



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Laboratório de Farmacologia Molecular

SÍNDROME DE RESISTÊNCIA AOS HORMÔNIOS TIREOIDEANOS:
MECANISMO MOLECULAR DA DOMINÂNCIA NEGATIVA NA REPRESSÃO
TRANSCRICIONAL INDUZIDA PELO HORMÔNIO TIREOIDEANO.

FANNY NASCIMENTO MOURA VIANA

ORIENTADOR: PROF. FRANCISCO DE ASSIS ROCHA NEVES

Dissertação submetida ao Corpo Docente do curso de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília
Maio, 2006

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).

“Porque dEle e por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele, pois, a glória eternamente. Amém!” (Rm. 11:36). Dedico esse trabalho ao autor e consumidor da minha fé, Jesus Cristo, o único que em troca da alegria que lhe estava proposta, suportou a cruz para morrer em meu lugar.

Ao meu esposo César que inúmeras vezes me incentivou e aos meus pais, Rosa, Elison e Moacir, pessoas cujos ensinamentos e suporte são indispensáveis.

AGRADECIMENTOS

Sou eternamente grata a Deus, que tem me dado todas as coisas. Durante todos os dias da minha vida, Ele tem me ensinado que “o coração do homem pode fazer planos, mas a resposta certa vem dos lábios do Senhor” (Pv. 16:01). Ele me instruiu no caminho que eu deveria escolher e se hoje eu cheguei até aqui eu devolvo a Ele toda a glória e reconhecimento, pois sem Ele eu nada poderia fazer.

Aos meus pais, Rosa e Elison, por terem acreditado no meu potencial e investido sem restrições em todas as áreas da minha vida. Nunca me esquecerei das palavras de ânimo que me encorajaram a realizar meus sonhos nos momentos mais difíceis dessa jornada. Ao meu pai, Moacir, por tudo o que o senhor fez por mim, mas principalmente pelo carinho e admiração.

Ao meu esposo César que foi e será meu eterno amigo, companheiro e amante; que me tem ensinado que o segredo da felicidade e da realização pessoal está no equilíbrio. Seu amor e respeito têm me motivado a crescer e deslumbrar o maravilhoso futuro que nós temos e que já começamos a viver juntos. Pela compreensão e pelo auxílio na revisão desse trabalho. Por sonhar os meus sonhos e por fazer de cada dia, desses oito anos que estamos juntos, uma verdadeira obra-prima.

Ao professor Francisco A. R. Neves, pelo aprendizado, apoio e dedicação e por ter participado da minha formação profissional desde os anos de iniciação científica. As nossas discussões foram muito produtivas e o crescimento alcançado não se restringiu apenas à área acadêmica, mas se estendeu também para a minha vida pessoal.

Ao Prof. Luis Alberto Simeoni, pela sua amizade e pelos conselhos partilhados os quais muito me auxiliaram durante o aprendizado e desenvolvimento das técnicas de laboratório. Ao professor Ralff C. J. Ribeiro, que por um breve espaço de tempo tive a oportunidade de ser motivada por sua vasta formação científica e por sua dedicação à pesquisa.

Agradeço também aos meus avós, Antônio e Neide, que com muito esforço lutaram para que seus ensinamentos, conceitos e princípios se perpetuassem na nossa família. Admiro muito vocês. Aos meus irmãos, Thiago e Lucas, que com muita paciência me apoiaram

tanto nos momentos de alegria, como nas horas de angústia. Muito obrigada pelo amor e pela amizade de vocês. A todos os meus tios, primos e primas que sempre torceram pelo meu sucesso.

Aos pais do meu esposo, José Viana e Lindamara, que me adotaram como filha e compreenderam a minha ausência sempre intercedendo por mim para que minha vitória fosse completa. Não poderia jamais esquecer da minha cunhadinha, Jejê, que foi uma peça fundamental para a correção e revisão final do meu trabalho. Muito obrigada pela sua ajuda.

Às grandes amigas Raquel e Paula, as quais tive a oportunidade de conhecer durante a graduação e fazem parte da minha vida até hoje de uma maneira muito especial. Agradeço pelo incentivo que vocês sempre me deram e por compartilharem comigo da alegria da salvação que Jesus Cristo tem nos proporcionado.

Aos meus amigos de caminhada cristã, Camila Capita, Patrícia, Carlos, Carol, Samuel, Fabrícia, Adilson, Josué Júnior, Igor, Josilene e a todos da Igreja Betel que compreenderam a minha luta. Em especial aos companheiros de liderança, Marcos e Neide, que deram suporte na minha ausência e participaram de vários momentos felizes levando-me a compreender que quem tem amigos nunca é considerado um fracassado.

À Cristina Simeoni e Rilva pela companhia, amizade e apoio nas atividades técnicas e administrativas. A prontidão e a disponibilidade de vocês me fazem lembrar das palavras de Cristo: “quem quiser tornar-se grande entre vós, será esse o que vos sirva.” (Mc. 10:43).

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular, Angélica, Alessandra, Elaine, Gustavo, Guilherme, Karime, Karine, Marie Togashi, Maurício, Marlon, Manuela, Pinedo, Tiago, Viviane e prof^a Yolanda. Muito obrigada pelo enriquecimento que vocês me proporcionaram nos nossos debates científicos e pelas trocas de experiências. Em especial às amigas Daniela e Adriana. Nossos momentos de descontração trouxeram alegria em meio às dificuldades das transfecções e purificações. Ao casal, Ruth e Ranieri, pela proximidade que nós alcançamos por meio das viagens, congressos, simpósios e até pela localidade das nossas moradias. Muito obrigada por vocês diremirem as inúmeras

dúvidas que surgiram na elaboração e conclusão dessa dissertação, principalmente no manuseio dos instrumentos de informática.

Aos alunos de iniciação científica, Caroline, Carolina Perdigão, Isabel, Juliana, Riobaldo, Sílvia e Sérgio pelo convívio e pela amizade e em especial às dedicadas alunas, Fabiana e Priscila, que se empenharam em aprender novas técnicas e conceitos do universo da Biologia Molecular para contribuir diretamente na execução desse trabalho. Obrigada pelo tempo que vocês disponibilizaram para me ajudar.

Ainda gostaria de agradecer especialmente à grande amiga Lara, de quem me tornei discípula, pela paciência, amizade, dedicação, investimento, aprendizado das técnicas de laboratório e pelo incentivo ao meu crescimento científico. Muito do que consegui alcançar no mundo da pesquisa devo a você.

Valeu demais as noites mal dormidas
Ansiando a paz bendita e pretendida
Que eu já não sabia mais onde que fora se esconder
Valeu o tempo de esperar o Teu querer

Valeu demais os dias mal passados
Caminhando atrás de planos mal traçados
Que eu só posso agradecer a Tua mão que me livrou
Valeu o tempo de esperar mas já passou

Pois estou bem certo breve o tempo de aflição
Não pode comparar-se a nossa eterna salvação
E os dias de tristeza servem mais pra destacar
A imensa glória e honra com que Deus vai nos brindar

Valeu demais, valeu, o tempo e o contratempo
Que esta história traz em cada vão momento
Fica cheio de esperança que a certeza da presença do Senhor
Em cada passo por onde eu for.

(Ghilherme Kerr Neto)

O sucesso é ter paz na consciência,
que é resultado direto da satisfação pessoal de saber
que fez o melhor que podia para se tornar
o melhor que é capaz de ser.

(John Wooden)

ÍNDICE

<i>Lista de Abreviaturas</i>	10
<i>Resumo</i>	13
<i>Abstract</i>	15
<i>Introdução</i>	16
∅ Hormônio Tiroideano	18
∅ Receptores nucleares	20
∅ Receptor do Hormônio Tiroideano	22
∅ Regulação da Transcrição Gênica pelo Hormônio Tiroideano	27
∅ Dimerização dos receptores nucleares	41
∅ Base Molecular da SRHT	43
<i>Objetivos</i>	51
<i>Materias e Métodos</i>	52
∅ Plasmídeos utilizados	52
∅ Transformação	53
∅ Purificação de Plasmídeos	53
∅ Mutação Sítio-dirigida	54
∅ Cultura de Células	55
∅ Método de Transfecção e Ensaio da Atividade da Enzima Luciferase	55
∅ Curvas Dose-resposta	56
∅ Cálculo da Taxa de Ativação e Repressão	56
<i>Resultados</i>	58
Efeito Dominante Negativo do F451X e G345R no Elemento Responsivo Positivo F2	58
Efeito Dominante Negativo do F451X e do G345R nos Elementos Responsivos Negativos	59
Curvas dose-resposta do F451X e G345R	72
Efeito Dominante Negativo do F451X e do G345R em elevadas concentrações	78
Avaliação das Propriedades de Dimerização no Efeito Dominante Negativo do F451X e G345R em TSH	83
Importância da Dimerização na Repressão da Transcrição do Promotor do TRH-LUC e AP-1	87
<i>Discussão</i>	88
<i>Sumário</i>	98

<i>Conclusão</i>	98
<i>Referências Bibliográficas</i>	99
<i>Anexos</i>	119

LISTA DE ABREVIATURAS

- AF-1- Função de ativação 1
AF-2- Função de ativação 2
AR – Receptor dos androgênios
CBP- *CREB binding Protein*
CREB- proteína que se liga ao elemento responsivo cAMP
DBD- Domínio de ligação ao DNA
DRs- Repetições diretas da seqüência AGGTCA espaçadas por 1 a 5 nucleotídeo(s) (DR1-DR5)
ER- Receptor de estrogênio
F2- Seqüência correspondente a um palíndromo invertido da seqüência AGGTCA
F451X- Mutação do TR em que os onze últimos aminoácidos a partir da fenilalanina 451 foram deletados
FSH – Hormônio folículo-estimulante
G345R- Mutação do TR onde a glicina 345 foi substituída por uma arginina
GR- Receptor de glicocorticóides
GST- Glutathione-S-Transferase
GRIP – *glucocorticoid receptor-interacting protein*
GRIP1- Proteína de fusão entre GST e GRIP1
H1 a H12 - Representa as 12 alfa hélices do receptor
HAT- Histona acetilase
HDACs- Histona desacetilases
HRE- Elemento responsivo ao hormônio
HSP- Proteínas de choque térmico
HT- Hormônio tireoideano
hTR β 1- Receptor do hormônio tireoideano humano isoforma beta 1
IC₅₀- Concentração onde se obteve metade da inibição máxima
JNK – Jun amino-terminal kinase
L422R- Mutação do TR onde a leucina 422 foi substituída por uma arginina
LBD- Domínio de ligação ao ligante
LH – Hormônio luteizante
LUC- Gene que codifica a luciferase

LXXLL- Seqüência consenso de aminoácidos presentes na superfície dos co-ativadores responsável pela interação com os receptores nucleares

LXXXIXXX(I/L)- Seqüência consenso de aminoácidos presentes na superfície dos correpressores responsável pela interação com os receptores nucleares

MTB- Maquinaria de transcrição basal

MR – Receptor de mineralocorticóides

NCoR- Correpresor de receptores nucleares

NRIF3- Receptor nuclear-interação com o fator 3

nTRE- Elemento responsivo negativo

pCMX- Vetor que possui os promotores T7 e CMX

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

pCIP- Proteína associada ao co-integrador p300/CBP

pCAF- Fator associado a p300/CBP

Pit 1 – Ativador transcricional da pituitária

PPAR- Receptor de proliferadores peroxissomais

PR – Receptor da progesterona

pTRE- Elemento responsivo positivo

RAR-Receptor do ácido retinóico

RXR- Receptor do ácido retinóide X

S1 a S4- Representa as 4 fitas betas do receptor do hormônio tireoideano

SDS-PAGE- Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante com SDS

SEM – Erro padrão da média

Sin 3 – Regulador transcricional com efeito positivo e negativo na expressão gênica individual

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

SRC-1; NCoA1- Sinônimos do co-ativador de receptores nucleares 1 incluindo os receptores de esteróides

SRHT - Síndrome de Resistência aos Hormônios Tireoideanos

T7- Bacteriófago T7

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

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

TFIIB-Fator de Transcrição IIB

TFIID-Fator de Transcrição IID
TFIIE-Fator de Transcrição IIE
TFIIF-Fator de Transcrição IIF
TIF2;GRIP1;SRC-2;NCoA2- Sinônimos do co-ativador de receptores nucleares 2 incluindo receptores esteróides
TK- Timidina Cinase
TPA – 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, promotor tumoral
TR - Receptor do hormônio tireoideano
TRBP- Proteína que se liga ao TR
TR nativo- Receptor do hormônio tireoideano sem mutações, selvagem
TRwt – *wild type*, receptor do hormônio tireoideano nativo
TR Δ 1 ou 2- Receptor do hormônio tireoideano, isoforma alfa1 ou 2 com deleção
TR Δ 3- Receptor do hormônio tireoideano isoforma beta 3 com deleção
TRE- Elemento responsivo ao hormônio tireoideano
TREpal- Sequência correspondente a um palíndromo da sequência AGGTCA
TRH- Hormônio liberador de TSH
TR α 1 ou 2- Receptor do hormônio tireoideano, isoforma alfa1 ou 2
TR β 1,2 ou 3- Receptor do hormônio tireoideano, isoforma beta 1, 2 ou 3
TSA – “trichostatin A” - inibidor das HDACs
TSH- Hormônio estimulador da tireóide
VDR- Receptor da vitamina D

RESUMO

A Síndrome de Resistência aos Hormônios Tireoideanos (SRHT) é caracterizada pela resposta reduzida dos tecidos-alvo aos hormônios tireoideanos (HTs). É comumente devida 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 nativo, fenômeno conhecido como dominância negativa. Em genes regulados positivamente pelo T₃, o mecanismo molecular da dominância negativa envolve a dimerização do TR mutado com o TR nativo ou com RXR, sobre o DNA. Porém, pouco se sabe como isso ocorre em genes cuja transcrição é reprimida por T₃.

O objetivo desse estudo foi investigar o mecanismo de dominância negativa em genes regulados negativamente por T₃, bem como a importância da dimerização envolvida nesse processo. Para isso, células U937 foram co-transfectadas com vetores de expressão do TR α_1 nativo ou TR mutado associados ao gene repórter da luciferase dirigido por promotores regulados negativamente: AP-1, TRH ou TSH α . Os TRs mutados utilizados foram os descritos na SRHT (F451X e G345R). Além disso, o mutante L422R, que é deficiente na sua propriedade de dimerização também foi utilizado.

Os resultados mostraram que o F451X e G345R, quando comparado ao TR nativo, não reprimem a transcrição na presença de T₃. Quando co-transfectado com TR nativo, F451X (1:5) reduz em 61% a inibição transcricional do TSH α , mas em apenas 16% em AP-1 e não prejudica a repressão em TRH. Efeito similar foi observado com outro mutante da SRHT, o G345R. A dominância negativa não foi observada no promotor com sítio AP-1 ou no TRH, mesmo quando a concentração dos mutantes, F451X e G345R, foi 10x maior que TR nativo. A introdução da mutação L422R no mutante F451X (L422R/F451X) e no G345R (L422R/G345R) corrigiu o forte efeito dominante negativo desses mutantes na regulação do promotor do TSH. É interessante observar que o mutante L422R, na presença de T₃, apresentou uma taxa de repressão transcricional semelhante ao TR nativo no promotor do TRH (74%) e AP-1 (78%) mas significativamente inferior na regulação do promotor do TSH, 11% em relação ao TR nativo. Nossos resultados sugerem que a dimerização está envolvida na dominância negativa do TR mutado quando este regula a transcrição do promotor do TSH, enquanto que no promotor do TRH e AP-1, a ligação via monômeros de TR parece ser a forma oligomérica preferida e incapaz de induzir a

dominância negativa. Coletivamente, esses resultados sugerem que o efeito dominante negativo imposto pelo TR mutado varia de acordo com o promotor que é regulado negativamente por TR e que a forma monomérica não parece exercer a dominância negativa.

ABSTRACT

Resistance to thyroid hormone (RTH) is characterized by the reduced response of the target tissue to thyroid hormone (TH). Usually is related with mutations in one allele of thyroid hormone receptor beta (TR β) that is encoded for TR mutant, which impairs the normal function of TR wild type (TRwt), a phenomenon described as a dominant-negative effect. In positive regulated genes for T₃, this effect involves the dimerization of TR mutant with TRwt or with RXR on DNA. However, it is not well understood how this occur in genes which transcription is down regulated by T₃.

The aim of this study was to investigate the importance of dimerization in the dominant-negative mechanism in negative regulated genes by T₃. For this, the U937 cells were co-transfected with TR β 1wt expression vectors or TR mutant, associated to luciferase reporter gene, driven by negative regulated promoters such as AP-1, TRH or TSH. The TR mutants were described in the RTH (F451X or G345R). The mutant L422R, that is defective in the dimerization, was also utilized.

The results showed that F451X and G345R, when compared with TRwt, did not suppress the transcription in the presence of T₃. When co-transfected with TRwt, F451X (1:5) reduced in the 61 % the TSH α transcription inhibition, but only 16% in AP1 and did not damage the suppression in TRH. The same effect was observed with other RTH mutant, the G345R. The dominant-negative effect was not observed in the promoter with AP-1 or TRH, even so the concentration of the mutants, F451X and G345R, was ten times higher than TRwt. The presence of the mutation L422R in the mutant F451X (L422R/F451X) and in the G345R (L422R/G345R) corrected the strong dominant-negative effect these mutants in the regulation of the TSH. Is interesting to observe that the mutant L422R, in the presence of T₃, show the suppression rate was similar to TRwt in the TRH promoter (74%) and AP-1 (78%) but significantly lower in the regulation of the TSH promoter (11%). Our results suggest that dimerization is involved in the dominant-negative effect of TR mutant in the regulation of the transcription of the TSH promoter, while in the TRH and AP-1 promoter, TR seems preferentially to bind as monomers and it is incapable to persuade the dominantnegative effect. Taken together, these results suggest that the dominant-negative effect of the mutants varies with the type of promoter which is negative regulated for TR and the monomers can not practice the dominant-negative effect.

INTRODUÇÃO

A Síndrome de Resistência aos Hormônios Tireoideanos (SRHT) é caracterizada pela resposta reduzida dos tecidos-alvo ao hormônio tireoideano (HT). Foi inicialmente descrita em 1967 em dois indivíduos que apresentavam bócio, surdo-mudez e atraso na idade óssea (Refetoff et al., 1967; Refetoff, 1982; Refetoff et al., 1993). 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 (Refetoff et al., 1993). Já foram identificados mais de 1000 indivíduos com SRHT provenientes de cerca de 250 famílias (Carvalho e Ramos, 2004). A incidência da SRHT é de aproximadamente 1 em 50.000 recém-nascidos e o padrão de herança é autossômico dominante, sendo que a transmissão recessiva foi identificada em apenas uma família (Takeda et al., 1992).

Inúmeros pacientes são assintomáticos; outros exibem sinais e sintomas de tirotoxicose tais como agitação, diarreia, insônia, nervosismo, tremores, perda de peso e taquicardia; enquanto outros apresentam hipotireoidismo com ganho de peso, surdez (hipoacusia), icterícia neonatal, atraso da maturação óssea, falha no crescimento, retardo mental, anormalidades na linguagem, sonolência, fadiga crônica, letargia e intolerância ao frio (Refetoff et al., 1993). O mecanismo molecular envolvido na grande variabilidade de manifestações clínicas não está totalmente esclarecido. Especula-se que se deve, em parte, à severidade da resistência hormonal, efetividade dos mecanismos compensatórios, resistência variável em múltiplos tecidos e presença de fatores genéticos moduladores ainda não esclarecido (Phillips et al., 2001; Weiss et al., 1997). Embora a reduzida sensibilidade ao HT possa variar em severidade, existem características clínicas comumente encontradas na síndrome, que são bócio, retardo do crescimento e ausência dos sintomas comuns e das alterações metabólicas provocadas pelo excesso de HT (Beck-Peccoz e Chatterjee, 1994).

Bócio é a anormalidade mais comumente encontrada no exame físico, ocorrendo em 85% dos casos. Taquicardia ocorre em 90% dos indivíduos com SRHT (Refetoff et al., 1993). Metade dos pacientes com SRHT tem dificuldade no aprendizado, frequentemente

associada com hiperatividade e déficit de atenção e, em geral, baixo quociente de inteligência (QI). Entretanto, retardo mental ($QI < 60$) ocorre em apenas 3% dos casos. Discreto ou moderado retardo no crescimento e atraso na idade óssea estão presentes em 25% dos casos. Defeitos auditivos também estão presentes em um quarto dos pacientes. Outras manifestações foram observadas, tais como infecções repetidas nas vias aéreas superiores, diminuição da massa óssea, surdez, hipotonia e convulsão (Weiss et al., 1993; Brucker-Davis, 1995).

O diagnóstico da SRHT é fundamentado em achados clínicos e testes laboratoriais da função do hormônio tireoideano, através do qual a maioria dos pacientes é identificada pela elevação persistente dos níveis séricos de T_3 e T_4 livres, associada a níveis inapropriadamente normais ou elevados de TSH sérico. Conseqüentemente, a resistência no hipotálamo e/ou na pituitária resulta em uma incompleta supressão de TSH que é a primeira indicação clínica de resistência ao hormônio. A administração de doses supra-fisiológicas de hormônio tireoideano não produz o efeito supressivo esperado na secreção de TSH ou na indução das respostas metabólicas dos tecidos alvo. Assim, na SRHT são necessárias altas doses de hormônios tireoideanos para suprimir a secreção hipofisária de TSH. O achado de níveis séricos elevados de HT com TSH não suprimidos é usualmente o motivo da investigação que leva ao diagnóstico (Refetoff et al., 1993).

Na maioria dos pacientes não tratados, a resistência aos hormônios tireoideanos nos tecidos periféricos é compensada pela elevação dos níveis séricos de T_3 e T_4 livres, mantendo-se um estado eumetabólico. O grau dessa compensação, entretanto, é variável entre indivíduos, bem como entre os diferentes tecidos. Assim, evidências clínicas e laboratoriais de deficiência e de excesso de HTs podem coexistir. Por exemplo, um paciente com SRHT pode apresentar retardo do crescimento e dificuldade de aprendizado (sugerindo hipotireoidismo), associados a taquicardia, avanço da idade óssea ou hiperatividade (sugerindo hipertireoidismo) (Refetoff et al., 1993; Beck-Peccoz e Chatterjee, 1994).

Tradicionalmente, a SRHT vem sendo subdividida em dois tipos principais: Resistência Generalizada ao Hormônio Tireoideano e Resistência Hipofisária ao Hormônio Tireoideano. Como a maioria dos pacientes são eumetabólicos 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 (Sakurai et al., 1989). Já um pequeno número de indivíduos são definidos como portadores de resistência hipofisária (Hayashi et al., 1998), cuja sensibilidade periférica aos HT é preservada e, dessa forma, os pacientes apresentam sinais de hipermetabolismo (taquicardia, agitação) pelos elevados níveis circulantes de T_3 . Em alguns casos, indivíduos com a mesma mutação e, às vezes, pertencendo à mesma família foram classificados como tendo resistência generalizada e hipofisária. Posteriormente, estudos clínicos demonstraram que a resposta dos marcadores periféricos à ação do HT estava igualmente atenuada nos dois grupos. Ainda não foi descrito um modelo molecular para explicar essas duas síndromes (Refetoff et al., 1993; Beck-Peccoz e Chatterjee, 1994;) e diversos autores concluíram que são partes do espectro de uma mesma doença (Sakurai et al., 1989; Safer et al., 1997; Hayashi et al., 1998).

Ø HORMÔNIO TIREOIDEANO

Os hormônios tireoideanos (HTs) possuem inúmeros efeitos fisiológicos e um papel fundamental na diferenciação e desenvolvimento de organismos vertebrados (Greenspan, 1994). Os HTs atuam em vários órgãos e vias metabólicas dos mamíferos e seus efeitos afetam o desenvolvimento fetal, o metabolismo de lipídeos e carboidratos e o sistema cardiovascular, pulmonar e neuromuscular (Greenspan, 1997). Uma vez produzidos e secretados pela glândula tireóide, os hormônios tireoideanos 3,5,3',5'-tetra-iodo-L-tironina (tiroxina ou T_4) e 3,5,3'-tri-iodotironina (T_3), dentre os quais o T_3 se destaca como principal hormônio ativo, são transportados no sangue e levados aos tecidos alvo onde exercerão o seu efeito biológico.

O T_4 , principal hormônio secretado pela tireóide, é convertido pela enzima tiroxina 5'-deiodinase nos tecidos periféricos em T_3 , que é o hormônio metabolicamente ativo. Existem diferentes isoformas da enzima 5'-deiodinase presente nos diversos tecidos. Os mecanismos de resistência ao hormônio tireoideano podem ser explicados por mutações nessas enzimas (Refetoff et al., 1993). Assim, o T_3 derivado dessas fontes é responsável pela maioria das ações dos hormônios tireoideanos (Ribeiro et al., 1995).

Os HTs circulam livremente no plasma ou ligados a proteínas carreadoras. A ligação desses hormônios a essas proteínas aumenta suas meias-vidas e assegura uma

distribuição regular do hormônio nos tecidos alvos. O hormônio livre é transportado por difusão passiva ou por transportadores específicos através da membrana celular dirigindo-se ao núcleo da célula (Ribeiro et al., 1998b; Hennemann et al., 2001).

A ação dos HTs é mediada pela ligação a receptores específicos que se localizam no núcleo das células (receptores nucleares) e são denominados de receptores do hormônio tireoideano (TRs). Uma vez ligados aos hormônios, os receptores iniciam uma seqüência de eventos bioquímicos, que terminam por promover na célula a resposta à ação hormonal (Hill e Treisman, 1995).

A síntese e secreção dos hormônios tireoideanos são regulados pelo mecanismo de retro-alimentação negativa (feedback negativo) que envolve o hipotálamo, a hipófise (ou glândula pituitária) e a glândula tireóide, chamado de eixo H-P-T. O hormônio liberador da tireotropina (TRH) é produzido no núcleo paraventricular do hipotálamo e estimula a liberação das subunidades α e β da tireotropina (hormônio estimulador da tireóide – TSH), no lobo anterior da hipófise. Este, por sua vez, estimula a produção de HTs pela glândula tireóide. A presença de T_3 inibe, em nível transcricional, a produção de TRH e TSH no hipotálamo e na pituitária, respectivamente (Shupnik et al., 1986), o que resulta em uma menor liberação dos hormônios tireoideanos pela tireóide. Na SRHT observa-se um feedback negativo anormal do T_3 no TSH/TRH, gerando sinais, sintomas e anormalidades laboratoriais característicos devido à resposta reduzida ao HT pelo hipotálamo, hipófise e tecidos periféricos (figura 01).

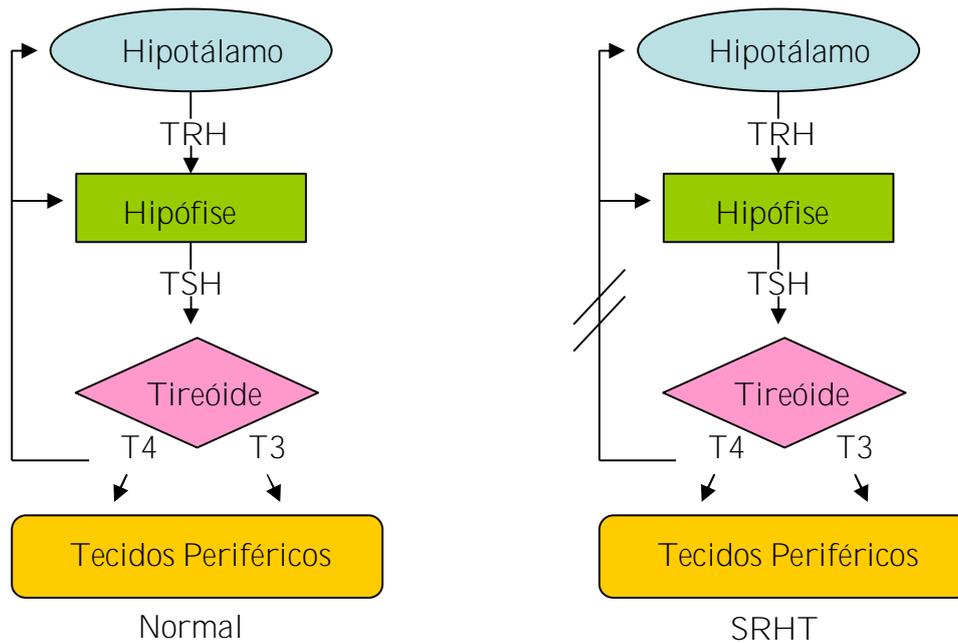


Figura 01. Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. Em condições normais, o hipotálamo secreta TRH, o qual estimula a hipófise (ou glândula pituitária) a produzir TSH que, por sua vez, estimula a tireóide a produzir principalmente T₄. O T₄ é metabolizado nos tecidos periféricos 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 o T₃ se liga ao seu receptor; na SRHT, o feedback está inibido devido à sensibilidade reduzida da 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.

Ø RECEPTORES NUCLEARES

Os receptores nucleares são fatores de transcrição regulados por ligantes que controlam a expressão gênica ao ligarem-se diretamente em seqüências específicas no DNA, os elementos responsivos ao hormônio (HREs) (Beato, 1991; Greenspan, 1997; Evans, 1988). Os HREs geralmente estão localizados na região promotora dos genes alvo (Ribeiro et al., 1995) e são específicos para cada receptor. Geralmente, os HRES possuem duas cópias imperfeitas de um hexanucleotídeo que podem estar arranjadas em diferentes orientações, com espaçamento e seqüências flanqueadoras diferentes (Naar et al., 1991; Greenspan, 1997). Os receptores nucleares associam-se aos HREs como monômeros, homodímeros ou heterodímeros (Glass, 1994).

A superfamília dos receptores nucleares é formada por um grupo que compreende cerca de 75 proteínas diferentes que estão envolvidas na transdução de sinais hormonais

extracelulares em respostas transcricionais (Umesono et al., 1991; Mangelsdorf e Evans, 1995; Ribeiro et al., 1998b; Committee, 1999). Dentre os membros dessa família destacam-se os TRs, juntamente com os receptores que medeiam as ações dos hormônios esteróides, da vitamina D, dos retinóides e de vários outros ligantes que incluem ácidos graxos e eicosanóides. Entretanto, a superfamília de receptores nucleares também inclui os “receptores órfãos”, que são os membros mais numerosos da família e que ainda não possuem ligantes conhecidos (Evans, 1988; Kliewer et al., 1999).

Os receptores dos hormônios esteróides formam uma subclasse da superfamília. Esses receptores se ligam aos glicocorticóides (GRs), mineralocorticóides (MRs), androgênios (ARs), estrogênio (ER) e progesterona (PR). Na ausência de seus ligantes, esses receptores estão associados às proteínas de choque térmico (heat shock proteins, HSP) no citosol e em alguns casos no núcleo da célula. A interação com o ligante promove a dissociação das proteínas HSP e induz à formação de homodímeros que se ligam a regiões específicas do DNA, denominadas de elementos responsivos ao hormônio (hormone response elements, HREs). Os receptores dos hormônios esteróides ligam-se a esses HREs, geralmente um palíndromo, espaçados por 3 bases (AGAACAnnnTGTTCT) como homodímeros. Há também inúmeros casos em que os receptores esteróides podem controlar a transcrição através da interação com outros fatores de transcrição, que estão por sua vez ligados ao DNA. Uma vez ligados diretamente ou indiretamente ao DNA, o complexo hormônio-receptor estimula ou reprime a transcrição dos genes alvo (Mangelsdorf et al., 1995).

Outra subclasse da superfamília de receptores nucleares é representada pelos receptores dos hormônios tireoideanos (thyroid hormone receptors, TR), do ácido retinóico (retinoic acid receptor, RAR), da vitamina D (vitamin D receptor, VDR), e dos ativadores de proliferação de peroxissomos (peroxisomal-proliferator activated receptors, PPARs). Tais receptores, na ausência do hormônio (aporeceptores), estão localizados predominantemente no núcleo, em solução ou ligados ao DNA. Os aporeceptores são comumente ativos e podem reprimir ou estimular a expressão de genes com os quais estão associados. Essa subclasse liga-se preferencialmente a repetições diretas (Direct Repeats, DRs) do hexâmero AGGTCA (AGGTCA_(n)AGGTCA). Neste caso, o número de bases (n) que separa cada hexâmero determina a especificidade da ligação (Mangelsdorf et al., 1995). Além das repetições diretas (DRs), os elementos responsivos aos hormônios podem

estar na forma de palíndromos não espaçados (AGGTCATGACCT) – TREpal (Mangelsdorf et al., 1990a) ou palíndromos invertidos e espaçados por 6 bases (TGACCT n₆ AGGTCA) - F2 (Baniahmad et al., 1990) (figura 02).

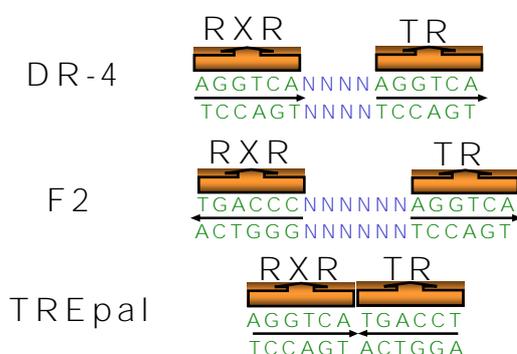


Figura 02. Elementos responsivos do receptor do hormônio tireoideano: Repetições diretas (DR-4), palíndromo invertido (F2) e palíndromo (TREpal). O “N” indica o número de nucleotídeos entre os hexâmeros. Adaptado de Barra et al., 2004.

Os aporeceptores dessa subclasse estão associados a proteínas repressoras dentro de um complexo maior de proteínas, que participa da supressão ou ativação da transcrição de genes alvo. O receptor dessa subclasse, quando ligado ao hormônio (holoreceptor), promove a dissociação das proteínas co-repressoras e, subsequentemente, a associação com proteínas co-ativadoras, que medeiam a estimulação ou repressão dos genes alvo. Os genes alvo estimulados pela ação do hormônio são geralmente reprimidos pelo aporeceptor, enquanto os genes alvo reprimidos pela ação do hormônio são geralmente estimulados pelo aporeceptor. Acredita-se que os holoreceptores dessa subclasse atuem formando heterodímeros com o receptor do ácido retinóico X (retinoid X receptors, RXR). O RXR é um exemplo de receptor órfão que foi posteriormente “adotado” por um ligante, o ácido 9-cis retinóico, descoberto após a clonagem do RXR (Mangelsdorf e Evans, 1995).

Ø RECEPTOR DO HORMÔNIO TIREOIDEANO

Os TRs atuam como fatores reguladores da transcrição gênica, aumentando ou diminuindo a expressão dos genes-alvo, dependendo se os promotores dos genes contêm elementos responsivos ao HT regulados de forma positiva ou negativa, respectivamente (Hu e Lazar, 2000; Zhang and Lazar, 2000; Yen, 2003).

Os TRs são codificados por dois proto-oncogenes que produzem proteínas que se ligam ao T₃ com alta afinidade e especificidade. O gene do TR α encontra-se no cromossomo 17, enquanto o gene do TR β encontra-se no cromossomo 3 (Weinberger et al., 1986). Cada um desses genes codifica várias proteínas ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 3$), que são o resultado do processamento alternativo do RNA mensageiro (“splicing” alternativo) ou da utilização de promotores alternativos (figura 03) (Flamant e Samarut, 2003). Dessa forma, as diferentes isoformas do TR são $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$, sendo que somente $\alpha 1$, $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ se ligam ao hormônio. As isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2$ diferem somente em sua região carboxi-terminal e, por esse motivo, a isoforma $\alpha 2$ não se liga ao hormônio, enquanto que as isoformas $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ diferem em sua região amino-terminal (Flamant e Samarut, 2003). Admite-se que a isoforma $\alpha 2$ possa exercer ação inibitória sobre os outros TRs ao competir com os mesmos pela formação de heterodímeros com RXR ou pela ligação aos elementos responsivos aos hormônios tireoideanos (TREs) (Brent, 1994). A isoforma TR $\beta 3$ foi recentemente descrita em ratos (Williams, 2000) e, a partir da comparação das seqüências genômicas desses animais com os humanos, pode-se prever que essa isoforma está conservada entre as duas espécies (Flamant e Samarut, 2003). A isoforma TR $\alpha 2$, por não se ligar ao T₃, pode inibir a transcrição mediada por TR $\beta 1$ ou TR $\beta 1$, provavelmente por competir com a ligação aos TREs e com a formação de heterodímeros com RXR (Ribeiro et al., 1998b).

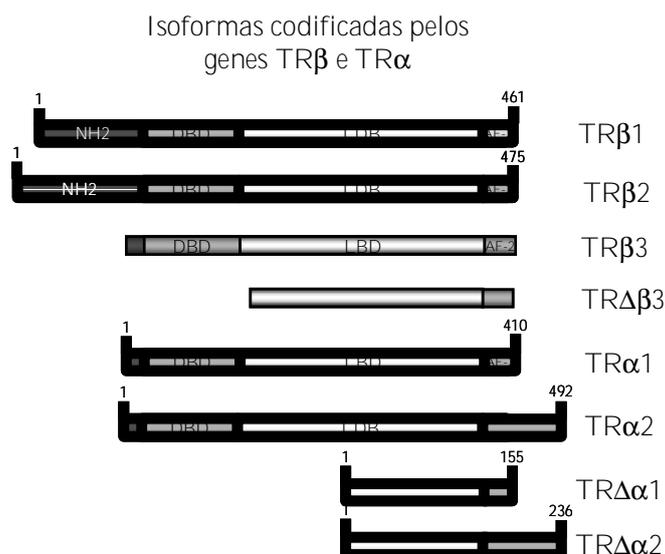


Figura 03. Estrutura primária das diferentes isoformas codificadas pelos genes receptor do hormônio tireoideano: as isoformas TR α 1, TR α 2, TR β 1 e TR β 2 são codificadas pelo gene TR α através da utilização de promotores alternativos. O gene TR β , por *splicing* alternativo e também pela utilização de promotores alternativos, produz as proteínas TR β 1, TR β 2, TR $\Delta\beta$ 1 e TR $\Delta\beta$ 2. Fonte: Barra et al., 2004.

A expressão relativa dos dois genes que codificam os TRs e a distribuição dos seus produtos variam de tecido para tecido e nos diferentes estágios de desenvolvimento. Os RNAs mensageiros (“messenger RNA”, mRNA) do TR α 1, TR α 2 e TR β 1 são expressos em quase todos os tecidos, mas diferem quantitativamente durante o desenvolvimento e de acordo com o tipo celular. Por exemplo, o TR β 1 é abundante no fígado, rim e cérebro e o TR α 1 é abundante nos músculos esqueléticos, gordura marrom e no coração. O TR α 2 é abundante no cérebro, ao passo que a expressão do TR β 2 é observada quase que exclusivamente na pituitária anterior e em outras áreas do cérebro (Lazar, 1993). O TR α 1 e TR α 2 são encontrados principalmente no epitélio do intestino delgado, pulmão e durante os estágios precoces do desenvolvimento (Flamant e Samarut, 2003). Em ratos, o TR β 3 é expresso no fígado, rim e pulmão, enquanto que o TR β 3 no músculo esquelético, coração, baço e cérebro (Williams, 2000). Essa expressão variada dos subtipos de TR pode constituir um mecanismo usado pelo T₃ para a regulação de tecidos de forma seletiva (Brent, 1994).

ü DOMÍNIOS FUNCIONAIS DOS RECEPTORES DO HORMÔNIO TIREOIDEANO

A análise estrutural e funcional do TR e de outros receptores nucleares demonstra que esses receptores exibem uma estrutura modular com domínios funcionais distintos, os quais exercem ações específicas. Cada módulo desempenha uma função, mas diferentes módulos podem interagir entre si para executar uma determinada ação biológica. Os três principais domínios são: o amino-terminal (N-terminal), o de ligação ao DNA (DBD) e o de ligação ao ligante (LBD). Existe, também, uma pequena região que conecta o DBD ao LBD, que é conhecida como dobradiça hinge (figura 04) (Ribeiro et al., 1998b).

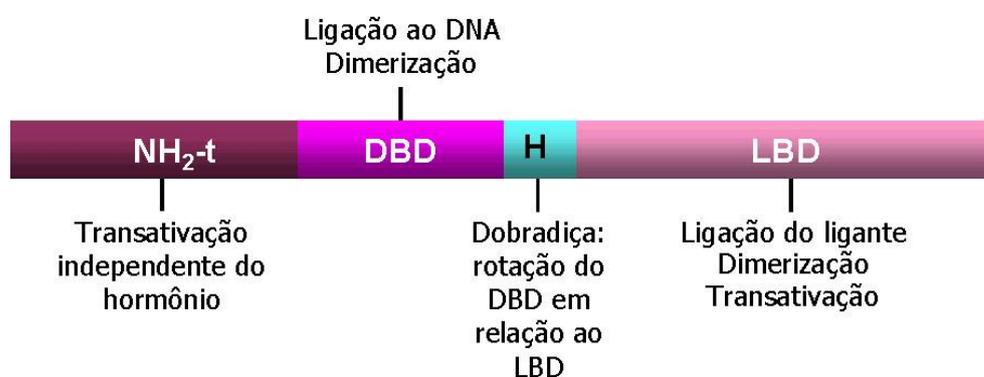


Figura 04. Estrutura linear representando os domínios funcionais dos receptores nucleares e suas funções: domínio amino-terminal (NH₂-t), domínio de ligação ao DNA (DBD), dobradiça (Hinge) e domínio de ligação ao ligante (LBD). Fonte: Barra et al., 2004.

O domínio amino-terminal é extremamente variável entre os membros da superfamília dos receptores nucleares, tanto no tamanho quanto na sequência de aminoácidos, e exibe uma função de ativação transcricional independente do ligante, denominada função de ativação 1 (AF-1) (Warnmark et al., 2003). No TR esse módulo é relativamente pequeno e na maioria dos casos a deleção desse módulo tem pouco efeito nas respostas transcricionais positivas ao hormônio tireoideano (3,5,3'-triiodo-L-tironina, T₃). Exceto por um segmento conservado de doze aminoácidos adjacentes ao DBD, os módulos amino-terminal dos TR são completamente divergentes dos outros receptores nucleares (McKenna e O'Malley, 2002; Ribeiro et al., 1998b).

A estrutura do DBD é extremamente conservada em toda superfamília e é responsável por ligar o receptor aos HREs. Assim, o DBD do TR α 1 possui 100% e 87% de homologia em relação ao TR α 2 e aos TR β 1 e TR β 2, respectivamente. O DBD inclui duas sequências de aminoácidos com resíduos de cisteína que formam duas estruturas independentes em forma de alça, que são coordenadas por uma molécula de zinco, e

conhecidas como dedos de zinco. A integridade de cada dedo de zinco é crítica, pois deleções ou substituições de resíduos de cisteína comprometem a ligação do receptor ao DNA, e conseqüentemente, sua atividade transcricional (Yen et al., 1995). Os dois dedos de zinco são separados por uma seqüência de 15 a 17 aminoácidos. Três aminoácidos da base do primeiro dedo representam a região chamada de caixa P (P-box). Esses aminoácidos são responsáveis pelo reconhecimento do elemento responsivo específico para cada receptor, ao passo que uma seqüência de cinco aminoácidos, localizada entre a primeira e a segunda cisteína na base do segundo dedo, é denominada de caixa D (D-box), uma região importante para a dimerização do receptor (Umesono and Evans, 1989; Ribeiro et al., 1998b). Os termos P-box e D-box estão relacionados com a posição proximal e distal dessas regiões, respectivamente (Glass, 1994).

O módulo situado na região carboxi-terminal, o LBD, é menos conservado que o DBD, e confere especificidade ao ligante específico do receptor. O LBD é importante para a formação de dímeros e também atua na associação do receptor com outras proteínas, tais como as HSPs, os co-repressores (Horlein et al., 1995; McKenna and O'Malley, 2002) e os co-ativadores (Feng et al., 1998; Glass et al., 1997), que participam nos processos de repressão ou de ativação da transcrição. Além dessas funções, o LBD contém uma superfície que é fundamental para a ativação transcricional, que se forma com a ligação do hormônio ao receptor. Após a ligação do hormônio, essa região, denominada função de ativação 2 (AF-2), passa a se interagir com os co-ativadores, que permitirão a formação do complexo protéico envolvido na ativação da transcrição (Wu et al., 2001).

Estudos recentes de cristalografia de raios X com o domínio LBD de TR (Ribeiro et al., 1998a; Wagner et al., 1995), RAR (Renaud et al., 1995), RXR (Bourguet et al., 1995), ER (Brzozowski et al., 1997) e PPAR (Nolte et al., 1998), demonstraram que o LBD dos receptores da superfamília tem uma estrutura tridimensional conservada e constituída predominantemente de 12 α -hélices (numeradas de 1 a 12, H1 a H12). Observou-se também que o ligante se aloja no interior do receptor e, com isso, desempenha um papel fundamental na formação da estrutura final do holoreceptor (figura 06). A função ativadora AF-2 envolve predominantemente 3 α -hélices (H3, H5 e H12), que formam uma superfície hidrofóbica, na qual se alojam os co-ativadores. Dessa maneira a estrutura tridimensional do holoreceptor é de importância crítica para entendermos o mecanismo estrutural

envolvido na ativação do receptor pelo hormônio (Wagner et al., 1995; Apriletti et al., 1998; Ribeiro et al., 1998a).

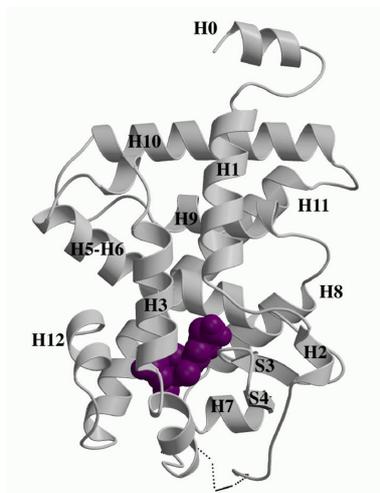


Figura 05. Desenho do rTR-âLBD que demonstra 12 α -hélices como seus principais constituintes estruturais do TR e a localização do ligante dentro do LBD. Fonte: Wagner et al., 1995.

A região que conecta o DBD ao LBD, e que age como uma dobradiça, é extremamente variável entre os diferentes receptores (Yen, 2001). No caso específico do TR, a principal função dessa região seria promover o movimento de rotação do DBD em relação ao LBD, possibilitando que o TR se ligue nos TREs com diferentes orientações (Mangelsdorf et al., 1990b; Kurokawa et al., 1993; Ribeiro et al., 1998b).

Ø REGULAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO GÊNICA PELO HORMÔNIO TIREOIDEANO

Û PROTEÍNAS CO-REGULADORAS DA AÇÃO DO TR

Vários estudos têm demonstrado que TR, na sua forma de aporeceptor (não ligado ao T_3), é capaz de interagir com fatores de transcrição como o TFIIB e TFIID, que são componentes chaves da maquinaria de transcrição basal (Wu e Koenig, 2000), podendo inibir a montagem do complexo de pré-iniciação da transcrição no promotor. Dessa forma, a interação do TR com os componentes da maquinaria de transcrição basal seria uma forma que o TR utilizaria para mediar a repressão basal independente de ligante (Fondell et al., 1996). Por outro lado, o TR não exerce essa função isoladamente, e vários estudos sugerem que sua associação com proteínas corressoras solúveis é crítica e fundamental para o TR reprimir a transcrição basal (Yen, 2001).

Dois dos principais co-repressores para o TR são o NCoR, “Nuclear Receptor Corepressor”, proteína de 270kDa (Horlein et al., 1995), e o SMRT, “silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor” (Chen e Evans, 1995). Tanto o NCoR quanto o SMRT são capazes de interagir com o TR na ausência de T₃, tanto em solução como quando o TR está ligado aos seus elementos responsivos. A interação do co-repressor com TR ocorre por meio de uma α -hélice do co-repressor que contém a seqüência de consenso LXXXIXXX(I/L) (onde L corresponde ao aminoácido leucina, I ao aminoácido Isoleucina e X a qualquer outro aminoácido) (Nagy et al., 1999; Perissi et al., 1999). O SMRT possui duas dessas seqüências, já o NCoR possui 3, duas delas homólogas às do SMRT e uma terceira, recentemente descoberta, específica para o TR, justificando a maior afinidade do TR pelo NCoR. Os co-repressores são capazes de interagir com outros repressores como as histonas desacetilases (HDACs), formando um complexo de co-repressores (Au-Fliegner et al., 1993; Feng et al., 1998; Wu and Koenig, 2000). A presença das HDACs no complexo co-repressor sugere que a repressão seja mediada pela desacetilação das histonas presentes na região promotora, possivelmente porque a histona desacetilada torna a cromatina mais condensada, restringindo o acesso dos fatores de transcrição basal ao DNA (figura 06) (Yen, 2001).

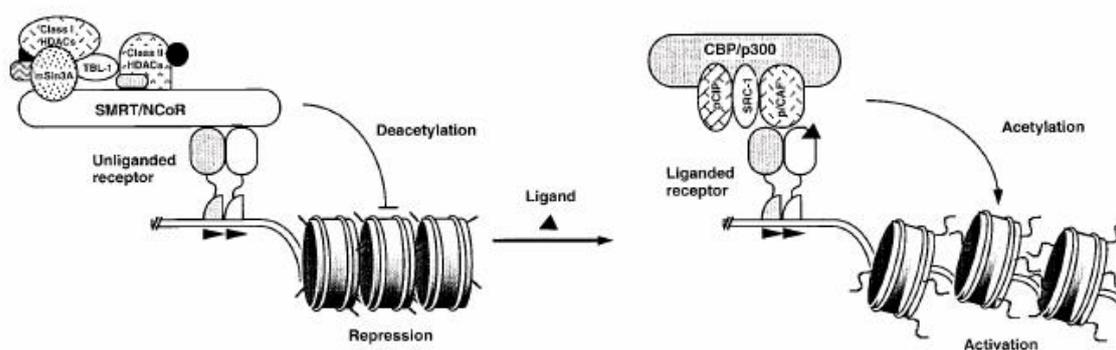


Figura 06. Complexo de co-ativadores e co-repressores e acetilação das histonas. Na ausência do ligante, o receptor heterodimérico está associado com um complexo de proteínas co-repressoras (SMRT/NCoR), que recrutam as HDACs diretamente ou pela interação com Sin3. Muitas outras proteínas podem pertencer a esse complexo, cuja exata composição ainda não é bem conhecida. A desacetilação das histonas mantém a cromatina compacta e assim reprime a transcrição. O ligante provoca a liberação do complexo de co-repressores e o recrutamento dependente do domínio AF-2 de co-ativadores da família p160 (tais como SRC-1, CBP/p300 e P/CAF). Todas essas proteínas possuem atividade

acetil-transferase (HAT), que permite a descompactação da cromatina e ativação gênica. Fonte: Aranda e Pascual, 2001.

A ligação do T₃ ao TR provoca mudanças conformacionais na estrutura do receptor, favorecendo a dissociação do TR com os correpressores (Makowski et al., 2003) seguindo da interação com proteínas co-ativadores (Zhang e Lazar, 2000). Os co-ativadores, por possuírem atividade histona acetil transferase (HAT), estimulam a transcrição ao acetilarem as histonas (Glass e Rosenfeld, 2000; McKenna e O'Malley, 2002; Yen, 2001). A hiperacetilação das histonas relaxa a cromatina e facilita o acesso dos fatores de transcrição basal ao promotor do gene alvo, estimulando a atividade transcricional. Ademais, co-ativadores são capazes de acetilar outras proteínas além das histonas, como o fator de transcrição p 53 e fatores de transcrição basal como TFIIE-TFIIF, que poderiam contribuir para o aumento da atividade transcricional (Wu e Koenig, 2000).

Vários co-ativadores foram identificados: GRIP-1 (proteína 1 que interage com GR), SRC-1 (co-ativador 1 do receptor de esteróide), pCIP (proteína associada ao co-integrador p300/CBP) e o pCAF (fator associado a p300/CBP) (McKenna et al., 1999). Outra proteína identificada como co-ativadora do TR é uma proteína que se liga ao CREB (proteína que se liga ao elemento responsivo cAMP) conhecida com CBP (proteína que se liga a CREB) e mais recentemente foi identificado o co-ativador TRBP (proteína que se liga ao TR) (Lan et al., 2000; McKenna et al., 1999). Esses co-ativadores não são específicos, associam-se com vários outros membros da superfamília dos receptores nucleares e exercem seu efeito ativando a transcrição na presença do ligante. Esta associação é feita pela interação de um segmento de α -hélice de seqüência LXXLL (onde L corresponde a leucina e X a qualquer aminoácido) presente na região central do co-ativador, com a superfície AF-2 dos receptores nucleares (Heery et al., 1997; McInerney et al., 1998). Cada co-ativador possui 3 cópias desta seqüência LXXLL e existem evidências de que diferentes receptores nucleares interagem com LXXLL distintos (Yen, 2001; Glass e Rosenfeld, 2000; McKenna e O'Malley, 2002). Já foi descoberto um novo co-ativador específico para o TR e RXR, o NRIF3, “nuclear receptor-interacting factor 3”, que não é capaz de interagir com nenhum outro receptor nuclear e não possui nenhuma homologia com os outros co-ativadores já descritos (Li et al., 1999). A importância deste co-ativador na modulação específica do hormônio tireoideano ainda não está totalmente definida.

Os efeitos do TR na regulação da expressão gênica nos genes ativados pelo T₃, tais como o hormônio de crescimento (GH) (Flug et al., 1987; Glass et al., 1987 Brent et al., 1989), a enzima málica hepática (Petty et al., 1990), a cadeia pesada de á miosina (Izumo e Mahdavi, 1988; Tsika et al., 1990) e muitos outros, são inicialmente obtidos com a ligação do receptor a seqüências de DNA específicas, presentes na região regulatória dos genes alvo. Essas regiões são compostas pela seqüência hexanucleotídica AGGTCA (Wu et al., 2001), e, como já foi dito anteriormente, podem estar organizadas em três orientações diferentes: na forma de repetição direta espaçada por 4 nucleotídeos quaisquer (DR-4), ou na forma de palíndromo invertido espaçada por seis nucleotídeos quaisquer (F2), ou, ainda, na forma de palíndromo sem nenhum espaçamento (TREpal) (figura 03) (Ribeiro et al., 1998b). Aproximadamente 30 TREs naturais já foram identificados, sendo que a maioria é DR-4, seguido pelo F2 e mais raramente o TREpal (Yen, 2001).

Na ausência do ligante, os membros da subclasse dos receptores dos hormônios tireoideanos ligam-se ao DNA na forma de homo ou heterodímeros. Esses dímeros, por sua vez, se associam aos correpressores, como NCoR e o SMRT, que formam complexos com as desacetilases de histonas (HDACs), incluindo HDAC-1, 2 e 3, que mantêm a cromatina compacta e inibe a transcrição (Yen, 2003). Com a ligação do hormônio ao receptor, observa-se formação predominante de heterodímeros com o RXR, seguida de dissociação das proteínas co-repressoras e subseqüentemente, a associação com proteínas co-ativadoras como os co-ativadores do receptor de esteróide (SRC-1, SRC-2 e SRC-3) e o complexo de proteína que interage com o receptor de vitamina D/proteína associada ao TR (complexo DRIP-TRAP), dentre outras proteínas, que medeiam a estimulação de genes alvo e possuem atividade histona acetiltransferase (Bannister and Kouzarides, 1996; Ogryzko et al., 1996; Spencer et al., 1997; McKenna et al., 1999). Com a acetilação das histonas, a cromatina é relaxada, o que facilita o acesso de outros fatores de transcrição e estimula o processo transcricional pela RNA polimerase (Ribeiro et al., 1998b; McKenna et al., 1999). Portanto, a ligação com o hormônio transforma o TR de um estado repressor para um estado ativador da transcrição de genes estimulados pelo T₃ (figura 07) (Ribeiro et al., 1995).

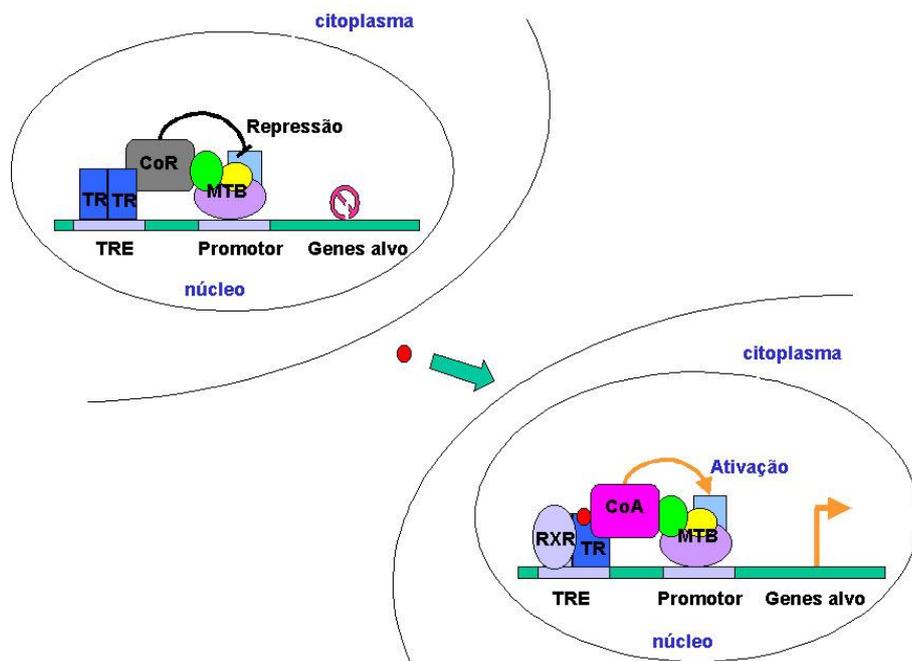


Figura 07. Representação esquemática do mecanismo de ação do TR. Na ausência de T_3 , o TR se encontra ligado ao TRE como homodímero associado a proteínas co-repressoras que atuam inibindo a maquinaria de transcrição basal (MTB). A ligação do TR ao T_3 (círculo vermelho), induz a uma mudança conformacional que conduz a dissociação de homodímeros (TR/TR) e associação de heterodímeros (TR/RXR), liberação dos co-repressores e associação com proteínas co-ativadoras que agem sobre a MTB ativando a transcrição de genes alvo. Fonte: Barra et al., 2004.

ü GENES REGULADOS NEGATIVAMENTE PELO T_3

Os mecanismos que envolvem os genes regulados negativamente pelo HT, como o TRH (Hollenberg et al., 1995a; Satoh et al., 1996), TSHá (Burnside et al., 1989; Chatterjee et al., 1989), TSHâ (Carr et al., 1989; Wondisford et al., 1989; Bodenner et al., 1991), cadeia pesada de â miosina (Rindt et al., 1995) e fator de crescimento epidermal (Thompson et al., 1992), são bem menos compreendidos. Provavelmente envolvem a mesma classe de moléculas em TREs diferentes, denominados TREs negativo (nTRE ou NRE). Diferentemente dos elementos responsivos positivos, uma seqüência consenso para os nTREs ainda não foi estabelecida, mas já foi demonstrado que o TR é capaz de exercer a regulação inibitória da transcrição de diferentes genes por meio de nTREs divergentes estruturalmente, assim como a ativação pelo T_3 utiliza uma variedade de TRE positivos, como o TREpal, DR-4 e F2 (Satoh et al., 1996). Estudos de mutagênese localizaram esses nTREs próximo a região “TATA box”, sugerindo que a regulação negativa pelo T_3 pode

ser causada pela interferência do complexo de iniciação da transcrição (Chatterjee et al., 1989).

Existem evidências de que os genes alvos podem adotar mecanismos distintos para este tipo de repressão. No caso dos genes TRH, TSH_á e TSH_â, observa-se que a transcrição é suprimida pelo T₃ e ativada pelo TR quando este não está ligado ao T₃. Ademais, é interessante observar que, de maneira oposta ao que ocorre na ativação da transcrição, existem evidências de que os co-repressores estão envolvidos na ativação da transcrição pelo TR sob forma de apo-receptor (Tagami et al., 1997; Satoh et al., 1999; Tagami et al., 1999; Berghagen et al., 2002), e os co-ativadores, na repressão induzida pelo TR ligado ao T₃ (Weiss et al., 1999), demonstrando que a função dos co-reguladores é dependente do contexto do promotor (Kim et al., 2005). Desta forma, mutantes de TR que não se interagem com moléculas co-repressoras apresentam uma redução da ativação da transcrição dos genes TRH e TSH na ausência do hormônio (Tagami et al., 1997; Berghagen et al., 2002), e TR mutantes (E457A), que interagem deficientemente com co-ativadores, apresentam uma regulação negativa dos mesmos genes comprometida (Ortiga-Carvalho et al., 2005). Além disso, camundongos com deleção do gene que codifica o co-ativador SRC-1 apresentam resistência à supressão da síntese e secreção de TSH pelo T₃ (Weiss et al., 1999). Neste mesmo sentido, mutações no TR que impedem a ligação do TR com proteínas co-ativadoras p160 suprimem a repressão mediada pelo T₃ no promotor do TSH_á, mas não impede a ativação da transcrição mediada pelo TR na ausência do T₃ (Tagami et al., 1999). Uma possível explicação de como o SMRT pode atuar como co-repressor nos pTREs e como co-ativador nos nTREs é que o complexo formado nesses dois elementos responsivos podem adotar diferentes conformações, resultando em diferentes contribuições no complexo de iniciação transcricional. Isso é indicado pelo fato de que a sensibilidade do complexo TR-SMRT a proteases é diferente, dependendo do elemento responsivo em que é formado (Berghagen et al., 2002). Esta hipótese é descrita esquematicamente na figura 08. Na ausência do hormônio, o complexo TR-SMRT assume diferentes conformações dependendo do TRE e isto resulta no recrutamento de diferentes polipeptídeos, que ativam ou reprimem o complexo de iniciação transcricional.

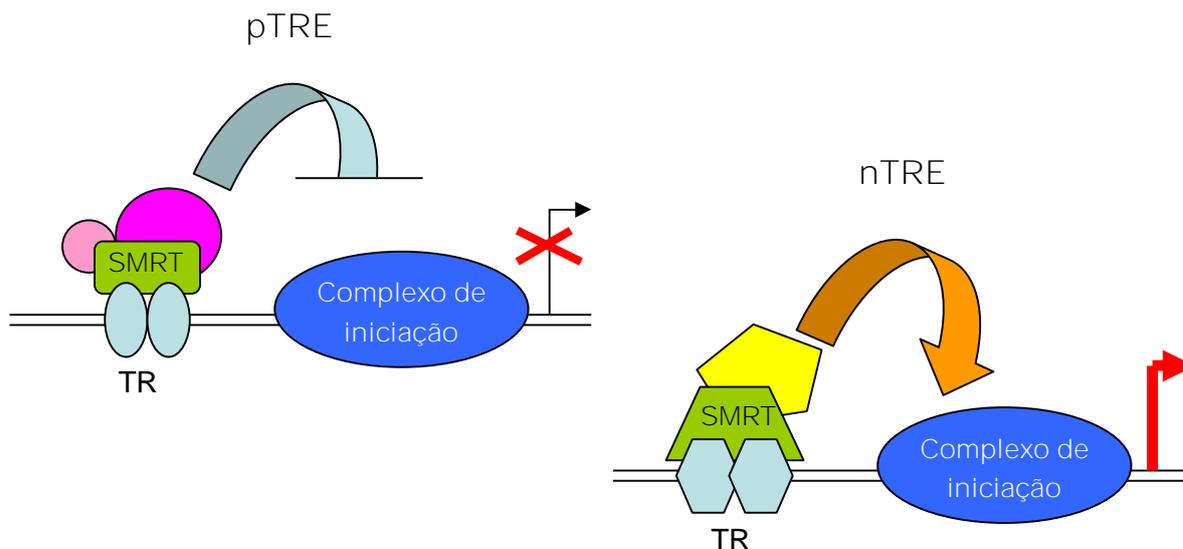


Figura 08. Uma ilustração modelo das diferentes funções do SMRT no elemento responsivo positivo (pTRE) e negativo (nTRE). Na ausência do ligante, o TR (mostrado como homodímero, mas pode ser também heterodímero com o RXR) se liga ao pTRE. O SMRT se liga e recruta outros polipeptídeos, que inibem o complexo de iniciação transcrricional. Por outro lado, quando TR está ligado ao nTRE, também na ausência do hormônio, o SMRT também se liga, porém o complexo TR-SMRT assume uma conformação diferente, que recruta outras proteínas que estimulam o complexo de iniciação transcrricional e ativam a transcrição. Adaptado de Berghagen et al., 2002.

Dentre as isoformas do TR, TR \hat{a}_2 é quantitativamente e funcionalmente mais importante que TR \hat{a}_1 e TR \hat{b}_1 na regulação do hipotálamo e pituitária (Koenig et al., 1987; Hodin et al., 1989; Cook et al., 1992; Lechan et al., 1994; Schwartz et al., 1994; Ng et al., 1995; Safer et al., 1997; Langlois et al., 1997; Abel et al., 1999; Abel et al., 2001). Isto, como já foi descrito anteriormente, está de acordo com a distribuição dessas isoformas, já que o TR \hat{a}_1 está presente predominantemente no músculo esquelético, tecido adiposo e coração; TR \hat{b}_1 , no cérebro, fígado e rim; enquanto o TR \hat{a}_2 está restrito, principalmente, no hipotálamo e na pituitária (Hodin et al., 1989; Cook et al., 1992; Lazar, 1993; Apriletti et al., 1998; Zhang and Lazar, 2000) e em menor escala no desenvolvimento da retina e no sistema auditivo (Sjoberg et al., 1992; Bradley et al., 1994).

Também já foi demonstrado o envolvimento das histonas desacetilases (HDAC) na repressão. A co-transfecção de TRH-LUC com um inibidor das HDACs (TSA – trichostatin A) diminuiu a repressão na presença do T $_3$, sem interferir na ativação na ausência de T $_3$ (Becker et al., 2001). O mesmo fenômeno pode ser observado com o promotor do TSH \hat{a} , em que o T $_3$ induz o recrutamento de HDAC $_2$ (Sasaki et al., 1999) e de TR \hat{a}_1 pelo nTRE (Loinder and Soderstrom, 2005; Sasaki et al., 1999) e a presença do TSA

diminui a repressão dependente do ligante (Sasaki et al., 1999). Esses resultados apontam a importância das HDACs na repressão mediada por T_3 . No entanto, baseado nas informações estruturais ainda não é possível se compreender, como o TR ligado recrutaria as HDACs.

A importância da ligação do TR ao DNA na repressão ainda é uma questão polêmica. Vários modelos têm sugerido que a regulação negativa é realizada por meio de uma ligação direta TR-DNA (Chatterjee et al., 1989; Bodenner et al., 1991; Naar et al., 1991; Carr et al., 1992; Cohen et al., 1995; Takeda et al., 1997; Sasaki et al., 1999; Laflamme et al., 2002). Recentemente, foi demonstrado que a ligação direta do TR α_2 ao nTRE é requerida para a regulação negativa dependente de T_3 (Shibusawa et al., 2003b). Esta hipótese foi demonstrada por meio de um mutante TR α_2 -GS125 em que dois aminoácidos (glutamato e glicina, localizados na região do dedo de zinco do DBD do TR α_2) foram mutados para glicina e serina, respectivamente, impedindo o reconhecimento da sequência do nTRE. Quando TR α_2 -GS125 foi transfectado em células 293T, a regulação negativa dependente de T_3 dos genes TRH, TSH α e TSH β foram abolidas. Outros estudos também utilizaram o mutante, TR-C127S, que não se liga ao DNA, e observaram que a ativação do promotor do TRH, na ausência do ligante, foi prejudicada (Takeda et al., 1997; Satoh et al., 1999;). O significado fisiológico da ligação TR-DNA foi confirmada pelo achado de que camundongos mutantes homocigotos para TR α_2 -GS125 (TR $\alpha^{GS/GS}$) apresentaram uma regulação anormal pelo T_3 no eixo hipotálamo-pituitária-tireóide e na retina, idêntico às anormalidades previamente observadas no camundongo “knock-out” TR α (TR $\alpha^{-/-}$) (Shibusawa et al., 2003b). Esses resultados indicam que a ligação TR-DNA é necessária para a regulação transcricional negativa.

Porém, a regulação negativa dependente de T_3 pode ocorrer sem uma interação direta TR-DNA (Tagami et al., 1997; Kim et al., 2004;). O TR pode interagir com outras proteínas e essas, por sua vez, interagem com o DNA, como o que ocorre com c-jun e c-fos, que é um composto protéico dimérico que por meio do sítio AP-1 é regulado negativamente pelo T_3 (Lopez et al., 1993; Lazar, 2003;) (figura 09).

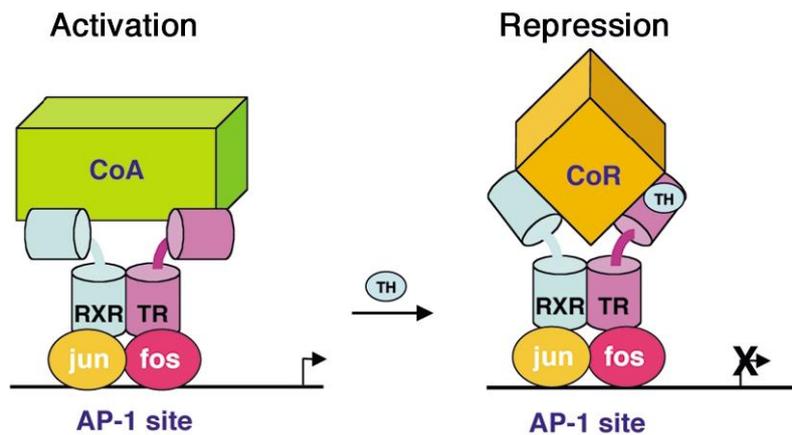


Figura 09. Mecanismo potencial de regulação negativa. Representação esquemática da interação indireta TR-DNA (TR-AP-1) por meio da interação proteína-proteína (TR-jun/fos) de um provável mecanismo de regulação negativa pelo hormônio tireoideo. Adaptado de Lazar, 2003.

Uma outra hipótese para a regulação da atividade do promotor do $TSH\alpha$ pode ser explicada pelo mecanismo de seqüestro, na qual o TR em solução e não ligado ao T_3 , recruta os co-repressores que por sua vez seqüestram as histonas desacetilases (HDAC) que reprimem a transcrição (Tagami et al., 1997; Tagami et al., 1999). O seqüestro destas desacetilases da região promotora não permite a condensação da cromatina, favorecendo a ativação da transcrição. Posteriormente, com a ligação do T_3 ao TR, ocorre a dissociação do complexo co-repressor/HDAC e TR, que agora passa a recrutar co-ativadores que seqüestram as histonas acetilases (HATs) e outros fatores de transcrição que relaxam a cromatina, permitindo o fácil acesso das HDACs à região promotora. Conseqüentemente, a ausência de co-ativadores e HATs, favorecem a repressão dependente do ligante (figura 10) (Tagami et al., 1999). Esses resultados sugerem que a regulação negativa pelo T_3 pode ser induzida sem uma interação direta TR-DNA. Porém esse modelo não explica como a especificidade da regulação negativa é conferida.

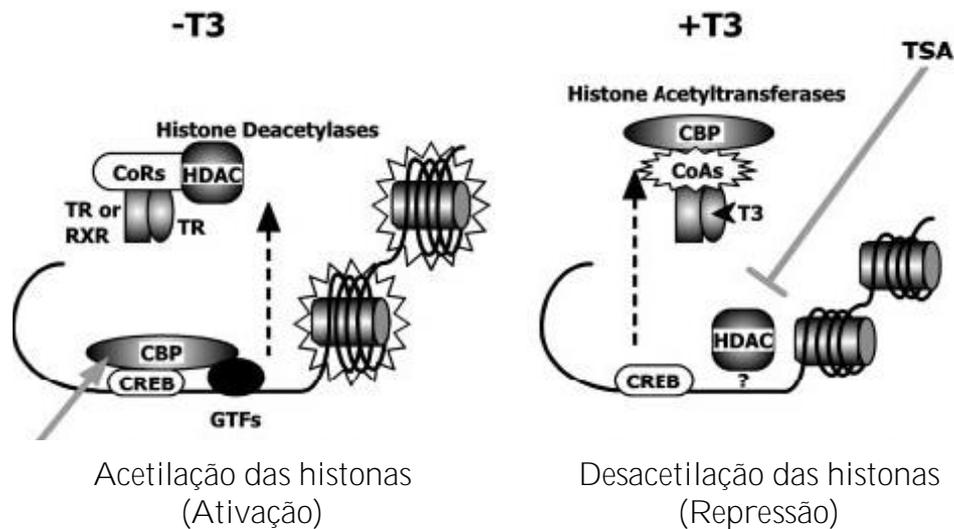


Figura 10. Modelo de regulação negativa do TSH. Na ausência de T_3 o TR em solução se liga a co-repressores que recrutam HDAC da região promotora, resultando no aumento da acetilação das histonas e ativação transcricional. Na presença do T_3 o TR dissocia dos co-repressores e recruta os co-ativadores, deixando a região promotora livre para atuação das HDACs, que compactam a cromatina e reprimem a transcrição. GTFs – Fatores gerais de transcrição. Adaptado de Tagami et al., 1999.

- Promotor do TSH:

A tireotropina (TSH) pertence à família dos hormônios glicoproteicos que inclui também o hormônio folículo-estimulante (FSH), luteizante (LH) e a gonadotropina coriônica. É uma proteína heterodimérica composta pelas subunidades α e β ligadas não covalentemente, em que a cadeia α é comum aos quatro membros da família das glicoproteínas e a cadeia β é distinta e assim confere especificidade a cada hormônio. (Shupnik et al., 1989; Wood et al., 1989). O hormônio tireoideano regula negativamente a atividade do gene de ambos, α e β , em nível transcricional (Chin et al., 1993), porém as duas subunidades parecem requerer diferentes fatores de transcrição basal e podem também ter mecanismos diferentes de regulação transcricional pelo T_3 (Shupnik, 2000), embora apresentem uma parcial homologia (Carr et al., 1992).

A região regulatória do promotor do TSH β que está envolvida na repressão mediada pelo T_3 foi descrita como sendo a região “downstream” do sítio de início da transcrição (Wondisford et al., 1989; Bodenner et al., 1991; Sasaki et al., 1999). O nTRE do TSH β de humanos consiste de dois domínios localizados entre as bases +3 e +17pb (domínio 1) e +28 e +37pb (domínio 2) do exon 1, próximo a uma seqüência “TATA box”,

“downstream” dos sítios de ligação de fatores de transcrição Pit1 (ativador transcricional da pituitária), exigidos para a expressão do TSHâ (figura 11) (Shupnik, 2000). O primeiro domínio é constituído de uma seqüência consenso (GGGTCA) e outra, relativamente degenerada (GCATCT), que é uma repetição invertida espaçada por cinco pares de base. O segundo domínio é composto por apenas uma seqüência (GCAAAGTAAG) (Bodenner et al., 1991), homóloga ao TRE do gene do hormônio de crescimento de rato (-190 GAAAGGTAAG -181) (Flug et al., 1987; Koenig et al., 1987). A seqüência 5’ do domínio 1 e o domínio 2 são idênticos em humanos, ratos e camundongos (figura 11) (Cohen et al., 1995). O TR se liga ao sítio 1 com maior afinidade e pode formar homodímeros (Bodenner et al., 1991) ou monômeros (Fondell et al., 1993; Carr and Wong, 1994; Cohen et al., 1995), enquanto que no domínio 2 o TR se liga apenas na forma de monômeros e com baixa afinidade pelo DNA (Bodenner et al., 1991). Porém, estudos recentes demonstraram que mutações no domínio 2 diminuíram a repressão mediada pelo T₃ (Sasaki et al., 1999), demonstrando que ambos os domínios são importantes para a inibição.

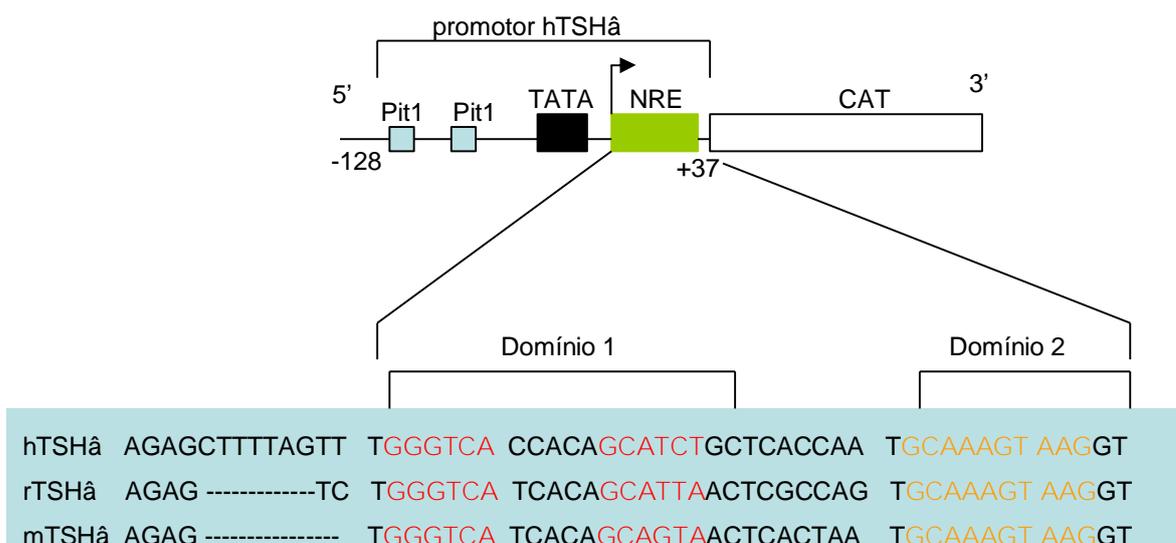


Figura 11. Estrutura do promotor do TSHâ: comparação entre espécies (h-humano, r-rato e m-camundongo). Os quadrados azuis pequenos indicam dois Pit1 (elementos de ativação) e o quadrado verde indica o elemento responsivo negativo. A seqüência em vermelho pertence ao domínio 1 e a seqüência em laranja, domínio 2. Adaptado de Sasaki et al., 1999.

- Promotor do TRH:

Já foram identificados seis potenciais “half-sites” envolvidos na regulação do promotor do hTRH (sítios 1 a 6) entre -250 e +55pb. Porém, a caracterização dos

elementos que medeiam o efeito do TR e do T₃ demonstrou que apenas três (sítios 4, 5 e 6), que são separados e atuam de maneira combinatorial, estavam realmente envolvidos na regulação negativa do TRH (figura 12) (Hollenberg et al., 1995a). Dois desses elementos (sítios 5 e 6) localizados no promotor do hTRH entre as bases +14 e +19 (GGGTCC) e +37 e +42 (TGACCT), respectivamente, não são conservados entre as espécies de roedores (Satoh et al., 1996). Eles são organizados como “single half-site” e a ligação do TR nesses elementos é realizada via monômeros.

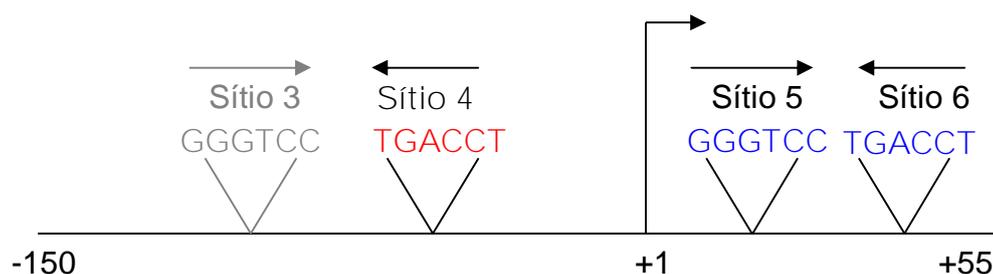


Figura 12. Localização e seqüência dos potenciais “half-sites” que medeiam a regulação negativa do promotor do hTRH. Os sítios 1 e 2 são half-sites adicionais upstream da posição -150 e por não apresentarem nenhum significado funcional, foram excluídos. O sítio 3 está localizado entre -115 e -120, porém, mutações nesse sítio também mostraram que ele não teve nenhum efeito na regulação negativa. O sítio 4 está localizado entre -55 e -60; sítio 5, +14 e +19; e sítio 6, +37 e +42. As setas indicam a orientação dos half-sites; a seqüência em cinza indica o half-site que não influenciou na regulação do TRH; a seqüência em vermelho, o half-site de maior importância; e as seqüências em azul, os half-sites de menor importância na regulação negativa. Adaptado de Hollenberg et al., 1995a.

O terceiro “half-site”, sítio 4, exerce uma maior importância na regulação negativa pelo T₃ e por isso é considerado o principal nTRE no promotor do TRH (Hollenberg et al., 1995a; Satoh et al., 1996; Guissouma et al., 2002). Este nTRE predominante, de seqüência TGACCT, localizado entre as bases -60 e -55, foi identificado nos promotores do TRH de humano e de camundongo e é bem conservado entre as espécies (Hollenberg et al., 1995a; Satoh et al., 1996; Balkan et al., 1998; Satoh et al., 1999;). Já foi demonstrado que a interação DNA-TR é mais forte no sítio 4 do que nos sítios 5 e 6 (Hollenberg et al., 1995a).

A isoforma TR \hat{a} exerce, preferencialmente, a regulação inibitória da transcrição gênica do TRH de humano e rato, sendo assim isoforma-específica conferida pelo domínio N-terminal (Satoh et al., 1996; Guissouma et al., 2002). TR \hat{a}_1 e TR \hat{a}_2 inibem a expressão do TRH de camundongos de forma semelhante (Guissouma et al., 1998), porém no TRH

de humanos o TR α_2 é mais eficiente que TR α_1 na repressão dependente do ligante (Langlois et al., 1997). O domínio N-terminal da isoforma TR α_1 reduz a ativação transcricional independente do ligante e anula a repressão do TRH dependente do ligante (Guissouma et al., 2002).

No promotor do TRH, o TR se liga ao co-ativador SRC-1 de maneira dependente de T₃ e SRC-1 anula a ativação na ausência do hormônio, mostrando, assim, que esse co-regulador prejudica a ativação e auxilia na repressão (Guissouma et al., 2002). Em contrapartida, a super-expressão de N-CoR e SMRT aboliu a repressão dependente de T₃ (Becker et al., 2001) e a co-transfecção, aumentou a ativação independente do ligante. De fato o NCoR interage com TR no sítio 4 na ausência de T₃ e a adição do hormônio promove a sua dissociação. Uma hipótese é que os co-repressores antagonizam a repressão dependente de T₃ pelo seqüestro de moléculas chave, como as HDACs (Sato et al., 1999) ou ainda que o TR interage com os co-repressores de maneira diferenciada nesses promotores e ao invés de recrutar outros peptídeos repressores, recrutam proteínas que estimulam o complexo de iniciação transcricional e ativam a transcrição (Yang and Privalsky, 2001; Berghagen et al., 2002).

- Sítio AP-1:

O AP-1 é um fator de transcrição dimérico composto de produtos da família dos proto-oncogenes *jun* e *fos* (Angel and Karin, 1991), sendo c-Jun o maior componente do complexo AP-1 (Angel et al., 1988; Bohmann et al., 1987). Essas proteínas podem se homodimerizar (c-Jun/c-Jun) ou heterodimerizar (c-Jun/c-Fos) e são capazes de se ligar a um sítio específico do DNA, sítio AP-1. O complexo protéico AP-1, em resposta a fatores de crescimento, citocinas, promotores de tumor (TPA) e diversos oncogenes (*src* e *ras*), é capaz de induzir a expressão de vários genes, que estão envolvidos na proliferação e na diferenciação celular, e assim, desenvolve um papel crítico na regulação do crescimento normal e neoplásico (Herschman, 1991). Um exemplo clássico desses genes é o promotor da colagenase humana, cuja expressão é largamente determinada pelo complexo AP-1 (Angel et al., 1987; Schmidt et al., 1993). Porém, os receptores nucleares, tais como TR (Zhang et al., 1991), ER (Kushner et al., 2000; Cheung et al., 2005;), RAR (Nicholson et al., 1990) e GR (Jonat et al., 1990; Yang-Yen et al., 1990), podem interagir com o complexo AP-1 e regular negativamente a expressão desses genes (Perez et al., 1994). A

interferência com a atividade do AP-1 não é mediada pela ligação direta dos receptores ao DNA e sim por uma interação proteína-proteína dos receptores com *c-jun* ou *c-fos* (Zhang et al., 1991) (figura 09).

O TR, assim como os outros receptores, é capaz de se ligar, indiretamente, e ativar ou reprimir a transcrição na ausência ou presença do ligante, respectivamente (Lazar, 2003). Estudos de co-transfecção do TR com o promotor da colagenase demonstraram que o grau de inibição é largamente dependente do hormônio tireoideano (Schmidt et al., 1993). Assim, em genes regulados pelo complexo AP-1, o TR não ligado ao T₃ ativa e o TR ligado, reprime a transcrição gênica, como o que ocorre com os outros genes regulados negativamente pelo T₃. A deleção de 17 aminoácidos da região carboxi-terminal do TR impediu a interação do receptor com Jun, demonstrando que o domínio C-terminal é importante para que o TR exerça o efeito antagonista sobre AP-1 (Zhang et al., 1991). O DBD do TR também é requerido para a potencialização e repressão, pois também participa da interação proteína-proteína. O TR mutante sem o DBD é incapaz de reprimir o promotor do *c-fos* pelo T₃ (Perez et al., 1993). Por outro lado, a região N-terminal não é requerida para interação com Jun (Lopez et al., 1993). O mesmo autor também demonstrou que o TR interage com Jun e não com Fos.

Além de inibir a atividade do AP-1, o TR também é capaz de bloquear efetivamente a expressão de *c-Fos* e, dessa forma, a formação do complexo AP-1, potencializando seu efeito inibitório (Perez et al., 1993). O mecanismo de ação pelo qual o TR interfere na atividade do AP-1 ainda não está muito claro. Uma das hipóteses é que TR e AP-1 competem por um co-fator que é requerido para a transativação eficiente de ambas as proteínas. Essa hipótese foi demonstrada pela superexpressão do co-ativador CBP (CREB-binding protein), que restaurou a atividade do AP-1, que tinha sido reprimida pelo receptor ligado (Kamei et al., 1996). Além da competição por co-ativadores, um outro mecanismo pelo qual o TR e os outros receptores nucleares interferem com AP-1 é via impedimento da fosforilação de *c-Jun* por inibição das JNKs (Jun amino-terminal kinase). A fosforilação nas serinas 63 e 73 potencializa a ação de *c-jun* sobre AP-1 permitindo que ocorra a ligação entre *c-jun* e o co-ativador CBP. Os receptores nucleares na presença de seus ligantes inibem ativação das JNKs, logo inibem a ligação da CBP a Jun. Consequentemente, os TRs previnem a ativação dependente da fosforilação de fatores transcripcionais, que são envolvidos na indução do AP-1 (Caelles et al., 1997).

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 (Zhang et al., 1991). 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 α (Kok et al., 1987; Dobrovic et al., 1988).

Ø DIMERIZAÇÃO DOS RECEPTORES NUCLEARES

Como descrevemos anteriormente, acredita-se que os receptores da subclasse do TR, RAR, VDR e PPAR regulam a transcrição gênica *in vivo* associados como heterodímeros ao RXR e ligados a DRs (Kliewer et al., 1992). O RXR pertence à família dos fatores de transcrição e funciona tanto como receptor dependente do ligante ácido 9-cis retinóide, que são pequenas moléculas lipofílicas derivados da Vitamina A (Retinol), como também parceiro heterodimérico dos receptores do hormônio tireoideano, do ácido retinóico e da vitamina D (Mangelsdorf et al., 1992). Assim como os esteróides e os hormônios tireoideanos, os RXRs afetam a morfogênese, o desenvolvimento, o crescimento e a diferenciação celular (Gudas, 1994). A formação de heterodímeros entre TR e RXR, nos elementos responsivos positivos, aumenta a ligação do receptor ao DNA tanto *in vitro* como *in vivo* e estimula a transcrição gênica (Darling et al., 1991; Yu et al., 1991; Kliewer et al., 1992; Hallenbeck et al., 1993; Leng et al., 1994;). Geralmente, quando o RXR está dimerizado com VDR, TR ou RAR em DRs, o complexo formado não responde ao ligante do RXR, que por esta razão é considerado um parceiro silencioso. Isso ocorre porque a ligação do RXR ao TR induz uma alteração alostérica no LBD do RXR que o impede de se ligar ao ácido 9 cis-retinóico (9cisRA) (Forman et al., 1995; Leblanc and Stunnenberg, 1995).

Porém, o papel do RXR nos elementos responsivos negativos tem sido pouco estudado. A configuração de muitos nTREs não favorece a ligação do clássico heterodímero TR-RXR já que, frequentemente, muitos aparecem como “single half-site” que implica que somente o TR pode se ligar ao DNA como monômero. Alguns autores demonstraram que, no promotor do TSH, o RXR na presença do seu ligante 9-cis, exerce um papel antagonista à ativação e inibição exercida na ausência ou presença do hormônio tireoideano, respectivamente (Hallenbeck et al., 1993; Cohen et al., 1995). Também demonstraram que o RXR não forma heterodímero com o TR e quando RXR é adicionado *in vitro*, diminui a formação de monômero ligado ao DNA, sugerindo que a heterodimerização entre TR e RXR em solução diminui a ligação do TR ao nTRE (Cohen et al., 1995; Sasaki et al., 1999). Entretanto, a diminuição da repressão observada na presença de RXR não foi comprovada em outros estudos que demonstraram que o RXR potencializa tanto a ativação como a repressão, na ausência e presença de T₃, respectivamente (Haugen et al., 1997; Safer et al., 1997; Laflamme et al., 2002). No promotor do TRH já é consenso que o RXR melhora tanto a ativação como a repressão transcricional na ausência ou presença do ligante, respectivamente (Hollenberg et al., 1995a; Safer et al., 1997; Takeda et al., 1997; Laflamme et al., 2002), porém nenhum estudo conclusivo tem demonstrado a importância da heterodimerização entre receptores no sítio AP-1.

Os receptores nucleares contêm duas regiões independentes para a dimerização, uma no LBD e outra no DBD. Acredita-se que a dimerização ocorra em dois estágios: entre os LBDs, ainda quando os TRs estão em solução e entre os DBDs, após a ligação dos TRs ao DNA (Hirst et al., 1992; Kurokawa et al., 1994; Mangelsdorf and Evans, 1995). Na associação entre os heterodímeros, TR/RXR, em DR-4, os aminoácidos do segundo dedo de zinco do RXR associam-se com os aminoácidos do primeiro dedo de zinco do TR, adotando uma conformação onde o RXR se liga no hexâmero AGGTCA situado na região 5' e o TR se liga no hexâmero AGGTCA situado na região 3' (Rastinejad et al., 1995; Zechel et al., 1994).

Os conceitos atuais sobre a dimerização entre LBDs do TR são baseados em mutações que identificaram uma área de aproximadamente 40 aminoácidos na H10 e H11 (Au-Fliegner et al., 1993; Nagaya et al., 1993; Perlmann et al., 1996). Entretanto, esses estudos são baseados em mutações situadas no interior do receptor e que, portanto, tende a

alterar de forma grosseira a estrutura do TR, o que pode alterar as interações intramoleculares. Além disso, a afinidade pelo hormônio também pode ser modificada e, conseqüentemente, dificultar a interpretação dos resultados. Recentemente, os aminoácidos na superfície do LBD do TR foram identificados o que possibilitou a confecção de uma série de mutações na superfície do TR que, por modificarem somente o local da mutação, preservam a estrutura global do TR e tendem a alterar apenas interações proteína-proteína no local da mutação (Feng et al., 1998). Esta estratégia, que empregou mais de 60 mutantes cobrindo toda a superfície do LBD do TR, permitiu identificar um núcleo de aminoácidos hidrofóbicos na H11, que está envolvido na dimerização do TR (Ribeiro et al., 2001). Os resultados mostraram que uma mesma superfície no LBD é empregada para a dimerização do TR em DR-4 e F2 indicando que a homodimerização nesses TREs independe da orientação e espaçamento dos hexâmeros AGGTCA. Entretanto, no palíndromo TREpal nenhuma mutação foi capaz de impedir a homodimerização do TR sugerindo que neste elemento, a banda supostamente composta por homodímeros é na verdade constituída por dois monômeros. Além disso, este estudo mostrou que dos aminoácidos hidrofóbicos envolvidos, a leucina 422 (L422) do LBD do TR β_1 é o resíduo que cumpre um papel crítico tanto para a homo como para a heterodimerização do TR (Ribeiro et al., 2001). Mais recentemente, observamos em células U937 que a mutação da leucina 422 por arginina (L422R) diminui em aproximadamente 50% a atividade transcricional do TR no elemento responsivo DR-4, e praticamente extingue a transcrição no elemento responsivo F2. Já no elemento responsivo TRE-pal, esta mutação aumenta a atividade transcricional do TR. Esses resultados sugerem que é possível que os homodímeros exerçam um papel na atividade transcricional induzida pelo T₃ (Velasco, 2005).

Ø BASE MOLECULAR DA SRHT

A SRHT está relacionada ao gene do TR β (cerca de 80-85% dos pacientes apresentam mutações neste gene). Não foram descritas mutações no gene do TR α . Atualmente foram identificadas 122 mutações diferentes no gene do TR β (Lado-Abeal et al., 2005) em mais de 250 famílias portadoras de SRHT (Carvalho e Ramos, 2004; Cheng, 2005), sendo que a maioria se deve a substituições de um único nucleotídeo, mas também foram identificadas deleções ou inserções de nucleotídeos causando deleção de aminoácidos ou a formação precoce de comuns de parada (Nagaya et al., 1993). A maioria

das mutações descritas foram encontradas em três regiões “*hot spot*” (figura 13) localizadas no domínio de ligação ao ligante (LBD) entre os exons 8 e 10 do TR β , resultando em TR β s com afinidade de ligação ao T₃ mínima ou reduzida. Porém, cerca de 15% das famílias com SRHT não apresentaram mutações no TR β . Esses indivíduos sem mutação no TR possuem um fenótipo semelhante àqueles com mutação e apresentam um padrão de herança autossômico dominante. Provavelmente outros co-fatores de transcrição envolvidos na ação do HT são responsáveis pela resistência hormonal nesses casos (Matsushita et al., 2000). De fato, estudos do eixo hipotálamo/hipófise/tireóide de camundongos knock-out para os co-ativadores SRC-1 ou RXR demonstraram que a ausência de um co-fator pode causar SRHT (Xu et al., 1998).

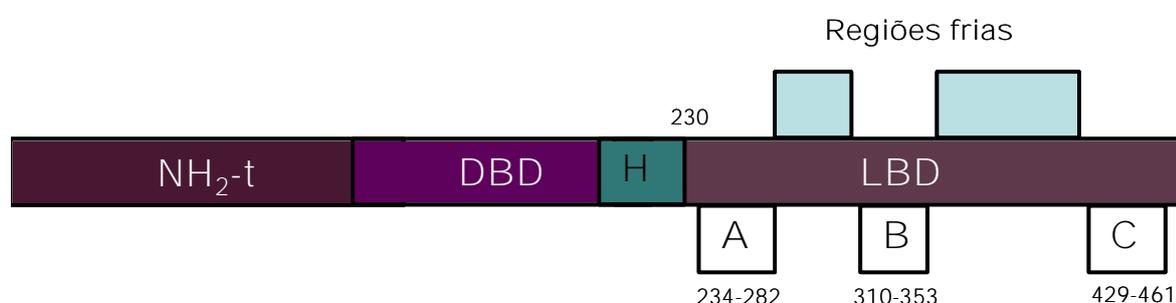


Figura 13. Localização das mutações no gene do TR β associados com a SRHT. As mutações encontradas no TR β ocorrem agrupadas em três áreas do domínio de ligação ao T₃. As posições dos aminoácidos, onde as mutações foram encontradas, estão indicados nos quadrados (A, B, C). A região fria de 28 e 75 aminoácidos não contém mutações que causam SRHT. Adaptado de Carvalho e Ramos, 2004.

Inúmeros estudos relatam que os indivíduos afetados são heterozigotos para mutações no gene TR β , condizentes com o modo de herança dominante encontrado nesta doença (Adams et al., 1994). Entretanto, dois casos já foram publicados na literatura apresentando SRHT com herança autossômica recessiva. Esses indivíduos provinham de famílias com casamentos consanguíneos. A análise genética molecular do gene TR β de uma dessas famílias mostrou que os membros afetados apresentavam deleções completas de ambos alelos TR β com TR α normal (Takeda et al., 1992). Esses pacientes eram surdos-mudos com leves dismorfismos, mas tinham estatura normal. Interessantemente, os membros heterozigotos dessa família, que tinham somente um alelo TR β deletado, exibiram um fenótipo normal. Isto sugere que uma simples cópia do TR β é suficiente para

manter homeostasia e que a atividade dominante negativa se dá pela interferência do TR β afetado sobre os TRs normais (Refetoff et al., 1993; Yen and Chin, 1994). A quantidade de TR β mutante produzido também contribui para severidade da atividade dominante negativa (Zhang et al., 2002). O outro caso é um exemplo extremo em que o paciente apresentou um quadro severo de SRHT com retardamento mental e graves distúrbios do metabolismo com sinais de hipotireoidismo e hipertireoidismo. Esse paciente era homocigoto para a deleção de um aminoácido do LBD do TR β , sugerindo que a atividade dominante negativa se deveu a interferência dos TR β afetados sobre as isoformas TR α (Ono et al., 1991). Os membros desta família que eram heterocigotos possuíam resistência generalizada com o padrão clássico de dominância negativa. (Ono et al., 1991).

A expressão “dominância negativa”, que é freqüentemente utilizada para caracterizar esta síndrome, pretende justificar o fato de que a proteína codificada pelo alelo afetado interfere com a função da proteína normal. Estas mutações alteram uma ou mais características funcionais do receptor, principalmente a afinidade pelo T₃ e a ligação com co-fatores (proteínas co-ativadoras ou co-repressoras) (Ribeiro et al., 1998b). Entretanto, estas mutações geralmente preservam a capacidade do TR de se ligar ao DNA e formar heterodímeros com o RXR (Chatterjee, 1997).

Uma observação intrigante nos pacientes com SRHT é a acentuada variabilidade na resistência ao HT nos diferentes tecidos de um mesmo indivíduo ou entre indivíduos com a mesma mutação no gene do TR β . O mecanismo molecular envolvido na dominância negativa exercida pelo TR mutado parece ser múltiplo. Alguns estudos sugerem que a ligação do receptor mutado ao DNA e formação de heterodímeros com RXR são essenciais para atividade dominante negativa (Nagaya et al., 1993; Collingwood et al., 1994).

A observação de que o TR β_2 era expresso na pituitária e no hipotálamo levantou a hipótese de que a resistência hipofisária poderia representar uma entidade genética distinta, talvez caracterizada por mutações no domínio amino terminal do TR β_2 . Entretanto a análise de vários casos de resistência hipofisária indicou que as mutações encontradas nestas famílias são também encontradas em membros com resistência generalizada (Adams et al., 1994), indicando que a mesma mutação, em uma mesma família, pode resultar em resistência generalizada em um membro e resistência hipofisária em outro.

Os mutantes encontrados na resistência generalizada interferem com a função do TR nativo tanto nos elementos responsivos regulados positivamente ou negativamente (Safer et al., 1997). Nagaya (1993) observou que mutações introduzidas no DBD do alelo mutante, às quais impediam a sua ligação ao DNA, atenuavam a atividade dominante negativa. Além disto, foi demonstrado que os TR dominantes negativos se interagem com maior afinidade aos co-repressores, de forma que a ligação do hormônio não promoveria a dissociação do co-repressor e impediria a ativação da transcrição (Safer et al., 1998).

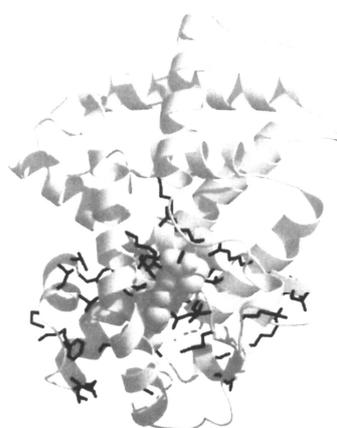


Figura 14. Esquema tridimensional da porção LBD do TR α_1 . As mutações encontradas na resistência generalizada estão localizadas ao redor da região onde o hormônio é acoplado. As cadeias laterais dos resíduos mutados estão representadas. Fonte: Ribeiro et al., 1998a.

A mutação G345R, encontrada em alguns pacientes com SRTH, 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 (Sakurai et al., 1989).

Outra mutação foi encontrada no receptor TR β de uma menina japonesa de 6 anos de idade que apresentava uma resistência generalizada. Esta mutação altera o resíduo de

fenilalanina para um códon de parada resultando na deleção de 11 aminoácidos carboxiterminal (figura 15). Esta substituição determina a perda da afinidade do TR ao T₃, mas também não afeta a capacidade do TR de se ligar aos TREs e de formar heterodímeros com RXR. A paciente era heterozigota e apresentava um severo retardo mental, distúrbio no desenvolvimento da fala e hiperatividade, demonstrando assim, que esta mutação exerce um forte efeito dominante negativo (Miyoshi et al., 1995). Este receptor mutado (F451X) não possui a hélice 12 (H12) e se liga fortemente ao co-repressor SMRT, estando impossibilitado de dissociar-se desse e de associar-se com co-ativadores impedindo assim a ativação da transcrição gênica (Matsushita et al., 2000).

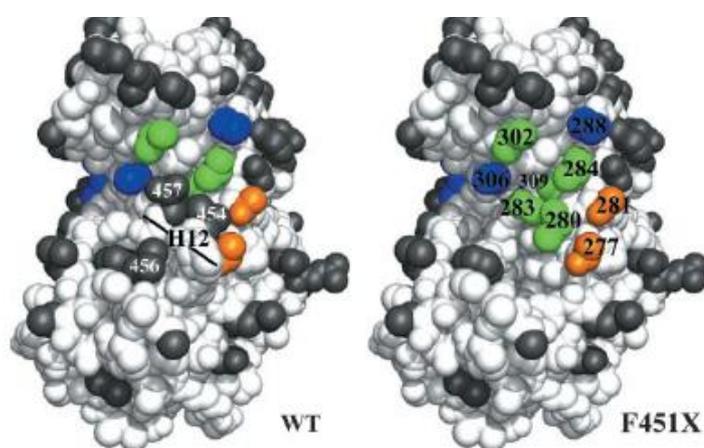


Figura 15. Estrutura cristalográfica do LBD do TR nativo mostrando os aminoácidos da superfície de ligação ao N-CoR e o posicionamento da hélice 12. À direita mostra o mutante F451X em que 11 aminoácidos (451 a 461) foram deletados e dessa forma a superfície de ligação ao co-repressor fica exposta, o que no TR nativo era protegida pela H12. Fonte: Marimuthu et al., 2002.

O mecanismo molecular envolvido na atividade dominante negativa dos mutantes encontrados na SRHT, como o G345R, ainda não está totalmente esclarecido e várias teorias tentam explicar esse fenômeno. No entanto, os resultados apresentados ainda são controversos. Uma possibilidade é a de que esse mutante, por ser incapaz de ligar-se ao T₃, estaria impossibilitado de dissociar-se dos co-repressores, como normalmente ocorre com o TR nativo (Nagaya et al., 1993). A construção de um duplo mutante que além da mutação G345R, possuía a mutação P214R, que reduz a ligação com co-repressores, confirmou esta possibilidade. P214R/G345R reduziu significativamente a dominância negativa observada isoladamente com o G345R (Tagami et al., 1998). Além da

incapacidade de se desligar do co-repressor, uma especulação para explicar a dominância negativa é de que o TR mutado poderia se heterodimerizar com o RXR ou formar homodímeros inativos com o TR nativo. Nesta linha de investigação, foi estudado o efeito de um duplo mutante o G345R/L428R, que mantém a capacidade de formar homodímero mas não de se ligar com RXR sob a forma de heterodímero. Em ensaios de co-transfecção foi demonstrado que a adição da mutação L428R ao G345R aboliu a dominância negativa do G345R sugerindo que heterodimerização mas não a homodimerização é um pré-requisito para a atividade dominante negativa do G345R (Nagaya e Jameson, 1993a). Outro trabalho sugere que o mutante proveniente da SRHT, R316H, que presumivelmente reduz seletivamente a homodimerização, provoca uma resistência ao T₃ bem menos acentuada que outros mutantes encontrados na SRTH (Kitajima et al., 1995). Além disso, a introdução desta mutação no G345R produzindo o duplo mutante (R316H/G345R), reduz a intensa atividade dominante negativa do G345R ao nível do que ocorre com o R316H isoladamente sugerindo que mutações que alteram a homodimerização também tendem a atenuar a atividade dominante negativa de mutantes da SRTH (Ando et al., 1996; Kitajima et al., 1995; Lin et al., 1997).

Entretanto, as mutações citadas anteriormente foram realizadas em resíduos que estão no interior do TR e por isso podem modificar significativamente a estrutura global do receptor e várias de suas funções, como a afinidade ao T₃ e ligações com proteínas co-reguladoras. Ademais, é interessante observar que todas as mutações encontradas na síndrome que supostamente interfeririam com a dimerização não fazem parte da superfície de dimerização definida mais recentemente para o TRβ₁ (Ribeiro et al., 2001).

Recentemente, sob uma nova perspectiva decorrente do fato de agora conhecermos detalhadamente a superfície de dimerização no LBD do TRβ₁ (Ribeiro et al., 2001), investigamos novamente a importância da dimerização na dominância negativa dos mutantes presentes na SRHT. Em células U937, a adição da mutação L422R, que impede a formação de homo e heterodímeros, ao mutante F451X (L422R/F451X) aboliu a atividade dominante negativa observada isoladamente com o F451X (Figura 16) (Velasco, 2005). O mesmo padrão de resposta foi observado para o mutante G345R/L422R. Considerando que a mutação L422R altera somente as propriedades de dimerização do TR, preservando a estrutura global do receptor e conseqüentemente outras funções como ligação ao T₃ e recrutamento de co-reguladores, esses resultados demonstram que um dos mecanismos

moleculares envolvidos na dominância negativa envolve a formação de dímeros do TR α mutado com o receptor nativo ou com RXR.

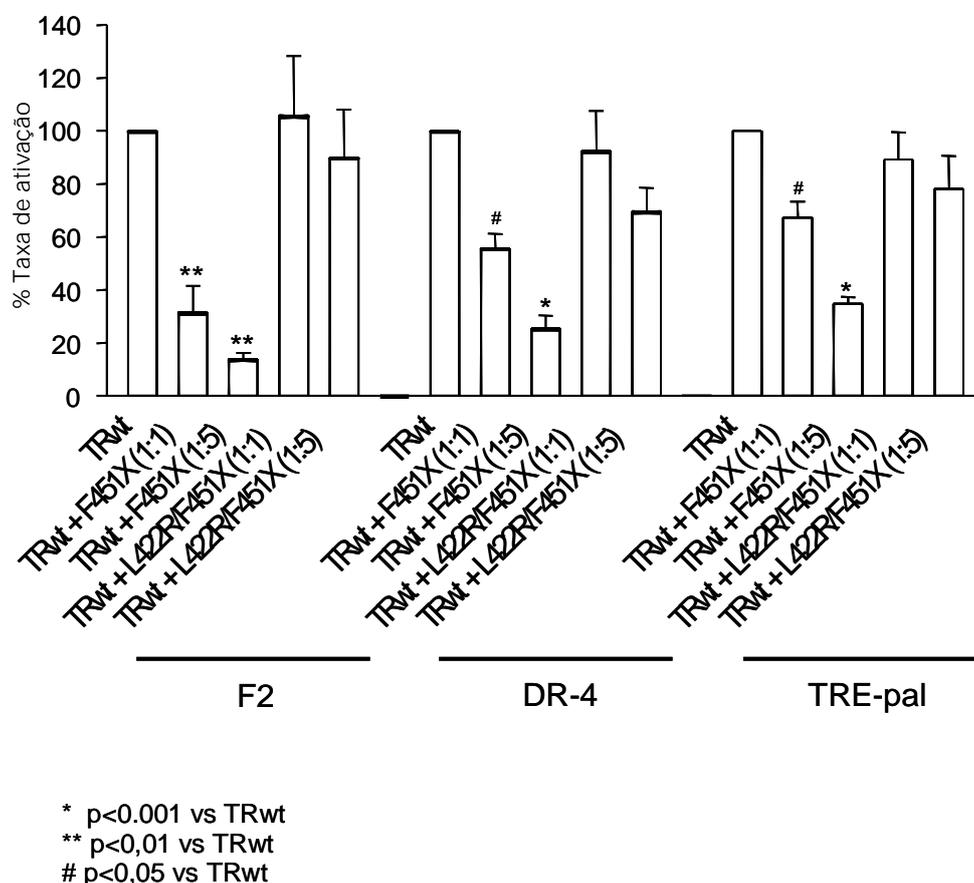


Figura 16 – Inibição da atividade do TR α ₁ nativo pelo F451X em resposta ao T₃ em F2, DR-4 e TREpal. As células U937 foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter F2, DR-4 ou TRE-pal e 0,5 ug do vetor de expressão do TR α ₁wt, ou 0,5 ug do TR α ₁ nativo + 0,5 ug do F451X (1:1), 0,5 ug do TR α ₁wt + 2,5 ug do F451X (1:5), TR α ₁wt + 0,5 ug do L422R/F451X (1:1) ou 0,5 ug do TR α ₁wt + 2,5 ug do L422R/F451X (1:5) e tratadas com etanol (veículo) ou 100 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi mediada após 22h com a lise das células e os números representam a média \pm SEM do percentual da taxa de ativação em relação ao TR α ₁wt de 3 a 5 experimentos (* p < 0,001, ** p < 0,01 e # p < 0,05 versus TR α ₁wt). Adaptado de Velasco, 2005.

Entretanto, todos esses experimentos foram realizados com elementos responsivos regulados positivamente pelo T₃. Porém, como já foi citado anteriormente, os TRs também desempenham um papel crítico e fundamental na repressão de genes regulados negativamente, tais como o AP-1, TRH, TSH α e TSH β . Dessa forma, o impedimento da regulação negativa pelo T₃ no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide apresenta um papel crítico na fisiopatogenia da SRHT. No entanto, o fenômeno da dominância negativa em genes

regulados negativamente foi muito pouco estudado. Os estudos que o fizeram utilizaram basicamente o promotor do TSH (Chatterjee et al., 1991; Clifton-Bligh et al., 1998; Flynn et al., 1994; Hayashi et al., 1998; Jameson, 1994; Nagaya and Jameson, 1993b; Nomura et al., 1996; Safer et al., 1997; Tagami and Jameson, 1998) e em menor proporção, o promotor do TRH (Clifton-Bligh et al., 1998; Flynn et al., 1994; Safer et al., 1997). Nenhum estudo avaliou a dominância negativa no sítio AP-1. Considerando a falta de conhecimento nesta questão, decidimos investigar a dominância negativa dos mutantes F451X e G345R em promotores de genes regulados negativamente por T₃ como o TRH, o promotor da colagenase em seu sítio AP-1 e também o TSH. Além disso, estudamos a importância da dimerização neste fenômeno.

OBJETIVOS

Ø OBJETIVO GERAL

Investigar o mecanismo molecular do efeito dominante negativo, efetuado pelos TR β mutantes encontrados em pacientes com a SRHT, nos genes regulados negativamente pelo T₃.

Ø OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a interferência funcional dos mutantes F451X e G345R nos TRs nativos no complexo AP-1 e no promotor do gene do TSH α e TRH, verificando:

a) se existe o efeito dominante negativo da mesma forma que é observado nos elementos regulados positivamente;

b) se o efeito dominante negativo é influenciado pela dimerização entre receptores, por meio do ensaio de co-transfecção com o mutante L422R.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ø PLASMÍDEOS UTILIZADOS

Os plasmídeos pCMV-hTR β ₁ utilizados para a síntese dos receptores do hormônio tireoideano são vetores de expressão que contêm o cDNA do TR β ₁ humano. A transcrição do RNA codificado por este cDNA é controlada pelo promotor do citomegalovírus e do T7, o que permite a expressão desses RNAs em células de mamíferos e pelo promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7, permitindo a expressão desses RNAs em um sistema de transcrição e tradução *in vitro*, e conseqüentemente, das proteínas por eles codificadas. Os detalhes da construção desses plasmídeos foram descritos anteriormente (Umesono et al., 1991; Feng et al., 1998).

Os vetores que possuem as mutações de glicina para arginina no aminoácido 345 (pCMV-TR β ₁ G345R), leucina para arginina no aminoácido 422 (pCMV-TR β ₁ L422R) bem como os vetores que possuem as duplas mutações L422R/F451X e G345R/L422R foram gerados pela técnica de mutagênese sítio-dirigida (Quick Change Site-Directed Mutagenesis; Stratagene), descrita posteriormente. O vetor que possui a deleção dos 10 últimos aminoácidos do TR β ₁, em que a fenilalanina foi trocada por um códon de parada no aminoácido 451, (pCMV-TR β ₁ F451X), foi gentilmente doada pelo Dr. Jonh Baxter do Metabolic Research Unit, University of Califórnia, San Francisco.

Os genes repórteres F2 e AP-1 foram construídos a partir do vetor pUC19 (New England Biolabs, Beverly, EUA) contendo cada plasmídeo duas cópias do elemento responsivo positivo F2 ou negativo, contendo o sítio AP-1 (Ä Coll T₃) (Lopes et al., 1993) ou a região promotora do TSHá. Esses TREs situam-se a frente de um promotor mínimo contendo a seqüência de -32/+45 do promotor da timidina cinase do vírus do herpes simplex (TK). O promotor mínimo contém as seqüências responsáveis para ligação da maquinaria basal de transcrição e RNA polimerase II e não possui seqüências conhecidas para outros fatores de transcrição, as quais poderiam interferir na transcrição induzida pelo TR β ₁. Esse promotor está associado a seqüências que codificam a enzima luciferase (LUC). Todos esses plasmídeos foram doados pelo Dr. Jonh Baxter do Metabolic Research Unit, University of Califórnia, San Francisco.

O plasmídeo TRH-luc usado contém as regiões regulatórias que são necessárias e suficientes para observar a regulação transcricional dependente de T₃. Foi construído a partir do vetor pNASSb (Clontech) (Balkan et al., 1998) e contém um fragmento 5' do gene TRH de rato que se estende do -547 a +84 bp clonado upstream da região que codifica a enzima luciferase (Guissouma et al., 2002). Este plasmídeo foi doado gentilmente pela Dra. Bárbara Demeneix do Laboratoire de Physiologie Générale, France.

Ø TRANSFORMAÇÃO

A transformação é um processo utilizado para introduzir um plasmídeo em uma célula procariótica. Foram utilizadas cepas de bactérias *E.coli* DH5á para replicação dos plasmídeos.

Em um tubo de microcentrífuga, 100-1000 ng do plasmídeo a ser transformado foram incubados com 50µL de *E.coli* DH5á durante 30 minutos no gelo. Após este período as células foram submetidas a um choque térmico por 2 minutos em um banho-maria a 42°C. Esse procedimento provoca abertura dos poros da parede celular da bactéria e permite, assim, a entrada do plasmídeo na célula. Em seguida, adicionou-se 500 µL de meio de cultura LB (5g de yeast extract, 10g de triptone e 10g de NaCl em 1L de água destilada) sem antibiótico e incubou-se por 1 hora a 37°C no BOD (Biologic Oxygen Demand). Esse período é necessário para que ocorra a expressão da β -lactamase e conseqüentemente, para o desenvolvimento de resistência ao antibiótico. Posteriormente, 50µL da transformação foram plaqueados em uma placa de petri contendo meio de cultura LB com 1,5% de agar e 0,1 mg/mL de ampicilina. A placa foi incubada por 16 horas a 37°C no BOD. Por este procedimento, somente as células que expressaram o gene de resistência a ampicilina foram transformadas e, conseqüentemente, puderam crescer na placa.

Ø PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

Após a transformação das bactérias, uma colônia resistente foi selecionada e colocada para crescer em 5 mL de meio LB, contendo 5 µL de ampicilina (100mg/mL) por 4-6 horas a 37°C em um Shaker. Em seguida, estas bactérias foram inoculadas em 500 mL

do mesmo meio de cultura e colocadas para crescer por 16 horas a 37°C sob agitação no Shaker .

Ao término do período de crescimento da cultura, as bactérias foram separadas por centrifugação e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi mantido para a extração e purificação dos plasmídeos de acordo com o protocolo do Quiagen Plasmid Maxi Kit. A purificação dos plasmídeos por esse kit se baseia na afinidade do DNA por uma coluna de troca aniônica, onde sua carga negativa se interage com a carga positiva da resina da coluna.

Ø MUTAÇÃO SÍTIO-DIRIGIDA

Os mutantes G345R, L422R, L422R/F451X e G345R/L422R foram gerados pela técnica de mutagênese sítio dirigida (Quick Change Site-Directed Mutagenesis; Stratagene) por PCR, empregando-se oligonucleotídeos sintéticos (primers) como iniciadores, contendo a seqüência dos nucleotídeos mutados. Os duplo mutantes L422R/F451X e G345R/L422R foram construídos adicionando primers contendo a seqüência dos nucleotídeos mutados L422R aos mutantes pCMV-TR β 1 F451X ou pCMV-TR β 1 G345R, respectivamente. As seqüências dos primers utilizados foram:

L422R₁: 5' GGC CAA AAC TCC GGA TGA AGG TGA C 3'

L422R₂: 5' GTC ACC TTC ATC CGG AGT TTT GGC C 3'

G345R₁: 5' GCT GAA AAA TGG GCG TCT TGG GGT GG 3'

G345R₂: 5' CCA CCC CAA GAC GCC CAT TTT TCA GC

Por esse método, o vetor de expressão do TR α 1 nativo (pCMV-hTR α 1) foi amplificado utilizando-se a enzima *pfu* DNA polimerase de alta fidelidade gerando plasmídeos mutantes. Para separarmos os plasmídeos nativos dos mutantes foi utilizada a enzima Dpn I, a qual digere todo o DNA metilado. O DNA original (molde) se encontra metilado, pois é proveniente de uma purificação plasmidial feita a partir de E.coli, que, naturalmente, metila seu DNA. Então, os plasmídeos mutantes que não são degradados por Dpn I, provenientes do PCR, foram transformados e purificados, como já foi descrito anteriormente. A seqüência mutada foi confirmada pelo sequenciamento de DNA.

Ø CULTURA DE CÉLULAS

Os procedimentos de cultura de células foram realizados de acordo com métodos descritos anteriormente (Chiellini e cols.,1998). Foram utilizadas células derivadas de promonócitos humanos (U937) obtidas do Centro de Cultura de Células da Universidade da Califórnia, San Francisco (UCSF - University of California San Francisco). Estas células foram cultivadas em meio RPMI 1640, contendo 10% de soro de recém-nato bovino com 2mM de glutamina, 50µL/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina e mantidos em uma incubadora a 37°C com 5% de CO₂.

Ø MÉTODO DE TRANSFEÇÃO E ENSAIO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LUCIFERASE

O método de electroporação foi utilizado para a transfecção das células mantidas em cultura. As células U937 foram coletadas por centrifugação e ressuspendidas em 0,5mL de solução PBS (Phosphate Buffered Saline) contendo 0.1% dextrose. Em seguida, estas células foram misturadas a 4,0 µg do plasmídeo repórter e de 1,0µg a 11,0 µg do vetor de expressão dos TRs e transferidas para uma cuveta, em que foram eletroporadas utilizando um gerador de pulso Bio-Rad com voltagem de 0,3 volts e 960µF. As células eletroporadas foram transferidas para recipientes contendo 6,0mL de RPMI com 10% de soro fetal bovino. Neste meio, as células foram ressuspendidas, colocadas em triplicata em placas de 12 poços (1,0mL/poço) e incubadas por 24 horas a 37°C com etanol (controle) ou 1000nM de T₃.

Para o ensaio da enzima LUC, as células foram transferidas para tubos de eppendorf de 1,5mL e centrifugadas por 1 minuto a 13.000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e descartado, enquanto que o precipitado celular foi lisado e solubilizado pela adição de 150µL de 0,25Mtris – HCl, pH 7,6 contendo 0,5% de triton X 100 a 0.1%. As células foram incubadas por 30 minutos a -80°C, para uma lise mais eficiente, e depois que foram descongeladas a temperatura ambiente, transferiu-se 20µL de cada amostra para uma placa de leitura de 96 poços. Esta placa foi submetida ao Contador Beta (Luminesce Counter – MicroBeta JET, Perkin Elmer), que misturou automaticamente o lisado celular com 20µL do substrato para enzima luciferase (Luciferase Assay System – Promega) e quantificou a medida da atividade da enzima LUC.

Ø CURVAS DOSE-RESPOSTA

As transfecções para construção das curvas dose-resposta para o TRâ1 nativo, F451X e G345R em F2, AP-1 e TRH foram realizadas de acordo com o protocolo descrito no item Método de Transfecção e Ensaio da Atividade da Enzima Luciferase. Porém, além do etanol utilizado como veículo, as células também foram incubadas com concentrações crescentes de T₃ que variaram de 10⁻¹⁰M a 10⁻⁶M. A partir da leitura da luciferase obtida foi calculada a taxa de ativação, em F2, ou repressão, em AP-1 e TRH. Com esse valor se construiu as curvas.

Ø CÁLCULO DA TAXA DE ATIVAÇÃO E REPRESSÃO

§ Taxa de Ativação:

Para calcular a taxa de ativação nos experimentos de transfecção e ensaio com gene repórter, utilizamos os valores da leitura da luciferase dos experimentos tratados com T₃ e dividimos pelo valor da leitura dos experimentos tratados com etanol (controle).

$$\text{Taxa de ativação} = \frac{\text{Leitura da luciferase c/ T}_3}{\text{Leitura da luciferase s/ T}_3}$$

Esses cálculos foram realizados nas transfecções com o elemento responsivo positivo, F2, bem como nas curvas dose-resposta também em F2.

Para calcular o percentual da Taxa de Ativação (% Taxa de Ativação) assumimos que a taxa de ativação do TRâ₁ nativo era 100% e a partir dessa correlação calculamos a percentagem para as outras taxas de ativação.

§ Taxa de Repressão:

Para calcular a taxa de repressão nos experimentos realizados com os elementos responsivos negativos AP-1, TRH e TSH, calculamos a percentagem dos valores da leitura com T₃ assumindo que o valor da leitura com etanol (controle) é 100% e então, subtraímos de 100 o valor encontrado.

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

Esses cálculos também foram realizados nas curvas dose-resposta em AP-1 e TRH, porém não subtraímos de 100 e denominamos de % ativação.

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

Para calcular o percentual da Taxa de Repressão (Repressão (% TR nativo)) assumimos que a taxa de repressão do TR \hat{a} ₁ nativo era 100% e a partir dessa correlação calculamos a percentagem para as outras taxas de repressão.

Nos elementos responsivos negativos também calculamos o percentual da leitura da luciferase (% Leitura da Luciferase), em que consideramos os valores da leitura da luciferase do TR \hat{a} ₁ nativo s/ T₃ como sendo 100% e a partir dessa correlação calculamos a percentagem para outras leituras.

Ø ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados apresentados nesse trabalho representam a média e o erro padrão da média de pelo menos 3 experimentos. Toda a análise estatística assim como os gráficos apresentados foram realizados através do programa PRISM. Para compararmos os valores obtidos da co-transfecção do TR nativo com os mutantes com o TR nativo sozinho utilizamos o teste de análise de variância One-Way seguido do teste de comparação Newman-Keuls. As curvas dose-resposta e o cálculo do EC50 também foram calculados pelo programa PRISM utilizando a ferramenta regressão não linear e construção da curva dose-resposta sigmoidal. Um resultado foi considerado ser estatisticamente significativo quando o valor de p foi < 0,05.

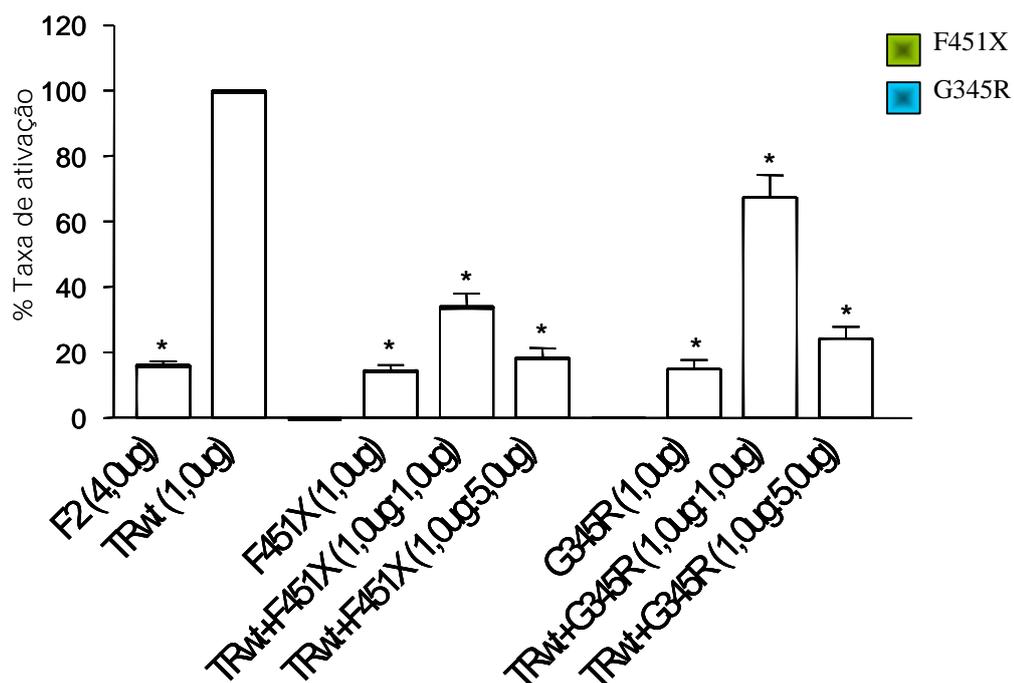
RESULTADOS

Inicialmente, com o objetivo de se confirmar a eficiência dos mutantes F451X e G345R de exercer seu efeito dominante negativo, ou seja de reprimir a ação do TR \hat{a} ₁ nativo em promotores regulados positivamente pelo T₃, realizamos ensaios de co-transfecção transitória com plasmídeos de expressão para TR \hat{a} ₁ nativo ou para os mutantes, juntamente com um plasmídeo repórter contendo um promotor regulado positivamente (F2) ligado a seqüências que codificam a enzima luciferase (LUC) em células promonocíticas humanas (U937) cultivadas na ausência ou presença de T₃.

Efeito Dominante Negativo do F451X e G345R no Elemento Responsivo Positivo F2

Na figura 17 (Tabelas 01 e 02 em anexo) observa-se o percentual da taxa de ativação da transcrição mediada pela co-transfecção do TR \hat{a} ₁ nativo com os mutantes F451X e G345R, nas proporções de 1:1 e 1:5, respectivamente, em relação ao TR \hat{a} ₁ nativo sozinho no elemento responsivo positivo F2. Como podemos observar, quando comparada ao TR \hat{a} ₁ nativo, a co-transfecção do F451X na razão 1:1 reduziu significativamente a atividade do TR \hat{a} ₁ nativo para valores de $34,02 \pm 4,07\%$, em relação ao TR \hat{a} ₁ nativo. Na mesma proporção, a co-transfecção do G345R com TR \hat{a} ₁ nativo também reduziu, porém de forma menos acentuada, a atividade do TR \hat{a} ₁ nativo para valores de $67,44 \pm 6,83\%$. Quando utilizamos a proporção de 1:5 dos mutantes em relação ao TR \hat{a} ₁ nativo, proporção esta comumente utilizada pela literatura (Nagaya et al., 1993), observamos que a co-transfecção de F451X e G345R reduziu de forma marcante a ação do TR \hat{a} ₁ nativo para valores significativamente inferiores, $18,44 \pm 2,87\%$ e $24,30 \pm 3,66\%$, respectivamente.

Esses resultados confirmam o efeito dominante negativo do G345R e principalmente do F451X sobre o TR \hat{a} ₁ nativo na razão de 1:1 e 1:5 em F2.



* p < 0.001 vs TRwt(1,0ug)

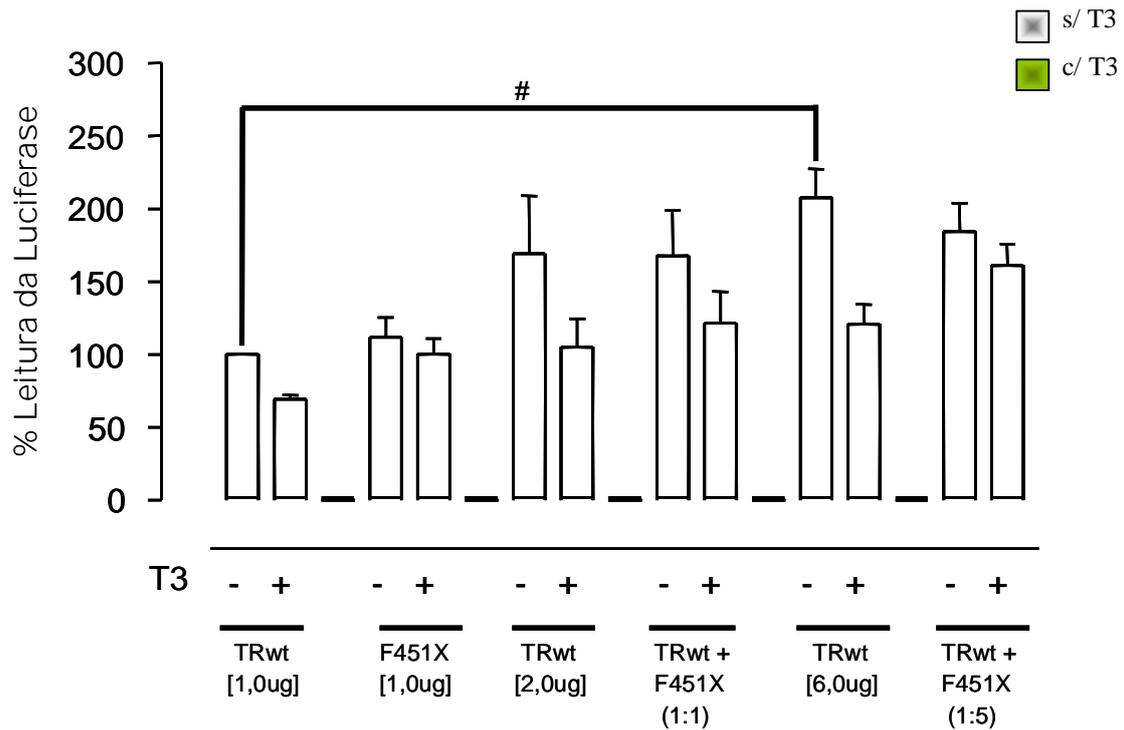
Figura 17 – Inibição da atividade do TR α_1 wt pelo F451X e G345R em resposta ao T₃ em F2. As células U937 foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter F2-2TKLUC e 1,0ug do vetor de expressão do TR α_1 nativo, F451X, G345R ou 1,0 ug do TR α_1 nativo + 1,0 ug do F451X (1:1), 1,0 ug do TR α_1 nativo + 1,0 ug do G345R (1:1), 1,0 ug do TR α_1 nativo + 5,0 ug do F451X (1:5) ou 1,0 ug do TR α_1 nativo + 5,0 ug do G345R (1:5) e tratadas com etanol (veículo) ou 100 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi mediada após 22h com a lise das células e os números representam a média do percentual da taxa de ativação em relação ao TR α_1 nativo (n = 4; * p < 0,001 versus TR α_1 nativo 1,0ug).

Efeito Dominante Negativo do F451X e do G345R nos Elementos Responsivos Negativos

O achado de que o G345R e principalmente o F451X reprime a ação do TR α_1 nativo nos elementos responsivos positivos nos levou a testar se este efeito dominante negativo persiste nos genes regulados negativamente pelo T₃. Portanto, foram realizados experimentos de transfecção transitória nos promotores do TSH α , TRH e AP-1 nas proporções de 1:1 e 1:5 dos mutantes em relação ao TR α_1 nativo.

TSH

Como podemos observar na figura 18a (tabela 03), na ausência de T_3 , considerando 100% a atividade de 1,0 μg do TR \hat{a}_1 nativo, a co-tranfecção de concentrações crescentes de TR \hat{a}_1 nativo aumentou significativamente a atividade transcrional do promotor TSH-LUC. Assim, com 6,0 μg de TR \hat{a}_1 nativo a atividade subiu para $207,35 \pm 19,73 \%$. De forma semelhante ao TR \hat{a}_1 nativo na ausência de T_3 , a co-tranfecção de F451X aumentou significativamente a atividade transcrional do promotor do TSH ligado a luciferase. Por outro lado, quando comparamos a atividade repressora do TR \hat{a}_1 nativo com F451X (figura 18b) observamos que o mutante da SRHT não conseguiu reprimir a transcrição. Assim, na presença de T_3 , enquanto 1,0 μg de TR \hat{a}_1 nativo reprimiu em $30,82 \pm 2,92 \%$ a atividade transcrional do TSH-LUC, a repressão mediada por F451X foi de somente $10,07 \pm 1,50\%$. Além disso, podemos observar que o F451X apresentou atividade dominante negativa sobre o TR \hat{a}_1 nativo em sua capacidade de reprimir a transcrição do TSH. Como podemos notar, quando co-transfectamos o mutante F451X na razão de 1:5 (1,0 μg TR \hat{a}_1 nativo + 5,0 μg F451X) observamos uma drástica redução da repressão do TR \hat{a}_1 nativo para $11,67 \pm 3,23\%$. Na proporção de 1:1 esta diminuição foi menor ($27,02 \pm 2,13 \%$), apesar de ter sido estatisticamente significativa.



p < 0,05

Figura 18a – Resposta ao T_3 mediada pela adição do vetor de expressão do $TR\hat{\alpha}_1$ wt ou do mutante F451X ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug $TR\hat{\alpha}_1$ wt + 1,0ug F451X) ou 1:5 (1,0 ug $TR\hat{\alpha}_1$ wt + 5,0ug F451X). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TSH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T_3 . A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a média do percentual da leitura da luciferase na ausência ou presença de T_3 em relação ao $TR\hat{\alpha}_1$ wt na ausência de T_3 (n = 5, # p < 0,05).

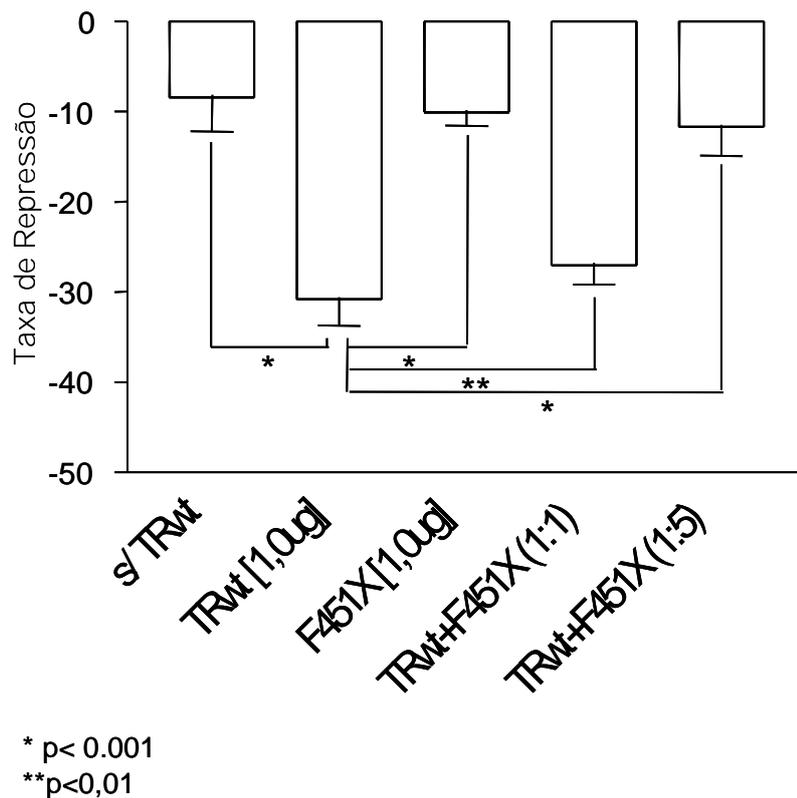
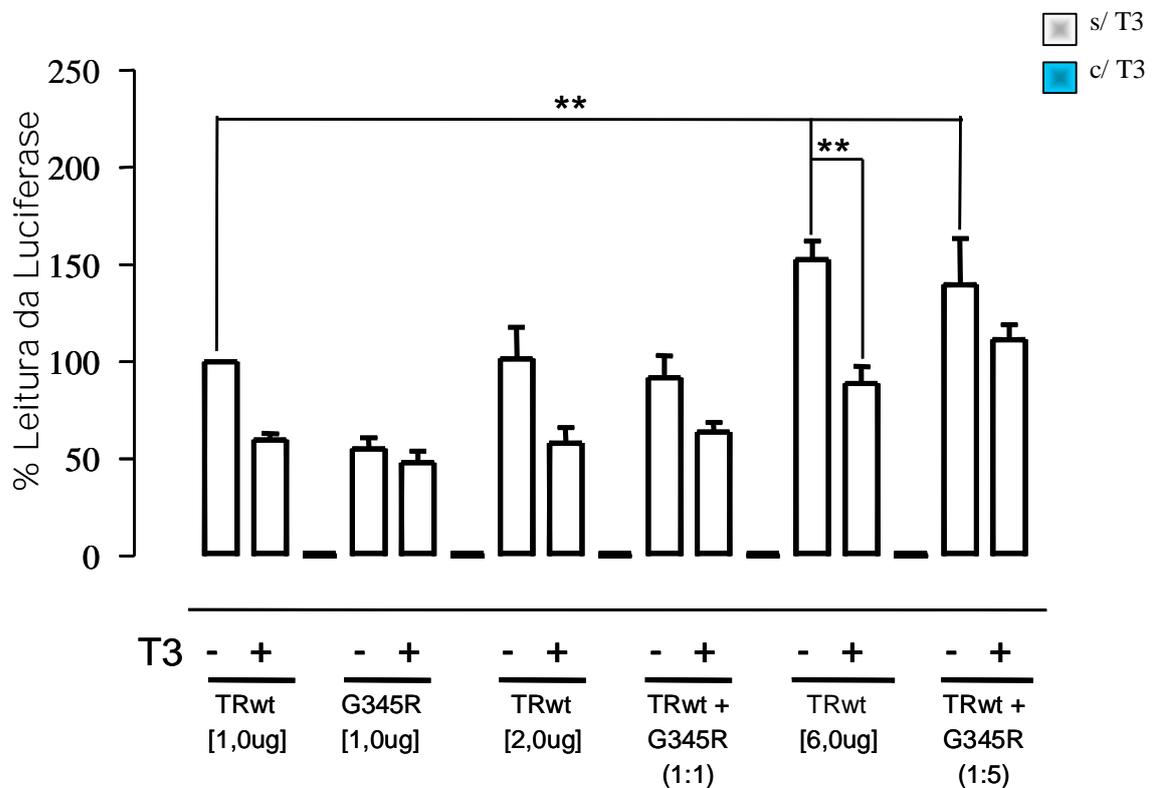


Figura 18b – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR₁wt, ou do mutante F451X ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0ug TR₁wt + 1,0ug F451X) ou 1:5 (1,0 ug TR₁wt + 5,0 ug F451X). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TSH e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a média da taxa de repressão de cada receptor (n = 5; * p < 0,001 e ** p < 0,01).

Quando analisamos o mutante G345R (tabela 04), na ausência de T₃, observamos que sua co-transfecção não aumentou a atividade transcricional do promotor do TSH-LUC, pelo contrário até diminuiu para valores de $55,28 \pm 5,7\%$ em relação ao TR₁ nativo (figura 19a). De forma semelhante ao F451X, G345R também não reprimiu eficientemente a transcrição na presença do T₃, apresentando uma taxa de repressão de apenas $12,00 \pm 2,97\%$, enquanto que a taxa de repressão do TR₁ nativo foi de $40,07 \pm 3,25\%$ (figura 19b). A co-transfecção de G345R diminuiu ligeiramente a atividade transcricional do promotor do TSH ligado a luciferase, mas não foi estatisticamente significativa. Porém, ao analisarmos a repressão mediada por T₃ em 1,0 ug de TR₁ nativo ($40,07 \pm 3,25\%$) observamos que a co-transfecção de G345R na concentração de 1:1 e 1:5, reduziu a repressão mediada por TR₁ nativo para $33,26 \pm 2,38\%$ e $17,10 \pm 3,176\%$ respectivamente.

Portanto, assim como o F451X, podemos observar que o mutante G345R também exerceu o efeito dominante negativo expressivo na repressão do promotor do TSH-LUC.



** p < 0.01

Figura 19a – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR α ₁wt , ou do mutante G345R ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug TR α ₁wt + 1,0 ug G345R) ou 1:5 (1,0 ug TR α ₁wt + 5,0 ug G345R). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TSH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a média do percentual da leitura da luciferase na ausência ou presença de T₃ em relação ao TR α ₁wt na ausência de T₃ (n = 6 - 8; *p<0,01).

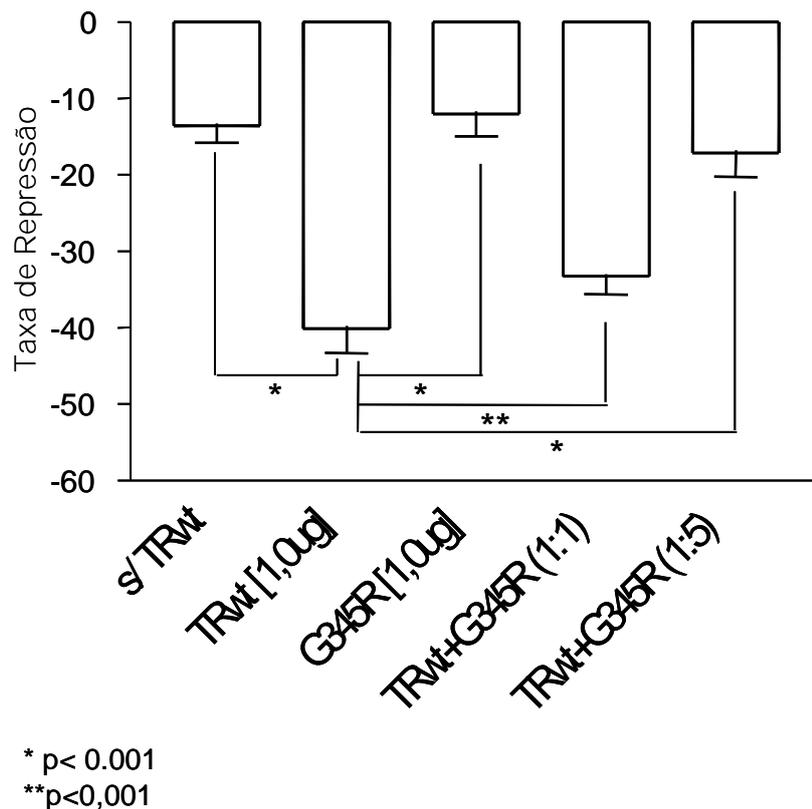


Figura 19b – Resposta ao T_3 mediada pela adição do vetor de expressão do $TR\hat{\alpha}_1$, ou do mutante G345R ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug $TR\hat{\alpha}_1$ wt + 1,0 ug G345R) ou 1:5 (1,0 ug $TR\hat{\alpha}_1$ wt + 5,0 ug G345R). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TSH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T_3 . A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a média da taxa de repressão de cada receptor (n = 6 - 8; * p < 0,001 e ** p < 0,001).

TRH

Em seguida, resolvemos examinar os efeitos dos mutantes F451X e G345R sobre a atividade transcrional do promotor TRH-LUC conduzindo a expressão do gene da luciferase. Como podemos observar na figura 20a, de forma semelhante ao promotor de TSH-LUC, na ausência de T_3 , a co-transfecção de $TR\hat{\alpha}_1$ nativo aumentou a atividade transcrional do TRH de maneira dose dependente. Conseqüentemente, 12,0 μ g de $TR\hat{\alpha}_1$ nativo aumentou a taxa de transcrição em $279,28 \pm 57,09\%$. De forma similar ao $TR\hat{\alpha}_1$ nativo, 2,0 μ g do mutante F451X também ativou a transcrição do TRH na ausência do hormônio com o valor de $100,38 \pm 11,38\%$ em relação ao $TR\hat{\alpha}_1$ nativo (tabela 05). Por outro lado, ao contrário do $TR\hat{\alpha}_1$ nativo, F451X não reprimiu eficientemente a transcrição, na presença de T_3 , pois sua taxa de repressão foi apenas de $16,11 \pm 3,55\%$, um valor significamente menor que a repressão do $TR\hat{\alpha}_1$ nativo que foi de $48,10 \pm 4,87\%$ (figura

20b). Ao analisarmos o efeito dominante negativo do F451X sobre o TR \hat{a} ₁ nativo na repressão mediada por T₃, para nossa surpresa, ao contrário do descrito anteriormente com TSH, a co-transfecção do F451X, seja na proporção de 1:1 ou 1:5 não diminuiu a atividade repressora do TR nativo ($48,10 \pm 4,87\%$ versus $52,94 \pm 3,73\%$ na proporção de 1:1 e $56,37 \pm 4,32\%$ na proporção de 1:5).

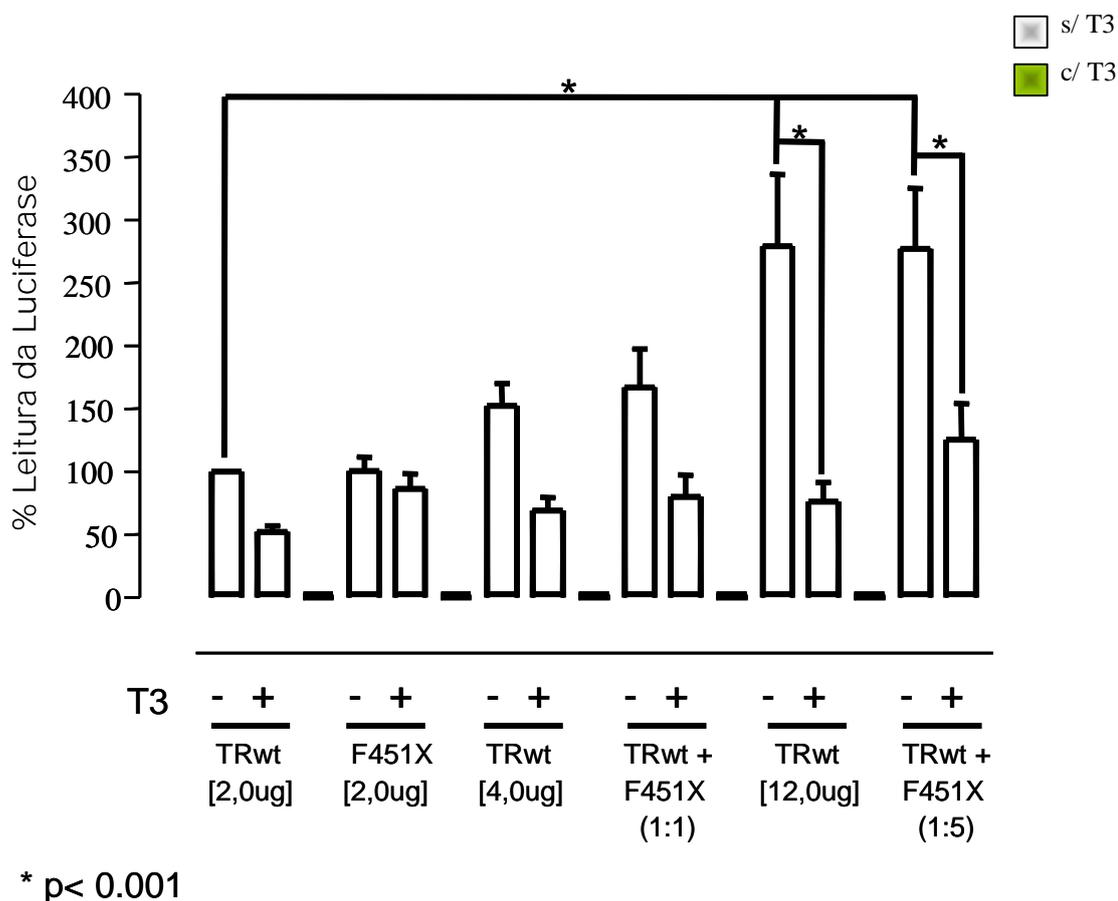


Figura 20a – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR \hat{a} ₁wt, ou do mutante F451X ou de ambos na proporção de 1:1 (2,0 ug TR \hat{a} ₁wt + 2,0 ug F451X) ou 1:5 (2,0 ug TR \hat{a} ₁wt + 10,0 ug F451X). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TRH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a média do percentual da leitura da luciferase na ausência ou presença de T₃ em relação ao TR \hat{a} ₁wt na ausência de T₃ (n = 9, * p < 0,001).

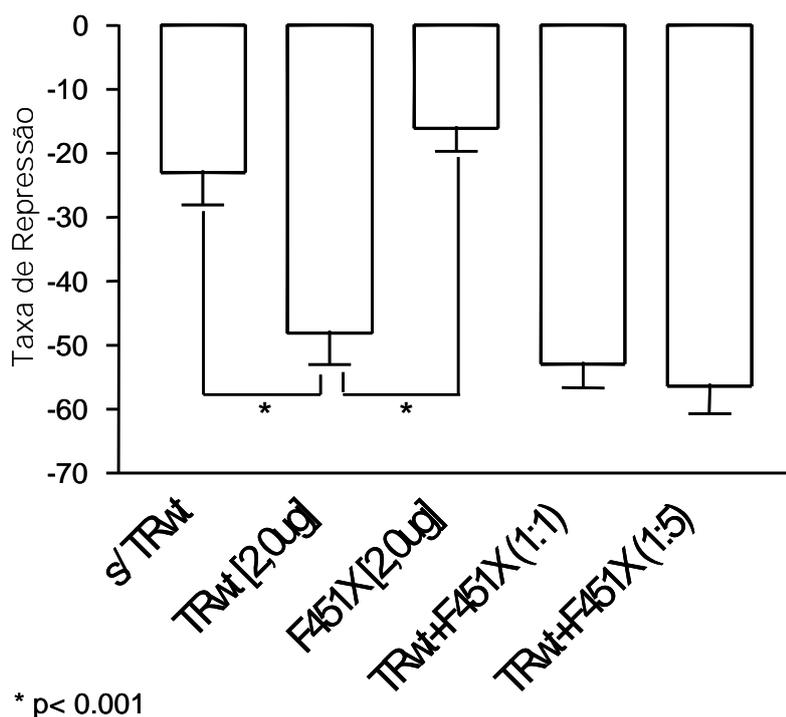
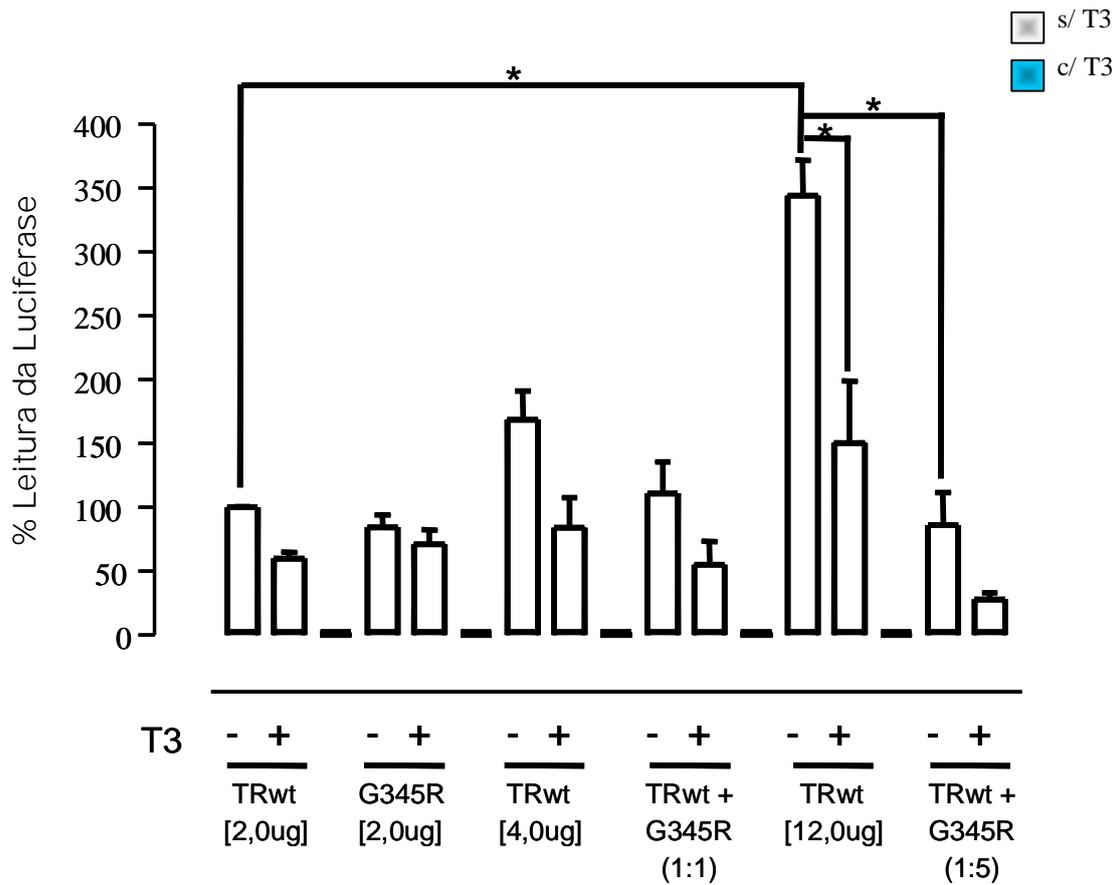


Figura 20b – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR $\hat{\alpha}$ ₁wt, ou do mutante F451X ou de ambos na proporção de 1:1 (2,0 ug TR $\hat{\alpha}$ ₁wt + 2,0 ug F451X) ou 1:5 (2,0 ug TR $\hat{\alpha}$ ₁wt + 10,0 ug F451X). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TRH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a média da taxa de repressão de cada receptor (n = 9 ; * p < 0,01).

O mutante G345R, ao contrário do F451X, apresentou uma taxa de ativação um pouco menor que o TR $\hat{\alpha}$ ₁ nativo (figura 21a), mas também não reprimiu eficientemente a transcrição na presença do T₃ (com média do percentual de repressão de 13,64 ± 5,51% versus 46,19 ± 5,69% do TR $\hat{\alpha}$ ₁ nativo (2,0ug)) (figura 21b e tabela 06). A co-transfecção de G345R diminuiu a atividade transcritora do promotor do TRH ligado a luciferase, porém, ao analisarmos o efeito dominante negativo do G345R sobre o TR $\hat{\alpha}$ ₁ nativo na repressão mediada por T₃, observamos que, assim como o ocorrido com o F451X, a co-transfecção do G345R, tanto na proporção de 1:1 ou 1:5 não diminuiu a atividade repressora do TR nativo (46,19 ± 5,69% versus 44,65 ± 6,44% na proporção de 1:1 e 49,71 ± 7,49% na proporção de 1:5).

Portanto, diferentemente do que foi observado com TSH, os mutantes F451X e G345R não apresentaram a dominância negativa sobre o promotor do TRH.



* $p < 0.001$

Figura 21a – Resposta ao T_3 mediada pela adição do vetor de expressão do TR α_1 wt, ou do mutante G345R ou de ambos na proporção de 1:1 (2,0 ug TR α_1 wt + 2,0 ug G345R) ou 1:5 (2,0 ug TR α_1 wt + 10,0 ug G345R). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TRH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T_3 . A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a média do percentual da leitura da luciferase na ausência ou presença de T_3 em relação ao TR α_1 wt na ausência de T_3 (n = 4 - 7, * $p < 0,001$).

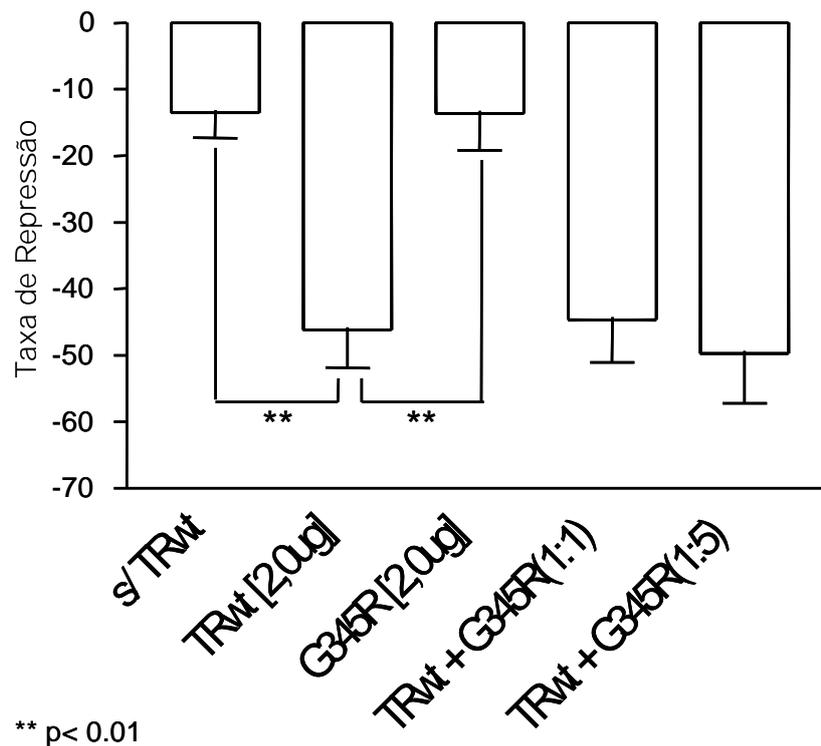


Figura 21b – Resposta ao T_3 mediada pela adição do vetor de expressão do TR \hat{a}_1 wt, ou do mutante G345R ou de ambos na proporção de 1:1 (2,0 ug TR \hat{a}_1 wt + 2,0 ug G345R) ou 1:5 (2,0 ug TR \hat{a}_1 wt + 10,0 ug G345R). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TRH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T_3 . A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a média da taxa de repressão de cada receptor (n = 7; ** p < 0,01).

AP-1

Decidimos também investigar os efeitos dos mutantes F451X e G345R no promotor da colagenase, mais especificamente, no elemento AP-1, que sabidamente o TR reprime a transcrição sem se ligar diretamente ao DNA. Na figura 22a podemos observar que na ausência de T_3 , a co-transfecção de TR \hat{a}_1 nativo aumentou a atividade transcripcional do AP-1 de maneira dose dependente, assim como o ocorrido em TSH-LUC e TRH-LUC. Dessa forma, 6,0 μ g de TR nativo aumentou a taxa de transcrição em $238,54 \pm 36,71\%$. De forma similar ao TR \hat{a}_1 nativo, 1,0 μ g do mutante F451X também ativou a transcrição do AP-1 na ausência do hormônio com o valor de $115,31 \pm 12,35\%$ em relação ao TR \hat{a}_1 nativo (tabela 07). Por outro lado, ao contrário do TR \hat{a}_1 nativo, F451X não reprimiu eficientemente a transcrição, na presença de T_3 , pois sua taxa de repressão foi apenas de $4,90 \pm 2,03\%$, um valor significativamente menor que a repressão do TR \hat{a}_1 nativo que foi de

49,53 ± 4,06% (figura 22b). Ao analisarmos o efeito dominante negativo do F451X sobre o TR \hat{a} ₁ nativo na repressão mediada por T₃, da mesma maneira como foi descrito anteriormente com TRH, a co-transfecção do F451X, seja na proporção de 1:1 ou 1:5 não diminuiu a atividade repressora do TR \hat{a} ₁ nativo (49,53 ± 4,06% versus 49,00 ± 4,45% na proporção de 1:1 e 41,18 ± 3,57% na proporção de 1:5).

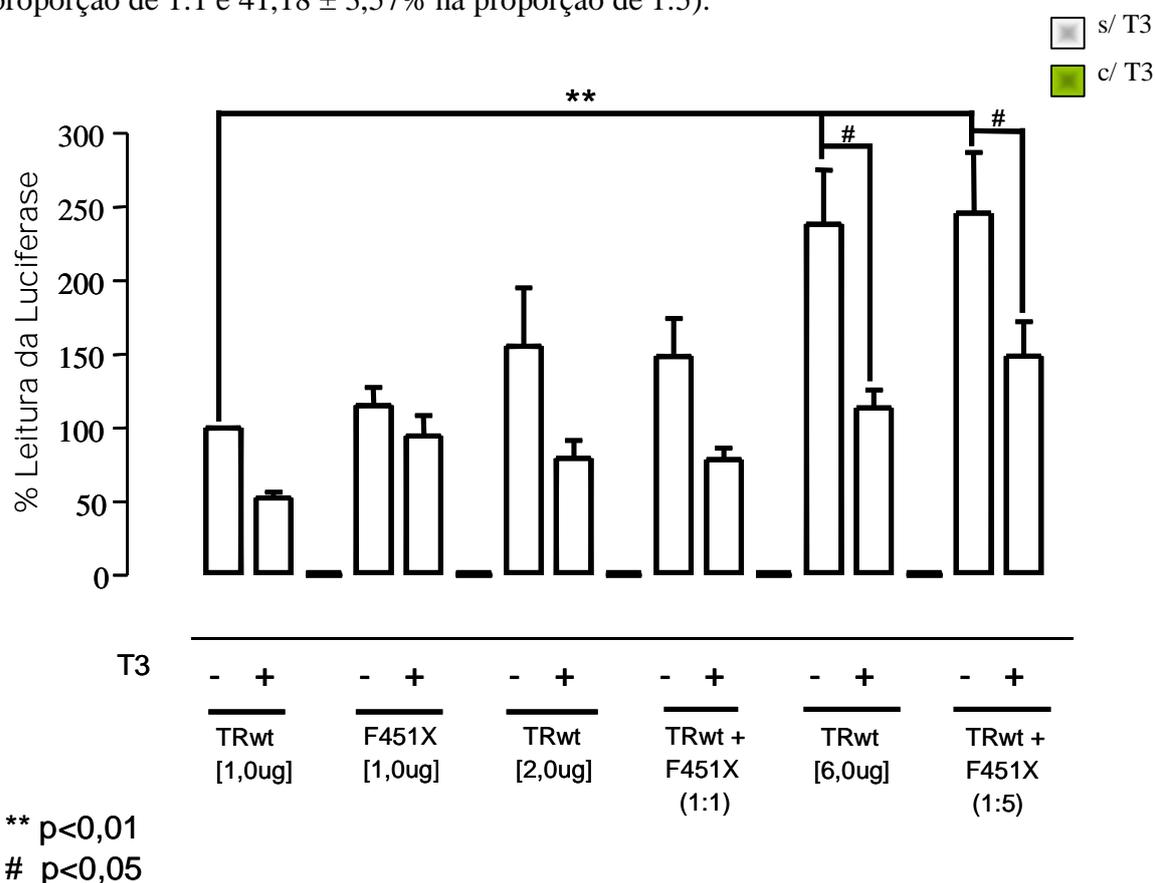


Figura 22a – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR \hat{a} ₁wt, ou do mutante F451X ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug TR \hat{a} ₁wt + 1,0 ug F451X) ou 1:5 (1,0 ug TR \hat{a} ₁wt + 5,0 ug F451X). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter AP-1 e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a média do percentual da leitura da luciferase na ausência ou presença de T₃ em relação ao TR \hat{a} ₁wt (1,0ug) na ausência de T₃ (n = 4; ** p < 0,01 e # p < 0,05).

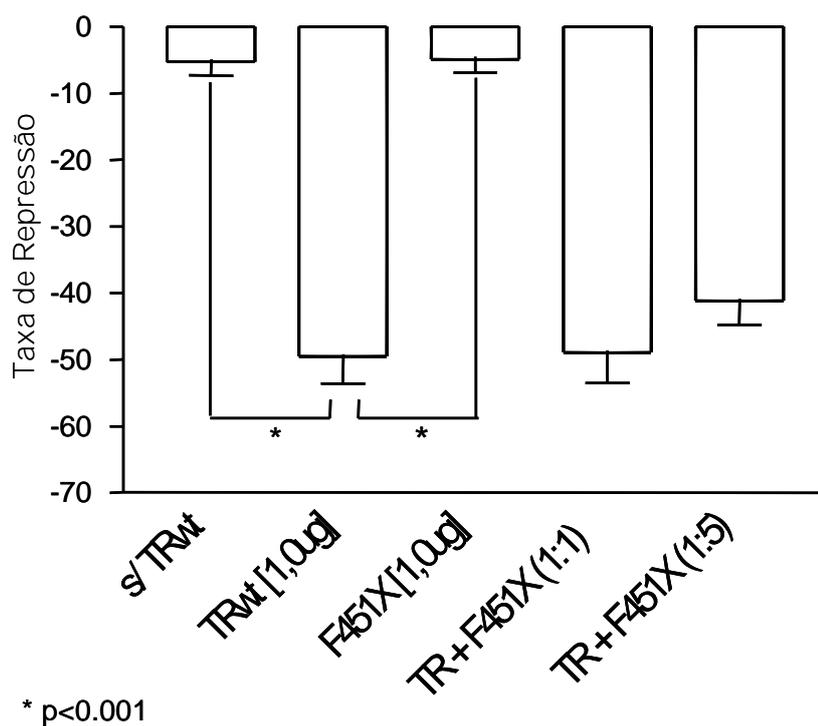
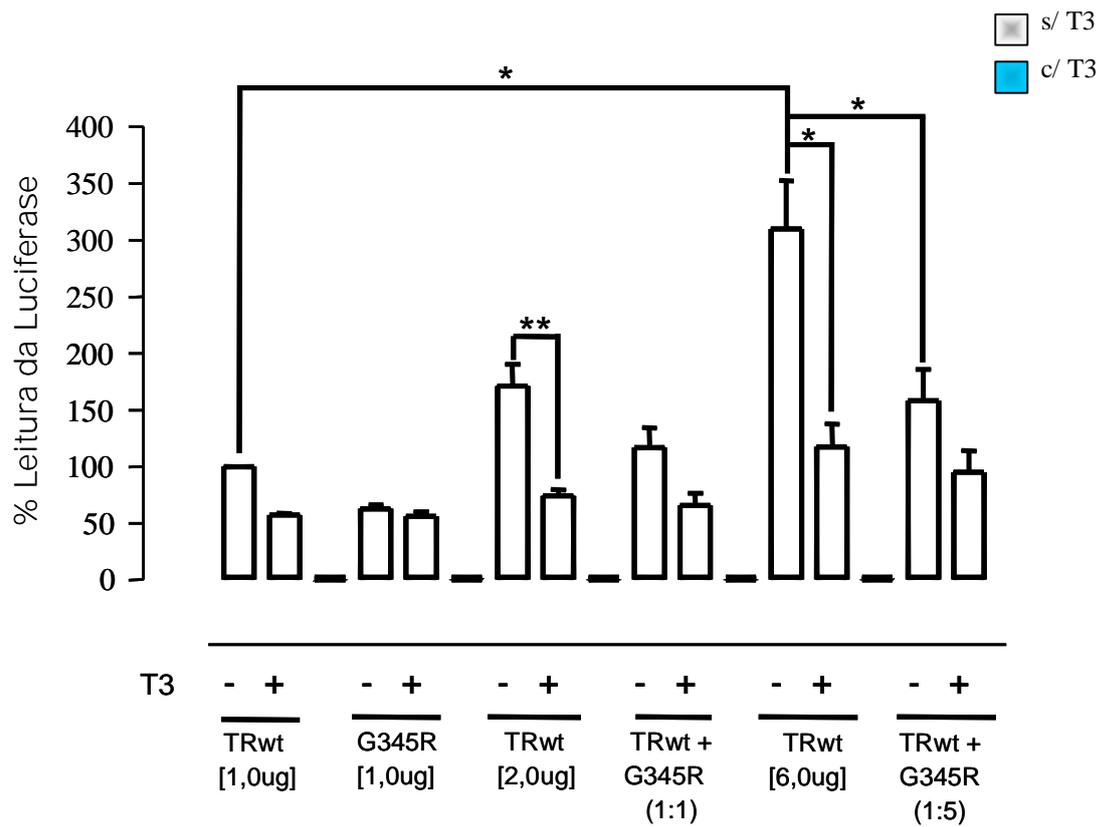


Figura 22b – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR α ₁wt, ou do mutante F451X ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug TR α ₁wt + 1,0 ug F451X) ou 1:5 (1,0 ug TR α ₁wt + 5,0 ug F451X). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter AP-1 e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a média da taxa de repressão de cada receptor (n = 4; * p < 0,001).

O mutante G345R, ao contrário do F451X, apresentou uma taxa de ativação menor que o TR α ₁ nativo (figura 23a), mas também não reprimiu eficientemente a transcrição na presença do T₃ (com média do percentual de repressão de $10,66 \pm 2,11\%$ versus $42,82 \pm 1,65\%$ do TR α ₁ nativo (1,0ug)) (figura 23b e tabela 08). A co-transfecção de G345R também diminuiu a atividade transcricional do AP-1 ligado a luciferase, porém, ao analisarmos o efeito dominante negativo do G345R sobre o TR α ₁ nativo na repressão mediada por T₃, observamos que, assim como o ocorrido com o F451X, a co-transfecção do G345R, tanto na proporção de 1:1 ou 1:5 não diminuiu a atividade repressora do TR α ₁ nativo ($42,82 \pm 1,65\%$ versus $43,31 \pm 0,65\%$ na proporção de 1:1 e $40,96 \pm 2,96\%$ na proporção de 1:5).

Portanto, semelhante ao que foi observado com TRH, os mutantes F451X e G345R não apresentaram a dominância negativa sobre o AP-1.



* $p < 0,001$

** $p < 0,01$

Figura 23a – Resposta ao T_3 mediada pela adição do vetor de expressão do $TR\hat{\alpha}_1$ wt, ou do mutante G345R ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug $TR\hat{\alpha}_1$ wt + 1,0 ug G345R) ou 1:5 (1,0 ug $TR\hat{\alpha}_1$ wt + 5,0 ug G345R). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter AP-1 e tratadas com etanol ou 1000 nM de T_3 . A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a média do percentual da leitura da luciferase na ausência ou presença de T_3 em relação ao $TR\hat{\alpha}_1$ wt (1,0 ug) na ausência de T_3 (n = 6; * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$).

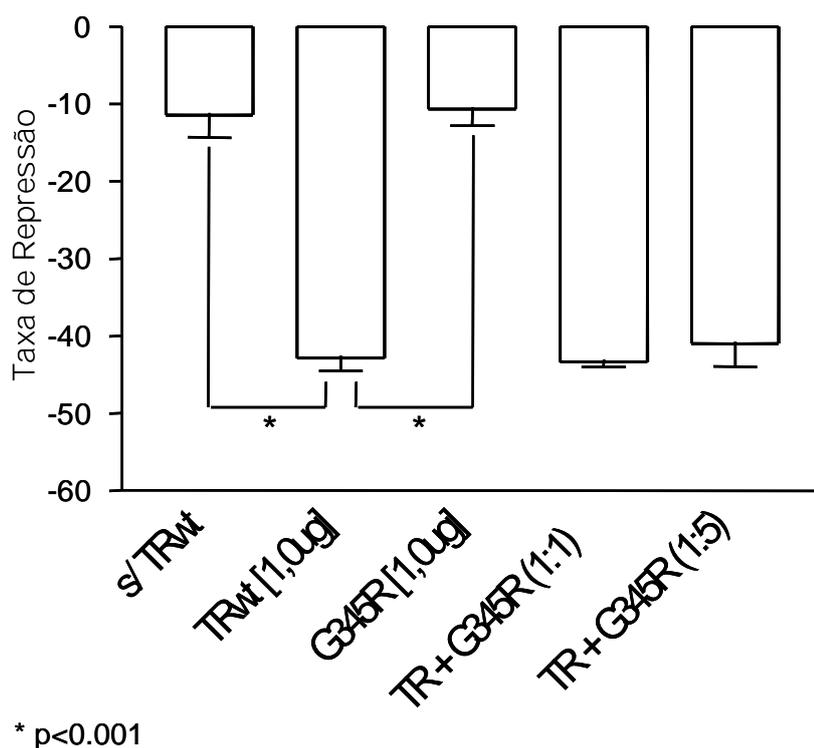


Figura 23b – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR \hat{a} ₁wt, ou do mutante G345R ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug TR \hat{a} ₁wt + 1,0 ug G345R) ou 1:5 (1,0 ug TR \hat{a} ₁wt + 5,0 ug G345R). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter AP-1 e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a média da taxa de repressão de cada receptor (n = 6; * p < 0,001).

Curvas dose-resposta do F451X e G345R

Considerando que a co-transfecção desses mutantes juntamente com o TR \hat{a} ₁ nativo não exerceram o efeito dominante negativo, ou seja, não modificaram a taxa de repressão transcricional mediada pelo T₃ sobre o TR \hat{a} ₁ nativo em TRH e AP-1 e que nesses estudos utilizamos doses elevadas de T₃ (10⁻⁶M), decidimos analisar se em doses menores seria possível observarmos algum tipo de efeito similar à dominância negativa. Para isto, decidimos investigar o comportamento desses mutantes sozinhos e co-transfectados com o TR \hat{a} ₁ nativo e tratados com doses crescentes de T₃ (10⁻¹⁰M a 10⁻⁶M) tanto no elemento responsivo positivo F2, quanto nos negativos, AP-1 e TRH.

A figura 24 (tabela 09) mostra a curva dose-resposta do mutante F451X em F2. Quando comparamos os valores das taxas de ativação para cada dose de T₃ tanto do F451X sozinho, como da co-transfecção com o TR \hat{a} ₁ nativo, observamos que houve uma diferença

estatística nas concentrações de 10^{-7}M e 10^{-6}M em relação ao TR $\hat{\text{a}}_1$ nativo ($p < 0,001$). A análise da resposta máxima (eficácia) mostrou que a média da taxa de ativação obtida pelo TR $\hat{\text{a}}_1$ nativo sozinho foi de $9,643 \pm 1,521$ enquanto que pela co-transfecção do mutante com o TR $\hat{\text{a}}_1$ nativo foi de $2,317 \pm 0,150$ e do mutante sozinho foi de $1,330 \pm 0,035$. Quando avaliamos o IC $_{50}$ observamos que os valores obtidos pelo TR $\hat{\text{a}}_1$ nativo ($3,2240 \cdot 10^{-8}\text{M}$) também foi diferente do F451X ($1,4020 \cdot 10^{-9}\text{M}$) e do TR $\hat{\text{a}}_1$ nativo + F451X ($1,3750 \cdot 10^{-8}\text{M}$). Dessa forma, confirmamos que o mutante F451X exerce um efeito dominante negativo evidente sobre o TR $\hat{\text{a}}_1$ nativo em F2 na concentração de 1:1, como já foi descrito anteriormente, mesmo variando a concentração de T $_3$

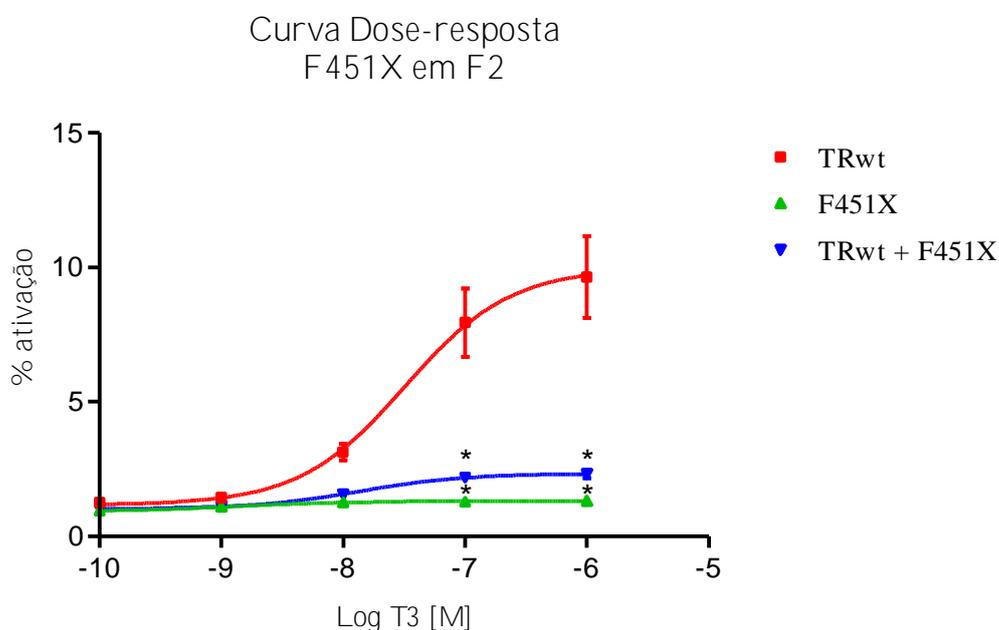


Figura 24 – Curva dose-resposta ao T $_3$ mediada pela adição de 2ug do vetor de expressão do TR $\hat{\text{a}}_1$ wt, F451X ou TR $\hat{\text{a}}_1$ wt + F451X (1,0 ug + 1,0 ug). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter F2-2TKLUC e tratadas com etanol ou concentrações crescentes de T $_3$ (10^{-10}M , 10^{-9}M , 10^{-8}M , 10^{-7}M e 10^{-6}M). A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam a taxa de ativação em relação à ausência de T $_3$. O cálculo e a estatística do IC $_{50}$ e da resposta máxima foram feitos no programa Prism e os valores obtidos foram IC $_{50}$ TR $\hat{\text{a}}_1$ nativo: $3,2240 \cdot 10^{-8}\text{M}$, IC $_{50}$ F451X: $1,4020 \cdot 10^{-9}\text{M}$ e IC $_{50}$ TR $\hat{\text{a}}_1$ wt + F451X: $1,3750 \cdot 10^{-8}$. Resposta máxima TR $\hat{\text{a}}_1$ wt: $9,643 \pm 1,521$, F451X: $1,330 \pm 0,035$ e TR $\hat{\text{a}}_1$ wt + F451X: $2,317 \pm 0,150$. A medida de dispersão adotada foi o erro padrão da média (SEM). ($n = 3$, * $p < 0,001$ vs TR $\hat{\text{a}}_1$ wt nas respectivas concentrações de T $_3$).

Em seguida, investigamos o comportamento dos mutantes F451X e G345R, sob a variação da dose de T $_3$, em TRH-LUC. A figura 25 (tabela 10) mostra a curva dose-

resposta do mutante F451X. Diferente do que foi mostrado em F2, a análise da resposta máxima (eficácia) em TRH-LUC mostrou que a média do percentual de repressão obtido pelo TR \hat{a} ₁ nativo co-transfectado com o mutante F451X ($47,05 \pm 5,28\%$) foi ligeiramente maior ao obtido pelo TR \hat{a} ₁ nativo sozinho ($41,55 \pm 5,42\%$), mas não estatisticamente diferente. Além disso, a comparação dos valores do TR \hat{a} ₁ nativo com TR \hat{a} ₁ nativo + F451X, observados para cada dose de T₃, não apresentou nenhuma diferença estatística. Porém o mutante sozinho obteve uma resposta máxima de $20,86 \pm 4,69\%$ de repressão e apresentou diferença estatística na concentração de 10^{-7} M em relação ao TR \hat{a} ₁ nativo. Quando avaliamos o IC₅₀ observamos que o valor obtido pelo TR \hat{a} ₁ nativo ($4,6870 \cdot 10^{-9}$ M) foi semelhante ao observado pela co-transfecção TR \hat{a} ₁ nativo + F451X ($5,8890 \cdot 10^{-9}$ M), enquanto que o IC₅₀ do F451X sozinho foi $1,4360 \cdot 10^{-10}$ M.

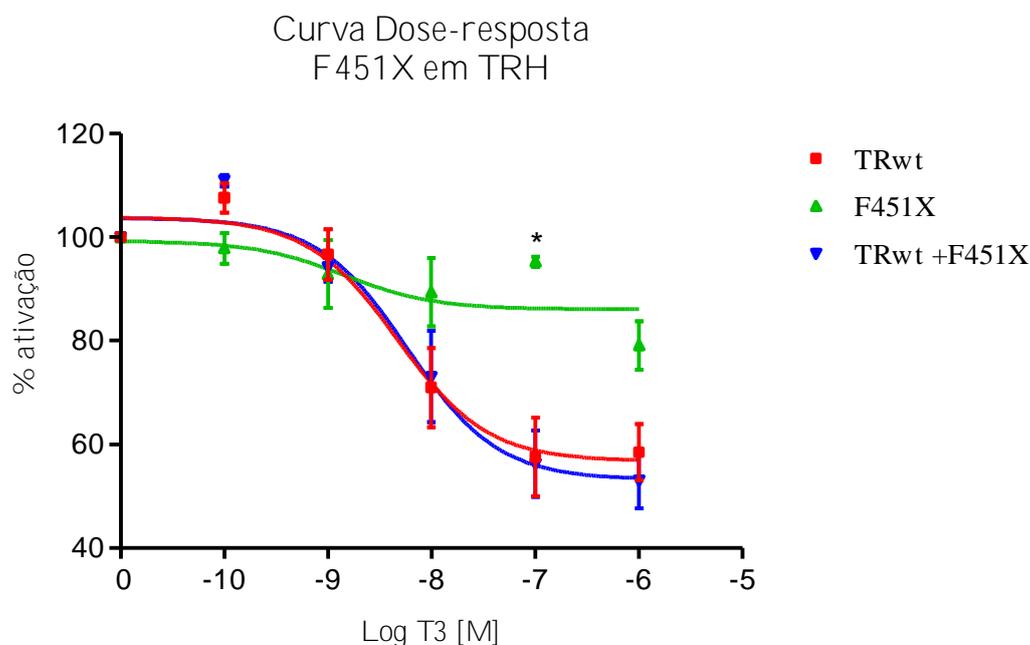


Figura 25 – Curva dose-resposta ao T₃ mediada pela adição de 2,0 ug do vetor de expressão do TR \hat{a} ₁wt, F451X ou TR \hat{a} ₁wt + F451X (1,0 ug + 1,0 ug). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TRH e tratadas com etanol ou concentrações crescentes de T₃ (10^{-10} M, 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M e 10^{-6} M). A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual de ativação em relação ao respectivo receptor na ausência de T₃. O cálculo e a estatística do IC₅₀ e da resposta máxima foram feitos no programa Prism e os valores obtidos foram IC₅₀ TR \hat{a} ₁wt: $4,6870 \cdot 10^{-9}$ M, IC₅₀ F451X: $1,4360 \cdot 10^{-9}$ M e IC₅₀ TR \hat{a} ₁wt + F451X: $5,8890 \cdot 10^{-9}$ M. Resposta máxima TR \hat{a} ₁wt: $41,55 \pm 5,420\%$, F451X: $20,86 \pm 4,69\%$ e TR \hat{a} ₁wt + F451X: $47,05 \pm 5,28\%$. A medida de dispersão adotada foi o erro padrão da média (SEM). (n = 3, * p < 0,05 vs TR \hat{a} ₁wt na respectiva concentração de T₃).

A figura 26 (tabela 11) mostra a curva dose-resposta do mutante G345R em TRH-LUC. E como observado em F451X, a análise da resposta máxima (eficácia) mostrou que a média do percentual de repressão obtido pelo TR \hat{a}_1 nativo sozinho ($53,83 \pm 5,13\%$) foi semelhante ao obtido pela co-transfecção do mutante com o TR \hat{a}_1 nativo ($50,07 \pm 0,53\%$). Além disso, a comparação dos valores do TR \hat{a}_1 nativo com TR \hat{a}_1 nativo + G345R, observados para cada dose de T $_3$, não apresentou nenhuma diferença estatística. O mutante sozinho obteve uma resposta máxima de $23,10 \pm 1,801\%$ de repressão e apresentou diferença estatística nas concentrações de 10^{-8}M a 10^{-6}M em relação ao TR \hat{a}_1 nativo. Quando avaliamos o IC $_{50}$ observamos que o valor obtido pelo TR \hat{a}_1 nativo ($3,4230 \cdot 10^{-9}\text{M}$) foi semelhante ao observado pela co-transfecção TR \hat{a}_1 nativo + G345R ($2,1380 \cdot 10^{-9}\text{M}$), enquanto que o IC $_{50}$ do G345R sozinho foi significativamente maior ($1,2560 \cdot 10^{-7}\text{M}$).

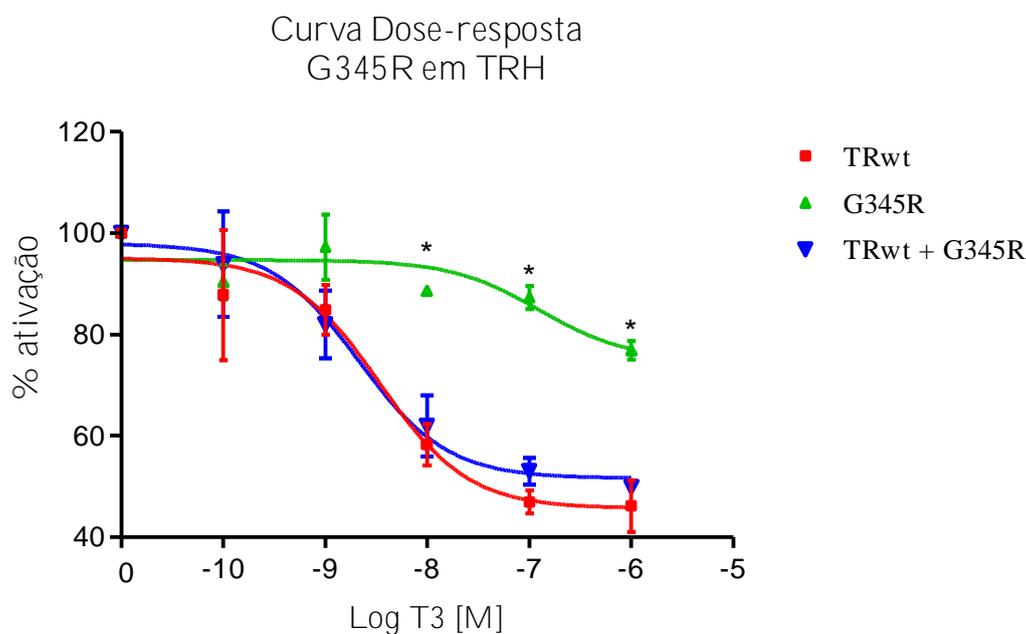


Figura 26 – Curva dose-resposta ao T $_3$ mediada pela adição de 2,0 ug do vetor de expressão do TR \hat{a}_1 wt, G345R ou TR \hat{a}_1 wt + G345R (1,0 ug + 1,0 ug). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TRH-LUC e tratadas com etanol ou concentrações crescentes de T $_3$ (10^{-10}M , 10^{-9}M , 10^{-8}M , 10^{-7}M e 10^{-6}M). A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual de ativação em relação ao respectivo receptor na ausência de T $_3$. O cálculo e a estatística do IC $_{50}$ e da resposta máxima foram feitos no programa Prism e os valores obtidos foram IC $_{50}$ TR \hat{a}_1 wt: $3,4230 \cdot 10^{-9}\text{M}$, IC $_{50}$ G345R: $1,2560 \cdot 10^{-7}\text{M}$ e IC $_{50}$ TR \hat{a}_1 wt + G345R: $2,1380 \cdot 10^{-9}\text{M}$. Resposta máxima TR \hat{a}_1 wt: $53,83 \pm 5,13\%$, G345R: $23,10 \pm 1,80\%$ e TR \hat{a}_1 wt + G345R: $50,07 \pm 0,53\%$. A medida de dispersão adotada foi o erro padrão da média (SEM). (n = 3, * p < 0,001 vs TR \hat{a}_1 wt nas respectivas concentrações de T $_3$).

Logo após, examinamos o comportamento dos mutantes F451X e G345R, sob a variação da concentração de T₃, em AP-1. A figura 27 mostra a curva dose-resposta do F451X (tabela 12) e como observado em TRH-LUC, a análise da resposta máxima (eficácia) mostrou que a média do percentual de repressão obtido pelo TRâ₁ nativo sozinho (49,80 ± 5,85%) foi muito semelhante ao obtido pela co-transfecção do mutante com o TRâ₁ nativo (45,70 ± 1,70%). Além disso, a comparação dos valores do TRâ₁ com TRâ₁ nativo + F451X, observados para cada dose de T₃, não apresentou nenhuma diferença estatística. Porém o mutante sozinho obteve uma resposta máxima de apenas 14,77 ± 5,40% de repressão e apresentou diferença estatística nas concentrações de 10⁻⁷M e 10⁻⁶M em relação ao TRâ₁ nativo. Quando avaliamos o IC₅₀ observamos que o valor obtido pelo TRâ₁ nativo (1,4110.10⁻⁸M) foi semelhante ao observado pela co-transfecção TRâ₁ nativo + F451X (1,0350.10⁻⁸M), enquanto que o IC₅₀ do F451X sozinho foi 3,7080.10⁻⁸ M.

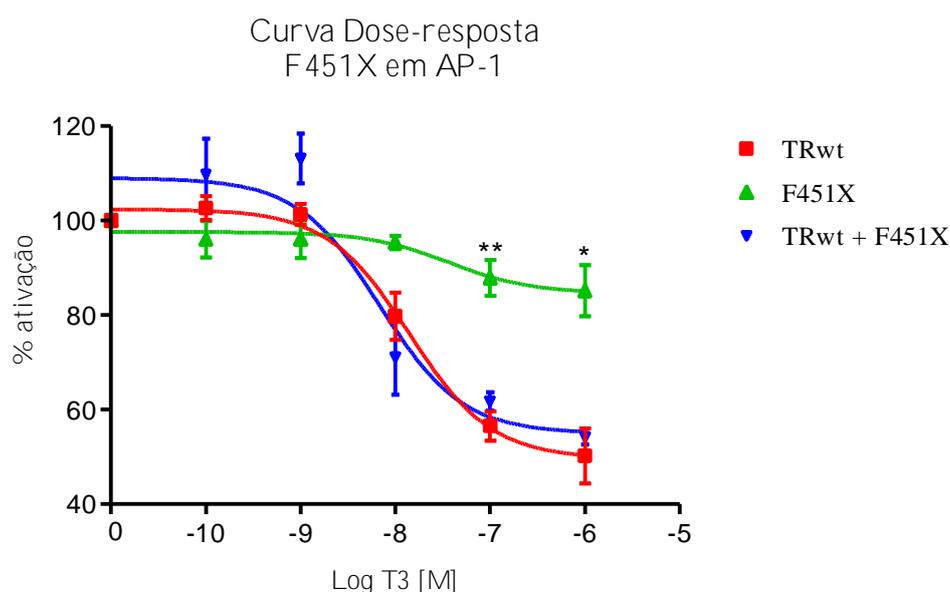


Figura 27 – Curva dose-resposta ao T₃ mediada pela adição de 2,0 ug do vetor de expressão do TRâ₁wt, F451X ou TRâ₁wt + F451X (1,0 ug + 1,0 ug). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter AP-1 e tratadas com etanol ou concentrações crescentes de T₃ (10⁻¹⁰M, 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M e 10⁻⁶M). A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual de ativação em relação ao respectivo receptor na ausência de T₃. O cálculo e a estatística do IC₅₀ e da resposta máxima foram feitos no programa Prism e os valores obtidos foram IC₅₀ TRâ₁wt: 1,4110.10⁻⁸ M, IC₅₀ F451X: 3,7080.10⁻⁸ M e IC₅₀ TRâ₁wt + F451X: 1,0350.10⁻⁸ M. Resposta máxima TRâ₁wt: 49,80 ± 5,850%, F451X: 14,77 ± 5,406% e TRâ₁wt + F451X: 45,70 ± 1,701%. A medida de dispersão adotada foi o erro padrão da média (SEM). (n = 3, * p < 0,001 e ** p < 0,01 vs TRâ₁wt na respectiva concentração de T₃).

Quando analisamos o G345R em AP-1 (fig. 28, tabela 13) novamente observamos que a análise da resposta máxima (eficácia) mostrou que a média do percentual de repressão obtido pelo TRâ₁ nativo sozinho ($55,0 \pm 2,90\%$) foi semelhante ao obtido pela co-transfecção do mutante com o TRâ₁ nativo ($50,23 \pm 5,09\%$). Além disso, a comparação dos valores do TRâ₁ nativo com TRâ₁ nativo + G345R, observados para cada dose de T₃, também não apresentou nenhuma diferença estatística. Porém o mutante sozinho obteve uma resposta máxima de apenas $13,97 \pm 2,86\%$ de repressão e apresentou diferença estatística nas concentrações de 10^{-8}M , 10^{-7}M e 10^{-6}M em relação ao TRâ₁ nativo. Quando avaliamos o IC₅₀ observamos que o valor obtido pelo TRâ₁ nativo ($6,6860 \cdot 10^{-9}\text{M}$) foi muito semelhante ao observado pela co-transfecção TRâ₁ nativo + G345R ($6,4500 \cdot 10^{-9}\text{M}$), enquanto que o IC₅₀ do G345R sozinho foi significativamente diferente ($8,9440 \cdot 10^{-10}\text{M}$). Portanto, os mutantes F451X e G345R não apresentaram o efeito dominante negativo sobre o TRâ₁ nativo em TRH-LUC nem em AP-1, mesmo em baixas concentrações de T₃.

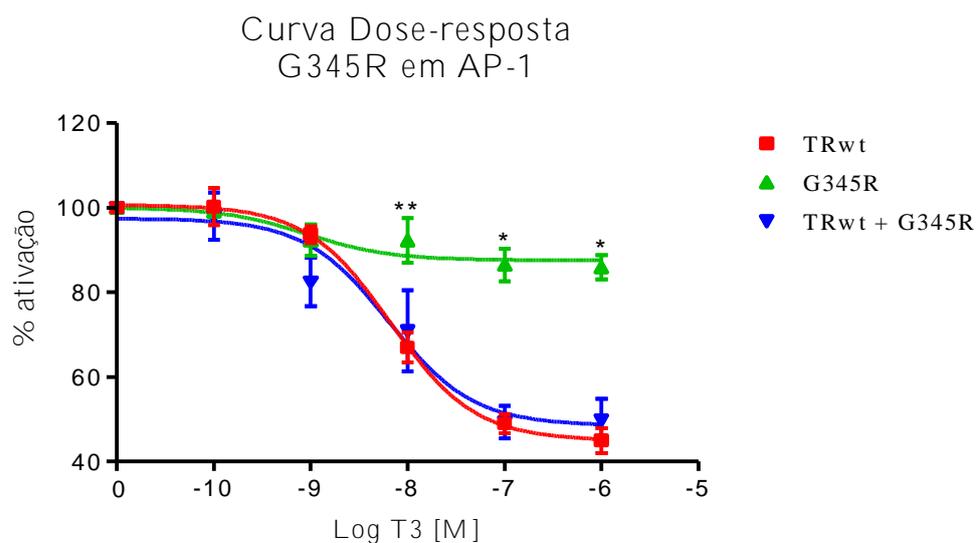


Figura 28 – Curva dose-resposta ao T₃ mediada pela adição de 2,0 ug do vetor de expressão do TRâ₁wt, G345R ou TRâ₁wt + G345R (1,0 ug + 1,0 ug). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter AP-1 e tratadas com etanol ou concentrações crescentes de T₃ (10^{-10}M , 10^{-9}M , 10^{-8}M , 10^{-7}M e 10^{-6}M). A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual de ativação em relação ao respectivo receptor na ausência de T₃. O cálculo e a estatística do IC₅₀ e da resposta máxima foram feitos no programa Prism e os valores obtidos foram IC₅₀ TRâ₁wt: $6,6860 \cdot 10^{-9}\text{M}$, IC₅₀ G345R: $8,9440 \cdot 10^{-10}\text{M}$ e IC₅₀ TRâ₁wt + G345R: $6,4500 \cdot 10^{-9}\text{M}$. Resposta máxima TRâ₁wt: $55,0 \pm 2,90\%$, G345R: $13,97 \pm 2,86\%$ e TRâ₁wt + G345R: $50,23 \pm 5,09\%$. A medida de dispersão adotada foi o erro padrão da média (SEM). (n = 3, * p < 0,001 e ** p < 0,05 vs TRâ₁wt na respectiva concentração de T₃).

Efeito Dominante Negativo do F451X e do G345R em elevadas concentrações

Tendo em vista que os mutantes F451X e G345R quando co-transfectados com o TR $\hat{\alpha}$ ₁wt não apresentaram dominância negativa sobre a repressão do promotor do TRH-LUC e AP-1, seja sobre a eficácia, medida pela repressão máxima ou na sua potência, avaliada pelo IC50, re-avaliamos se concentrações mais elevadas desses mutantes, nas proporções de até 10 mais de F451X e G345R, iriam interferir na ação do TR $\hat{\alpha}$ ₁ nativo.

TRH

A figura 29 mostra o percentual de repressão de proporções crescentes do mutante F451X co-transfectado com o TR $\hat{\alpha}$ ₁ nativo em TRH-LUC. Como podemos observar, considerando 100% a repressão de 1,0 μ g do TR β ₁ nativo, a co-tranfecção de F451X, nas razões de 1:1, 1:5 e 1:10, diminuiu ligeiramente o percentual de repressão do promotor TRH-LUC (101,89 \pm 14,81%, 90,07 \pm 13,97% e 78,06 \pm 8,93%, respectivamente), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (tabela 14).

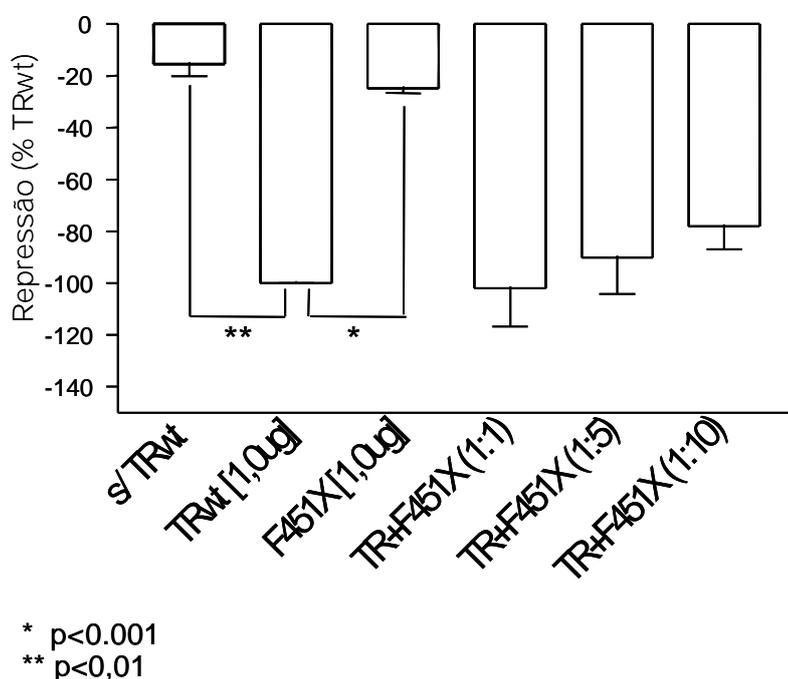


Figura 29 – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR $\hat{\alpha}$ ₁wt, ou do mutante F451X ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug TR $\hat{\alpha}$ ₁wt + 1,0 ug F451X), 1:5 (1,0 ug TR $\hat{\alpha}$ ₁wt + 5,0 ug F451X) ou 1:10 (1,0 ug TR $\hat{\alpha}$ ₁wt + 10,0 ug F451X). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TRH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de repressão em relação ao TR $\hat{\alpha}$ ₁wt (n = 3; * p < 0,001 e ** p < 0,01).

Podemos observar que em G345R (figura 30) obtivemos o mesmo padrão mostrado em F451X. Considerando 100% a repressão de 1,0 μ g do TR β ₁ nativo, a co-transfecção de G345R, nas razões de 1:1, 1:5 e 1:10, diminuiu ligeiramente o percentual de repressão do promotor TRH-LUC (94,97 \pm 7,44%, 85,75 \pm 5,04% e 83,40 \pm 8,30%, respectivamente), porém esta diferença também não foi estatisticamente significativa (tabela 15).

Dessa forma, avaliamos que mesmo em elevadas concentrações os mutantes F451X e G345R não apresentaram o efeito dominante negativo sobre o TR β ₁ nativo em TRH-LUC.

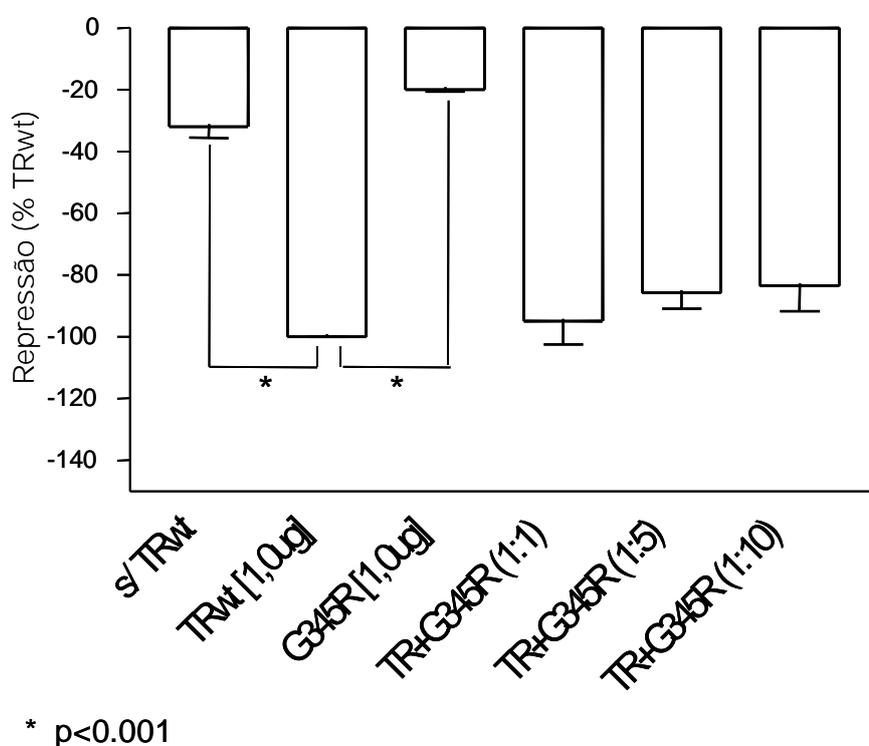
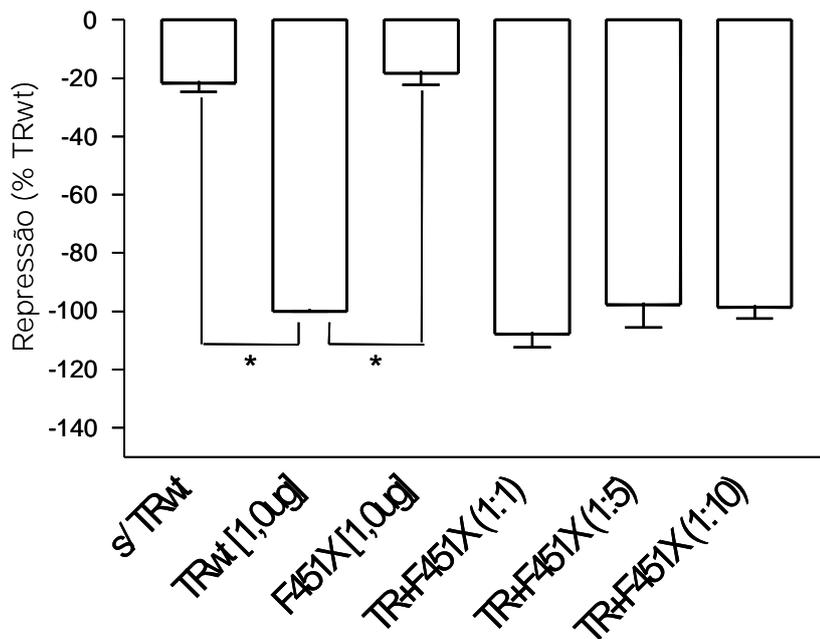


Figura 30 – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR $\hat{\alpha}$ ₁wt, ou do mutante G345R ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug TR $\hat{\alpha}$ ₁wt + 1,0 ug G345R), 1:5 (1,0 ug TR $\hat{\alpha}$ ₁wt + 5,0 ug G345R) ou 1:10 (1,0 ug TR $\hat{\alpha}$ ₁wt + 10,0 ug G345R). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TRH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de repressão em relação ao TR $\hat{\alpha}$ ₁wt (n = 3; * p < 0,001).

AP-1

Também analisamos o efeito de doses elevadas dos mutantes F451X e G345R sobre o TR β ₁ nativo em AP-1. Observamos que o mutante F451X (figura 31), considerando

100% a repressão de 1,0 μg do TR $\hat{\alpha}_1$ nativo, não exerceu o efeito dominante negativo sobre o TR $\hat{\alpha}_1$ nativo, mesmo em elevadas concentrações com média do percentual de repressão de $107,75 \pm 4,53\%$ (na razão de 1:1), $97,66 \pm 7,76\%$ (na razão de 1:5) e $98,54 \pm 3,84\%$ (na razão de 1:10), não apresentando nenhuma diferença estatística entre eles e o TR $\hat{\alpha}_1$ nativo (tabela 16).



* $p < 0,001$

Figura 31 – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR $\hat{\alpha}_1$ wt, ou do mutante F451X ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug TR $\hat{\alpha}_1$ wt + 1,0 ug F451X), 1:5 (1,0 ug TR $\hat{\alpha}_1$ wt + 5,0 ug F451X) ou 1:10 (1,0 ug TR $\hat{\alpha}_1$ wt + 10,0 ug F451X) . As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter AP-1 e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de repressão em relação ao TR $\hat{\alpha}_1$ wt (n = 3; * p < 0,001).

Em G345R (figura 32) observamos o mesmo ocorrido com o F451X. Considerando 100% a repressão de 1,0 μg do TR $\hat{\alpha}_1$ nativo, a co-tranfecção de G345R, nas razões de 1:1, 1:5 e 1:10, diminuiu ligeiramente o percentual de repressão do AP-1 ($106,18 \pm 3,07\%$, $87,39 \pm 3,51\%$ e $78,73 \pm 12,39\%$, respectivamente), porém esta diferença também não foi estatisticamente significativa (tabela 17).

Portanto, semelhante ao que foi observado com TRH-LUC, os mutantes F451X e G345R também não apresentaram o efeito dominante negativo sobre o TR α_1 nativo em AP-1.

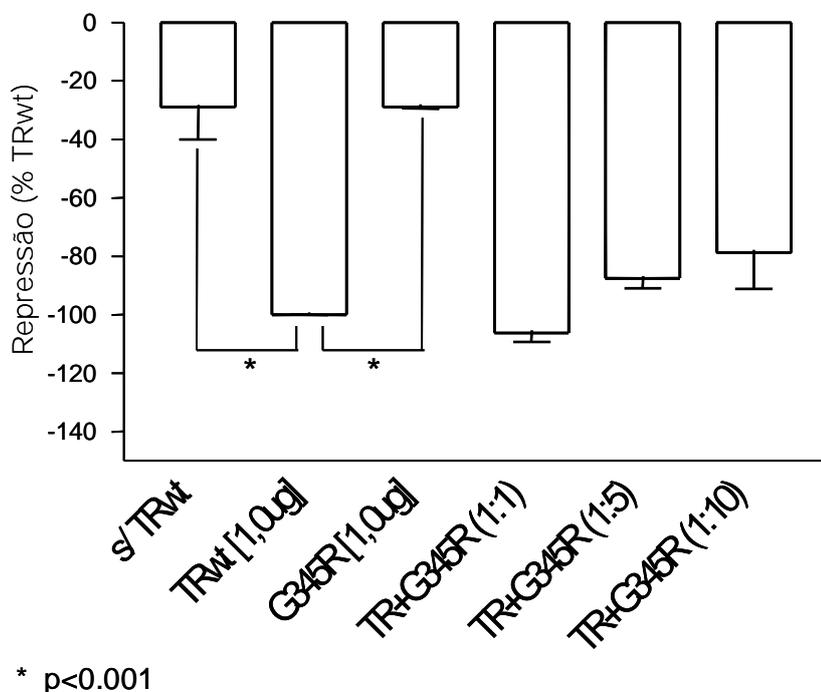


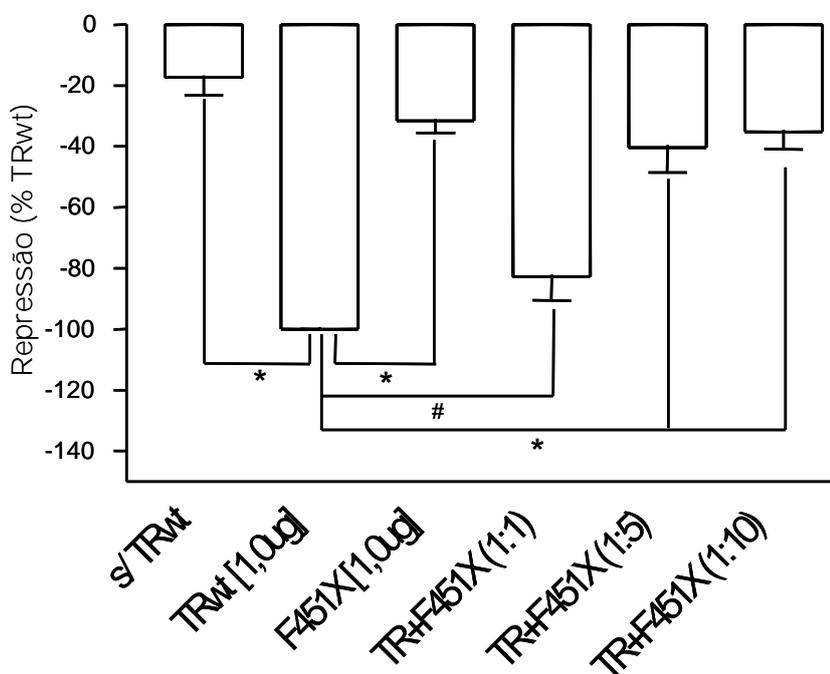
Figura 32 – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR α_1 wt, ou do mutante G345R ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug TR α_1 wt + 1,0 ug G345R), 1:5 (1,0 ug TR α_1 wt + 5,0 ug G345R) ou 1:10 (1,0 ug TR α_1 wt + 10,0 ug G345R) . As células foram co-transfectadas com 4ug do vetor para o gene repórter AP-1 e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de repressão em relação ao TR α_1 wt (n = 3; keyword>Recept α SH

TSH

Para confirmar a existência da diferença significativa entre a dominância negativa que o F451X e G345R exerce sobre o TSH-LUC mas não sobre TRH-LUC e AP-1, resolvemos re-examinar a dominância negativa do F451X e G345R sobre a atividade transcricional do promotor do TSH-LUC com a utilização de proporções crescentes dos mutantes.

Como podemos observar na figura 33, considerando 100% a repressão de 1,0 µg do TR α_1 nativo, a co-tranfecção de F451X, nas razões de 1:1, 1:5 e 1:10, diminuiu

significativamente o percentual de repressão do promotor TSH-LUC ($82,74 \pm 7,84\%$, $40,28 \pm 8,09 \%$ e $35,21 \pm 5,64 \%$, respectivamente) (tabela 18).

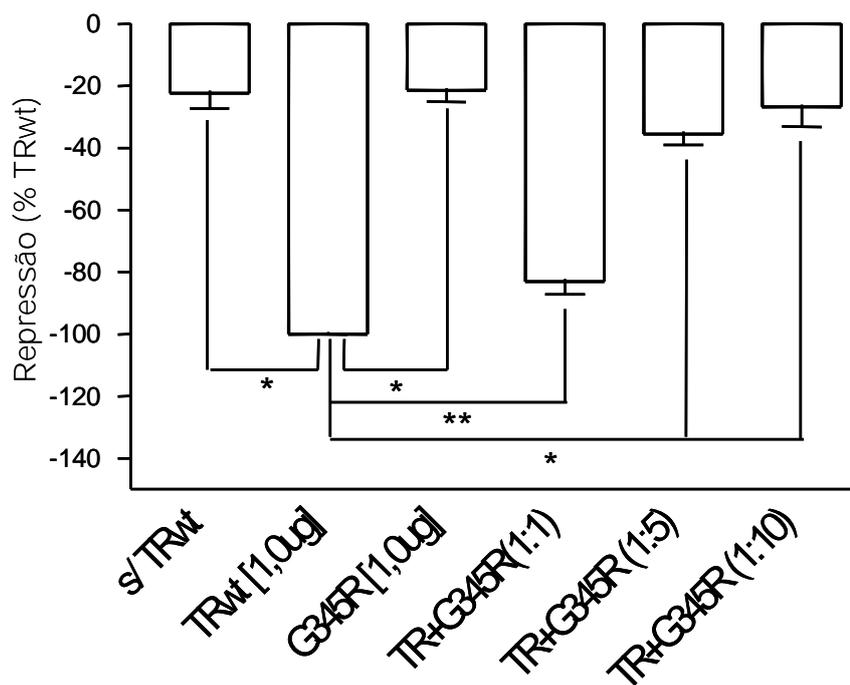


* $p < 0,001$

$p < 0,05$

Figura 33 – Resposta ao T_3 mediada pela adição do vetor de expressão do $TR\hat{a}_1$ wt, ou do mutante F451X ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug $TR\hat{a}_1$ wt + 1,0 ug F451X), 1:5 (1,0 ug $TR\hat{a}_1$ wt + 5,0 ug F451X) ou 1:10 (1,0 ug $TR\hat{a}_1$ wt + 10,0 ug F451X). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TSH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T_3 . A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de repressão em relação ao $TR\hat{a}_1$ wt ($n = 5$; * $p < 0,001$).

O mesmo foi evidenciado com o G345R (figura 34). Considerando 100% a repressão de 1,0 μ g do $TR\hat{a}_1$ nativo, a co-transfecção de G345R, nas razões de 1:1, 1:5 e 1:10, também diminuiu significativamente o percentual de repressão do promotor TSH-LUC ($82,98 \pm 4,05\%$, $35,44 \pm 3,47\%$ e $26,71 \pm 6,41\%$, respectivamente) (tabela 19).



* p<0.001
 ** p<0,01

Figura 34 – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR_α1wt, ou do mutante G345R ou de ambos na proporção de 1:1 (1,0 ug TR_α1wt + 1,0 ug G345R), 1:5 (1,0 ug TR_α1wt + 5,0 ug G345R) ou 1:10 (1,0 ug TR_α1wt + 10,0 ug G345R) . As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TSH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de repressão em relação ao TR_α1wt (n = 4; * p < 0,001).

Dessa forma, confirmamos a existência da dominância negativa que os mutantes F451X e G345R exercem sobre o TR_α1 nativo em TSH-LUC mas não em TRH-LUC e AP-1.

Avaliação das Propriedades de Dimerização no Efeito Dominante Negativo do F451X e G345R em TSH

O achado de que os mutantes F451X e G345R conseguiram exercer o efeito dominante negativo apenas no TSH-LUC, nos levou a testar se o fenômeno da dimerização entre receptores estaria envolvido na dominância negativa no TSH, assim como o que ocorre nos elementos regulados positivamente (Velasco, 2005).

Para testar esta hipótese lançamos mão do mutante L422R, que, como descrito anteriormente, possui as propriedades de dimerização afetadas. A figura 35 mostra a capacidade de repressão do L422R no promotor do TSH ligado a luciferase, na presença de T_3 . Considerando 100% a repressão de 1,0 μg do TR \hat{a} ₁ nativo, podemos observar que o L422R não conseguiu reprimir a transcrição na presença do hormônio, sendo que a média do percentual de repressão foi de apenas $11,42 \pm 3,27\%$ (tabela 20).

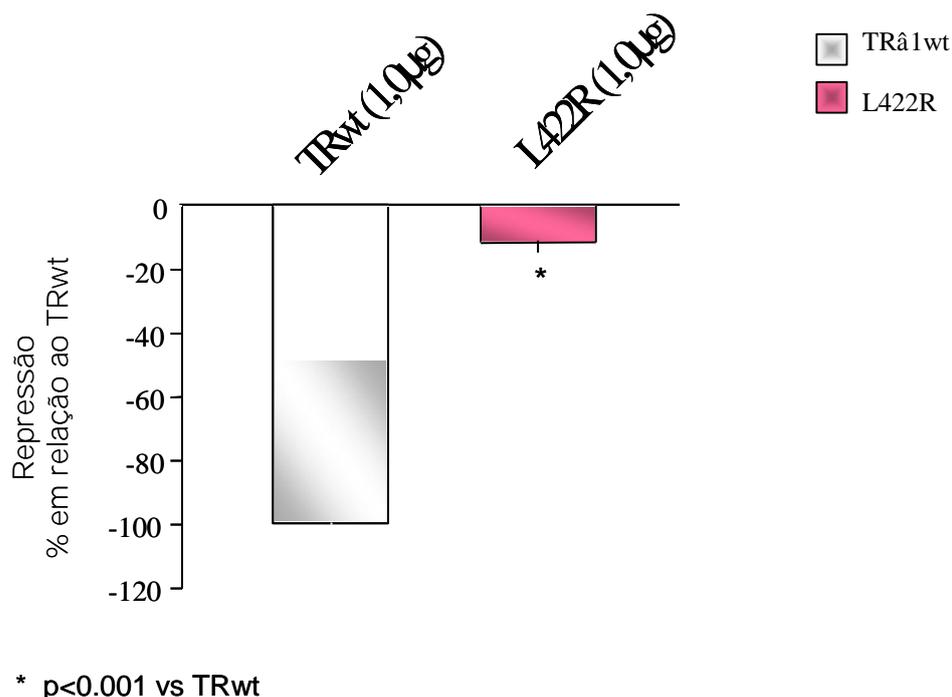


Figura 35 – Resposta ao T_3 mediada pela adição de 1,0 ug do vetor de expressão do TR \hat{a} ₁wt ou do mutante L422R. As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TSH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T_3 . A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de repressão em relação ao TR \hat{a} ₁wt (n = 5, * p < 0,001 vs TRwt).

Dessa forma, decidimos utilizar os duplos mutantes L422R/F451X e G345R/L422R, que possuíam ao mesmo tempo uma mutação encontrada na SPTH e a mutação envolvida na superfície de dimerização, para avaliarmos se o efeito dominante negativo seria corrigido ou pelo menos atenuado no TSH.

Observamos que o L422R/F451X sozinho não conseguiu reprimir a transcrição na presença do hormônio (figura 36, tabela 18). Porém, considerando 100% a repressão de 1,0 μg do TR \hat{a} ₁wt, verificamos que o duplo-mutante corrigiu a atividade dominante negativa do F451X na proporção de 1:1 ($102,72 \pm 14,93\%$ versus $82,74 \pm 7,84\%$ do TR+F451X

(1:1)) e 1:5 ($96,56 \pm 9,56\%$ versus $40,28 \pm 8,09\%$ do TR+F451X (1:5)). Na concentração 1:10, observamos que o duplo-mutante atenuou o forte efeito dominante negativo do F451X ($69,16 \pm 6,09\%$ versus $35,21 \pm 5,64\%$ do TR+F451X (1:10)).

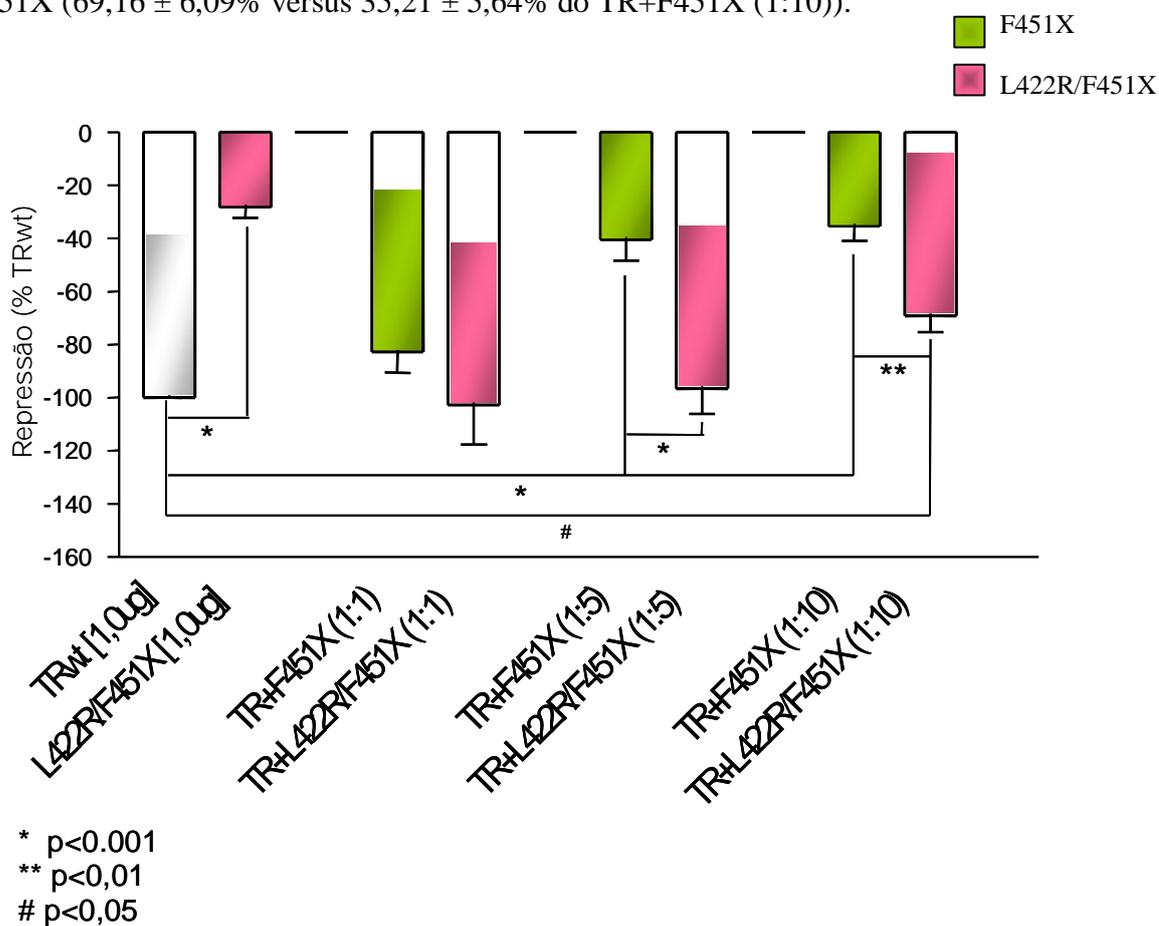
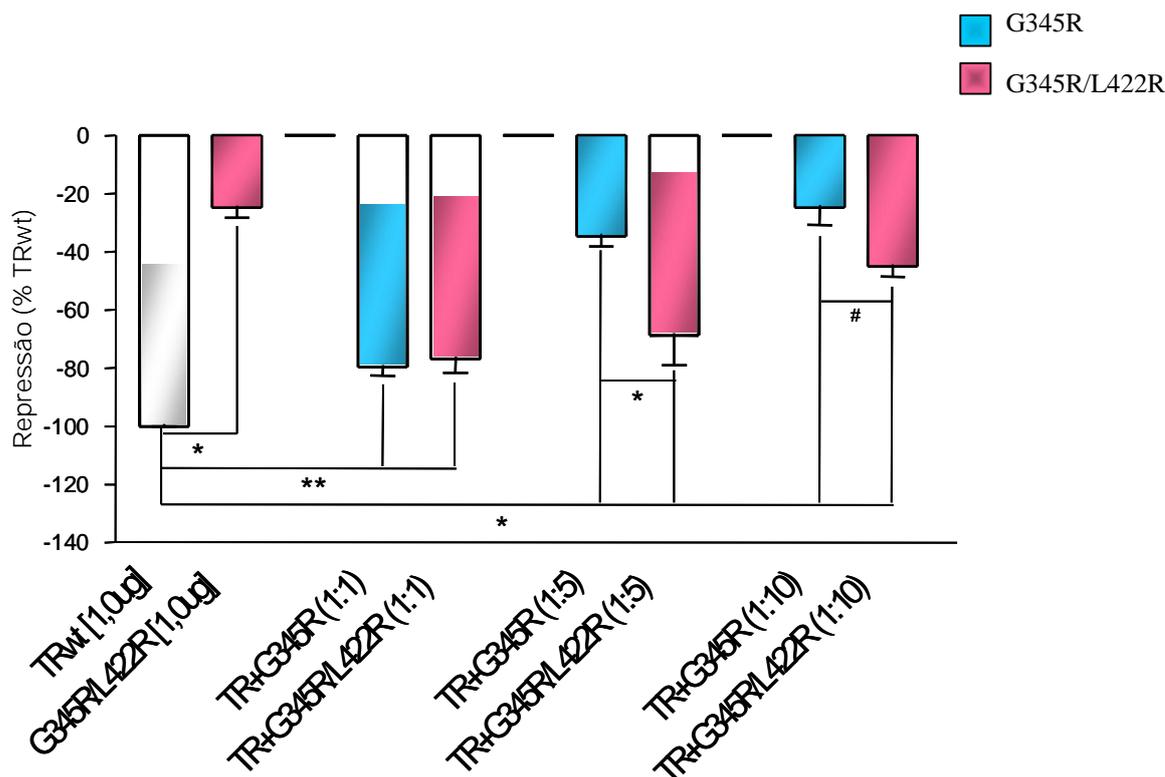


Figura 36 – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR \hat{a} ₁wt ou do L422R/F451X, ou ainda da combinação dos mutantes com o TR \hat{a} ₁wt na proporção de 1:1 (1,0 ug TR \hat{a} ₁wt + 1,0 ug F451X ou 1,0 ug TR \hat{a} ₁wt + 1,0 ug L422R/F451X), 1:5 (1,0 ug TR \hat{a} ₁wt + 5,0 ug F451X ou 1,0 ug TR \hat{a} ₁wt + 5,0 ug L422R/F451X) ou 1:10 (1,0 ug TR \hat{a} ₁wt + 10,0 ug F451X ou 1,0 ug TR \hat{a} ₁wt + 10,0 ug L422R/F451X). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TSH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de repressão em relação ao TR \hat{a} ₁wt (n = 5; * p < 0,001, ** p < 0,01 e # p < 0,05).

Também observamos que o G345R/L422R sozinho não conseguiu reprimir a transcrição na presença do hormônio (figura 37, tabela 19). Porém, considerando 100% a repressão de 1,0 μ g do TR \hat{a} ₁ nativo, verificamos que o duplo-mutante atenuou a intensa atividade dominante negativa do G345R na proporção de 1:5 ($68,82 \pm 10,20\%$ versus

34,60 ± 3,48% do TR+G345R (1:5)) e 1:10 (44,96 ± 3,58% versus 24,67 ± 6,12% do TR+G345R (1:10)).

Assim, verificamos que o duplo mutante L422R/F451X corrigiu a atividade dominante negativa do F451X e o G3455R/L422R atenuou o efeito do G345R sobre o TR α_1 nativo em TSH-LUC, indicando que a dimerização está envolvida neste fenômeno.



* p<0,001
 ** p<0,01
 # p<0,05

Figura 37 – Resposta ao T₃ mediada pela adição do vetor de expressão do TR α_1 wt ou do G345R/L422R, ou ainda da combinação dos mutantes com o TR α_1 wt na proporção de 1:1 (1,0 ug TR α_1 wt + 1,0 ug G345R ou 1,0 ug TR α_1 wt + 1,0 ug G345R/L422R), 1:5 (1,0 ug TR α_1 wt + 5,0 ug G345R ou 1,0 ug TR α_1 wt + 5,0 ug G345R/L422R) ou 1:10 (1,0 ug TR α_1 wt + 10,0 ug G345R ou 1,0 ug TR α_1 wt + 10,0 ug G345R/L422R). As células foram co-transfectadas com 4,0 ug do vetor para o gene repórter TSH-LUC e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de repressão em relação ao TR α_1 wt (n = 4; * p < 0,001, ** p < 0,01 e # p < 0,05).

Importância da Dimerização na Repressão da Transcrição do Promotor do TRH-LUC e AP-1

Tendo em vista que observamos a dominância negativa dos mutantes F451X e G345R sobre o TR $\hat{\alpha}$ ₁ nativo na modulação da repressão do promotor do TSH-LUC, mas não sobre a atividade transcricional do promotor do TRH-LUC e AP-1, e que a dimerização é importante para a dominância negativa e para a regulação da transcrição do promotor do TSH-LUC, decidimos avaliar se a dimerização participaria da regulação da transcrição dos promotores de TRH-LUC e AP-1.

Considerando 100% a repressão de 1,0 μ g do TR $\hat{\alpha}$ ₁ nativo, podemos observar que o L422R em TRH-LUC apresentou uma média do percentual de repressão de $73,97 \pm 2,16\%$ e em AP-1, apresentou uma média do percentual de repressão foi de $68,00 \pm 2,37\%$ (figura 38, tabelas 21 e 22). Portanto, observamos que a dimerização não é tão importante para a regulação da transcrição dos promotores de TRH-LUC e AP-1 ou ainda que esses promotores utilizam outra superfície de dimerização que não envolve o resíduo L422.

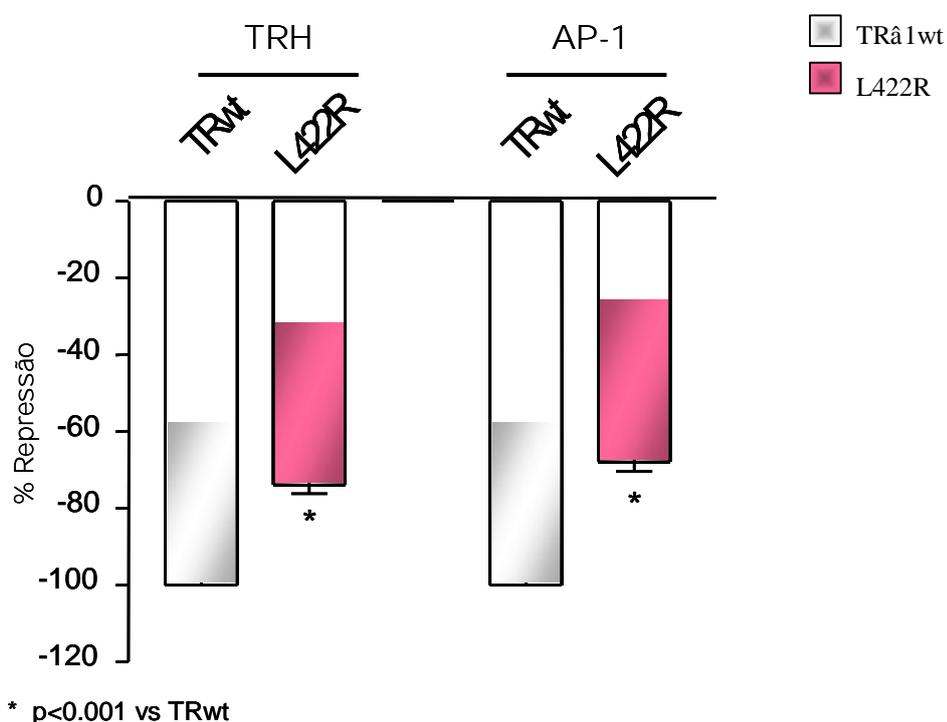


Figura 38 – Resposta ao T₃ mediada pela adição de 1,0 μ g do vetor de expressão do TR $\hat{\alpha}$ ₁wt ou do mutante L422R. As células foram co-transfectadas com 4,0 μ g do vetor para o gene repórter TRH-LUC e AP-1 e tratadas com etanol ou 1000 nM de T₃. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números representam o percentual da taxa de repressão em relação ao TR $\hat{\alpha}$ ₁wt (n = 3 - 5, * p < 0,001 vs TRwt).

DISCUSSÃO

O mecanismo molecular envolvido no efeito dominante negativo encontrado nos mutantes da SRHT ainda não foi totalmente elucidado. Muito já se tem avançado no conhecimento de como este fenômeno ocorre nos genes regulados positivamente pelo T_3 . Sabe-se que a patogênica molecular da SRHT é multifatorial, porém, dentre os mecanismos mais importantes, destaca-se a dimerização entre receptores e a ligação ao DNA como fatores co-responsáveis para que o TR mutado exerça sua ação repressora sobre o TR nativo nos promotores ativados por T_3 . Também é notório o forte efeito dominante negativo de alguns mutantes, tais como F451X e G345R, em elementos responsivos positivos (Sakurai et al., 1990; Nagaya et al., 1993; Ando et al., 1996; Tagami and Jameson, 1998; Matsushita et al., 2000).

A atividade repressora dos hormônios tireoideanos exerce ação fundamental na regulação de diversos genes envolvidos no metabolismo, proliferação e na diferenciação celular. Feng e cols. mostraram que aproximadamente 50% dos genes dependentes de T_3 , no fígado, são suprimidos (Feng et al., 2000). Dentre os genes regulados negativamente, destacam-se os promotores do TRH e TSH, que atuam no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide, em que o T_3 participa ativamente do processo de retro-alimentação negativa. Já é consenso que o aumento das concentrações séricas de T_3 e T_4 inibe a expressão de TRH e TSH, em nível hipotalâmico e hipofisário, respectivamente. Porém, o mecanismo molecular envolvido nesta repressão ainda necessita ser melhor esclarecido. Sabe-se que o TR se liga a seqüências específicas dentro dos promotores do TRH e TSH e ativa a transcrição na ausência do ligante. O estado ativador é convertido a repressor com a chegada do hormônio. Entretanto, este processo não ocorre isoladamente, mas sim com o envolvimento de um complexo de inúmeras proteínas que ativam ou reprimem a transcrição, além do fenômeno da compactação das cromatinas, da própria mudança conformacional do TR interagindo com o DNA e da possibilidade de dimerizar ou não com outros receptores, como o RXR, ou com o próprio TR.

Dentro desse universo de repressão surge o questionamento se ocorre e como pode acontecer a influência de TRs mutados sobre TR nativo, fenômeno este tão importante na SRHT. Assim, neste trabalho investigamos se o efeito dominante negativo ocorre em genes regulados negativamente pelo T_3 , como é relatada nos elementos responsivos positivos e se

a dimerização participa do processo de dominância negativa. Para isto utilizamos os ensaios de gene repórter em células promonocíticas humanas (U937) co-transfectadas com vetores de expressão do TR α_1 nativo ou TR α_1 mutado associados ao gene repórter da luciferase dirigido por promotores regulados negativamente: AP-1, TRH ou TSH α . Os TRs mutados utilizados foram os descritos na SRHT (F451X e G345R). Além disso, o mutante L422R, que é deficiente na sua propriedade de dimerização também foi utilizado.

Utilizando os ensaios de transfecção, inicialmente confirmamos que os mutantes F451X e G345R não conseguem ativar a transcrição e prejudicam acentuadamente a ação dos TRs nativos nas proporções de 1:1 e 1:5 em F2 (vide figura 17), o que está de acordo com a literatura (Sakurai et al., 1990; Miyoshi et al., 1995; Ando et al., 1996; Matsushita et al., 2000; Velasco, 2005).

Como foi descrito anteriormente, o promotor do TSH α necessita de fatores de transcrição Pit1 para a sua expressão. Como esses ativadores transcricionais são encontrados exclusivamente nas células hipofisárias, decidimos utilizar o promotor do TSH α , pois assim viabilizaria o estudo em células promonocíticas humanas (U937).

A região promotora da subunidade α tem sido bem menos definida. Análises de deleção demonstraram que o nTRE no gene α encontra-se dentro de uma região de 104pb entre -100 e +4pb, com um sítio de ligação ao TR entre -22 e -7pb imediatamente “downstream” da “TATA box” (Chatterjee et al., 1989). Esta localização induziu a hipótese de que a ligação do TR pode interferir com a ligação de fatores da “TATA box” e, dessa forma, mediar a repressão. Ao contrário do TSH α , Pit1 não é requerido para expressão da subunidade α . (Shupnik, 2000). Apesar de vários estudos analisarem a seqüência do DNA determinante para a ligação do TR, nenhuma seqüência consenso foi elucidada. A região entre -22 e -7pb é a que mais se assemelha ao TRE palindrômico descrito por Glass (figura 39) (Glass et al., 1988).

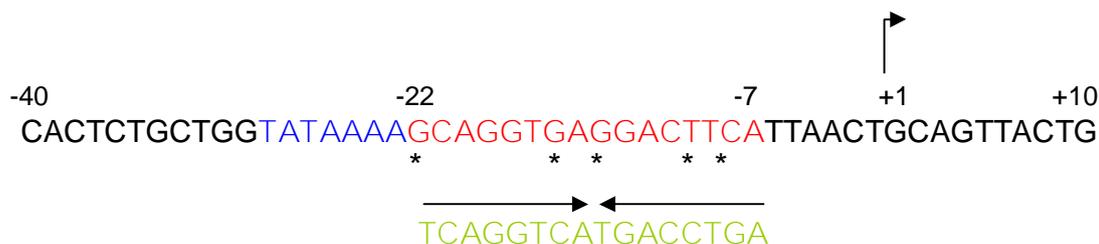


Figura 39. Ilustração esquemática do promotor do TSHá. A sequência em vermelho corresponde ao sítio de ligação do TR (-22 à -7pb); em azul, à TATA box e em verde, ao TRE palindrômico descrito por Glass e colaboradores (Glass et al., 1988). Os nucleotídeos diferentes do TRE palindrômico estão indicados pelo asterisco e a seta indica o sítio de início transcricional. Adaptado de Chatterjee et al., 1989.

Observamos que o F451X aumentou significativamente a atividade transcricional do promotor do TSHá ligado a luciferase, porém, não conseguiu reprimir a transcrição (figuras 18a e 18b). Isto pode ser explicado pelo fato de que esta mutação se caracteriza pela ligação ávida a co-repressores, principalmente SMRT (Safer et al., 1998; Matsushita et al., 2000) e como nos genes regulados negativamente os co-repressores participam da ativação (Tagami e Jameson, 1998; Berghagen et al., 2002), o F451X consegue ativar até um pouco melhor a transcrição, na ausência do hormônio, em relação ao TR nativo. Entretanto, há um impedimento na associação com co-ativadores, que neste contexto participariam da repressão e, por isso, o F451X não consegue reprimir a transcrição na presença do T_3 . A atividade dominante negativa é diminuída quando a mutação P214R, que reduz a ligação com co-repressor, é inserida nos mutantes da SRHT (Tagami e Jameson, 1998). Quando co-repressores (SMRT ou N-CoR) são co-transfectados nos promotores regulados negativamente aumentam a ativação basal na ausência de T_3 (Tagami et al., 1997). Esses achados indicam que os co-repressores estão envolvidos na patogênese da SRHT e desenvolvem um importante papel no controle dos genes regulados negativamente (Clifton-Bligh et al., 1998).

Quando co-transfectado com TR nativo, o F451X reduziu em 62% a inibição transcricional do TSHá, embora, na ausência de T_3 , não tenha interferido na ativação. Este acentuado efeito dominante negativo foi mais visível quando a concentração do mutante foi 5 vezes maior que do TR nativo, apesar do mutante bloquear parcialmente a atividade do TR nativo na razão de 1:1 (figura 18b). Isto já foi observado em estudos anteriores (Chatterjee et al., 1991; Nagaya et al., 1993; Nagaya and Jameson, 1993b; Jameson, 1994), porém a base para o requerimento de um excesso de receptores mutados e sua relevância

para SRHT não é clara. É possível que sinais clínicos da SRHT, como por exemplo elevados níveis de hormônio tireoideano, são indicadores mais sensíveis da inibição do receptor do que nossos ensaios *ex vivo* de expressão gênica, devido a natureza artificial desses experimentos (Chatterjee et al., 1991). Efeito similar foi observado com o G345R (1:5), com uma redução de 57% da inibição transcricional do TSH (figuras 19a e 19b). Porém, este mutante quando co-transfectado isoladamente, na ausência do hormônio, não aumentou a atividade transcricional do promotor do TSH-LUC, como o que ocorreu com F451X, pelo contrário, até diminuiu para valores de $55,28 \pm 5,7\%$ em relação ao TR α_1 nativo, o que já foi demonstrado por outros autores (Nagaya et al., 1993; Nagaya e Jameson, 1993b; Jameson et al., 1994; Tagami e Jameson, 1998). A explicação para esta ocorrência ainda não é clara, uma vez que já foi demonstrado que o G345R também interage com NCoR independente de T₃ (Tagami and Jameson, 1998). Porém, o estudo de interação do mutante com NCoR foi realizado em um elemento responsivo positivo, DR-4. Talvez, a interação do G345R com o co-repressor seja diferenciada nos elementos negativos devido às mudanças conformacionais que o TR e proteínas acessórias assumem nesses promotores. Para confirmar esta hipótese seria interessante realizar ensaios *in vitro* de interação proteína-proteína (G345R-NCoR ou SMRT) com sítios de ligação ao DNA do promotor do TSH.

Por outro lado, a dominância negativa não foi observada no promotor do TRH (figuras 20 e 21) nem no sítio AP-1 (figuras 22 e 23), mesmo quando a concentração dos mutantes, F451X e G345R, foi 10 vezes maior que TR nativo (vide figuras 29 à 32). Já foram relatadas duas mutações encontradas na SRHT (R429Q e R383H) (Flynn et al., 1994; Clifton-Bligh et al., 1998) que exerceram ação dominante negativa sobre TR nativo no promotor do TRH. Intrigantemente, estas mutações não influenciavam negativamente o TR nativo nos elementos responsivos positivos. Entretanto, o mutante R383H, na presença de doses elevadas de T₃, também não apresentou dominância negativa no TRH (Clifton-Bligh et al., 1998). Outros estudos também relataram que a atividade inibitória de receptores mutados, que possuem afinidade reduzida de ligação ao T₃, é eliminada em altas concentrações do hormônio (Chatterjee et al., 1991; Meier et al., 1992; Nagaya et al., 1993; Safer et al., 1997). A partir de então decidimos realizar os mesmos experimentos de transfecção, porém, variando a concentração de hormônio (curvas dose-resposta), com o

objetivo de avaliar se em doses menores de T_3 os mutantes F451X e G345R conseguiriam apresentar a dominância negativa como a que foi vista no TSH e no F2.

Ao contrário do que foi observado em F2, em que a atividade dominante negativa é facilmente visualizada (figura 24), a resposta às variações de T_3 foi muito similar entre o TR nativo sozinho e co-transfectado com F451X ou G345R, tanto no promotor do TRH como no sítio AP-1 (figuras 25 a 28). A hipótese inicial seria de que como utilizamos doses fixas de T_3 ($10^{-6}M$) seria possível que a co-transfecção dos mutantes com TR nativo apresentasse uma mesma eficácia, calculada pela resposta máxima, porém menos potente, avaliada pelo IC₅₀, que corresponde à dose de T_3 em que observamos a metade da inibição máxima. Nossos resultados mostraram que tanto a eficácia como a potência foi semelhante entre o TR nativo sozinho e co-transfectado com os mutantes da SRHT. Esses dados sugerem que, diferente do que foi relatado na literatura com o mutante R383H (Clifton-Bligh et al., 1998), a ação negativa dos nossos mutantes (F451X e G345R) sobre TR nativo não ocorre no gene do TRH nem da colagenase em seu sítio AP-1, mesmo em baixas concentrações de hormônio.

Algumas hipóteses têm surgido para explicar o comportamento diferenciado do F451X e G345R no TRH e AP-1. Apesar dos mutantes F451X e G345R estarem relacionados com a resistência generalizada, vale ressaltar que a atividade dominante negativa dos mutantes relacionados com a resistência hipofisária nos elementos responsivos negativos podem ser dependentes da isoforma TR \hat{a}_2 . Os mutantes da resistência hipofisária (R429Q, R338W e R338L) na isoforma TR \hat{a}_1 apresentaram uma fraca dominância negativa no promotor do TRH e TSH \hat{a} , mesmo com excesso de 10x do mutante em relação ao TR nativo, mas tiveram uma forte atividade dominante negativa quando expressos na isoforma TR \hat{a}_2 nos mesmos promotores (Safer et al., 1997). Dessa forma a síndrome causada por essas mutações é limitada aos tecidos que expressam esta isoforma, pituitária anterior e hipotálamo. Os mutantes da resistência generalizada tiveram atividade dominante negativa similar em ambas isoformas do TR \hat{a} (Safer et al., 1997; Wan et al., 2005).

Além disso, camundongos transgênicos com deleção da isoforma TR \hat{a}_2 (knock-out) apresentaram uma redução na ativação transcrricional do TSH na ausência de T_3 e uma menor capacidade do T_3 em suprimir a síntese de TSH (Abel et al., 1999). É interessante

observar que esses animais apresentam uma incapacidade total em suprimir a expressão de TRH na presença de T_3 (Abel et al., 2001). Esses resultados sugerem que a regulação do TSH pode envolver também as outras duas isoformas do TR (TR \hat{a}_1 e \hat{a}_1) além do TR \hat{a}_2 , mas a regulação do TRH exige, necessariamente, a presença do TR \hat{a}_2 .

Como a regulação do TSH pode ser feita pelas três isoformas, mas a transcrição do TRH é realizada exclusivamente pelo TR \hat{a}_2 (Abel et al., 2001), uma das hipóteses para explicar o porquê de não visualizarmos a dominância negativa no TRH, pode ser devido ao fato de que as mutações utilizadas encontravam-se na isoforma TR \hat{a}_1 e não no \hat{a}_2 . Porém, alguns trabalhos demonstraram que em experimentos de transfecção heteróloga o TR \hat{a}_1 pode funcionar igual ou melhor que TR \hat{a}_2 no controle do TRH (Hollenberg et al., 1996; Lezoualc'h et al., 1992). Além disso, somam-se os nossos dados da transfecção do TR \hat{a}_1 nativo, que obteve uma taxa de repressão de $48,10 \pm 4,87\%$ (figura 20b), demonstrando, assim, que TR \hat{a}_1 consegue reprimir a transcrição do TRH e que a influência das diferentes isoformas na regulação negativa ainda é controversa.

Outro fato que pode ser observado é a questão da dimerização entre receptores nos elementos responsivos negativos. Como já foi citado anteriormente, o promotor do TRH possui três sítios de interação com o TR (sítios 4, 5 e 6). Nos sítios 5 e 6 o TR se liga via monômeros e não forma heterodímeros com o RXR. O aumento da quantidade de RXR, demonstrado em ensaios *in vitro* de gel-shift, diminui a formação de monômeros, provavelmente pela formação de heterodímeros em solução (Hollenberg et al., 1995a). No sítio 4, o TR pode se ligar como monômero e também como heterodímero com RXR (TR-RXR) (Guissouma et al., 2002; Satoh et al., 1996), sendo que a ligação como heterodímero não é influenciada pela presença ou ausência de T_3 em ensaios de ligação proteína-DNA (gel mobility shift assay – EMSA). Alguns autores relatam que o TR pode se ligar também como homodímeros (Satoh et al., 1999; Shibusawa et al., 2003b). Estudos transcricionais realizados com mutações no sítio 4 mostraram a perda de todas as formas de ligação do TR além da diminuição significativa dos níveis de expressão de TRH na ausência do hormônio, bem como uma deficiência na regulação dependente de T_3 do gene do TRH de rato (Guissouma et al., 2002). Já foi demonstrado que o sítio 4 forma uma repetição direta, espaçada por 11 nucleotídeos, com um outro potencial “half-site”, mais adiante, localizado entre as bases -43 e -38. Assim, é possível que ocorra uma interação do TR via homodímeros e heterodímeros (Satoh et al., 1999), visto que mutações nesta região do

promotor diminuíram drasticamente essas duas formas de interação (Hollenberg et al., 1995a).

Além disso, o RXR α quando co-transfectado com TR α , na presença do sítio 4 intacto, aumenta o percentual de repressão induzido pelo T₃ (Hollenberg et al., 1995a; Laflamme et al., 2002). Esse aumento da regulação negativa não foi observado quando utilizaram um RXR com uma mutação na região que interage com o DNA (Hollenberg et al., 1995a). Porém, a importância da ligação do RXR ao DNA na repressão não foi comprovada em outro estudo quando, utilizando-se de um receptor quimérico que continha o domínio C-terminal do RXR com o DBD do GAL4, observaram que a construção RXR α -GAL produziu um aumento da repressão semelhante ao RXR α nativo em TRH, TSH α e TSH β . Considerando que o DBD do GAL4 é incapaz de reconhecer o nTRE, esses resultados sugerem que o domínio C-terminal do RXR é suficiente para mediar a regulação negativa e que ele funciona sem a formação de um heterodímero clássico no nTRE (Laflamme et al., 2002). A co-transfecção de RXR β também aumentou a ativação na ausência do ligante (Takeda et al., 1997).

O promotor da collagenase possui o sítio AP-1, que é composto de uma seqüência consenso palindrômica: 5'-TGA G/C TCA-3', regulado negativamente pelo T₃ (Angel et al., 1987; Lee et al., 1987). A interferência do TR com a atividade do AP-1 não é mediada pela ligação direta dos receptores ao DNA e sim por uma interação proteína-proteína dos receptores com os fatores de transcrição *c-jun* ou *c-fos* (Zhang et al., 1991). Nenhum estudo foi realizado com o objetivo de observar se ocorre a formação de homodímeros ou heterodímeros com RXR neste sítio.

Para avaliar a importância da dimerização nesses promotores, tanto do TRH como da collagenase em seu sítio AP-1, utilizamos a mutação L422R, que altera somente as propriedades de dimerização do TR.

É interessante observar que o mutante L422R, na presença de T₃, apresentou uma taxa de repressão transcricional semelhante ao TR nativo no promotor do TRH (74%) e AP-1 (78%) (figura 38). Como o L422R interfere na formação de homodímeros e heterodímeros simultaneamente, a ligação via monômeros de TR parece ser a forma oligomérica preferida nesses promotores. Já foi demonstrado que, nos elementos responsivos positivos, a dimerização do TR mutado com o TR nativo ou com o RXR é

importante para que ocorra o efeito dominante negativo, pois esse fenômeno é abolido quando a mutação L422R, que interfere na dimerização, é inserida nos mutantes da SRHT (F451X ou G345R) (Velasco, 2005). Como a interferência do TR mutado com o TR nativo não ocorreu no TRH e AP-1, nossos dados sugerem que a ligação via monômeros de TR parece ser incapaz de induzir a dominância negativa. Porém, não excluímos a probabilidade do mutante L422R ainda se dimerizar com o TR nativo ou com o RXR, pois é possível que o receptor utilize outra superfície de dimerização, já que o TR pode adotar uma conformação diferente nesses elementos responsivos negativos. Para eliminar esta possibilidade seria interessante realizar ensaios de interação proteína-DNA *in vitro* com o mutante L422R, juntamente com o TR nativo e RXR, em TRH e AP-1 e assim, observar as formas de ligação do receptor nesses promotores.

Também desenvolvemos o mesmo estudo no promotor do TSH. Observamos que o L422R apresentou uma taxa de repressão transcricional significativamente inferior na regulação do TSH, 11% em relação ao TR nativo (figura 35), diferente do que foi observado em AP-1 e TRH. É importante destacar que o provável sítio de interação do TR com o DNA no promotor do TSHá funciona como um palíndromo parcialmente degenerado (figura 39). Interessante é que no TREpal, que é um elemento responsivo palindrômico (figura 02), porém regulado positivamente pelo T₃, o L422R funciona até melhor que o TR nativo (Velasco, 2005). Estudos de interação proteína-DNA *in vitro* demonstraram que o L422R abole a heterodimerização com RXR no TREpal (Ribeiro et al., 2001). Esses dados sugerem que no palíndromo positivo a dimerização não desenvolve um papel essencial na função do TR e que a ativação da transcrição pode ser por monômeros não ligados (Velasco, 2005). Porém, nossos resultados, ao contrário do TREpal, indicam que a dimerização é importante na regulação do promotor do TSHá.

De posse desses resultados, decidimos adicionar o L422R ao mutante F451X (L422R/F451X) e ao G345R (L422R/G345R). Na concentração de 1:1 e 1:5, verificamos que os duplo-mutantes corrigiram o forte efeito dominante negativo exercido pelo F451X e G345R na repressão do TSHá (figuras 36 e 37). Da mesma forma, em um outro estudo, a co-transfecção de RXR aumentou o efeito dominante negativo do R316H (mutante encontrado na resistência hipofisária) no TSHá (Takeda et al., 1997). Porém, na concentração de 1:10, os duplo-mutantes não conseguiram corrigir, apenas atenuaram o efeito dominante negativo. Isto pode ser explicado pelo fato de que, mesmo tendo pouca

afinidade pelo TR nativo, o excesso de duplo mutante (L422R/F451X e L422R/G345R) co-transfectado acaba favorecendo sua dimerização com o TR nativo propiciando o aparecimento da dominância negativa. Nossos resultados sugerem que a dimerização está envolvida na dominância negativa do TR mutado quando este regula a transcrição do promotor do TSH. Porém, ainda não está totalmente elucidado se a homo ou heterodimerização é a forma mais ativa na repressão deste promotor.

Apesar do TR se ligar preferencialmente ao DNA como monômeros e homodímeros, estudos transcricionais já demonstraram, que o RXR α quando co-transfectado com TR α_1 e α_1 aumenta a ativação independente do ligante do gene do TSH. O mesmo não ocorre com a isoforma TR α_2 (Safer et al., 1997; Laflamme et al., 2002;). Porém, alguns autores contradizem este achado afirmando que o RXR não apresenta nenhum efeito na regulação negativa do TSH (Takeda et al., 1997; Shibusawa et al., 2003a;) ou ainda que o RXR α antagoniza tanto a ativação como a repressão, na ausência ou presença de T $_3$, respectivamente, de maneira dependente do ligante do RXR (ácido 9-cis retinóico) (Cohen et al., 1995). Entretanto, esses experimentos foram realizados em células JEG-3 que já expressam um alto nível de RXR endógeno. Em contrapartida, a isoforma RXR β atrapalha a repressão do TSH α mediada pelo T $_3$ (Hallenbeck et al., 1993; Carr and Wong, 1994; Haugen et al., 1997). A co-transfecção de RXR α_1 , que é restrito ao lobo anterior da pituitária, aumentou a repressão do TSH α na presença de T $_3$ e ácido 9-cis retinóico, simultaneamente (Haugen et al., 1997). Este mesmo estudo demonstrou que o ácido 9-cis retinóico possui um efeito supressor sobre o TSH α dependente da isoforma RXR α_1 . Laflamme L demonstrou que o domínio carboxi-terminal do RXR é essencial e suficiente para exercer sua ação sobre o TR e que a ligação do RXR ao DNA não é requerida. Assim, ele sugere um novo modelo de ação em que o RXR atua mais como um co-regulador do que como um parceiro para heterodimerização com o TR (Laflamme et al., 2002). Este modelo é consistente com a configuração conhecida do nTRE do TSH.

Em nossos estudos não co-transfectamos o RXR, porém utilizamos células U937 que contém RXR endógeno e assim é provável que tenha ocorrido a heterodimerização. Se a mutação L422R abolir a dimerização com RXR no TSH α da mesma forma como o ocorrido em TRE β al (Ribeiro et al., 2001), podemos concluir que realmente a interação do TR com RXR é essencial para que o T $_3$ regule a expressão do TSH. Para confirmar esta

hipótese é necessário realizar estudos que avaliem a interação do mutante L422R, juntamente com o TR nativo e RXR no promotor do TSH.

Além disso, quando estudamos as mutações da SRHT no sítio AP-1, reiteramos a importância da ligação direta do TR mutado ao DNA para que ocorra a atividade dominante negativa (Velasco, 2005). Esta hipótese é reforçada pelo fato de que o TR nativo interage com o sítio AP-1 por meio das oncoproteínas c-Jun e c-Fos e assim não se liga diretamente ao DNA. Por isso não conseguimos visualizar a dominância negativa no sítio AP-1. Coletivamente, esses resultados sugerem que o efeito dominante negativo imposto pelo TR mutado varia de acordo com o promotor que é regulado negativamente por TR e que a forma monomérica não parece exercer a dominância negativa.

SUMÁRIO

1. Os mutantes F451X e G345R da Síndrome de Resistência aos Hormônios Tireoideanos não exerceram a atividade dominante negativa no promotor do TRH nem da colagenase em seu sítio AP-1;

2. O efeito dominante negativo foi efetivo no promotor do TSH e a dimerização está diretamente envolvida neste processo.

3. No promotor do TRH e no sítio AP-1, a ligação via monômeros de TR parece ser a forma oligomérica preferida e incapaz de induzir a dominância negativa ou o TR utiliza outra superfície de interação além do aminoácido leucina 422.

4. A ligação direta do TR ao DNA é importante para que ocorra o efeito dominante negativo do F451X e do G345R.

CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o promotor onde o TR está atuando pode modular a forma oligomérica preferencial que, por sua vez, estará agindo, seja como monômeros (TRH e AP-1), ou como homo ou heterodímeros (TSH). Além disso, o efeito dominante negativo irá ocorrer se a forma de ligação do TR no DNA for sob a forma de homo ou heterodímero. Na forma de monômeros não observamos o efeito dominante negativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, E.D., Ahima, R.S., Boers, M.E., Elmquist, J.K. and Wondisford, F.E. (2001) **Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons.** *J Clin Invest*, 107, 1017-1023.
- Abel, E.D., Boers, M.E., Pazos-Moura, C., Moura, E., Kaulbach, H., Zakaria, M., Lowell, B., Radovick, S., Liberman, M.C. and Wondisford, F. (1999) **Divergent roles for thyroid hormone receptor beta isoforms in the endocrine axis and auditory system.** *J Clin Invest*, 104, 291-300.
- Adams, M., Matthews, C., Collingwood, T.N., Tone, Y., Beck-Peccoz, P. and Chatterjee, K.K. (1994) **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*, 94, 506-515.
- Ando, S., Nakamura, H., Sasaki, S., Nishiyama, K., Kitahara, A., Nagasawa, S., Mikami, T., Natsume, H., Genma, R. and Yoshimi, T. (1996) **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*, 151, 293-300.
- Angel, P., Allegretto, E.A., Okino, S.T., Hattori, K., Boyle, W.J., Hunter, T. and Karin, M. (1988) **Oncogene jun encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1.** *Nature*, 332, 166-171.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, C., Herrlich, P. and Karin, M. (1987) **Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor.** *Cell*, 49, 729-739.
- Angel, P. and Karin, M. (1991) **The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation.** *Biochim Biophys Acta*, 1072, 129-157.
- Apriletti, J.W., Ribeiro, R.C.J., Wagner, R.L., Feng, W., Webb, P., Kushner, P.J., West, B.L., Nilsson, S., Scanlan, T.S., Fletterick, R.J. and Baxter, J.D. (1998) **Molecular and Structural Biology of Thyroid Hormone Receptors.** *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 25.
- Aranda, A. and Pascual, A. (2001) **Nuclear hormone receptors and gene expression.** *Physiol Rev*, 81, 1269-1304.

- Au-Fliegner, M., Helmer, E., Casanova, J., Raaka, B.M. and Samuels, H.H. (1993) The conserved ninth C-terminal heptad in thyroid hormone and retinoic acid receptors mediates diverse responses by affecting heterodimer but not homodimer formation. *Mol Cell Biol*, 13, 5725-5737.
- Balkan, W., Tavianini, M.A., Gkonos, P.J. and Roos, B.A. (1998) Expression of rat thyrotropin-releasing hormone (TRH) gene in TRH-producing tissues of transgenic mice requires sequences located in exon 1. *Endocrinology*, 139, 252-259.
- Baniahmad, A., Steiner, C., Kohne, A.C. and Renkawitz, R. (1990) Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell*, 61, 505-514.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T. (1996) The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, 384, 641-643.
- Barra, G.B., Velasco, L.F., Pessanha, R.P., Campos, A.M., Moura, F.N., Dias, S.M., Polikarpov, I., Ribeiro, R.C., Simeoni, L.A. and Neves, F.A. (2004) [Molecular mechanism of thyroid hormone action]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 48, 25-39.
- Beato, M. (1991) Transcriptional control by nuclear receptors. *Faseb J*, 5, 2044-2051.
- Beck-Peccoz, P. and Chatterjee, V.K. (1994) The variable clinical phenotype in thyroid hormone resistance syndrome. *Thyroid*, 4, 225-232.
- Becker, N., Seugnet, I., Guissouma, H., Dupre, S.M. and Demeneix, B.A. (2001) Nuclear corepressor and silencing mediator of retinoic and thyroid hormone receptors corepressor expression is incompatible with T(3)-dependent TRH regulation. *Endocrinology*, 142, 5321-5331.
- Berghagen, H., Ragnhildstveit, E., Krogsrud, K., Thuestad, G., Apriletti, J. and Saatcioglu, F. (2002) Corepressor SMRT functions as a coactivator for thyroid hormone receptor T3Ralpha from a negative hormone response element. *J Biol Chem*, 277, 49517-49522.
- Bodenner, D.L., Mroczynski, M.A., Weintraub, B.D., Radovick, S. and Wondisford, F.E. (1991) A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene. *J Biol Chem*, 266, 21666-21673.
- Bohmann, D., Bos, T.J., Admon, A., Nishimura, T., Vogt, P.K. and Tjian, R. (1987) Human proto-oncogene c-jun encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science*, 238, 1386-1392.

- Bourguet, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995) Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature*, 375, 377-382.
- Bradley, D.J., Towle, H.C. and Young, W.S. (1994) Alpha and beta thyroid hormone receptor (TR) gene expression during auditory neurogenesis: evidence for TR isoform-specific transcriptional regulation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 439-443.
- Brent, G.A. (1994) The molecular basis of thyroid hormone action. *N Engl J Med*, 331, 847-853.
- Brent, G.A., Harney, J.W., Chen, Y., Warne, R.L., Moore, D.D. and Larsen, P.R. (1989) Mutations of the rat growth hormone promoter which increase and decrease response to thyroid hormone define a consensus thyroid hormone response element. *Mol Endocrinol*, 3, 1996-2004.
- Brucker-Davis, F.e.a. (1995) Genetic and clinical features of 42 kindreds with resistance to thyroid hormone. *The National Institutes of Health prospective study*, 123, 572-583.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.A. and Carlquist, M. (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389, 753-758.
- Burnside, J., Darling, D.S., Carr, F.E. and Chin, W.W. (1989) Thyroid hormone regulation of the rat glycoprotein hormone alpha-subunit gene promoter activity. *J Biol Chem*, 264, 6886-6891.
- Caelles, C., Gonzalez-Sancho, J.M. and Munoz, A. (1997) Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes Dev*, 11, 3351-3364.
- Carr, F.E., Burnside, J. and Chin, W.W. (1989) Thyroid hormones regulate rat thyrotropin beta gene promoter activity expressed in GH3 cells. *Mol Endocrinol*, 3, 709-716.
- Carr, F.E., Kaseem, L.L. and Wong, N.C. (1992) Thyroid hormone inhibits thyrotropin gene expression via a position-independent negative L-triiodothyronine-responsive element. *J Biol Chem*, 267, 18689-18694.
- Carr, F.E. and Wong, N.C. (1994) Characteristics of a negative thyroid hormone response element. *J Biol Chem*, 269, 4175-4179.

- Carvalho, G.A. and Ramos, H.E. (2004) Thyroid hormone resistance syndrome. *Arg Bras Endocrinol Metabol*, 48, 83-92.
- Chatterjee, V.K. (1997) Resistance to thyroid hormone. *Horm Res*, 48, 43-46.
- Chatterjee, V.K., Lee, J.K., Rentoumis, A. and Jameson, J.L. (1989) Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 9114-9118.
- Chatterjee, V.K., Nagaya, T., Madison, L.D., Datta, S., Rentoumis, A. and Jameson, J.L. (1991) Thyroid hormone resistance syndrome. Inhibition of normal receptor function by mutant thyroid hormone receptors. *J.Clin.Invest.*, 87, 1977-1984.
- Chen, J.D. and Evans, R.M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, 377, 454-457.
- Cheng, S.Y. (2005) Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance. *Trends Endocrinol Metab*, 16, 176-182.
- Cheung, E., Acevedo, M.L., Cole, P.A. and Kraus, W.L. (2005) Altered pharmacology and distinct coactivator usage for estrogen receptor-dependent transcription through activating protein-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 559-564.
- Chin, W.W., Carr, F.E., Burnside, J. and Darling, D.S. (1993) Thyroid hormone regulation of thyrotropin gene expression. *Recent Prog Horm Res*, 48, 393-414.
- 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. (1998) A Novel TR β Mutation (R383H) in Resistance to Thyroid Hormone Syndrome Predominantly Impairs Corepressor Release and Negative Transcriptional Regulation. *Molecular Endocrinology*, 12, 609-621.
- Cohen, O., Flynn, T.R. and Wondisford, F.E. (1995) Ligand-dependent antagonism by retinoid X receptors of inhibitory thyroid hormone response elements. *J Biol Chem*, 270, 13899-13905.
- Collingwood, T.N., Adams, M., Tone, Y. and Chatterjee, V.K. (1994) Spectrum of transcriptional, dimerization, and dominant negative properties of twenty different mutant thyroid hormone beta-receptors in thyroid hormone resistance syndrome. *Mol Endocrinol*, 8, 1262-1277.
- Committee, N. (1999) A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily [letter]. *Cell*, 97, 161-163.

- Cook, C.B., Kakucska, I., Lechan, R.M. and Koenig, R.J. (1992) Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus. *Endocrinology*, 130, 1077-1079.
- Darling, D.S., Beebe, J.S., Burnside, J., Winslow, E.R. and Chin, W.W. (1991) 3,5,3'-triiodothyronine (T3) receptor-auxiliary protein (TRAP) binds DNA and forms heterodimers with the T3 receptor. *Mol Endocrinol*, 5, 73-84.
- 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.
- Evans, R.M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240, 889-895.
- Feng, W., Ribeiro, R.C.J., Wagner, R.L., Nguyen, H., Apriletti, J.W., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., Kushner, P.J. and West, B.L. (1998) Hormone-Dependent Coactivator Binding to a Hydrophobic Cleft on Nuclear Receptors. *Science*, 280, 1747-1749.
- Feng, X., Jiang, Y., Meltzer, P. and Yen, P.M. (2000) Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Mol Endocrinol*, 14, 947-955.
- Flamant, F. and Samarut, J. (2003) Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab*, 14, 85-90.
- Flug, F., Copp, R.P., Casanova, J., Horowitz, Z.D., Janocko, L., Plotnick, M. and Samuels, H.H. (1987) cis-acting elements of the rat growth hormone gene which mediate basal and regulated expression by thyroid hormone. *J Biol Chem*, 262, 6373-6382.
- Flynn, T.R., Hollenberg, A.N., Cohen, O., Menke, J.B., Usala, S.J., Tollin, S., Hegarty, M.K. and Wondisford, F.E. (1994) A novel C-terminal domain in the thyroid hormone receptor selectively mediates thyroid hormone inhibition. *J Biol Chem*, 269, 32713-32716.
- Fondell, J.D., Brunel, F., Hisatake, K. and Roeder, R.G. (1996) Unliganded thyroid hormone receptor alpha can target TATA-binding protein for transcriptional repression. *Mol Cell Biol*, 16, 281-287.
- Fondell, J.D., Roy, A.L. and Roeder, R.G. (1993) Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression. *Genes Dev*, 7, 1400-1410.

- Forman, B.M., Umesono, K., Chen, J. and Evans, R.M. (1995) Unique response pathways are established by allosteric interactions among nuclear hormone receptors. *Cell*, 81, 541-550.
- Glass, C.K. (1994) Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev*, 15, 391-407.
- Glass, C.K., Franco, R., Weinberger, C., Albert, V.R., Evans, R.M. and Rosenfeld, M.G. (1987) A c-erb-A binding site in rat growth hormone gene mediates trans-activation by thyroid hormone. *Nature*, 329, 738-741.
- Glass, C.K., Holloway, J.M., Devary, O.V. and Rosenfeld, M.G. (1988) The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. *Cell*, 54, 313-323.
- Glass, C.K., Rose, D.W. and Rosenfeld, M.G. (1997) Nuclear receptor coactivators. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 222-232.
- Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (2000) The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev*, 14, 121-141.
- Greenspan, F.S. (1994) The thyroid gland. In Greenspan, F.S. and Baxter, J.D. (eds.), *Basic & Clinical Endocrinology*. Appleton & Lange, Norwalk, Vol. 1, pp. 160-226.
- Greenspan, F.S. (1997) The thyroid gland in *Basic & Clinical Endocrinology*, F.S. Greenspan and G.J. Stewler, Editors. 1997, Appleton & Lange: Stamford, CT., cap 7, p. 192-262.
- Gudas, L.J. (1994) Retinoids and vertebrate development. *J Biol Chem*, 269, 15399-15402.
- Guissouma, H., Dupre, S.M., Becker, N., Jeannin, E., Seugnet, I., Desvergne, B. and Demeneix, B.A. (2002) Feedback on hypothalamic TRH transcription is dependent on thyroid hormone receptor N terminus. *Mol Endocrinol*, 16, 1652-1666.
- Guissouma, H., Ghorbel, M.T., Seugnet, I., Ouatas, T. and Demeneix, B.A. (1998) Physiological regulation of hypothalamic TRH transcription in vivo is T3 receptor isoform specific. *Faseb J*, 12, 1755-1764.
- Hallenbeck, P.L., Phyllaier, M. and Nikodem, V.M. (1993) Divergent effects of 9-cis-retinoic acid receptor on positive and negative thyroid hormone receptor-dependent gene expression. *J Biol Chem*, 268, 3825-3828.
- Haugen, B.R., Brown, N.S., Wood, W.M., Gordon, D.F. and Ridgway, E.C. (1997) The thyrotrope-restricted isoform of the retinoid-X receptor-gamma1 mediates 9-cis-

- retinoic acid suppression of thyrotropin-beta promoter activity. *Mol Endocrinol*, 11, 481-489.
- Hayashi, Y., Xie, J., Weiss, R.E., Pohlenz, J. and Refetoff, S. (1998) 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*, 245, 204-210.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387, 733-736.
- Hennemann, G., Docter, R., Friesema, E.C., de Jong, M., Krenning, E.P. and Visser, T.J. (2001) Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev*, 22, 451-476.
- Herschman, H.R. (1991) Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem*, 60, 281-319.
- Hill, C.S. and Treisman, R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*, 80, 199-211.
- Hirst, M.A., Hinck, L., Danielsen, M. and Ringold, G.M. (1992) Discrimination of DNA response elements for thyroid hormone and estrogen is dependent on dimerization of receptor DNA binding domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 89, 5527-5531.
- Hodin, R.A., Lazar, M.A., Wintman, B.I., Darling, D.S., Koenig, R.J., Larsen, P.R., Moore, D.D. and Chin, W.W. (1989) Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science*, 244, 76-79.
- Hollenberg, A.N., Monden, T., Flynn, T.R., Boers, M.E., Cohen, O. and Wondisford, F.E. (1995a) The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Mol Endocrinol*, 9, 540-550.
- Hollenberg, A.N., Monden, T., Madura, J.P., Lee, K. and Wondisford, F.E. (1996) Function of nuclear co-repressor protein on thyroid hormone response elements is regulated by the receptor A/B domain. *J Biol Chem*, 271, 28516-28520.
- Hollenberg, A.N., Monden, T. and Wondisford, F.E. (1995b) Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *J Biol Chem*, 270, 14274-14280.

- Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamel, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, 377, 397-404.
- Hu, X. and Lazar, M.A. (2000) Transcriptional repression by nuclear hormone receptors. *Trends Endocrinol Metab*, 11, 6-10.
- Izumo, S. and Mahdavi, V. (1988) Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature*, 334, 539-542.
- Jameson, J.L. (1994) Mechanisms by which thyroid hormone receptor mutations cause clinical syndromes of resistance to thyroid hormone. *Thyroid*, 4, 485-492.
- Jonat, C., Rahmsdorf, H.J., Park, K.K., Cato, A.C., Gebel, S., Ponta, H. and Herrlich, P. (1990) Antitumor promotion and antiinflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell*, 62, 1189-1204.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1996) A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, 85, 403-414.
- Kim, S.W., Ho, S.C., Hong, S.J., Kim, K.M., So, E.C., Christoffolete, M. and Harney, J.W. (2005) A novel mechanism of thyroid hormone-dependent negative regulation by thyroid hormone receptor, nuclear receptor corepressor (NCoR), and GAGA-binding factor on the rat cD44 promoter. *J Biol Chem*, 280, 14545-14555.
- Kim, S.W., Hong, S.J., Kim, K.M., Ho, S.C., So, E.C., Harney, J.W. and Larsen, P.R. (2004) A novel cell type-specific mechanism for thyroid hormone-dependent negative regulation of the human type 1 deiodinase gene. *Mol Endocrinol*, 18, 2924-2936.
- Kitajima, K., Nagaya, T. and Jameson, J.L. (1995) Dominant negative and DNA-binding properties of mutant thyroid hormone receptors that are defective in homodimerization but not heterodimerization. *Thyroid*, 5, 343-353.
- Kliwer, S., Leehmann, J.M. and Willson, T.M. (1999) Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse. *Science*, 284, 757-760.

- Kliwer, S.A., Umesono, K., Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M. (1992) **Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling.** *Nature*, 355, 446-449.
- Koenig, R.J., Brent, G.A., Warne, R.L., Larsen, P.R. and Moore, D.D. (1987) **Thyroid hormone receptor binds to a site in the rat growth hormone promoter required for induction by thyroid hormone.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 5670-5674.
- 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. (1987) **Deletion of a DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer.** *Nature*, 330, 578-581.
- Kurokawa, R., DiRenzo, J., Boehm, M., Sugarman, J., Gloss, B., Rosenfeld, M.G., Heyman, R.A. and Glass, C.K. (1994) **Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding.** *Nature*, 371, 528-531.
- Kurokawa, R., Yu, V.C., Naar, A., Kyakumoto, S., Han, Z., Silverman, S., Rosenfeld, M.G. and Glass, C.K. (1993) **Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers.** *Genes Dev*, 7, 1423-1435.
- Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L., Scanlan, T.S., Shiau, A.K., Uht, R.M. and Webb, P. (2000) **Estrogen receptor pathways to AP-1.** *J Steroid Biochem Mol Biol*, 74, 311-317.
- Lado-Abeal, J., Dumitrescu, A.M., Liao, X.H., Cohen, R.N., Pohlenz, J., Weiss, R.E., Lebrethon, M.C., Verloes, A. and Refetoff, S. (2005) **A de novo mutation in an already mutant nucleotide of the thyroid hormone receptor beta gene perpetuates resistance to thyroid hormone.** *J Clin Endocrinol Metab*, 90, 1760-1767.
- Laflamme, L., Hamann, G., Messier, N., Maltais, S. and Langlois, M.F. (2002) **RXR acts as a coregulator in the regulation of genes of the hypothalamo-pituitary axis by thyroid hormone receptors.** *J Mol Endocrinol*, 29, 61-72.
- Lan, K., R., C.G. and Chin, W.W. (2000) **thyroid hormone receptor-binding protein, an LXXLL motif-containing protein, functions as a general coactivator.** *PNAS*, 97, 6212-6217.
- Langlois, M.F., Zanger, K., Monden, T., Safer, J.D., Hollenberg, A.N. and Wondisford, F.E. (1997) **A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-**

- terminal domain important for ligand-independent activation. *J Biol Chem*, 272, 24927-24933.
- Lazar, M.A. (1993) Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr.Rev.*, 14, 184-193.
- Lazar, M.A. (2003) Thyroid hormone action: a binding contract. *J Clin Invest*, 112, 497-499.
- Leblanc, B.P. and Stunnenberg, H.G. (1995) 9-cis retinoic acid signaling: changing partners causes some excitement. *Genes Dev*, 9, 1811-1816.
- Lechan, R.M., Qi, Y., Jackson, I.M. and Mahdavi, V. (1994) Identification of thyroid hormone receptor isoforms in thyrotropin-releasing hormone neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 135, 92-100.
- Lee, W., Mitchell, P. and Tjian, R. (1987) Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell*, 49, 741-752.
- Leng, X., Blanco, J., Tsai, S.Y., Ozato, K., O'Malley, B.W. and Tsai, M.J. (1994) Mechanisms for synergistic activation of thyroid hormone receptor and retinoid X receptor on different response elements. *J Biol Chem*, 269, 31436-31442.
- Lezoualc'h, F., Hassan, A.H., Giraud, P., Loeffler, J.P., Lee, S.L. and Demeneix, B.A. (1992) Assignment of the beta-thyroid hormone receptor to 3,5,3'-triiodothyronine-dependent inhibition of transcription from the thyrotropin-releasing hormone promoter in chick hypothalamic neurons. *Mol Endocrinol*, 6, 1797-1804.
- Li, D., Desai-Yajnik, V., Lo, E., Schapira, M., Abagyan, R. and Samuels, H.H. (1999) NRIF3 is a novel coactivator mediating functional specificity of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol*, 19, 7191-7202.
- Lin, K.H., Zhu, X.G., Hsu, H.C., Chen, S.L., Shieh, H.Y., Chen, S.T., McPhie, P. and Cheng, S.Y. (1997) Dominant negative activity of mutant thyroid hormone alpha1 receptors from patients with hepatocellular carcinoma. *Endocrinology*, 138, 5308-5315.
- Loinder, K. and Soderstrom, M. (2005) An LXXLL motif in nuclear receptor corepressor mediates ligand-induced repression of the thyroid stimulating hormone-beta gene. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 97, 322-327.
- Lopez, G., Schaufele, F., Webb, P., Holloway, J.M., Baxter, J.D. and Kushner, P.J. (1993) Positive and negative modulation of Jun action by thyroid hormone receptor at a unique AP1 site. *Mol Cell Biol*, 13, 3042-3049.

- Makowski, A., Brzostek, S., Cohen, R.N. and Hollenberg, A.N. (2003) **Determination of nuclear receptor corepressor interactions with the thyroid hormone receptor.** *Mol Endocrinol*, 17, 273-286.
- Mangelsdorf, D.J., Borgmeyer, U., Heyman, R.A., Zhou, J.Y., Ong, E.S., Oro, A.E., Kakizuka, A. and Evans, R.M. (1992) **Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid.** *Genes Dev*, 6, 329-344.
- Mangelsdorf, D.J. and Evans, R.M. (1995) **The RXR heterodimers and orphan receptors.** *Cell*, 83, 841-850.
- Mangelsdorf, D.J., Ong, E.S., Dyck, J.A. and Evans, R.M. (1990a) **Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway.** *Nature*, 345, 224-229.
- Mangelsdorf, D.J., Ong, E.S., Dyck, J.A. and Evans, R.M. (1990b) **Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway.** *Nature*, 345, 224-229.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R.M. (1995) **The nuclear receptor superfamily: the second decade.** *Cell*, 83, 835-839.
- Marimuthu, A., Feng, W., Tagami, T., Nguyen, H., Jameson, J.L., Fletterick, R.J., Baxter, J.D. and West, B.L. (2002) **TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor.** *Mol Endocrinol*, 16, 271-286.
- Matsushita, A., Misawa, H., Andoh, S., Natsume, H., Nishiyama, K., Sasaki, S. and Nakamura, H. (2000) **Very strong correlation between dominant negative activities of mutant thyroid hormone receptors and their binding avidity for corepressor SMRT.** *J Endocrinol*, 167, 493-503.
- McInerney, E.M., Rose, D.W., Flynn, S.E., Westin, S., Mullen, T.M., Krones, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R.T., Assa-Munt, N., Milburn, M.V., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1998) **Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation.** *Genes Dev*, 12, 3357-3368.
- McKenna, n.J., Lanz, R.B. and O'Malley, B.W. (1999) **Nuclear receptor coregulators: Cellular and Molecular Biology.** *The Endocrine Society*, 20, 321-344.
- McKenna, N.J. and O'Malley, B.W. (2002) **Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators.** *Cell*, 108, 465-474.
- Meier, C.A., Dickstein, B.M., Ashizawa, K., McClaskey, J.H., Muchmore, P., Ransom, S.C., Menke, J.B., Hao, E.H., Usala, S.J., Bercu, B.B. and al, e. (1992) **Variable transcriptional activity and ligand binding of mutant beta 1 3,5,3'-**

- triiodothyronine receptors from four families with generalized resistance to thyroid hormone. *Mol.Endocrinol.*, 6, 248-258.
- Miyoshi, Y., Nakamura, H., Sasaki, S., Tagami, T., Misaki, T., Konishi, J. and Nakao, K. (1995) 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*, 114, 9-17.
- Naar, A.M., Boutin, J.M., Lipkin, S.M., Yu, V.C., Holloway, J.M., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1991) The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell*, 65, 1267-1279.
- Nagaya, T., Eberhardt, N.L. and Jameson, J.L. (1993) Thyroid hormone resistance syndrome: correlation of dominant negative activity and location of mutations. *J Clin Endocrinol Metab*, 77, 982-990.
- Nagaya, T. and Jameson, J.L. (1993a) Distinct dimerization domains provide antagonist pathways for thyroid hormone receptor action. *J Biol Chem*, 268, 24278-24282.
- 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*, 268, 15766-15771.
- Nagy, L., Kao, H.Y., Love, J.D., Li, C., Banayo, E., Gooch, J.T., Krishna, V., Chatterjee, K., Evans, R.M. and Schwabe, J.W. (1999) Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors. *Genes Dev*, 13, 3209-3216.
- Ng, L., Forrest, D., Haugen, B.R., Wood, W.M. and Curran, T. (1995) N-terminal variants of thyroid hormone receptor beta: differential function and potential contribution to syndrome of resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol*, 9, 1202-1213.
- Nicholson, R.C., Mader, S., Nagpal, S., Leid, M., Rochette-Egly, C. and Chambon, P. (1990) Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP1 binding site. *Embo J*, 9, 4443-4454.
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K. and Milburn, M.V. (1998) Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*, 395, 137-143.

- Nomura, Y., Nagaya, T., Tsukaguchi, H., Takamatsu, J. and Seo, H. (1996) Amino acid substitutions of thyroid hormone receptor-beta at codon 435 with resistance to thyroid hormone selectively alter homodimer formation. *Endocrinology*, 137, 4082-4086.
- Oberste-Berghaus, C., Zanger, K., Hashimoto, K., Cohen, R.N., Hollenberg, A.N. and Wondisford, F.E. (2000) Thyroid hormone-independent interaction between the thyroid hormone receptor beta2 amino terminus and coactivators. *J Biol Chem*, 275, 1787-1792.
- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H. and Nakatani, Y. (1996) The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87, 953-959.
- Ono, S., Schwartz, I.D., Mueller, O.T., Root, A.W., Usala, S.J. and Bercu, B.B. (1991) Homozygosity for a dominant negative thyroid hormone receptor gene responsible for generalized resistance to thyroid hormone. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 73, 990-994.
- Ortiga-Carvalho, T.M., Shibusawa, N., Nikrodhanond, A., Oliveira, K.J., Machado, D.S., Liao, X.H., Cohen, R.N., Refetoff, S. and Wondisford, F.E. (2005) Negative regulation by thyroid hormone receptor requires an intact coactivator-binding surface. *J Clin Invest*, 115, 2517-2523.
- Perez, P., Palomino, T., Schonthal, A. and Aranda, A. (1994) Determination of the promoter elements that mediate repression of c-fos gene transcription by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 205, 135-140.
- Perez, P., Schonthal, A. and Aranda, A. (1993) Repression of c-fos gene expression by thyroid hormone and retinoic acid receptors. *J Biol Chem*, 268, 23538-23543.
- Perissi, V., Staszewski, L.M., McInerney, E.M., Kurokawa, R., Krones, A., Rose, D.W., Lambert, M.H., Milburn, M.V., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1999) Molecular determinants of nuclear receptor-corepressor interaction. *Genes Dev*, 13, 3198-3208.
- Perlmann, T., Umesono, K., Rangarajan, P.N., Forman, B.M. and Evans, R.M. (1996) Two distinct dimerization interfaces differentially modulate target gene specificity of nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol*, 10, 958-966.

- Petty, K.J., Desvergne, B., Mitsuhashi, T. and Nikodem, V.M. (1990) Identification of a thyroid hormone response element in the malic enzyme gene. *J Biol Chem*, 265, 7395-7400.
- Phillips, S.A., Rotman-Pikielny, P., Lazar, J., Ando, S., Hauser, P., Skarulis, M.C., Brucker-Davis, F. and Yen, P.M. (2001) Extreme thyroid hormone resistance in a patient with a novel truncated TR mutant. *J Clin Endocrinol Metab*, 86, 5142-5147.
- Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R.M. and Sigler, P.B. (1995) Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature*, 375, 203-211.
- Refetoff, S. (1982) Syndromes of thyroid hormone resistance. *Am J Physiol*, 243, E88-98.
- Refetoff, S., Dewind, L.T. and DeGroot, L.J. (1967) Familial syndrome combining deaf-mutism, stippled epiphyses, goiter and abnormally high PBI: possible target organ refractoriness to thyroid hormone. *J Clin Endocrinol Metab*, 27, 279-294.
- Refetoff, S., Weiss, R.E. and Usala, S.J. (1993) The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocr.Rev.*, 14, 348-399.
- Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H. and Moras, D. (1995) Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, 378, 681-689.
- Ribeiro, R.C., Apriletti, J.W., Wagner, R.L., Feng, W., Kushner, P.J., Nilsson, S., Scanlan, T.S., West, B.L., Fletterick, R.J. and Baxter, J.D. (1998a) X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65, 133-141.
- Ribeiro, R.C.J., Apriletti, J.W., Wagner, R.L., West, B.L., Feng, W., Huber, R., Kushner, P.J., Nilsson, S., Scanlan, T.S., Fletterick, R.J., Schaufele, F. and Baxter, J.D. (1998b) Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. *Recent Prog Horm Res*, 53, 351-394.
- Ribeiro, R.C.J., Apriletti, J.W., West, B.L., Wagner, R.L., Fletterick, R.J., Schaufele, F. and Baxter, J.D. (1995) The molecular biology of thyroid hormone action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 758, 366-389.
- Ribeiro, R.C.J., Feng, W., Wagner, R.L., Cláudia H.R. M. Costa, Alexandre C. Oereira, James W. Apriletti, Fletterick, R.J. and Baxter, J.D. (2001) Definition of the surface in the Thyroid Hormone Receptor ligand binding domain for

- association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. *JBC Journal of Biological Chemistry*, 276, 14987-14995.
- Rindt, H., Knotts, S. and Robbins, J. (1995) Segregation of cardiac and skeletal muscle-specific regulatory elements of the beta-myosin heavy chain gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 1540-1544.
- Safer, J.D., Cohen, R.N., Hollenberg, A.N. and Wondisford, F.E. (1998) Defective release of corepressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone. *J Biol Chem*, 273, 30175-30182.
- Safer, J.D., Langlois, M.F., Cohen, R., Monden, T., John-Hope, D., Madura, J., Hollenberg, A.N. and Wondisford, F.E. (1997) Isoform variable action among thyroid hormone receptor mutants provides insight into pituitary resistance to thyroid hormone. *Mol Endocrinol*, 11, 16-26.
- Sakurai, A., Miyamoto, T., Refetoff, S. and DeGroot, L.J. (1990) Dominant negative transcriptional regulation by a mutant thyroid hormone receptor-beta in a family with generalized resistance to thyroid hormone. *Mol. Endocrinol.*, 4, 1988-1994.
- Sakurai, A., Takeda, K., Ain, K., Ceccarelli, P., Nakai, A., Seino, S., Bell, G.I., Refetoff, S. and DeGroot, L.J. (1989) 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. U.S.A.*, 86, 8977-8981.
- Sasaki, S., Lesoon-Wood, L.A., Dey, A., Kuwata, T., Weintraub, B.D., Humphrey, G., Yang, W.M., Seto, E., Yen, P.M., Howard, B.H. and Ozato, K. (1999) Ligand-induced recruitment of a histone deacetylase in the negative-feedback regulation of the thyrotropin beta gene. *Embo J*, 18, 5389-5398.
- Satoh, T., Monden, T., Ishizuka, T., Mitsuhashi, T., Yamada, M. and Mori, M. (1999) DNA binding and interaction with the nuclear receptor corepressor of thyroid hormone receptor are required for ligand-independent stimulation of the mouse preprothyrotropin-releasing hormone gene. *Mol Cell Endocrinol*, 154, 137-149.
- Satoh, T., Yamada, M., Iwasaki, T. and Mori, M. (1996) Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors. *J Biol Chem*, 271, 27919-27926.

- Schmidt, E.D., Cramer, S.J. and Offringa, R. (1993) The thyroid hormone receptor interferes with transcriptional activation via the AP-1 complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 192, 151-160.
- Schwartz, H.L., Lazar, M.A. and Oppenheimer, J.H. (1994) Widespread distribution of immunoreactive thyroid hormone beta 2 receptor (TR beta 2) in the nuclei of extrapituitary rat tissues. *J Biol Chem*, 269, 24777-24782.
- Shibusawa, N., Hashimoto, K., Nikrodhanond, A.A., Liberman, M.C., Applebury, M.L., Liao, X.H., Robbins, J.T., Refetoff, S., Cohen, R.N. and Wondisford, F.E. (2003a) Thyroid hormone action in the absence of thyroid hormone receptor DNA-binding in vivo. *J Clin Invest*, 112, 588-597.
- Shibusawa, N., Hollenberg, A.N. and Wondisford, F.E. (2003b) Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. *J Biol Chem*, 278, 732-738.
- Shupnik, M.A. (2000) Thyroid hormone suppression of pituitary hormone gene expression. *Rev Endocr Metab Disord*, 1, 35-42.
- Shupnik, M.A., Ardisson, L.J., Meskell, M.J., Bornstein, J. and Ridgway, E.C. (1986) Triiodothyronine (T3) regulation of thyrotropin subunit gene transcription is proportional to T3 nuclear receptor occupancy. *Endocrinology*, 118, 367-371.
- Shupnik, M.A., Ridgway, E.C. and Chin, W.W. (1989) Molecular biology of thyrotropin. *Endocr Rev*, 10, 459-475.
- Sjoberg, M., Vennstrom, B. and Forrest, D. (1992) Thyroid hormone receptors in chick retinal development: differential expression of mRNAs for alpha and N-terminal variant beta receptors. *Development*, 114, 39-47.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1997) Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 389, 194-198.
- Tagami, T., Gu, W.X., Peairs, P.T., West, B.L. and Jameson, J.L. (1998) A novel natural mutation in the thyroid hormone receptor defines a dual functional domain that exchanges nuclear receptor corepressors and coactivators. *Mol Endocrinol*, 12, 1888-1902.
- Tagami, T. and Jameson, J.L. (1998) Nuclear corepressors enhance the dominant negative activity of mutant receptors that cause resistance to thyroid hormone. *Endocrinology*, 139, 640-650.

- Tagami, T., Madison, L.D., Nagaya, T. and Jameson, J.L. (1997) Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Mol Cell Biol*, 17, 2642-2648.
- Tagami, T., Park, Y. and Jameson, J.L. (1999) Mechanisms that mediate negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by the thyroid hormone receptor. *J Biol Chem*, 274, 22345-22353.
- Takeda, K., Sakurai, A., DeGroot, L.J. and Refetoff, S. (1992) 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.*, 74, 49-55.
- Takeda, T., Nagasawa, T., Miyamoto, T., Hashizume, K. and DeGroot, L.J. (1997) The function of retinoid X receptors on negative thyroid hormone response elements. *Mol Cell Endocrinol*, 128, 85-96.
- Thompson, K.L., Santon, J.B., Shephard, L.B., Walton, G.M. and Gill, G.N. (1992) A nuclear protein is required for thyroid hormone receptor binding to an inhibitory half-site in the epidermal growth factor receptor promoter. *Mol Endocrinol*, 6, 627-635.
- Tsika, R.W., Bahl, J.J., Leinwand, L.A. and Morkin, E. (1990) Thyroid hormone regulates expression of a transfected human alpha-myosin heavy-chain fusion gene in fetal rat heart cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 379-383.
- Umesono, K. and Evans, R.M. (1989) Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell*, 57, 1139-1146.
- Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C. and Evans, R.M. (1991) Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. *Cell*, 65, 1255-1266.
- Velasco, L.F.R. (2005) Estudo funcional das formas oligoméricas dos receptores de hormônios tireoideanos β_1 e a importância da dimerização e ligação ao DNA na Síndrome de Resistência aos Hormônios Tireoideanos. *Patologia Molecular*. Universidade de Brasília, Brasília, Vol. Doutorado.
- Wagner, R.L., Apriletti, J.W., McGrath, M.E., West, B.L., Baxter, J.D. and Fletterick, R.J. (1995) A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*, 378, 690-697.

- Wan, W., Farboud, B. and Privalsky, M.L. (2005) Pituitary resistance to thyroid hormone syndrome is associated with T3 receptor mutants that selectively impair beta2 isoform function. *Mol Endocrinol*, 19, 1529-1542.
- Warnmark, A., Treuter, E., Wright, A.P. and Gustafsson, J.A. (2003) Activation functions 1 and 2 of nuclear receptors: molecular strategies for transcriptional activation. *Mol Endocrinol*, 17, 1901-1909.
- Weinberger, C., Thompson, C.C., Ong, E.S., Lebo, R., Gruol, D.J. and Evans, R.J. (1986) The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, 324, 641-646.
- Weiss, R.E., Tunca, H., Knapple, W.L., Faas, F.H. and Refetoff, S. (1997) Phenotype differences of resistance to thyroid hormone in two unrelated families with an identical mutation in the thyroid hormone receptor beta gene (R320C). *Thyroid*, 7, 35-38.
- Weiss, R.E., Weinberg, M. and Refetoff, S. (1993) 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.*, 91, 2408-2415.
- Weiss, R.E., Xu, J., Ning, G., Pohlenz, J., O'Malley, B.W. and Refetoff, S. (1999) Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *Embo J*, 18, 1900-1904.
- Williams, G.R. (2000) Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Mol Cell Biol*, 20, 8329-8342.
- Wondisford, F.E., Farr, E.A., Radovick, S., Steinfeldt, H.J., Moates, J.M., McClaskey, J.H. and Weintraub, B.D. (1989) Thyroid hormone inhibition of human thyrotropin beta-subunit gene expression is mediated by a cis-acting element located in the first exon. *J.Biol.Chem.*, 264, 14601-14604.
- Wood, W.M., Kao, M.Y., Gordon, D.F. and Ridgway, E.C. (1989) Thyroid hormone regulates the mouse thyrotropin beta-subunit gene promoter in transfected primary thyrotropes. *J Biol Chem*, 264, 14840-14847.
- Wu, Y. and Koenig, R.J. (2000) Gene regulation by thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab*, 11, 207-211.

- Wu, Y., Xu, B. and Koenig, R.J. (2001) Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. *J Biol Chem*, 276, 3929-3936.
- Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F.J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1998) Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science*, 279, 1922-1925.
- Yang-Yen, H.F., Chambard, J.C., Sun, Y.L., Smeal, T., Schmidt, T.J., Drouin, J. and Karin, M. (1990) Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell*, 62, 1205-1215.
- Yang, Z., Hong, S.H. and Privalsky, M.L. (1999) Transcriptional anti-repression. Thyroid hormone receptor beta-2 recruits SMRT corepressor but interferes with subsequent assembly of a functional corepressor complex. *J Biol Chem*, 274, 37131-37138.
- Yang, Z. and Privalsky, M.L. (2001) Isoform-specific transcriptional regulation by thyroid hormone receptors: hormone-independent activation operates through a steroid receptor mode of co-activator interaction. *Mol Endocrinol*, 15, 1170-1185.
- Yen, P.M. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*, 81, 1097-1142.
- Yen, P.M. (2003) Molecular basis of resistance to thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab*, 14, 327-333.
- Yen, P.M. and Chin, W.W. (1994) Molecular mechanisms of dominant negative activity by nuclear hormone receptors. *Mol Endocrinol*, 8, 1450-1454.
- Yen, P.M., Wilcox, E.C., Hayashi, Y., Refetoff, S. and Chin, W.W. (1995) Studies on the repression of basal transcription (silencing) by artificial and natural human thyroid hormone receptor-beta mutants. *Endocrinology*, 136, 2845-2851.
- Yu, V.C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J.M., Devary, O.V., Naar, A.M., Kim, S.Y., Boutin, J.M., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1991) RXR beta: a coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell*, 67, 1251-1266.
- Zechel, C., Shen, X.Q., Chambon, P. and Gronemeyer, H. (1994) Dimerization interfaces formed between the DNA binding domains determine the cooperative

binding of RXR/RAR and RXR/TR heterodimers to DR5 and DR4 elements. *EMBO J*, 13, 1414-1424.

Zhang, J. and Lazar, M.A. (2000) The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu Rev Physiol*, 62, 439-466.

Zhang, X.K., Wills, K.N., Husmann, M., Hermann, T. and Pfahl, M. (1991) Novel pathway for thyroid hormone receptor action through interaction with jun and fos oncogene activities. *Mol Cell Biol*, 11, 6016-6025.

Zhang, X.Y., Kaneshige, M., Kamiya, Y., Kaneshige, K., Mcphie, P. and Cheng, S.Y. (2002) Differential Expression of Thyroid Hormone Receptor Isoforms Dictates the Dominant Negative Activity of Mutant Receptor. *Molecular Endocrinology*, 16, 2077-2092.

-

ANEXOS

Tabela 1: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante F451X em F2 [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	Taxa de Ativação	% ativação em relação ao TRâ1wt (1,0ug)
<u>Experimento # 01</u>				
sem TR	214,70	395,90	1,84	17,02
TR [1,0ug]	102,90	1112,60	10,81	100,00
F451X [1,0ug]	82,50	107,70	1,30	12,07
TR [2,0ug]	138,40	1810,40	13,08	120,98
TR + F451X (1:1)	132,70	368,70	2,77	25,69
TR [1,0ug]	175,30	1689,20	9,63	89,12
TR + F451X (1:5)	113,30	182,70	1,61	14,91
<u>Experimento # 02</u>				
sem TR	159,70	266,00	1,66	19,08
TR [1,0ug]	338,60	2947,80	8,70	100,00
F451X [1,0ug]	134,40	225,50	1,67	19,27
TR [2,0ug]	355,90	6112,90	17,17	197,29
TR + F451X (1:1)	350,70	1265,60	3,60	41,45
TR [1,0ug]	551,20	7564,10	13,72	157,63
TR + F451X (1:5)	312,80	728,00	2,32	26,73
<u>Experimento # 03</u>				
sem TR	155,30	227,30	1,46	13,84
TR [1,0ug]	99,70	1051,70	10,55	100,00
F451X [1,0ug]	109,50	154,70	1,41	13,39
TR [2,0ug]	135,10	3106,70	22,99	217,99
TR + F451X (1:1)	134,00	572,90	4,27	40,53
TR [1,0ug]	116,80	2719,40	23,28	220,71
TR + F451X (1:5)	102,90	193,30	1,87	17,80
<u>Experimento # 04</u>				
sem TR	71,10	122,10	1,710	14,67
TR [1,0ug]	87,20	1016,90	11,66	100,00
F451X [1,0ug]	94,10	149,50	1,58	13,62
TR [2,0ug]	89,10	1011,40	11,35	97,33
TR + F451X (1:1)	60,50	200,40	3,31	28,40
TR [1,0ug]	118,40	2650,40	22,38	191,95
TR + F451X (1:5)	86,10	143,50	1,66	14,29

Tabela 2 Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante G345R e, F2 [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	Taxa de Ativação	% ativação em relação ao TRâ1wt (1,0ug)
<u>Experimento # 01</u>				
sem TR	214,70	395,90	1,84	17,02
TR [1,0ug]	102,90	1112,60	10,81	100,00
G345R [1,0ug]	90,40	130,70	1,45	13,37
TR [2,0ug]	138,40	1810,40	13,08	120,98
TR + G345R (1:1)	110,70	969,60	8,76	81,01
TR [1,0ug]	175,30	1689,20	9,64	89,12
TR + G345R (1:5)	89,30	248,50	2,78	25,74
<u>Experimento # 02</u>				
sem TR	126,0	225,2	1,79	9,44
TR [1,0ug]	188,50	3576,20	18,97	100,00
G345R [1,0ug]	125,60	195,10	1,55	8,19
TR [2,0ug]	114,70	1857,20	16,19	85,35
TR + G345R (1:1)	73,30	238,70	3,26	17,16
TR [1,0ug]	72,70	157,90	2,17	11,45
TR + G345R (1:5)	60,00	157,60	2,63	13,85
<u>Experimento # 03</u>				
sem TR	72,50	126,50	1,74	20,74
TR [1,0ug]	81,10	680,80	8,39	100,00
G345R [1,0ug]	89,30	135,10	1,51	18,02
TR [2,0ug]	114,70	990,70	8,64	102,89
TR + G345R (1:1)	92,40	460,10	4,98	59,32
TR [1,0ug]	123,70	960,10	7,76	92,46
TR + G345R (1:5)	100,40	260,80	2,60	30,94
<u>Experimento # 04</u>				
sem TR	60,10	85,20	1,42	23,55
TR [1,0ug]	65,90	397,40	6,03	100,00
G345R [1,0ug]	53,20	65,60	1,23	20,45
TR [2,0ug]	90,80	337,40	3,72	61,62
TR + G345R (1:1)	58,40	218,30	3,74	61,99
TR [1,0ug]	95,10	381,30	4,01	66,49
TR + G345R (1:5)	55,30	88,90	1,61	26,66

Tabela 3: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante F451X em TSH [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt (1,0ug)
<u>Experimento # 01</u>				
sem TR	192,7	157,5	-18,28%	89,35
TR [1,0ug]	326,4	259,6	-20,46%	100,00
F451X [1,0ug]	314,0	288,7	-8,07%	39,44
TR [2,0ug]	510,10	351,85	-31,02%	151,61
TR + F451X (1:1)	518,60	390,90	-24,62%	120,33
TR [6,0ug]	764,1	468,6	-38,67%	189,00
TR + F451X (1:5)	595,30	507,30	-14,78%	72,24
<u>Experimento # 02</u>				
sem TR	170,8	165,60	-3,04%	8,39
TR [1,0ug]	384,90	245,45	-36,23%	100,00
F451X [1,0ug]	340,65	310,40	-8,88%	24,51
TR [2,0ug]	331,0	247,5	-25,23%	69,64
TR + F451X (1:1)	361,85	275,80	-23,78%	65,64
TR [6,0ug]	523,8	303,6	-42,04%	116,04
TR + F451X (1:5)	845,1	751,3	-11,10%	30,64
<u>Experimento # 03</u>				
sem TR	973,6	941,15	-3,33%	9,94
TR [1,0ug]	970,55	645,30	-33,51%	100,00
F451X [1,0ug]	1596,45	1380,2	-13,55%	40,44
TR [2,0ug]	2210,7	1431,4	-35,25%	105,19
TR + F451X (1:1)	2751,65	1941,95	-29,43%	87,82
TR [6,0ug]	2153,1	1498,4	-30,41%	90,75
TR + F451X (1:5)	1941,50	1755,20	-9,60%	28,65
<u>Experimento # 04</u>				
sem TR	382,47	317,73	-16,93%	59,51
TR [1,0ug]	527,27	377,37	-28,45%	100,00
F451X [1,0ug]	527,30	494,63	-6,20%	21,79
TR [2,0ug]	1522,77	778,50	-48,88%	171,81
TR + F451X (1:1)	776,07	509,93	-34,29%	120,53
TR [6,0ug]	1308,43	655,10	-49,93%	175,50
TR + F451X (1:5)	1102,30	867,40	-21,31%	74,90

<u>Experimento # 05</u>				
sem TR	329,90	328,70	-0,36%	1,02
TR [1,0ug]	944,00	609,43	-35,44%	100,00
F451X [1,0ug]	1041,30	899,30	-13,64%	38,49
TR [2,0ug]	815,03	540,07	-33,74%	95,20
TR + F451X (1:1)	1464,05	1127,20	-23,01%	64,93
TR [6,0ug]	1855,57	967,63	-47,85%	135,02
TR + F451X (1:5)	1040,25	1024,00	-1,56%	4,40

Tabela 4: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante G345R em TSH [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt (1,0ug)
<u>Experimento # 01</u>				
sem TR	267,53	247,90	-7,34%	21,96
TR [1,0ug]	643,70	428,50	-33,43%	100,00
G345R [1,0ug]	352,87	283,10	-19,77%	59,14
TR [2,0ug]	1117,70	593,97	-46,86%	140,17
TR + G345R (1:1)	656,50	430,23	-34,47%	103,11
TR [6,0ug]	1919,23	749,17	-60,97%	182,38
TR + G345R (1:5)	815,33	412,10	-49,46%	147,95
<u>Experimento # 02</u>				
sem TR	343,17	273,60	-20,27%	52,90
TR [1,0ug]	587,30	362,23	-38,32%	100,00
G345R [1,0ug]	392,47	311,10	-20,73%	54,10
TR [2,0ug]	976,93	453,17	-53,61%	139,90
TR + G345R (1:1)	767,70	386,50	-49,65%	129,57
TR [6,0ug]	655,30	622,50	-5,01%	13,07
TR + G345R (1:5)	1623,47	660,57	-59,31%	154,78
<u>Experimento # 03</u>				
sem TR	961,47	900,50	-6,34%	15,16
TR [1,0ug]	1760,10	1023,93	-41,83%	100,00
G345R [1,0ug]	675,03	557,17	-17,46%	41,74
TR [2,0ug]	776,23	459,70	-40,78%	97,49
TR + G345R (1:1)	403,17	264,43	-34,41%	82,26
TR [6,0ug]	1377,40	707,03	-48,67%	116,35
TR + G345R (1:5)	905,90	652,77	-27,94%	66,79
<u>Experimento # 04</u>				
sem TR	884,2	767,2	-13%	31,43
TR [1,0ug]	2267,4	1329,7	-41,36%	100,00
G345R [1,0ug]	989,2	796,1	-19,52%	47,20
TR [2,0ug]	1647,5	999,3	-39,35%	95,14
TR + G345R (1:1)	1910,2	1179,3	-38,26%	92,50
TR [6,0ug]	3320,6	1777,9	-46,46%	112,33
TR + G345R (1:5)	2748,6	2348,5	-14,56%	35,20

<u>Experimento # 05</u>				
sem TR	1101,53	868,00	-21,20%	36,04
TR [1,0ug]	1891,23	778,80	-58,82%	100,00
G345R [1,0ug]	943,10	777,47	-17,56%	29,85
TR [2,0ug]	1522,77	778,50	-48,88%	83,10
TR + G345R (1:1)	1817,63	1035,75	-43,02%	73,14
TR [6,0ug]	3320,63	1777,93	-46,46%	78,99
TR + G345R (1:5)	3555,40	2646,80	-25,56%	43,45
<u>Experimento # 06</u>				
sem TR	884,17	767,17	-13,23%	31,99
TR [1,0ug]	2267,43	1329,73	-41,36%	100,00
G345R [1,0ug]	1020,00	967,30	-5,17%	12,50
TR [2,0ug]	1647,47	999,27	-39,35%	95,14
TR + G345R (1:1)	1910,17	1179,27	-38,26%	92,50
TR [6,0ug]	3320,63	1777,93	-46,46%	112,33
TR + G345R (1:5)	2748,60	2348,50	-14,56%	35,20
<u>Experimento # 07</u>				
sem TR	248,23	198,90	-19,87%	75,21
TR [1,0ug]	360,03	264,90	-26,42%	100,00
G345R [1,0ug]	319,97	312,00	-2,49%	9,42
TR [2,0ug]	318,50	242,10	-23,99%	90,80
TR + G345R (1:1)	400,60	310,30	-22,54%	85,31
TR [6,0ug]	610,97	378,33	-38,08%	144,13
TR + G345R (1:5)	344,60	311,30	-9,66%	36,56
<u>Experimento # 08</u>				
sem TR	216,50	200,23	-7,51%	19,22
TR [1,0ug]	599,70	365,40	-39,07%	100,00
G345R [1,0ug]	329,03	297,57	-9,56%	24,47
TR [2,0ug]	679,90	446,40	-34,34%	87,89
TR + G345R (1:1)	621,73	425,00	-31,64%	80,98
TR [6,0ug]	994,57	565,73	-43,12%	110,37
TR + G345R (1:5)	822,40	737,10	-10,37%	26,54

Tabela 5: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante F451X em TRH [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt (1,0ug)
<u>Experimento # 01</u>				
sem TR	768,67	632,37	-17,73%	26,17
TR [2,0ug]	2711,33	874,40	-67,75%	100,00
F451X [2,0ug]	2262,23	1682,83	-25,61%	37,80
TR [4,0ug]	3364,40	868,53	-74,18%	109,49
TR + F451X (1:1)	3464,00	857,47	-75,25%	111,07
TR [12,0ug]	11381,03	1260,53	-88,92%	131,25
TR + F451X (1:5)	8326,73	1924,87	-76,88%	113,48
<u>Experimento # 02</u>				
sem TR				0,00
TR [2,0ug]	878,90	501,97	-42,89%	100,00
F451X [2,0ug]	1268,47	1152,43	-9,15%	21,33
TR [4,0ug]	1419,67	565,70	-60,15%	140,24
TR + F451X (1:1)	2278,07	967,07	-57,55%	134,18
TR [12,0ug]	5113,10	1184,07	-76,84%	179,16
TR + F451X (1:5)	4358,00	1603,37	-63,21%	147,38
<u>Experimento # 03</u>				
sem TR				0,00
TR [2,0ug]	2164,40	1192,57	-44,90%	100,00
F451X [2,0ug]	2208,33	2348,07	0,0%	0,00
TR [4,0ug]	2953,67	1851,10	-37,33%	83,14
TR + F451X (1:1)	1724,83	915,50	-46,92%	104,50
TR [12,0ug]	3210,10	1206,33	-62,42%	139,02
TR + F451X (1:5)	3184,83	1231,93	-61,32%	136,57
<u>Experimento # 04</u>				
sem TR				0,00
TR [2,0ug]	1880,67	689,43	-63,34%	100,00
F451X [2,0ug]	1547,73	983,40	-36,46%	57,56
TR [4,0ug]	2359,17	904,43	-61,66%	97,35
TR + F451X (1:1)	2226,60	863,47	-61,22%	96,65
TR [12,0ug]	7792,23	1406,07	-81,96%	129,40
TR + F451X (1:5)	3929,70	1444,50	-63,24%	99,84

<u>Experimento # 05</u>				
sem TR	549,43	528,90	-3,74%	16,45
TR [2,0ug]	3851,30	2975,67	-22,74%	100,00
F451X [2,0ug]	2138,73	1785,50	-16,52%	72,65
TR [4,0ug]	2622,53	1033,80	-60,58%	266,40
TR + F451X (1:1)	2304,90	1076,50	-53,30%	234,39
TR [12,0ug]	3904,57	1244,87	-68,12%	299,56
TR + F451X (1:5)	5390,83	1844,83	-65,78%	289,27
<u>Experimento # 06</u>				
sem TR	864,57	643,57	-25,56%	66,77
TR [2,0ug]	2869,40	1770,97	-38,28%	100,00
F451X [2,0ug]	1644,80	1279,27	-22,22%	58,05
TR [4,0ug]	5058,57	2836,37	-43,93%	114,76
TR + F451X (1:1)	3919,13	2366,93	-39,61%	103,47
TR [12,0ug]	2631,00	740,67	-71,85%	187,70
TR + F451X (1:5)	2194,20	1071,40	-51,17%	133,67
<u>Experimento # 07</u>				
sem TR	429,5	295,9	-31,00%	74,68
TR [1,0ug]	582,4	340,6	-41,51%	100,00
F451X [1,0ug]	878,55	775,50	-11,73%	28,26
TR [2,0ug]	691,6	327,0	-52,71%	126,98
TR + F451X (1:1)	764,5	392,9	-48,61%	117,10
TR [6,0ug]	1415,4	498,6	-64,77%	156,03
TR + F451X (1:5)	2114,5	1102,9	-47,84%	115,25
<u>Experimento # 08</u>				
sem TR	213,5	201,7	-5,00%	10,64
TR [1,0ug]	931,7	493,8	-47,00%	100,00
F451X [1,0ug]	1069,15	945,70	-11,55%	24,57
TR [2,0ug]	2231,9	810,6	-63,68%	135,49
TR + F451X (1:1)	2793,1	1266,4	-54,66%	116,30
TR [6,0ug]	1484,5	619,7	-58,26%	123,96
TR + F451X (1:5)	2836,10	1663,05	-41,36%	88,00
<u>Experimento # 09</u>				
sem TR	260,3	232,1	-11,00%	17,04
TR [1,0ug]	778,1	275,8	-64,55%	100,00
F451X [1,0ug]	878,55	775,50	-11,73%	18,17
TR [2,0ug]	1724,4	947,8	-45,04%	69,78
TR + F451X (1:1)	2266,1	1372,5	-39,43%	61,08
TR [6,0ug]	2754,4	1267,9	-53,97%	83,61
TR + F451X (1:5)	3516,20	2231,50	-36,54%	56,61

Tabela 6: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante G345R em TRH [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt (1,0ug)
<u>Experimento # 01</u>				
sem TR				0,00
TR [2,0ug]	1025,07	407,57	-60,24%	100,00
G345R [2,0 ug]	667,43	437,57	-34,44%	57,17
TR [4,0ug]	1295,27	399,43	-69,16%	114,81
TR + G345R (1:1)	875,60	308,43	-64,77%	107,52
TR [12,0ug]	2835,40	473,57	-83,30%	138,28
TR + G345R (1:5)	1636,77	445,30	-72,79%	120,83
<u>Experimento # 02</u>				
sem TR				0,00
TR [2,0ug]	1448,10	398,73	-72,47%	100,00
G345R [2,0 ug]	1283,97	908,03	-29,28%	40,40
TR [4,0ug]	6342,27	3434,97	-45,84%	63,25
TR + G345R (1:1)	1095,13	433,03	-60,46%	83,43
TR [12,0ug]	4900,67	1315,83	-73,15%	100,94
TR + G345R (1:5)	1127,13	361,40	-67,94%	93,75
<u>Experimento # 03</u>				
sem TR	549,43	528,90	-3,74%	16,45
TR [2,0ug]	3851,30	2975,67	-22,74%	100,00
G345R [2,0 ug]	1007,87	1084,73	7,62%	-33,51
TR [4,0ug]	2622,53	1033,80	-60,58%	266,40
TR + G345R (1:1)	1887,13	854,77	-54,71%	240,59
TR [12,0ug]	3904,57	1244,87	-68,12%	299,56
TR + G345R (1:5)	2384,50	933,90	-60,83%	267,50
<u>Experimento # 04</u>				
sem TR	864,57	643,57	-25,56%	66,77
TR [2,0ug]	2869,40	1770,97	-38,28%	100,00
G345R [2,0 ug]	1557,97	1278,07	-17,97%	46,94
TR [4,0ug]	5058,57	2836,37	-43,93%	114,76
TR + G345R (1:1)	2832,40	1545,07	-45,45%	118,73
TR [12,0ug]	2631,00	740,67	-71,85%	187,70
TR + G345R (1:5)	1289,00	541,17	-58,02%	151,57

<u>Experimento # 05</u>				
sem TR	4367,5	4018,7	-8,00%	26,24
TR [2,0ug]	4433,9	3082,2	-30,49%	100,00
G345R [2,0 ug]	4656,30	4361,10	-6,34%	20,79
TR [4,0ug]	10444,4	7509,50	-28,10%	92,16
TR + G345R (1:1)	9682,65	7204,5	-25,59%	83,93
TR [12,0ug]	23037,4	15115,7	-34,39%	112,79
TR + G345R (1:5)	14776,50	10990,2	-25,62%	84,03
<u>Experimento # 06</u>				
sem TR	205,2	206,3	0,52%	-1,34
TR [2,0ug]	456,5	279,5	-38,77%	100,00
G345R [2,0 ug]	352,90	327,1	-7,31%	18,85
TR [4,0ug]	606,8	468,8	-22,74%	58,65
TR + G345R (1:1)	845,55	678,0	-19,82%	51,12
TR [12,0ug]	1585,4	1088,5	-31,35%	80,86
TR + G345R (1:5)	1088,3	801,7	-26,33%	67,91
<u>Experimento # 07</u>				
sem TR	205,6	161,2	-22,00%	65,46
TR [2,0ug]	312,2	207,2	-33,61%	100,00
G345R [2,0 ug]	366,05	337,70	-7,74%	23,03
TR [4,0ug]	634,90	360,0	-43,30%	128,83
TR + G345R (1:1)	574,70	334,75	-41,75%	124,22
TR [12,0ug]	1292,6	709,0	-45,15%	134,34
TR + G345R (1:5)	1751,5	1113,40	-36,43%	108,39

Tabela 7: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante F451X em AP-1 [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt (1,0ug)
<u>Experimento # 01</u>				
sem TR	270,17	260,43	-3,60%	7,50
TR [1,0ug]	644,37	334,87	-48,03%	100,00
F451X [1,0 ug]	841,95	783,90	-6,89%	14,35
TR [2,0ug]	1971,40	774,77	-60,70%	126,38
TR + F451X (1:1)	1002,40	430,77	-57,03%	118,74
TR [6,0ug]	2001,90	892,63	-55,41%	115,37
TR + F451X (1:5)	2648,30	1404,73	-46,96%	97,77
<u>Experimento # 02</u>				
sem TR	493,10	475,30	-3,61%	5,89
TR [1,0ug]	797,20	308,23	-61,34%	100,00
F451X [1,0 ug]	707,30	703,30	-0,57%	0,93
TR [2,0ug]	676,95	382,75	-43,46%	70,85
TR + F451X (1:1)	1596,90	696,63	-56,38%	91,91
TR [6,0ug]	2521,93	1066,57	-57,71%	94,08
TR + F451X (1:5)	1343,17	702,50	-47,70%	77,76
<u>Experimento # 03</u>				
sem TR	177,73	157,50	-11,38%	24,95
TR [1,0ug]	2442,13	1328,23	-45,61%	100,00
F451X [1,0 ug]	362,77	353,30	-2,61%	5,72
TR [2,0ug]	650,00	388,53	-40,23%	88,20
TR + F451X (1:1)	996,17	581,30	-41,65%	91,32
TR [6,0ug]	2564,17	1302,90	-49,19%	107,85
TR + F451X (1:5)	2898,73	1906,20	-34,24%	75,07
<u>Experimento # 04</u>				
sem TR	172,13	167,60	-2,63%	6,09
TR [1,0ug]	280,30	159,33	-43,16%	100,00
F451X [1,0 ug]	230,27	208,27	-9,55%	22,13
TR [2,0ug]	355,40	207,07	-41,74%	96,71
TR + F451X (1:1)	276,53	163,33	-40,94%	94,86
TR [6,0ug]	357,80	198,30	-44,58%	103,29
TR + F451X (1:5)	709,70	455,35	-35,84%	83,04

Tabela 8: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TR β 1 nativo com o mutante G345R em AP-1 [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TR β 1wt (1,0ug)
<u>Experimento # 01</u>				
sem TR	85,87	72,0	-16,15%	40,83
TR [1,0ug]	119,33	72,13	-39,55%	100,00
G345R [1,0 ug]	86,80	85,73	-1,23%	3,11
TR [2,0ug]	146,97	82,27	-44,02%	111,30
TR + G345R (1:1)	102,80	60,53	-41,12%	103,97
TR [6,0ug]	172,93	70,13	-59,44%	150,29
TR + G345R (1:5)	94,13	54,27	-42,35%	107,08
<u>Experimento # 02</u>				
sem TR	68,93	57,87	-16,05%	33,17
TR [1,0ug]	152,13	78,53	-48,38%	100,00
G345R [1,0 ug]	91,07	75,47	-17,13%	35,40
TR [2,0ug]	370,77	119,20	-67,85%	140,24
TR + G345R (1:1)	127,20	71,47	-43,82%	90,57
TR [6,0ug]	499,03	132,27	-73,50%	151,92
TR + G345R (1:5)	97,47	54,27	-44,32%	91,60
<u>Experimento # 03</u>				
sem TR	90,67	89,20	-1,62%	3,42
TR [1,0ug]	237,50	125,10	-47,33%	100,00
G345R [1,0 ug]	132,53	118,53	-10,56%	22,31
TR [2,0ug]	312,53	140,27	-55,12%	116,46
TR + G345R (1:1)	239,87	129,73	-45,91%	96,99
TR [6,0ug]	700,67	222,43	-68,25%	144,20
TR + G345R (1:5)	436,50	206,53	-52,68%	111,30
<u>Experimento # 04</u>				
sem TR	184,00	160,27	-12,90%	31,10
TR [1,0ug]	377,00	220,67	-41,47%	100,00
G345R [1,0ug]	287,40	254,00	-11,62%	28,02
TR [2,0ug]	714,90	302,30	-57,71%	139,16
TR + G345R (1:1)	513,50	290,60	-43,41%	104,67
TR [6,0ug]	1577,73	667,06	-57,72%	139,18
TR + G345R (1:5)	767,70	467,17	-39,15%	94,40

<u>Experimento # 05</u>				
sem TR	546,90	447,17	-18,24%	47,09
TR [1,0ug]	533,97	327,17	-38,73%	100,00
G345R [1,0ug]	287,40	254,00	-11,62%	30,00
TR [2,0ug]	761,43	329,40	-56,74%	146,50
TR + G345R (1:1)	513,50	290,60	-43,41%	112,08
TR [6,0ug]	1363,53	597,03	-56,21%	145,13
TR + G345R (1:5)	1192,40	804,50	-32,53%	83,99
<u>Experimento # 06</u>				
sem TR	270,17	260,43	-3,60%	8,68
TR [1,0ug]	377,00	220,67	-41,47%	100,00
G345R [1,0ug]	215,45	190,00	-11,81%	28,48
TR [2,0ug]	740,00	364,30	-50,77%	122,42
TR + G345R (1:1)	742,13	428,90	-42,21%	101,78
TR [6,0ug]	1577,73	667,06	-57,72%	139,18
TR + G345R (1:5)	736,70	480,80	-34,74%	83,77

Tabela 9: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante F451X em F2 variando a concentração de T₃.

<u>LEITURA DA LUCIFERASE</u>			
T ₃	Experimento #01	Experimento #02	Experimento #03
TRâ1wt (2,0ug)			
0	94,50	118,50	96,40
10 ⁻¹⁰ M	120,60	158,60	112,40
10 ⁻⁹ M	120,60	167,20	159,70
10 ⁻⁸ M	267,30	447,10	274,50
10 ⁻⁷ M	602,00	1240,20	677,70
10 ⁻⁶ M	738,00	1500,50	817,20
F451X (2,0ug)			
0	86,30	71,60	68,90
10 ⁻¹⁰ M	85,50	71,90	62,70
10 ⁻⁹ M	100,40	80,80	70,70
10 ⁻⁸ M	112,20	91,20	84,90
10 ⁻⁷ M	120,80	87,90	87,60
10 ⁻⁶ M	115,10	91,30	96,00
TRâ1wt (1,0ug) + F451X (1,0ug)			
0	96,00	80,40	79,90
10 ⁻¹⁰ M	103,10	82,50	78,00
10 ⁻⁹ M	113,40	89,30	89,10
10 ⁻⁸ M	163,60	130,60	111,70
10 ⁻⁷ M	222,50	180,90	162,90
10 ⁻⁶ M	240,60	198,70	161,70
<u>TAXA DE ATIVAÇÃO</u>			
T ₃	Experimento #01	Experimento #02	Experimento #03
TRâ1wt (2,0ug)			
0	1,00	1,00	1,00
10 ⁻¹⁰ M	1,28	1,34	1,17
10 ⁻⁹ M	1,28	1,41	1,66
10 ⁻⁸ M	2,83	3,77	2,85
10 ⁻⁷ M	6,37	10,47	7,03
10 ⁻⁶ M	7,81	12,66	8,48
F451X (2,0ug)			
0	1,00	1,00	1,00
10 ⁻¹⁰ M	0,99	1,00	0,91
10 ⁻⁹ M	1,16	1,13	1,03
10 ⁻⁸ M	1,30	1,27	1,23
10 ⁻⁷ M	1,40	1,23	1,27
10 ⁻⁶ M	1,33	1,28	1,39

TRâ1wt (1,0ug) + F451X (1,0ug)				
0	1,00	1,00	1,00	1,00
10 ⁻¹⁰ M	1,07	1,03	1,03	0,98
10 ⁻⁹ M	1,18	1,11	1,11	1,12
10 ⁻⁸ M	1,70	1,62	1,62	1,40
10 ⁻⁷ M	2,32	2,25	2,25	2,04
10 ⁻⁶ M	2,51	2,47	2,47	2,02

EC50

TRâ1wt (2,0ug)	3,2200.10 ⁻⁸ M
F451X (2,0ug)	1,6810.10 ⁻⁹ M
TRâ1wt (1,0ug) + F451X (1,0ug)	1,3800.10 ⁻⁸ M

RESPOSTA MÁXIMA (TAXA DE ATIVAÇÃO)

TRâ1wt (2,0ug)	
Média	9,643
Desvio Padrão	2,634
Erro Padrão da Média	1,521
F451X (2,0ug)	
Média	1,330
Desvio Padrão	0,060
Erro Padrão da Média	0,035
TRâ1wt (1,0ug) + F451X (1,0ug)	
Média	2,317
Desvio Padrão	0,259
Erro Padrão da Média	0,150

Tabela 10: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante F451X em TRH variando a concentração de T₃.

<u>LEITURA DA LUCIFERASE</u>			
T ₃	Experimento #01	Experimento #02	Experimento #03
TRâ1wt (2,0ug)			
0	1001,93	3513,47	783,83
10 ⁻¹⁰ M	1106,63	3683,90	618,87
10 ⁻⁹ M	999,20	3624,30	683,63
10 ⁻⁸ M	624,63	3024,60	505,57
10 ⁻⁷ M	452,63	2507,63	440,87
10 ⁻⁶ M	521,70	2432,27	423,67
F451X (2,0ug)			
0	1089,53	1809,73	801,67
10 ⁻¹⁰ M	1131,07	1727,43	756,70
10 ⁻⁹ M	1083,63	1443,77	798,13
10 ⁻⁸ M	1082,60	1391,60	737,63
10 ⁻⁷ M	1049,23	1427,97	755,93
10 ⁻⁶ M	947,33	1443,70	566,83
TRâ1wt (1,0ug) + F451X (1,0ug)			
0	971,33	1953,13	589,87
10 ⁻¹⁰ M	1088,20	2145,43	439,13
10 ⁻⁹ M	873,47	1938,87	551,70
10 ⁻⁸ M	623,97	1599,43	492,23
10 ⁻⁷ M	443,30	1323,80	326,13
10 ⁻⁶ M	439,83	1232,20	297,73
<u>PERCENTUAL DE ATIVAÇÃO</u>			
T ₃	Experimento #01	Experimento #02	Experimento #03
TRâ1wt (2,0ug)			
0	100,00	100,00	100,00
10 ⁻¹⁰ M	110,45	104,85	78,95
10 ⁻⁹ M	99,73	103,15	87,22
10 ⁻⁸ M	62,34	86,09	64,50
10 ⁻⁷ M	45,18	71,37	56,24
10 ⁻⁶ M	52,07	69,23	54,05
F451X (2,0ug)			
0	100,00	100,00	100,00
10 ⁻¹⁰ M	103,81	95,45	94,39
10 ⁻⁹ M	99,46	79,78	99,56
10 ⁻⁸ M	99,36	76,90	92,01
10 ⁻⁷ M	96,30	78,90	94,30
10 ⁻⁶ M	86,95	79,77	70,71

TRâ1wt (1,0ug) + F451X (1,0ug)			
0	100,00	100,00	100,00
10 ⁻¹⁰ M	112,03	109,85	74,45
10 ⁻⁹ M	89,92	99,27	93,53
10 ⁻⁸ M	64,24	81,89	83,45
10 ⁻⁷ M	45,64	67,78	55,29
10 ⁻⁶ M	45,28	63,09	50,47

<u>EC50</u>	
TRâ1wt (2,0ug)	4,6870.10 ⁻⁹ M
F451X (2,0ug)	1,4360.10 ⁻⁹ M
TRâ1wt (1,0ug) + F451X (1,0ug)	5,8890.10 ⁻⁹ M

<u>RESPOSTA MÁXIMA (PERCENTUAL DE REPRESSÃO)</u>	
TRâ1wt (2,0ug)	
Média	41,55
Desvio Padrão	9,388
Erro Padrão da Média	5,420
F451X (2,0ug)	
Média	20,86
Desvio Padrão	8,138
Erro Padrão da Média	4,699
TRâ1wt (1,0ug) + F451X (1,0ug)	
Média	47,05
Desvio Padrão	9,160
Erro Padrão da Média	5,288

Tabela 11: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante G345R em TRH variando a concentração de T₃.

<u>LEITURA DA LUCIFERASE</u>			
T ₃	Experimento #01	Experimento #02	Experimento #03
TRâ1wt (2,0ug)			
0	10323,63	3924,03	8331,17
10 ⁻¹⁰ M	6416,13	3924,77	8442,83
10 ⁻⁹ M	8407,00	3710,83	6549,30
10 ⁻⁸ M	5611,90	2605,77	4500,20
10 ⁻⁷ M	4620,07	2021,23	3704,43
10 ⁻⁶ M	4102,90	2209,53	3540,73
G345R (2,0ug)			
0	6995,60	2564,10	5319,60
10 ⁻¹⁰ M	6469,03	2433,77	4450,73
10 ⁻⁹ M	7696,73	2326,37	4839,83
10 ⁻⁸ M	6237,97	2237,43	4754,57
10 ⁻⁷ M	6059,03	2346,10	4457,50
10 ⁻⁶ M	5144,97	2046,73	4109,40
TRâ1wt (1,0ug) + G345R (1,0ug)			
0	2912,07	1577,87	8649,43
10 ⁻¹⁰ M	2160,23	1544,27	9492,47
10 ⁻⁹ M	2357,57	1484,67	6140,97
10 ⁻⁸ M	1919,00	1103,50	4332,50
10 ⁻⁷ M	1578,13	757,03	4916,57
10 ⁻⁶ M	1438,00	804,07	4272,90
<u>PERCENTUAL DE ATIVAÇÃO</u>			
T ₃	Experimento #01	Experimento #02	Experimento #03
TRâ1wt (2,0ug)			
0	100,00	100,00	100,00
10 ⁻¹⁰ M	62,15	100,02	101,34
10 ⁻⁹ M	81,43	94,57	78,61
10 ⁻⁸ M	54,36	66,41	54,02
10 ⁻⁷ M	44,75	51,51	44,46
10 ⁻⁶ M	39,74	56,31	42,50
G345R (2,0ug)			
0	100,00	100,00	100,00
10 ⁻¹⁰ M	92,47	94,92	83,67
10 ⁻⁹ M	110,02	90,73	90,98
10 ⁻⁸ M	89,17	87,26	89,38
10 ⁻⁷ M	86,61	91,50	83,79
10 ⁻⁶ M	73,55	79,82	77,25

TRâ1wt (1,0ug) + G345R (1,0ug)			
0	100,00	100,00	100,00
10 ⁻¹⁰ M	74,18	97,87	109,75
10 ⁻⁹ M	80,96	94,09	71,00
10 ⁻⁸ M	65,90	69,94	50,09
10 ⁻⁷ M	54,19	47,98	56,84
10 ⁻⁶ M	49,38	50,96	49,40

<u>IC50</u>	
TRâ1wt (2,0ug)	3,4230.10 ⁻⁹ M
G345R (2,0ug)	1,2560.10 ⁻⁷ M
TRâ1wt (1,0ug) + G345R (1,0ug)	2,1380.10 ⁻⁹ M

<u>RESPOSTA MÁXIMA (PERCENTUAL DE REPRESSÃO)</u>	
TRâ1wt (2,0ug)	
Média	53,83
Desvio Padrão	8,887
Erro Padrão da Média	5,131
G345R (2,0ug)	
Média	23,10
Desvio Padrão	3,119
Erro Padrão da Média	1,801
TRâ1wt (1,0ug) + G345R (1,0ug)	
Média	50,07
Desvio Padrão	0,9238
Erro Padrão da Média	0,5333

Tabela 12: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante F451X em AP-1 variando a concentração de T₃.

<u>LEITURA DA LUCIFERASE</u>			
T ₃	Experimento #01	Experimento #02	Experimento #03
TRâ1wt (2,0ug)			
0	568,50	711,47	493,77
10 ⁻¹⁰ M	611,73	705,30	500,90
10 ⁻⁹ M	598,30	720,50	481,57
10 ⁻⁸ M	469,03	616,90	346,30
10 ⁻⁷ M	350,90	405,43	251,60
10 ⁻⁶ M	351,93	315,63	218,93
F451X (2,0ug)			
0	400,90	815,03	347,67
10 ⁻¹⁰ M	406,37	722,37	342,07
10 ⁻⁹ M	401,03	718,50	348,33
10 ⁻⁸ M	391,57	756,37	332,90
10 ⁻⁷ M	370,37	740,10	279,73
10 ⁻⁶ M	378,23	616,27	298,23
TRâ1wt (1,0ug) + F451X (1,0ug)			
0	612,50	603,23	407,97
10 ⁻¹⁰ M	674,13	741,30	393,83
10 ⁻⁹ M	703,40	732,37	421,70
10 ⁻⁸ M	406,50	522,90	246,70
10 ⁻⁷ M	362,10	395,43	247,47
10 ⁻⁶ M	316,43	324,20	234,67
<u>PERCENTUAL DE ATIVAÇÃO</u>			
T ₃	Experimento #01	Experimento #02	Experimento #03
TRâ1wt (2,0ug)			
0	100,00	100,00	100,00
10 ⁻¹⁰ M	107,60	99,13	101,44
10 ⁻⁹ M	105,24	101,27	97,53
10 ⁻⁸ M	82,50	86,71	70,13
10 ⁻⁷ M	61,72	56,99	50,96
10 ⁻⁶ M	61,91	44,36	44,34
F451X (2,0ug)			
0	100,00	100,00	100,00
10 ⁻¹⁰ M	101,36	88,63	98,39
10 ⁻⁹ M	100,03	88,16	100,19
10 ⁻⁸ M	97,67	92,80	95,75
10 ⁻⁷ M	92,38	90,81	80,46
10 ⁻⁶ M	94,35	75,61	85,78

TRâ1wt (1,0ug) + F451X (1,0ug)			
0	100,00	100,00	100,00
10 ⁻¹⁰ M	110,06	122,89	96,54
10 ⁻⁹ M	114,84	121,41	103,37
10 ⁻⁸ M	66,37	86,68	60,47
10 ⁻⁷ M	59,12	65,55	60,66
10 ⁻⁶ M	51,66	53,74	57,52

<u>IC50</u>	
TRâ1wt (2,0ug)	1,4110.10 ⁻⁸ M
F451X (2,0ug)	3,7080.10 ⁻⁸ M
TRâ1wt (1,0ug) + F451X (1,0ug)	1,0350.10 ⁻⁸ M

<u>RESPOSTA MÁXIMA (PERCENTUAL DE REPRESSÃO)</u>	
TRâ1wt (2,0ug)	
Média	49,80
Desvio Padrão	10,13
Erro Padrão da Média	5,850
F451X (2,0ug)	
Média	14,77
Desvio Padrão	9,363
Erro Padrão da Média	5,406
TRâ1wt (1,0ug) + F451X (1,0ug)	
Média	45,70
Desvio Padrão	2,946
Erro Padrão da Média	1,701

Tabela 13: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante G345R em AP-1 variando a concentração de T₃.

<u>LEITURA DA LUCIFERASE</u>			
T ₃	Experimento #01	Experimento #02	Experimento #03
TRâ1wt (2,0ug)			
0	658,63	637,03	575,57
10 ⁻¹⁰ M	628,77	695,47	554,50
10 ⁻⁹ M	623,60	615,43	517,83
10 ⁻⁸ M	397,37	460,90	393,83
10 ⁻⁷ M	300,83	306,33	306,57
10 ⁻⁶ M	258,03	306,47	274,67
G345R (2,0ug)			
0	386,63	424,97	460,10
10 ⁻¹⁰ M	384,23	412,37	464,10
10 ⁻⁹ M	382,77	389,70	397,43
10 ⁻⁸ M	317,30	422,50	440,03
10 ⁻⁷ M	359,17	338,33	400,77
10 ⁻⁶ M	328,87	388,57	375,57
TRâ1wt (1,0ug) + G345R (1,0ug)			
0	360,23	561,03	517,83
10 ⁻¹⁰ M	380,87	567,57	336,20
10 ⁻⁹ M	468,10	494,90	302,09
10 ⁻⁸ M	323,50	363,97	275,29
10 ⁻⁷ M	196,93	235,07	233,44
10 ⁻⁶ M	214,30	266,27	214,74
<u>PERCENTUAL DE ATIVAÇÃO</u>			
T ₃	Experimento #01	Experimento #02	Experimento #03
TRâ1wt (2,0ug)			
0	100,00	100,00	100,00
10 ⁻¹⁰ M	95,47	109,17	96,34
10 ⁻⁹ M	94,68	96,61	89,97
10 ⁻⁸ M	60,33	72,35	68,43
10 ⁻⁷ M	45,68	48,09	53,26
10 ⁻⁶ M	39,18	48,11	47,72
G345R (2,0ug)			
0	100,00	100,00	100,00
10 ⁻¹⁰ M	99,38	97,04	100,87
10 ⁻⁹ M	99,00	91,70	86,38
10 ⁻⁸ M	82,07	99,42	95,64
10 ⁻⁷ M	92,90	79,61	87,10
10 ⁻⁶ M	85,06	91,43	81,63

TRâ1wt (1,0ug) + G345R (1,0ug)			
0	100,00	100,00	100,00
10 ⁻¹⁰ M	105,73	101,16	87,24
10 ⁻⁹ M	129,94	88,21	76,70
10 ⁻⁸ M	89,80	64,87	58,09
10 ⁻⁷ M	54,67	41,90	51,38
10 ⁻⁶ M	59,49	47,46	42,29

<u>IC50</u>	
TRâ1wt (2,0ug)	6,6860.10 ⁻⁹ M
G345R (2,0ug)	8,9610.10 ⁻¹⁰ M
TRâ1wt (1,0ug) + G345R (1,0ug)	6,4480.10 ⁻⁹ M

<u>RESPOSTA MÁXIMA (PERCENTUAL DE REPRESSÃO)</u>	
TRâ1wt (2,0ug)	
Média	55,00
Desvio Padrão	5,027
Erro Padrão da Média	2,902
G345R (2,0ug)	
Média	13,97
Desvio Padrão	4,966
Erro Padrão da Média	2,867
TRâ1wt (1,0ug) + G345R (1,0ug)	
Média	50,23
Desvio Padrão	8,821
Erro Padrão da Média	5,093

Tabela 14 : Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante F451X em TRH [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt
<u>EXPERIMENTO # 01</u>				
sem TR	429,5	295,9	-31,00%	74,68%
TR [1,0ug]	582,4	340,6	-41,51%	100,00%
F451X [1,0ug]	878,55	775,50	-11,73%	28,26%
TR + F451X (1:1)	764,5	392,9	-48,61%	117,10%
TR + F451X (1:5)	2114,5	1102,9	-47,84%	115,25%
TR + F451 X (1:10)	5897,30	4059,90	-31,16%	75,07%
<u>EXPERIMENTO # 02</u>				
sem TR	213,5	201,7	-5,00%	10,64%
TR [1,0ug]	931,7	493,8	-47,00%	100,00%
F451X [1,0ug]	1069,15	945,70	-11,55%	24,57%
TR + F451X (1:1)	2793,1	1266,4	-54,66%	116,30%
TR + F451X (1:5)	2836,10	1663,05	-41,36%	88,00%
TR + F451 X (1:10)	5495,40	3046,90	-44,56%	94,81%
<u>EXPERIMENTO # 03</u>				
sem TR	260,3	232,1	-11,00%	20,16%
TR [1,0ug]	778,1	353,60	-54,56%	100,00%
F451X [1,0ug]	878,55	775,50	-11,73%	21,50%
TR + F451X (1:1)	2266,1	1372,5	-39,43%	72,27%
TR + F451X (1:5)	3516,20	2231,50	-36,54%	66,97%
TR + F451 X (1:10)	6682,00	4337,20	-35,09%	64,31%

Tabela 15 : Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante G345R em TRH [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt
<u>EXPERIMENTO # 01</u>				
sem TR	4367,5	4018,7	-8,00%	26,24%
TR [1,0ug]	4433,9	3082,2	-30,49%	100,00%
G345R [1,0ug]	4656,30	4361,10	-6,34%	20,79%
TR + G345R (1:1)	9682,65	7204,5	-25,59%	83,93%
TR + G345R (1:5)	14776,50	10990,2	-25,62%	84,03%
TR + G345R (1:10)	27443,30	19234,50	-29,91%	98,10%
<u>EXPERIMENTO # 02</u>				
sem TR	205,2	180,8	-11,89%	30,67%
TR [1,0ug]	456,5	279,5	-38,77%	100,00%
G345R [1,0ug]	352,90	327,1	-7,31%	18,85%
TR + G345R (1:1)	1053,00	678,0	-35,62%	91,88%
TR + G345R (1:5)	1108,80	773,50	-30,24%	78,00%
TR + G345R (1:10)	1699,65	1242,60	-26,89%	69,36%
<u>EXPERIMENTO # 03</u>				
sem TR	195,6	166,6	-14,83%	38,16%
TR [1,0ug]	327,45	200,20	-38,86%	100,00%
G345R [1,0ug]	366,05	337,70	-7,74%	19,92%
TR + G345R (1:1)	574,70	334,75	-41,75%	107,44%
TR + G345R (1:5)	1751,5	1113,40	-36,43%	93,75%
TR + G345R (1:10)	1530,35	1045,8	-31,66%	81,47%

Tabela 16 : Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante F451X em AP-1 [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt
<u>EXPERIMENTO # 01</u>				
sem TR	546,90	447,17	-18,24%	37,91%
TR [1,0ug]	665,90	345,50	-48,12%	100,00%
F451X [1,0ug]	841,95	783,90	-6,89%	14,32%
TR + F451X (1:1)	1112,33	551,50	-50,42%	104,78%
TR + F451X (1:5)	1546,45	798,90	-48,34%	100,46%
TR + F451 X (1:10)	1476,85	831,20	-43,72%	90,86%
<u>EXPERIMENTO # 02</u>				
sem TR	493,1	434,9	-11,80%	24,57%
TR [1,0ug]	644,37	334,87	-48,03%	100,00%
F451X [1,0ug]	633,17	730,37	15,35%	-31,96%
TR + F451X (1:1)	734,70	323,05	-56,03%	116,66%
TR + F451X (1:5)	900,90	427,25	-52,58%	109,47%
TR + F451 X (1:10)	837,10	425,30	-49,19%	102,42%
<u>EXPERIMENTO # 03</u>				
sem TR	172,13	158,20	-8,09%	18,74%
TR [1,0ug]	280,30	159,33	-43,16%	100,00%
F451X [1,0ug]	230,27	208,27	-9,55%	22,13%
TR + F451X (1:1)	276,53	155,00	-43,95%	101,83%
TR + F451X (1:5)	709,70	455,35	-35,84%	83,04%
TR + F451 X (1:10)	441,70	246,60	-44,17%	102,34%

Tabela 17 : Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante G345R em AP-1 [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt
<u>EXPERIMENTO # 01</u>				
sem TR	184,00	160,27	-12,90%	31,11%
TR [1,0ug]	377,00	220,67	-41,47%	100,00%
G345R [1,0ug]	287,40	254,00	-11,62%	28,02%
TR + G345R (1:1)	513,50	290,60	-43,41%	104,68%
TR + G345R (1:5)	767,70	467,17	-39,15%	94,41%
TR + G345R (1:10)	834,30	574,50	-31,14%	75,09%
<u>EXPERIMENTO # 02</u>				
sem TR	546,90	447,17	-18,24%	47,10%
TR [1,0ug]	533,97	327,17	-38,73%	100,00%
G345R [1,0ug]	287,40	254,00	-11,62%	30,00%
TR + G345R (1:1)	513,50	290,60	-43,41%	112,08%
TR + G345R (1:5)	1192,40	804,50	-32,53%	83,99%
TR + G345R (1:10)	874,05	529,50	-39,42%	101,78%
<u>EXPERIMENTO # 03</u>				
sem TR	270,17	260,43	-3,60%	8,68%
TR [1,0ug]	377,00	220,67	-41,47%	100,00%
G345R [1,0ug]	215,45	190,00	-11,81%	28,48%
TR + G345R (1:1)	742,13	428,90	-42,21%	101,78%
TR + G345R (1:5)	736,70	480,80	-34,74%	83,77%
TR + G345R (1:10)	1097,40	827,45	-24,60%	59,32%

Tabela 18: Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante F451X e L422R/F451X em TSH [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt
<u>EXPERIMENTO # 01</u>				
sem TR	192,7	157,5	-18,28%	78,90%
TR [1,0ug]	337,90	259,6	-23,17%	100,00%
F451X [1,0ug]	314,0	288,7	-8,07%	34,83%
L422R [1,0ug]	522,1	508,23	-2,66%	11,48%
L422R/F451X [1,0ug]	466,50	437,30	-6,26%	27,02%
TR [2,0ug]	510,10	351,85	-31,02%	133,88%
TR + F451X (1:1)	518,60	390,90	-24,62%	106,26%
TR + L422R/F451X (1:1)	451,03	285,25	-36,76%	158,65%
TR [6,0ug]	764,1	468,6	-38,67%	166,90%
TR + F451X (1:5)	595,30	507,30	-14,78%	63,79%
TR + L422R/F451X (1:5)	769,4	550,30	-28,48%	122,92%
TR [11,0ug]	892,8	478,5	-46,41%	200,30%
TR + F451 X (1:10)	1777,9	1630,6	-8,29%	35,78%
TR + L422R/F451X(1:10)	782,50	631,6	-19,29%	83,25%
<u>EXPERIMENTO # 02</u>				
	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt
sem TR	170,8	165,60	-3,04%	8,39%
TR [1,0ug]	384,90	245,45	-36,23%	100,00%
F451X [1,0ug]	340,65	310,40	-8,88%	24,51%
L422R [1,0ug]	377,4	377,97	0,15%	-0,41%
L422R/F451X [1,0ug]	221,6	187,2	-15,52%	42,84%
TR [2,0ug]	331,0	247,5	-25,23%	69,64%
TR + F451X (1:1)	361,85	275,80	-23,78%	65,64%
TR + L422R/F451X (1:1)	460,30	343,10	-25,46%	70,27%
TR [6,0ug]	523,8	303,6	-42,04%	116,04%
TR + F451X (1:5)	845,1	751,3	-11,10%	30,64%
TR + L422R/F451X (1:5)	843,15	590,10	-30,01%	82,83%
TR [11,0ug]	1168,90	693,63	-40,66%	112,23%
TR + F451 X (1:10)	1453,50	1376,73	-5,28%	14,57%
TR + L422R/F451X(1:10)	1157,70	926,40	-19,98%	55,15%

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRa1wt
<u>EXPERIMENTO # 03</u>				
sem TR	973,6	941,15	-3,33%	9,94%
TR [1,0ug]	970,55	645,30	-33,51%	100,00%
F451X [1,0ug]	1596,45	1380,2	-13,55%	40,44%
L422R [1,0ug]	1881,5	1772,4	-5,80%	17,31%
L422R/F451X [1,0ug]	1301,8	1172,2	-9,96%	29,72%
TR [2,0ug]	2210,7	1431,4	-35,25%	105,19%
TR + F451X (1:1)	2751,65	1941,95	-29,43%	87,82%
TR + L422R/F451X (1:1)	1513,4	1053,3	-30,40%	90,72%
TR [6,0ug]	2153,1	1498,4	-30,41%	90,75%
TR + F451X (1:5)	1941,50	1755,20	-9,60%	28,65%
TR + L422R/F451X (1:5)	1868,50	1354,60	-27,50%	82,07%
TR [11,0ug]	1813,37	909,20	-49,86%	148,79%
TR + F451 X (1:10)	2025,5	1755,17	-13,35%	39,84%
TR + L422R/F451X(1:10)	1165,8	955,05	-18,08%	53,95%

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRa1wt
<u>EXPERIMENTO # 04</u>				
sem TR	356,4	336,75	-5,51%	17,17%
TR [1,0ug]	555,60	377,37	-32,10%	100,00%
F451X [1,0ug]	527,30	494,63	-6,20%	19,31%
L422R [1,0ug]	542,40	507,25	-6,48%	20,19%
L422R/F451X [1,0ug]	744,70	693,77	-6,84%	21,31%
TR [2,0ug]	1522,77	778,50	-48,88%	152,27%
TR + F451X (1:1)	714,10	509,93	-28,59%	89,07%
TR + L422R/F451X (1:1)	870,90	583,60	-32,99%	102,77%
TR [6,0ug]	1308,43	655,10	-49,93%	155,55%
TR + F451X (1:5)	1102,30	967,63	-12,22%	38,07%
TR + L422R/F451X (1:5)	982,30	671,87	-31,60%	98,44%
TR [11,0ug]	1813,37	909,20	-49,86%	155,33%
TR + F451 X (1:10)	1968,33	1659,80	-15,67%	48,82%
TR + L422R/F451X(1:10)	1257,80	949,45	-24,52%	76,39%

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRa1wt
<u>EXPERIMENTO # 05</u>				
sem TR	322,15	283,70	-11,94%	33,69%
TR [1,0ug]	944,00	609,43	-35,44%	100,00%
F451X [1,0ug]	1041,30	899,30	-13,64%	38,49%
L422R [1,0ug]	689,50	647,10	-6,15%	17,35%
L422R/F451X [1,0ug]	717,90	668,47	-6,89%	19,44%
TR [2,0ug]	815,03	540,07	-33,74%	95,20%
TR + F451X (1:1)	1464,05	1127,20	-23,01%	64,93%
TR + L422R/F451X (1:1)	864,67	585,33	-32,31%	91,17%
TR [6,0ug]	1855,57	967,63	-47,85%	135,02%
TR + F451X (1:5)	1040,25	1024,00	-1,56%	4,40%
TR + L422R/F451X (1:5)	1299,37	1088,73	-16,21%	45,74%
TR [11,0ug]	1588,33	877,07	-44,78%	126,35%
TR + F451 X (1:10)	1374,60	1194,10	-13,13%	37,05%
TR + L422R/F451X(1:10)	1199,60	872,00	-27,31%	77,06%

Tabela 19 : Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante G345R e G345R/L422R em TSH [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt
<u>EXPERIMENTO # 01</u>				
sem TR	785,90	714,90	-9,03%	15,35%
TR [1,0ug]	1891,23	778,80	-58,82%	100,00%
G345R [1,0ug]	943,10	777,47	-17,56%	29,85%
L422R [1,0ug]	1881,5	1772,4	-5,80%	9,86%
G345R/L422R [1,0ug]	576,63	589,57	2,24%	-3,81%
TR [2,0ug]	1522,77	778,50	-48,88%	83,10%
TR + G345R (1:1)	1817,63	1035,75	-43,02%	73,14%
TR + G345R/L422R (1:1)	1109,83	643,40	-42,03%	71,46%
TR [6,0ug]	3320,63	1777,93	-46,46%	78,99%
TR + G345R (1:5)	3555,40	2646,80	-25,56%	43,45%
TR + G345R/L422R (1:5)	3083,53	2063,53	-33,08%	56,24%
TR [11,0ug]	1813,37	909,20	-49,86%	84,77%
TR + G345R (1:10)	3083,30	2585,25	-16,15%	27,46%
TR + G345R/L422R(1:10)	3716,20	2603,40	-29,94%	50,90%
<u>EXPERIMENTO # 02</u>				
	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt
sem TR	884,17	767,17	-13,23%	31,99%
TR [1,0ug]	2267,43	1329,73	-41,36%	100,00%
G345R [1,0ug]	1020,00	967,30	-5,17%	12,50%
L422R [2,0ug]	1389,00	1471,10	5,91%	-14,29%
G345R/L422R [2,0ug]	1344,30	1245,03	-7,38%	17,84%
TR [2,0ug]	1647,47	999,27	-39,35%	95,14%
TR + G345R (1:1)	1910,17	1224,20	-35,91%	86,82%
TR + G345R/L422R (1:1)	1945,93	1214,00	-37,61%	90,93%
TR [6,0ug]	3320,63	1777,93	-46,46%	112,33%
TR + G345R (1:5)	2748,60	2348,50	-14,56%	35,20%
TR + G345R/L422R (1:5)	2689,13	2028,60	-24,56%	59,38%
TR [11,0ug]	1485,20	1148,20	-22,69%	54,86%
TR + G345R (1:10)	1924,03	1840,60	-4,34%	10,49%
TR + G345R/L422R(1:10)	1299,20	1027,35	-20,92%	50,58%

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRa1wt
<u>EXPERIMENTO # 03</u>				
sem TR	248,23	198,90	-19,87%	68,31%
TR [1,0ug]	360,03	255,30	-29,09%	100,00%
G345R [1,0ug]	327,90	312,00	-4,85%	16,67%
L422R [1,0ug]	330,40	313,30	-5,18%	17,81%
G345R/L422R [1,0ug]	387,67	353,97	-8,69%	29,87%
TR [2,0ug]	318,50	242,10	-23,99%	82,47%
TR + G345R (1:1)	400,60	310,30	-22,54%	77,48%
TR + G345R/L422R (1:1)	490,07	384,73	-21,49%	73,87%
TR [6,0ug]	610,97	378,33	-38,08%	130,90%
TR + G345R (1:5)	344,60	311,30	-9,66%	33,21%
TR + G345R/L422R (1:5)	535,20	380,60	-28,89%	99,31%
TR [11,0ug]	681,77	454,60	-33,32%	114,54%
TR + G345R (1:10)	535,30	502,63	-6,10%	20,97%
TR + G345R/L422R(1:10)	372,80	333,75	-10,47%	35,99%

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRa1wt
<u>EXPERIMENTO # 04</u>				
sem TR	216,50	200,23	-7,51%	19,22%
TR [1,0ug]	599,70	365,40	-39,07%	100,00%
G345R [1,0ug]	329,03	297,57	-9,56%	24,47%
L422R [1,0ug]	389,00	385,60	-0,87%	2,23%
G345R/L422R [1,0ug]	1057,40	947,83	-10,36%	26,52%
TR [2,0ug]	679,90	446,40	-34,34%	87,89%
TR + G345R (1:1)	621,73	425,00	-31,64%	80,98%
TR + G345R/L422R (1:1)	1015,80	734,10	-27,73%	70,98%
TR [6,0ug]	994,57	565,73	-43,12%	110,37%
TR + G345R (1:5)	822,40	737,10	-10,37%	26,54%
TR + G345R/L422R (1:5)	1127,30	861,50	-23,58%	60,35%
TR [11,0ug]	1057,13	569,83	-46,10%	117,99%
TR + G345R (1:10)	1355,67	1145,17	-15,53%	39,75%
TR + G345R/L422R(1:10)	1125,20	938,83	-16,56%	42,39%

Tabela 20 : Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante L422R em TSH [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt
<u>EXPERIMENTO # 01</u>				
sem TR	216,5	200,23	-7,51%	36,71%
TR [1,0ug]	326,4	259,6	-20,46%	100,00%
L422R [1,0ug]	522,1	508,23	-2,66%	13,00%
<u>EXPERIMENTO # 02</u>				
sem TR	163,7	202,9	23,94%	-66,08%
TR [1,0ug]	384,90	245,45	-36,23%	100,00%
L422R [1,0ug]	377,4	377,97	0,15%	-0,41%
<u>EXPERIMENTO # 03</u>				
sem TR	932,8	965,0	3,44%	-10,27%
TR [1,0ug]	970,55	645,30	-33,51%	100,00%
L422R [1,0ug]	1881,5	1772,4	-5,80%	17,31%
<u>EXPERIMENTO # 04</u>				
sem TR	329,90	328,70	-0,36%	1,02%
TR [1,0ug]	944,00	609,43	-35,44%	100,00%
L422R [1,0ug]	689,50	647,10	-6,15%	17,35%
<u>EXPERIMENTO # 05</u>				
sem TR	1101,53	868,00	-21,20%	36,04%
TR [1,0ug]	1891,23	778,80	-58,82%	100,00%
L422R [1,0ug]	1881,5	1772,4	-5,80%	9,86%

Tabela 21 : Resultados dos experimentos de co-transfecção de TRâ1 nativo com o mutante L422R em TRH [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TRâ1wt
<u>EXPERIMENTO # 01</u>				
sem TR	195,6	166,6	-14,83%	38,16%
TR [1,0ug]	327,45	200,20	-38,86%	100,00%
L422R [1,0ug]	480,23	350,25	-27,07%	69,66%
<u>EXPERIMENTO # 02</u>				
sem TR	213,5	201,7	-5,00%	10,64%
TR [1,0ug]	931,7	493,8	-47,00%	100,00%
L422R [1,0ug]	1380,2	888,3	-35,64%	75,83%
<u>EXPERIMENTO # 03</u>				
sem TR	260,3	232,13	-10,82%	32,19%
TR [1,0ug]	312,2	207,2	-33,61%	100,00%
L422R [1,0ug]	480,2	356,9	-25,69%	76,44%

Tabela 22 : Resultados dos experimentos de co-transfecção de TR Δ 1 nativo com o mutante L422R em AP-1 [4,0ug].

	Leitura sem T3	Leitura com T3	% Taxa de Repressão	% repressão em relação ao TR Δ 1wt
<u>EXPERIMENTO # 01</u>				
sem TR	546,90	447,17	-18,24%	47,10%
TR [1,0ug]	533,97	327,17	-38,73%	100,00%
L422R [1,0ug]	617,53	442,10	-28,41%	73,35%
<u>EXPERIMENTO # 02</u>				
sem TR	426,37	495,83	16,29%	-33,92%
TR [1,0ug]	644,37	334,87	-48,03%	100,00%
L422R [1,0ug]	617,53	442,10	-28,41%	59,15%
<u>EXPERIMENTO # 03</u>				
sem TR	172,13	167,60	-2,63%	6,47%
TR [1,0ug]	268,60	159,33	-40,68%	100,00%
L422R [1,0ug]	231,20	165,20	-28,55%	70,18%
<u>EXPERIMENTO # 04</u>				
sem TR	184,00	160,27	-12,90%	31,11%
TR [1,0ug]	377,00	220,67	-41,47%	100,00%
L422R [1,0ug]	617,53	442,10	-28,41%	68,51%
<u>EXPERIMENTO # 05</u>				
sem TR	270,17	260,43	-3,60%	8,68%
TR [1,0ug]	377,00	220,67	-41,47%	100,00%
L422R [1,0ug]	231,20	165,20	-28,55%	68,84%