone. *Metabolism* 1972;21:723-56.
107. Carvalho, G.A. and Ramos, H.E. Thyroid hormone resistance syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004; 48: 83-92.
108. Weiss RE, Tunca H, Knapple WL, Faas FH, Refetoff S. Phenotype differences of resistance to thyroid hormone in two unrelated families with identical mutation in the thyroid hormone receptor β gene (R320). *Thyroid* 1997;7:35-8.
109. Phillips SA, Rotman-Pikielny P, Lazar J, Ando S, Hauser P, Skarulis MC, et al. Extreme thyroid hormone resistance in a patient with a novel truncated TR mutant. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5142-7.
110. Sakurai A, Takeda K, Ain K, Ceccarelli P, Nakai A, Seino S, Bell GI, Refetoff S, DeGroot LJ. Generalized resistance to thyroid hormone associated with a mutation in the ligand-binding domain of the human thyroid hormone receptor beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8977-8981.
111. Hayashi Y, Xie J, Weiss RE, Pohlenz J, Refetoff S. Selective pituitary resistance to thyroid hormone produced by expression of a mutant thyroid hormone receptor beta gene in the pituitary gland of transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:204-210.

112. Adams M, Matthews C, Collingwood TN, Tone Y, Beck-Peccoz P, Chatterjee KK. Genetic analysis of 29 kindreds with generalized and pituitary resistance to thyroid hormone. Identification of thirteen novel mutations in the thyroid hormone receptor beta gene. *J Clin Invest* 1994;94:506-515.
113. Chatterjee VK. Resistance to thyroid hormone. *Horm Res* 1997;48:43-6.
114. Takeda K, Sakurai A, DeGroot LJ, Refetoff S. Recessive inheritance of thyroid hormone resistance caused by complete deletion of the protein-coding region of the thyroid hormone receptor-beta gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:49-55.
115. Ono S, Schwartz ID, Mueller OT, Root AW, Usala SJ, Bercu BB. Homozygosity for a dominant negative thyroid hormone receptor responsible for generalized thyroid hormone resistance. *J Clin Endocr Metab* 1991;73:990-994.
116. Refetoff S. Resistance to thyroid hormone: one of several defects causing reduced sensitivity to thyroid hormone. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism* 2008;4(1).
117. Ando S, Sarlis NJ, Oldfield EH et al. Somatic mutation of TRbeta can cause a defect in negative regulation of TSH in a TSH-secreting pituitary tumor. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2001;86:5572-5576.
118. Weiss RE, Weinberg M, Refetoff S. Identical mutations in unrelated families with generalized resistance to thyroid hormone occur in cytosine-guanine-rich areas of the thyroid hormone receptor beta gene. Analysis of 15 families. *J Clin Invest* 1993;91:2408-15.
119. Yen PM. Thyrotropin receptor mutations in thyroid diseases. *Rev Endocr Metab Disord* 2000;1:123-29.
120. Parikh S, Ando S, Scheneider A et al. Resistance to thyroid hormone in a patient without thyroid hormone receptor mutations. *Thyroid* 2002;12:81-86.
121. Mamasiri S, Yesil S, Dumitrescu AM et al. Mosaicism of a thyroid hormone receptor-beta gene mutation in resistance to thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(9):3471-77.
122. Yen PM, Sugawara A, Refetoff S, Chin WW. New insights on the mechanism(s) of the dominant negative effect of mutant thyroid hormone receptor in generalized resistance to thyroid hormone. *J Clin Invest* 1992;90:1825-31.
123. Collingwood TN, Adams M, Tone Y, Chatterjee VK. Spectrum of transcriptional, dimerization, and dominant negative properties of twenty different

mutant thyroid hormone β -receptors in thyroid hormone resistance syndrome. *Mol Endocrinol* 1994;8:1261-77.

124. Meier CA, Parkison C, Chen A, Ashizawa K, Meier HS, Muchmore P, Cheng SY and Weintraub BD. Interaction of human beta 1 thyroid hormone receptor and its mutants with DNA and retinoid X receptor beta. T3 response element-dependent dominant negative potency. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 92 1986-1993.

125. Chatterjee VK, Nagaya T, Madison LD, Datta S, Rentoumis A, Jameson JL. Thyroid hormone resistance syndrome. Inhibition of normal receptor function by mutant thyroid hormone receptors. *J Clin Invest* 1991;87:1977-1984.

126. Reutrakul S, Sadow PM, Pannain S, Pohlenz J, Carvalho GA, Macchia PE et al. Search for abnormalities of nuclear co-repressors, co-activators, and a co-regulator in families with resistance to thyroid hormone without mutation in TR β or α genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3609-17.

127. Yoh SM, Chatterjee VK, Privalsky ML. Thyroid hormone resistance manifests as an aberrant interaction between mutant T₃ receptors and transcriptional corepressors. *Mol Endocrinol* 1997;11:470-480.

128. Safer JD, Cohen RN, Hollenberg AN, Wondisford, FE. Defective release of corepressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone. *J Biol Chem* 1998;273:30175-30182.

129. Nagaya T, Fujieda M and Seo H. Requirement of corepressor binding of thyroid hormone receptor mutants for dominant negative inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998;247:620-623.

130. Tagami T, Gu WX, Peairs PT, West BL, Jameson JL. A novel natural mutation in the thyroid hormone receptor defines a dual function domain that exchanges nuclear receptor corepressors and coactivators. *Mol Endocrinol* 1998;12:1888-1902.

131. McKenna NJ, O'Malley BW. Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and co-regulators. *Cell* 2002;108:465-74.

132. Kamiya Y, Zhang XY, Ying H, Kato Y, Willingham MC, Xu J et al. Modulation by steroid receptor coactivator-1 of target-tissue responsiveness in resistance to thyroid hormone. *Endocrinology* 2003;144:4144-53.

133. Sadow PM, Chassande O, Koo EK, Gauthier K, Samarut J, Xu J et al. Regulation of expression of thyroid hormone receptor isoforms and co-activators in liver and heart by thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 2003;203:65-75.

134. Safer JD, Langlois MF, Cohen R, Monden T, John-Hope D, Madura J, Hollenberg AN, Wondisford FE. Isoform variable action among thyroid hormone receptor mutants provides insight into pituitary resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol* 1997;11:16-26.
135. Miyoshi Y, Nakamura H, Sasaki S, Tagami T, Misaki T, Konishi J, Nakao K. Two consecutive nucleotide substitutions resulting in the T3 receptor beta gene resulting in an 11-amino acid truncation in a patient with generalized resistance to thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 1995;114:9-17.
136. Matsushita A, Misawa H, Andoh S, Natsume H, Nishiyama K, Sasaki S, Nakamura H. Very strong correlation between dominant negative activities of mutant thyroid hormone receptors and their binding avidity for corepressor SMRT. *J Endocrinol* 2000;167:493-503.
137. Marimuthu A, Feng W, Tagami T, Nguyen H, Jamenson JL, Fletterick RJ, et al. TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol* 2002 Feb;16(2):271-86.
138. Umesono K, Murakami KK, Thompson CC and Evans RM. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell* 1991;65:1255-1266.
139. Feng W, Ribeiro RCJ, Wagner RL, Nguyen H, Apriletti JW, Fletterick RJ, Baxter JD, Kushner PJ and West BL. Hormone-Dependent Coactivator Binding to a Hydrophobic Cleft on Nuclear Receptors. *Science* 1998;280:1747-1749.
140. Ribeiro RC, Feng W, Wagner RL, Costa CH, Pereira AC, Apriletti JW, et al. Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2001 May 4;276(18):14987-95.
141. Barra, GB. Farmacologia do receptor do Hormônio Tireoidiano, nova mutação no sítio de "splicing" do gene do hormônio luteinizante e determinação da atividade da luciferase: um novo método para medida in vitro de interação proteína-proteína. Doutorado em Ciências da Saúde. Universidade de Brasília, 2008.
142. Treisman R. Transient accumulation of c-fos RNA following serum stimulation requires a conserved 5' element and c-fos 3' sequences. *Cell*, 1985;42(3):889-902.
143. Sakurai, A., Miyamoto, T., Refetoff, S. and DeGroot, L.J. Dominant negative transcriptional regulation by a mutant thyroid hormone receptor-beta in a family with generalized resistance to thyroid hormone. *Mol. Endocrinol.* 1990;4:1988-1994.

144. Nagaya, T., Eberhardt, N.L. and Jameson, J.L. Thyroid hormone resistance syndrome: correlation of dominant negative activity and location of mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:982-990.
145. Nagaya, T. and Jameson, J.L. Distinct dimerization domains provide antagonist pathways for thyroid hormone receptor action. *J Biol Chem* 1993a;268:24278-24282.
146. Ando, S., Nakamura, H., Sasaki, S., Nishiyama, K., Kitahara, A., Nagasawa, S., Mikami, T., Natsume, H., Genma, R. and Yoshimi, T. Introducing a point mutation identified in a patient with pituitary resistance to thyroid hormone (Arg 338 to Trp) into other mutant thyroid hormone receptors weakens their dominant negative activities. *J Endocrinol.* 1996;151:293-300.
147. Clifton-Bligh, R.J., de Zegher, F., Wagner, R.L., Collingwood, T.N., Francois, I., Van Helvoirt, M., Fletterick, R.J. and Chatterjee, V.K.K. A Novel TR β Mutation (R383H) in Resistance to Thyroid Hormone Syndrome Predominantly Impairs Corepressor Release and Negative Transcriptional Regulation. *Molecular Endocrinology* 1998;12:609-621.
148. Nagaya, T. and Jameson, J.L. (1993b) Thyroid hormone receptor dimerization is required for dominant negative inhibition by mutations that cause thyroid hormone resistance. *J Biol Chem* 1993b;268:15766-15771.
149. Jameson, J.L. Mechanisms by which thyroid hormone receptor mutations cause clinical syndromes of resistance to thyroid hormone. *Thyroid* 1994;4:485-492.
150. Chatterjee VK. Resistance to thyroid hormone and peroxisome-proliferator-activated receptor γ resistance. *Biochemical Society* 2001:227-231.
151. Kok, K., Osinga, J., Carritt, B., Davis, M.B., van der Hout, A.H., van der Veen, A.Y., Landsvater, R.M., de Leij, L.F., Berendsen, H.H., Postmus, P.E. and et al. Deletion of a DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer. *Nature* 1987;330: 578-581.
152. Dobrovic, A., Houle, B., Belouchi, A. and Bradley, W.E. (1988) erbA-related sequence coding for DNA-binding hormone receptor localized to chromosome 3p21-3p25 and deleted in small cell lung carcinoma. *Cancer Res*, 48, 682-685.
153. Feige JN, Gelman L, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem* 2005;280:17880-90.

154. Rosen ED, Spiegelman BM. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth. *J Biol Chem* 2001;276(41):37731-4.
155. A IJ, Jeannin E, Wahli W, Desvergne B. Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element. *J Biol Chem* 1997;272(32):20108-17.
156. Altan N, Sepici-Dincel A, Sahin D, Kocamonoglu N, Kosova F, Engin A. Oxidative DNA damage: the thyroid hormone-mediated effects of insulin on liver tissue. *Endocrine* 2010;12.
157. Santi A, Duarte MM, Moresco RN, Menezes C, Bagatini MD, Schetinger MR, Loro VL. Association between thyroid hormones, lipids and oxidative stress biomarkers in overt hypothyroidism. *Clin Chem Lab Med* 2010;48.