

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

KARIME BICAS ROCHA IANNINI

AÇÃO DO HORMÔNIO TIREOIDEANO E DE SEU RECEPTOR SOBRE O
PROMOTOR DO INIBIDOR DO ATIVADOR DE PLASMINOGÊNIO TIPO 1 (PAI-1)

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO DE ASSIS ROCHA NEVES

BRASÍLIA
2008

KARIME BICAS ROCHA IANNINI

AÇÃO DO HORMÔNIO TIREOIDEANO E DE SEU RECEPTOR SOBRE O
PROMOTOR DO INIBIDOR DO ATIVADOR DE PLASMINOGÊNIO TIPO 1 (PAI-1)

Trabalho apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves

BRASÍLIA

2008

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Farmacologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, DF. Este trabalho teve apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos meus pais, Sandra e Evaldo, pelo amor e imenso esforço dedicados à minha educação.

Ao amor da minha vida, Betinho.

Não sei... se a vida é curta ou longa demais pra nós,
Mas sei que nada do que vivemos tem sentido,
se não tocamos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser:
Colo que acolhe,
Braço que envolve,
Palavra que conforta,
Silêncio que respeita,
Alegria que contagia,
Lágrima que corre,
Olhar que acaricia,
Desejo que sacia,
Amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida.
É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais,
Mas que seja intensa, verdadeira, pura...
Enquanto durar.

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida.

Ao meu marido, Roberto, pelo amor, paciência, alegria, carinho e companheirismo.

Aos meus pais, Sandra e Evaldo, pelo amor e apoio incondicional.

Ao Sr. Roberto e Dona Judith, pelos momentos felizes.

Minha eterna gratidão à minha família.

Ao Professor Francisco, pela confiança, amizade e incentivo intelectual. Não só pela orientação desse trabalho, mas por todos os momentos, desde o meu primeiro dia como aluna da graduação em ciências farmacêuticas desta universidade. Sua dedicação à ciência e à educação são exemplos a serem seguidos.

Às “meninas super-poderosas” do laboratório de farmacologia molecular: Viviane, Adriana, Rutnéia, Daniela, Monalisa, Cíntia, Juana e Sílvia. Também aos “meninos”: Ranieri, Gustavo e Sócrates. Especialmente à minha querida amiga Angélica, que é a pessoa mais doce que já conheci. À Laiana, Igor, Elaine e Anderson, pelo apoio e carinho. Às “minhas meninas”, Ana Carolina, Dandara e Raphaella, pela oportunidade de poder aprender a ensinar.

Às queridas Rilva e Cristina, pela amizade e apoio.

Aos professores do laboratório de farmacologia molecular: Marie, Luiz e Andreia, pela oportunidade de aprendizado e convívio.

A todos pelo companheirismo, mas principalmente por proporcionarem momentos de trabalho muito agradáveis.

A minha cunhada Carla, pelas conversas e pelo incentivo aos estudos.

Aos meus amigos, que tornam a vida muito mais doce e alegre.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

Relatos clínicos descrevem a existência de alterações do sistema fibrinolítico em pacientes com doenças da tireóide. Apesar de alguns resultados controversos, em geral, relata-se um risco elevado de sangramento em pacientes com hipotireoidismo e de trombose no hipertireoidismo. O papel do hormônio tireoideano (T_3) na capacidade fibrinolítica ainda não está completamente estabelecido. O inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1) – inibidor fisiológico dos ativadores de plasminogênio (tipo tecidual e uroquinase) – é um importante inibidor do sistema fibrinolítico. Conseqüentemente, altas concentrações plasmáticas de PAI-1 correlacionam-se com doenças trombóticas, enquanto baixas concentrações correlacionam-se com a tendência ao sangramento. Considerando que o T_3 , ao se ligar ao receptor do hormônio tireoideano (TR), regula a transcrição de vários genes, o objetivo desse estudo é o de analisar o efeito do T_3 sobre a atividade transcricional do promotor do gene PAI-1. Foi comparada a ação dos receptores do hormônio tireoideano ($TR\alpha$ e $TR\beta$) sobre a atividade transcricional do PAI-1 em células pró-monocíticas humanas (U937) e em células mesangiais humanas. Os resultados revelaram que o promotor do PAI-1 é significativamente estimulado pelo TR não-ligado e que o tratamento com T_3 diminuiu a atividade do promotor de uma maneira dose-dependente. Em células U937, o tratamento com T_3 ($10^{-7}M$) em células transfectadas com $TR\alpha$ e $TR\beta$ inibiram o promotor do PAI-1 em aproximadamente 70% e 40%, respectivamente, com um IC_{50} de $3,07 \times 10^{-10} M$ ($TR\alpha$) e $3,81 \times 10^{-10} M$ ($TR\beta$). Além disso, o T_3 reverteu a ativação do promotor do PAI-1 causado pelo éster de forbol PMA (12-miristato 13-acetato forbol) por meio da repressão direta do promotor do PAI-1 pelo TR ligado. Foi demonstrado que essa regulação depende do domínio de ligação ao DNA (DBD) do TR. Foram identificados dois possíveis elementos responsivos ao TR no promotor do PAI-1 entre o nucleotídeo -422 e -389, que contém uma seqüência TTTGGG, e entre o nucleotídeo -346 e -286, que contém uma seqüência DR-4. O TR se liga como heterodímero às seqüências de DNA citadas. Além disso, a regulação negativa exercida pelo T_3 requer uma superfície intacta de ligação a co-ativadores no TR. Esse efeito parece guardar relação com as anormalidades da coagulação observadas nos pacientes com disfunções da tireóide.

Palavras-chave: inibidor 1 de ativador de plasminogênio, hormônios tireoideanos, receptores dos hormônios tireoideanos, elementos reguladores de transcrição.

ABSTRACT

Various coagulation abnormalities occur in patients with thyroid hormones (TH) disorders. Patients with hypothyroidism are particularly at risk of hemorrhage. In contrast, in hyperthyroidism, there is a tendency to thrombotic complications development. However, the role of TH in the fibrinolytic capacity is not well established, and published data remain conflicting. Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1, a physiological inhibitor of plasminogen activators (urokinase and tissue types), is an important repressor of the fibrinolytic system. Consequently, high plasma levels of PAI-1 correlate to thrombotic disease, while low levels implies a bleeding tendency. In this study, we investigated whether PAI-1 gene expression is directly controlled by TH levels and whether the gene expression control depends on recruitment of cofactors. We compared the action of thyroid hormone receptors (TR α and TR β) in regulating the activity of human PAI-1 promoter through transfections in human mesangial cells and human leukemic monocyte lymphoma cells (U937). Our results showed that the human PAI-1 promoter is significantly stimulated by unliganded TRs and TH treatment decreased the PAI-1 promoter activity in a hormone-dependent manner. In U937 cells, the addition of T₃ (10⁻⁷M) in cells co-transfected with TR α and TR β inhibit PAI-1 promoter in almost 70% and 40%, respectively, with an IC₅₀ of 3,07 x 10⁻¹⁰ M (TR α) and 3,81 x 10⁻¹⁰ M (TR β). In addition, we found that T₃ reverses the activation of the PAI-1 promoter caused by phorbol 12-myristate 13-acetate through the direct repression of the PAI-1 promoter by liganded TR. Our results show that this regulation requires de DNA-binding domain of the TR. We shower two possible TR inhibitory elements in the PAI-1 promoter between -346 and -286, a DR-4 sequence, and -422 and -389, a TTTGGG sequence. Furthermore, the negative regulation exerted by TR requires an intact co-activator-binding surface. This effect may be important to explain the coagulation abnormalities observed in patients with thyroid hormones disorders.

Keywords: plasminogen activator inhibitor 1; thyroid hormones, thyroid hormone receptors, regulation of gene expression, transcriptional regulatory elements.

LISTA DE FIGURAS

1. REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 2.1** Representação esquemática da regulação da secreção dos hormônios tireoideanos pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. O hipotálamo produz o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) que induz a síntese do hormônio tireotrófico (TSH) na hipófise. O TSH estimula a tireóide a sintetizar os hormônios triiodotironina (T_3) e tiroxina (T_4). Esses THs regulam negativamente a síntese de TRH e TSH, exercendo retroalimentação negativa. 5
- Figura 2.2** Estrutura geral dos receptores nucleares com a representação dos domínios funcionais. **(a)** Estrutura primária, com a região amino-terminal (domínio A/B), domínio de ligação ao DNA (DBD, domínio C), região de dobradiça (hinge, domínio D), domínio de ligação ao ligante (LBD, domínio E), e região carboxi-terminal (domínio F). **(b)** Estrutura secundária, com a representação das regiões amino (N) e carboxi-terminais (C), AF-1, DBD e LBD. 7
- Figura 2.3** A superfamília dos NRs inclui 48 membros. Os ligantes naturais estão descritos à direita. Os receptores endócrinos (em azul, os receptores esteroidais que atuam como homodímeros; e em lilás, os receptores que se heterodimerizam com o RXR) e os receptores órfãos adotados sensores de lipídeos (em verde) já têm sua importância fisiológica estabelecida. A função fisiológica dos receptores órfãos adotados enigmáticos (em laranja) e dos receptores órfãos verdadeiros (em amarelo) ainda não foi definida. 8
- Figura 2.4** Produtos protéicos dos genes α e β do TR (THRA e THRB). As cores representam regiões idênticas ou divergentes resultante do *splicing* alternativo do mRNA. As regiões em preto representam o DBD. 10
- Figura 2.5** Estrutura primária dos domínios do TR com suas funções: região amino-terminal (domínio A/B), domínio de ligação ao DNA (DBD, domínio C), região de dobradiça (*hinge*, domínio D), domínio de ligação ao ligante (LBD, domínio E) e região carboxi-terminal (domínio F). O gráfico indica as regiões do TR que são responsáveis pela dimerização, localização nuclear, interação com co-repressores e co-ativadores. 12
- Figura 2.6** Demonstração das α -hélices e das folhas β -pregueadas que compõem o LBD em presença do hormônio, que se aloja no centro da proteína. Observações: H0 hélice representa a última hélice do DBD. H2 e S2 não são visualizadas. A cristalização e a determinação da estrutura do TR β foi realizada pelo Grupo de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo. 13
- Figura 2.7** O promotor de um gene, localizado na região 5', contém pequenas seqüências (<10 pares de base – pb) que se estendem pela região onde a transcrição se inicia. A região promotora pode conter 200 pb. Os círculos em vermelho no promotor ilustram diversas regiões específicas que são reconhecidas por fatores de transcrição. 14
- Figura 2.8** Elementos responsivos ao TR (TREs): repetição direta (DR-4), palíndromo invertido (F2) e palíndromo (TREpal). O N indica o número de nucleotídeos entre os hexâmeros. 15

- Figura 2.9** Representação do mecanismo de ação do TR. Na ausência do TH, o TR está ligado ao TRE como homodímero associado a co-repressores que atuam inibindo a maquinaria de transcrição basal (MTB). A ligação do TH ao TR propicia mudanças conformacionais que conduzem à dissociação de homodímeros (TR/TR) e associação de heterodímeros (TR/RXR), liberação dos co-repressores e associação com co-ativadores que agem sobre a MTB ativando a transcrição de genes-alvo. 16
- Figura 2.10** Regulação da expressão gênica do TR em um TRE positivo em três situações: **(a)** O TR ligado ao TRE como homo ou heterodímero com RXR na ausência do ligante recruta moléculas co-repressoras (CoR), interferindo na MTB, promovendo a repressão; **(b)** Na situação de ausência do TR (*knockout*), há a transcrição basal de genes-alvo; **(c)** Na presença do ligante, o TR/TR ou TR/RXR libera os co-repressores e recruta os co-ativadoras (CoA), e interagem diretamente com a maquinaria basal, o que leva a um aumento da atividade transcricional do receptor. 18
- Figura 2.11** Um mecanismo proposto para a regulação gênica negativa mediada pelo TH. **a)** O TH liga-se ao TR promovendo a troca de co-repressores por co-ativadores ligados ao TR no nTRE. Esse mecanismo requer necessariamente a ligação direta do TR ao DNA. **b)** TH liga-se ao TR promovendo a troca de co-ativadores por co-repressores ligados em um contexto de interação proteína-proteína ao DNA, mostrado nessa ilustração com o complexo AP-1 (jun/fos). **c)** TH liga-se ao TR e recruta co-ativadores previamente ligados a outros fatores de transcrição, como o complexo AP-1. 21
- Figura 2.12** Mecanismo de formação e degradação de fibrina pelo sistema fibrinolítico. O fator de coagulação Va ativa a protrombina, formando a trombina (fator de coagulação IIa) que converte o fibrinogênio em fibrina. O coágulo sanguíneo é composto por uma rede de fibrinas, que se adere a qualquer abertura vascular, impedindo a perda de sangue. Os ativadores de plasminogênio (PA) favorecem a formação da plasmina a partir do plasminogênio. A plasmina promove a degradação da fibrina em produtos de degradação da fibrina (PDF). Esse sistema pode ser reprimido mediante a inibição dos ativadores de plasminogênio (PAI) ou por meio da inibição direta da plasmina (antiplasmina). 26
- Figura 2.13** Modelo conformacional do PAI-1 nativo construído a partir do mapeamento da seqüência primária do PAI-1 humano. A alça central de reação (RCL) está representada em vermelho, a folha β -pregueada A em verde e a α -hélice F em azul 31
- Figura 2.14** Estrutura molecular esquematizada dos três estados em que o PAI-1 é encontrado *in vivo*: (A) forma ativa; (B) forma clivada e; (C) forma latente. Os resíduos de aminoácido Met₃₄₇/Arg₃₄₆, presentes na RCL da proteína reconhecem os PA (A). Quando a RCL reconhece o PA, a ligação entre os resíduos Met₃₄₇/Arg₃₄₆ é rompida e a RCL ligada ao PA se sobrepõe à folha β -pregueada A e α -hélice F, tornando a enzima inativa (B). Na forma latente (C), a RCL está inserida na folha β -pregueada A. E esta conformação é mais estável, mas apresenta menor capacidade inibitória. 32

5. MATERIAIS E MÉTODOS

- Figura 5.1** Desenho esquemático de uma célula eucariótica contendo DNA plasmideal com um gene de interesse. 41
- Figura 5.2** Síntese *in vitro* do TR β 1 marcado radioativamente pelo kit TNT T7-Quick. 46

6. RESULTADOS

- Figura 6.1** **T₃ reprime a atividade transcricional do promotor do gene PAI-1.** Resposta ao T₃ promovida pela adição de 1µg dos vetores de expressão TRα1 ou TRβ1 em células pró-monocíticas humanas U937. As células foram co-transfectadas com 2µg do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou T₃ 10⁻⁷M. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células, e os números do eixo vertical representam a média do percentual da leitura da luciferase na ausência ou presença de T₃. A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0, considerando-se P < 0,05. n=6. 50
- Figura 6.2** **A repressão da atividade transcricional do promotor do gene PAI-1 por T₃ é dose-dependente em células U937.** Curva dose-resposta ao T₃ promovida pela adição de 1µg do vetor de expressão TRβ1 ou TRα1 em células pró-monocíticas humanas U937. As células foram co-transfectadas com 2µg do vetor para o gene repórter PAI-1 (PAI-1-LUC) e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou concentrações crescentes de T₃ (10⁻¹⁰M, 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M e 10⁻⁶M). A atividade do gene repórter foi medida após 22hs com a lise das células, e os números representam o percentual de ativação em relação ao respectivo receptor na ausência de T₃. O IC₅₀ do TRα1 é igual à 3,067 x 10⁻¹⁰ M e do TRβ1 é igual a 3,808 x 10⁻¹⁰ M. n=3. O IC₅₀ foi calculado utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0. 51
- Figura 6.3** **A repressão da atividade transcricional do promotor do gene PAI-1 por T₃ depende da concentração de TRβ1 em células U937.** Resposta ao T₃ promovida pela adição de 0,5µg, 1µg, 2µg, 4µg e 8µg do vetor de expressão TRβ1 em células pró-monocíticas humanas U937. As células foram co-transfectadas com 2µg do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC ou 4µg F2-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou T₃ 10⁻⁷M. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números do eixo vertical representam a média do percentual da repressão na ausência e presença de T₃. n=3. A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0, considerando-se P < 0,05. n=3 52
- Figura 6.4** **T₃ reprime a transcrição de PAI-1 na presença de um potente indutor, o PMA, em células U937.** Resposta ao T₃ promovida pela adição de 1µg dos vetores de expressão TRα1 ou TRβ1 em células pró-monocíticas humanas U937. As células foram co-transfectadas com 2µg do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou T₃ 10⁻⁷M e PMA. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células, e os números do eixo vertical representam a média do percentual da leitura da luciferase na ausência ou presença de T₃. A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0, considerando-se P < 0,001. n=3 54
- Figura 6.5** **Mutantes do TRβ1.** Principais características dos mutantes I280M, F451X, L422R e Gal-TRβ-LBD. 55
- Figura 6.6** **Para a regulação da atividade transcricional do promotor do gene do PAI-1, TRβ1 necessita se ligar ao DNA e interagir com co-ativadores em células U937.** Resposta ao T₃ promovida pela adição de 1µg dos vetores de expressão TRβ1 wt e mutantes I280M, F451X, L422R e GAL-TRβ-LBD em células pró-monocíticas humanas U937. As células foram co-transfectadas com 2µg do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou T₃ 10⁻⁷M. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células, e os números do eixo vertical representam a média do percentual da repressão na ausência ou presença de T₃. A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0, considerando-se P < 0,05. n=3 56

- Figura 6.7** Para a regulação da atividade transcricional do promotor do gene PAI-1, TR β 1 necessita se ligar ao DNA, interagir-se com co-reguladores e dimerizar-se em células mesangiais humanas. Resposta ao T₃ promovida pela adição de 1 μ g dos vetores de expressão TR β 1 wt e mutantes I280M, F451X, L422R e GAL-TR β -LBD em células mesangiais humanas. As células foram co-transfectadas com 2 μ g do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou T₃ 10⁻⁷M. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células, e os números do eixo vertical representam a média do percentual da repressão na ausência ou presença de T₃. A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0, considerando-se P < 0,05. n=4 56
- Figura 6.8** O TR liga-se, como heterodímero, à seqüência específica no promotor do gene de PAI-1. O ensaio de ligação proteína-DNA foi realizado empregando-se 1 μ g de TR β 1wt sintetizado *in vitro* radio-marcado (³⁵S-metionina) e 3 μ g de RXRwt sintetizado *in vitro* não radio-marcado, na ausência e na presença de T₃ e 20ng do oligo (F2, PAI-1wt1, PAI-1wt2, PAI-1mut1 e PAI-1mut2). As reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não desnaturante e à autoradiografia. 59
- Figura 6.9** PPAR α , PPAR δ e PPAR γ não alteram a transcrição do gene PAI-1 em células mesangiais humanas. Resposta bezafibrato (BEZA) e Rosiglitazona (ROSI) promovida pela adição de 1,5 μ g do vetor de expressão PPAR α , PPAR δ e PPAR γ em células mesangiais humanas. As células foram co-transfectadas com 2 μ g do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC e PPER-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3), ROSI 10⁻⁵M ou BEZA 10⁻⁴M. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células, e os números do eixo vertical representam a média do percentual da leitura da luciferase na ausência ou presença dos ligantes. A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0, considerando-se P < 0,05. n=3 60

7. DISCUSSÃO

- Figura 7.1** Região promotora do gene do PAI-1 apresentando as possíveis regiões identificadas como elementos responsivos ao receptor do hormônio tireoideano. Em vermelho, a região que contém a seqüência TTTGGG. Em verde, a região que contém a seqüência AGGTCAaggAGGTCT (na caixa em lilás), caracterizando um elemento responsivo DR-4. 64
- Figura 7.2** Localização esquemática das regiões promotoras do gene do PAI-1 humano. 65

APÊNDICE A

- Figura A.1** **Efeito do T₃ na repressão do TRβ1 no promotor do PAI-1 em células mesangiais humanas.** Curva dose-resposta ao T₃ promovida pela adição de 1μg do vetor de expressão TRβ1 em células mesangiais humanas. As células foram co-transfectadas com 2μg do vetor para o gene repórter PAI-1 (PAI-1-LUC) e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou concentrações crescentes de T₃ (10⁻¹⁰M, 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M e 10⁻⁶M). A atividade do gene repórter foi medida após 22hs com a lise das células, e os números representam o percentual de ativação em relação ao respectivo receptor na ausência de T₃. O IC₅₀ do TRβ1 é igual a 4,3 x 10⁻¹⁰ M. n=3. 71
- Figura A.2** **Efeito de diferentes concentrações do TRβ1 sobre o promotor do PAI-1 em células mesangiais humanas.** Resposta ao T₃ promovida pela adição de 0,5μg, 1μg, 2μg, 4μg e 8μg do vetor de expressão TRβ1 em células mesangiais humanas. As células foram co-transfectadas com 2μg do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC ou 4μg F2-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou T₃ 10⁻⁷M. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números do eixo vertical representam a média do percentual da repressão na ausência e presença de T₃. n=4. 71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

³⁵ S-Met	Metionina marcada com enxofre 35
AF-1	Função de ativação 1
AF-2	Função de ativação 2
AGL	Ácidos graxos livres
AP-1	Complexo de fatores de transcrição composto pelas proteínas c-fos e c-jun
AR	Receptor de androgênios
BEZA	Bezafibrato
CAR	Receptor constitutivo de androstano
cDNA	DNA complementar
c-fos	Fator de transcrição do complexo AP-1
c-jun	Fator de transcrição do complexo AP-1
CO ₂	Dióxido de carbono
CoA	Co-ativador
CoR	Co-repressor
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DCV	Doenças cardiovasculares
DM	Diabetes mellitus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO/ETOH 2:3	Solução contendo 2 partes de dimetilsulfóxido e 3 partes de etanol
DR-4	Repetição direta espaçada por quatro nucleotídeos
ECA	Enzima conversora de angiotensina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMSA	Ensaio de alteração da mobilidade eletroforética (gel <i>shift</i>)
ER	Receptor de estrogênio
ERR β e γ	Receptores relacionados com o estrogênio β e γ
F2	Seqüência correspondente a um palíndromo invertido da seqüência AGGTCA
FeCl ₃	Cloreto de ferro
FXR	Receptor farnesóide X
GAL4	Fator de transcrição de levedura ativado por galactosidase
GR	Receptor de glicocorticóides
GRE	Elemento responsivo ao receptor de glicocorticóide
GRIP-1	Proteína 1 que interage com GR
H	Hélice
HDAC	Complexo de desacetilase das histonas
HLA	Antígenos leucocitários humanos
HNF4 α	Fator nuclear de hepatócito 4 α
HRE	Elemento responsivo ao hormônio
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% da atividade
IL-1	Interleucina 1
kb	Kilo bases
kDa	Kilo dalton
LBD	Domínio de ligação ao ligante
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LRH-1	Homólogo do receptor hepático X
LRP	Receptor de lipoproteínas de baixo peso molecular
LXR	Receptor hepático X
MHC	Miosina de cadeia pesada
MMPs	Metaloproteinases de matriz
MR	Receptor de mineralocorticóides
MTB	Maquinaria de transcrição basal
NCoR	Co-repressor de receptor nuclear

NR	Receptor nuclear
NTD	Domínio amino-terminal
nTRE	Elemento responsivo ao hormônio tireoideano negativo
PA	Ativador de plasminogênio
PAI	Inibidor do ativador do plasminogênio
PAI-1	Inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1
PB	Pares de base
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDF	Produtos de degradação da fibrina
PMA	Éster de forbol (12-miristato 13-acetato forbol)
PN-1	Protease nexina 1
PPAR α , δ e γ	Receptor ativado dos proliferadores peroxissomais α , δ e γ
PR	Receptor de progesterona
pTRE	Elemento responsivo ao hormônio tireoideano positivo
PXR	Receptor do pregnano X
RAR	Receptor do ácido retinóico
RCL	Alça central de reação
ROR α e β	Receptor órfão relacionado com o colesterol α e β
ROSI	Rosiglitazona
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida da reação da polimerase em cadeia
RXR	Receptor retinóide X
SF1	Fator esteroideogênico 1
SM	Síndrome metabólica
SMB	Domínio somatomedina B
SMRT	Mediador silencioso para o TR e RAR
SOD-1	Superóxido dismutase 1
SRC-1	Co-ativador 1 do receptor esteróide
T ₃	3,5,3'-triiodotironina
T ₄	3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina ou tiroxina
TEMED	N, N,N, N',N'- tetrametilenodiamina
TGF β	fator de crescimento transformante β
TGF β	Fator de crescimento transformante β
TH	Hormônio tireoideano
THRA	Gene do receptor do hormônio tireoideano α
THRB	Gene do receptor do hormônio tireoideano β
TNF α	Fator de necrose tumoral α
TNT T7	Kit com lisado de reticulócitos para a transcrição e tradução de proteínas <i>in vitro</i>
t-PA	Ativador de plasminogênio tipo tecidual
TR	Receptor do hormônio tireoideano
TRE	Elemento responsivo ao hormônio tireoideano
TREpal	Seqüência correspondente a um palíndromo da seqüência AGGTCA
TRH	Tireotrofina
TR α	Receptor do hormônio tireoideano α
TR β	Receptor do hormônio tireoideano β
TSH	Hormônio tireotrófico
U937	Células pró-monocíticas humanas
u-PA	Ativador de plasminogênio tipo uroquinase
u-PAR	Receptor de u-PA
VDR	Receptor da vitamina D
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
VLDRE	Elemento responsivo ao receptor de VLDL
VN	Vitronectina
WT	<i>Wild type</i> ou nativo

LISTA DE ABREVIATURAS DOS PLASMÍDEOS

VETORES DE EXPRESSÃO

pCMV	Vetor de expressão que contém o promotor do citomegalovírus.
pCDNA3	Vetor de expressão que contém o promotor do citomegalovírus.
pCMX	Vetor de expressão que contém o promotor do citomegalovírus, sem a inserção de um gene (vetor vazio).
pCMV-CTR α	pCMV que codifica o receptor do hormônio tireoideano β .
pCMV-TR β 1	pCMV que codifica o receptor do hormônio tireoideano α .
pCDNA3-PPAR α	pCDNA3 que codifica o receptor ativado por proliferadores peroxissomais α .
pCDNA3-PPAR γ	pCDN3 que codifica o receptor o receptor ativado por proliferadores peroxissomais δ .
pCDNA3-PPAR δ	pCDN3 que codifica o receptor o receptor ativado plor proliferadores peroxissomais γ .

MUTANTES DO TR β

I280M	Mutante do TR β , em que a isoleucina da posição 280 é trocada por uma metionina.
F451X	Mutante do TR β em que os dez últimos aminoácidos, a partir da fenilalanina 451, foram deletados.
L422R	Mutante do TR β em que a leucina da posição 422 é trocada por uma arginina.
GAL-TR β -LBD	quimera composta pelo LBD do receptor TR β 1 (aminoácidos 174 a 461) e o DBD do GAL4 – fator de transcrição de levedura ativado por galactosidade – (aminoácidos 1 a 147).

PLASMÍDEOS REPÓRTERES

PAI-1-LUC	Contendo a região promotora do gene PAI-1 humano dirigindo a expressão do gene da luciferase (LUC).
F2-LUC	Contendo o elemento responsivo de TR na forma de palíndromo invertido (F2) dirigindo a expressão do gene da luciferase (LUC).
PPRE-LUC	Contendo o elemento responsivo dos receptores PPAR dirigindo a expressão do gene da luciferase (LUC).

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 O HORMÔNIO TIREOIDEANO	4
2.1.1 Superfamília de Receptores Nucleares	6
2.1.2 Receptores dos Hormônios Tiroideanos	9
2.1.3 Domínios Funcionais dos Receptores do Hormônio Tiroideano	11
2.1.4 Elementos Responsivos ao Hormônio Tiroideano (TREs)	13
2.1.5 Mecanismo de Ação do Hormônio Tiroideano	15
2.1.6 Regulação Transcricional dos Receptores do Hormônio Tiroideano	17
2.2 O HORMÔNIO TIREOIDEANO E O SISTEMA HEMOSTÁTICO	22
2.3 O INIBIDOR DO ATIVADOR DE PLASMINOGÊNIO TIPO 1 (PAI-1)	25
2.3.1 O Sistema Fibrinolítico	25
2.3.2 PAI-1: Aspectos Gerais	28
2.3.3 PAI-1 e o Desenvolvimento de Doenças	33
2.3.4 Deficiência em Humanos	36
2.3.5 Expressão Gênica	37
3 JUSTIFICATIVA	39
4 OBJETIVOS	40
4.1 OBJETIVO GERAL	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4.3 OBJETIVO SECUNDÁRIO	40
5 MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 PLASMÍDEOS	41
5.2 CULTURA DE CÉLULAS	43
5.3 ENSAIOS DE GENE REPÓRTER POR MEIO DE TRANSFEÇÃO TRANSIENTE	43
5.4 CÁLCULO DA TAXA DE ATIVAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5.5. TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO DE PROTEÍNAS <i>IN VITRO</i>	45
5.6 ENSAIO DE ALTERAÇÃO DE MOBILIDADE EM GEL (EMSA OU <i>GEL SHIFT</i>)	46
6 RESULTADOS	49
6.1 O PROMOTOR DO GENE PAI-1 É NEGATIVAMENTE REGULADO PELO HORMÔNIO TIREOIDEANO	49
6.2 EFEITOS DE MUTANTES DO TRB NA REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO PROMOTOR DO PAI-1	54
6.3 IDENTIFICAÇÃO DO ELEMENTO RESPONSIVO AO TRB1 NO PROMOTOR DO PAI-1	57
6.4 EFEITOS DOS RECEPTORES NUCLEARES PPARs SOBRE A REGULAÇÃO DO PROMOTOR DO PAI-1	59
7 DISCUSSÃO	61
8 CONCLUSÃO	70
9 APÊNDICE A	71
10 REFERÊNCIAS	72

1 INTRODUÇÃO

O inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) assume importância cada vez maior em processos fisiopatológicos. Não só por ser o principal regulador da fibrinólise, mas porque é encontrado em vários tecidos e parece estar envolvido na patogênese de várias doenças, tais como as doenças cardiovasculares, doenças metabólicas e obesidade, câncer e fibrose (fibrose pulmonar e glomeruloesclerose renal). Esse efeito ocorre tanto por sua ação proteolítica quanto por sua ação no remodelamento de tecidos.

O PAI-1 foi purificado pela primeira vez por van Mourik *et al.* (1984). A partir de então, muitos estudos foram desenvolvidos para estabelecer suas funções e propriedades. O PAI-1 é uma proteína de 45 kDa, membro da família de inibidores serino-proteases e contribui para a regulação da fibrinólise endógena pela ligação irreversível aos ativadores de plasminogênio tipo tecidual e uroquinase (t-PA e u-PA, respectivamente). Também atua nos processos de adesão e migração celular, promovendo o remodelamento de tecidos, devido a sua capacidade de ligação a vitronectina.

Já é conhecido que algumas moléculas endógenas regulam a expressão gênica de PAI-1. Dentre elas encontram-se os fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformante β (TGF β), as citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF α) e a interleucina 1 e os hormônios, como a insulina, os corticosteróides e o estrogênio.

Evidências extraídas de diversos estudos clínicos apontam para a existência de uma correlação entre as concentrações de hormônio tireoideano (TH) e PAI-1. Embora esses resultados ainda sejam controversos, em pacientes com hipertireoidismo observam-se concentrações elevadas de PAI-1 e risco aumentado para a trombose; já no hipotireoidismo, observam-se concentrações de PAI-1 e maior chance de ocorrência de sangramentos.

As disfunções da tireóide alteram o balanço coagulação-fibrinólise, embora não se saiba ao certo como ocorre essa relação. As observações clínicas realizadas em

pacientes com hipo e hipertireoidismo justificam a exploração do mecanismo molecular por meio do qual o hormônio tireoideano regula o PAI-1. Considerando que nenhum estudo foi realizado para investigar se o promotor do PAI-1 é regulado pelo TH e que o receptor do hormônio tireoideano (TR) é um fator de transcrição que regula a expressão gênica de diversas proteínas, nós propusemos esse trabalho para estudar o efeito do TH e das diferentes isoformas do TR (TR α e TR β) sobre a regulação da transcrição no promotor do PAI-1.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Hormônio Tireoideano

Os hormônios tireoideanos (THs) possuem papel crítico no desenvolvimento, metabolismo, proliferação e diferenciação celular. Os THs são necessários para o funcionamento normal de quase todos os tecidos, desde a embriogênese até a vida adulta. Esses hormônios regulam o consumo de oxigênio, a temperatura corporal, a frequência cardíaca e o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos. Além disso, participam da síntese e degradação de fatores de crescimento e hormônios e dão origem a outros efeitos secundários (1-3).

A fonte dos THs é a glândula tireóide, que secreta predominantemente a forma 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina ou tiroxina (T_4) da qual deriva, por desidodação nos tecidos periféricos, a maior parte da 3,5,3'-triiodotironina (T_3) circulante. O T_3 é a forma mais potente do hormônio, pois se liga ao receptor com uma afinidade dez vezes maior que o T_4 . Dessa forma, para a manutenção da atividade normal dos tecidos-alvo, as concentrações intracelulares de T_3 devem ser garantidos. Tais processos dependem da integridade do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide e da ação de enzimas específicas, como as desidodases (3).

A função tireoideana é regulada pelo hormônio liberador de tireotrofina (TRH), produzido pelo hipotálamo. O TRH, por meio do sistema porta hipotálamo-hipofisário, dirige-se à hipófise, liga-se a receptores específicos no tireotrofo e induz a síntese da tireotrofina (TSH). Esse, por sua vez, interage com receptores presentes na membrana da célula folicular da tireóide e ativa a expressão de proteínas envolvidas na biossíntese dos THs, aumentando a atividade da célula tireoideana e estimulando a secreção hormonal. Os THs regulam negativamente a síntese de TRH e TSH, exercendo retroalimentação negativa no eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (**figura 2.1**) (4).

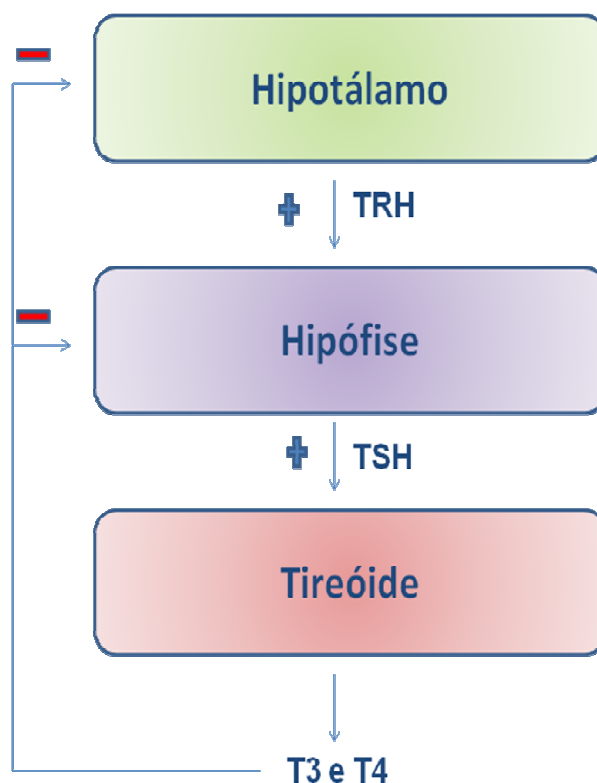


Figura 2.1. Representação esquemática da regulação da secreção dos hormônios tireoideanos pelo eixo hipotálamo-hipófise-tireóide. O hipotálamo produz o hormônio liberador de tireotrofina (TRH) que induz a síntese do hormônio tireotrófico (TSH) na hipófise. O TSH estimula a tireóide a sintetizar os hormônios triiodotironina (T₃) e tiroxina (T₄). Esses THs regulam negativamente a síntese de TRH e TSH, exercendo retroalimentação negativa.

Os THs secretados circulam comumente ligados às proteínas plasmáticas e somente 0,03% de T₄ e 0,3% de T₃ estão livres. O tempo de meia-vida dos THs é aumentado pela ligação às proteínas plasmáticas, e essa ligação garante que eles sejam regularmente distribuídos nos tecidos-alvo. A entrada e saída do hormônio nas células ocorrem principalmente por meio de transportadores específicos que regulam a captação e o efluxo do TH (5).

No interior da célula, o T₃ se liga a receptores específicos localizados no núcleo da célula, os receptores de hormônio tireoideano (TRs). Os TRs são os responsáveis pela ação do TH: ligam-se direta ou indiretamente (por meio de outros co-fatores) na

região promotora dos genes-alvo e regulam a transcrição gênica de diversas proteínas em quase todos os tecidos (6, 7).

Além da ação transcricional (genômica) mediada pelo TR, os THs podem regular vias sinalizadoras de forma independente da síntese protéica. Há descrições de ações não-genômicas envolvidas na termogênese, na atividade lipolítica, no aumento do débito cardíaco e na redução da resistência vascular periférica (3, 8).

2.1.1 Superfamília de Receptores Nucleares

Os TRs pertencem à superfamília dos receptores nucleares (NRs) que compreende 48 genes que codificam 75 proteínas diferentes envolvidas na transdução de sinais extracelulares. Os NRs são complexos de sinalização que atuam de diversas maneiras, modulando a ativação e a repressão de sinais. (2, 9-11).

A **figura 2.2** mostra a estrutura geral dos NRs. Todos os NRs possuem uma estrutura primária comum que inclui: o domínio amino-terminal (NTD) (domínio A/B), onde se encontra a região denominada função de ativação 1 (AF-1); a região central de domínio de ligação ao DNA (DBD), responsável por guiar o receptor aos elementos responsivos ao hormônio (HREs) (domínio C); o sítio de dobramento (*hinge*) (domínio D); o domínio de ligação ao ligante (LBD), que reconhece os ligantes dirigindo a especificidade da resposta biológica, além de apresentar uma superfície que propicia a dimerização (domínio E); e a região carboxi-terminal (domínio F) (12).

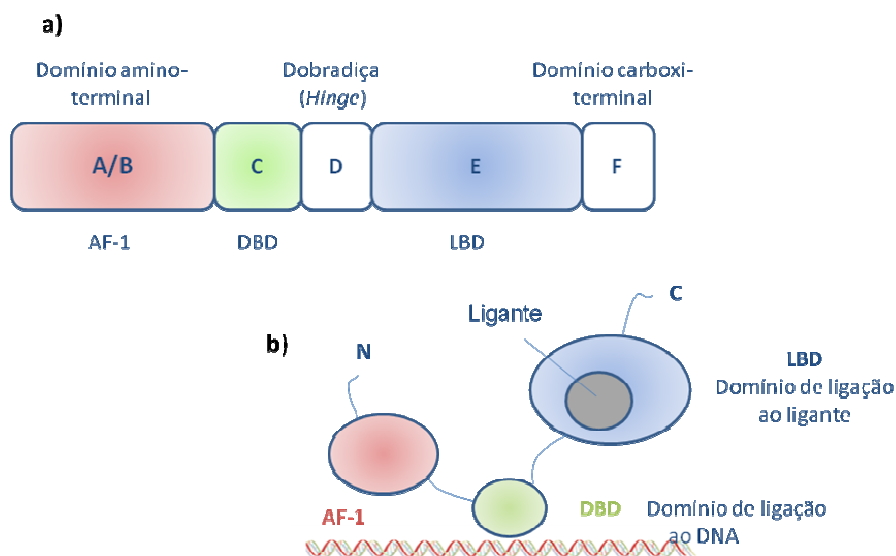


Figura 2.2. Estrutura geral dos receptores nucleares com a representação dos domínios funcionais. **(a)** Estrutura primária, com a região amino-terminal (domínio A/B), domínio de ligação ao DNA (DBD, domínio C), região de dobradiça (hinge, domínio D), domínio de ligação ao ligante (LBD, domínio E), e região carboxi-terminal (domínio F). **(b)** Estrutura secundária, com a representação das regiões amino (N) e carboxi-terminais (C), AF-1, DBD e LBD (13).

Os NRs podem ser divididos em três classes, baseado em seus ligantes fisiológicos e potenciais funções: receptores endócrinos, receptores órfãos adotados e receptores órfãos verdadeiros (**figura 2.3**) (9).

A primeira classe compreende os **receptores endócrinos** que atuam como receptores de hormônios e vitaminas. Essa classe inclui duas subclasses: os receptores esteroidais e os receptores heterodiméricos (9).

Os **receptores esteroidais** formam uma subclasse de NRs que, na ausência do ligante, estão associados a um complexo de proteínas no citoplasma da célula. A ligação do hormônio dissocia os receptores desse complexo, conduzindo-o ao núcleo, onde reconhecem seus respectivos HREs, para assim, regular a transcrição. Pertencem a esta classe os receptores de glicocorticóides (GR), de mineralocorticóides (MR), de androgênios (AR), de estrogênio (ER) e de progesterona (PR) (14).

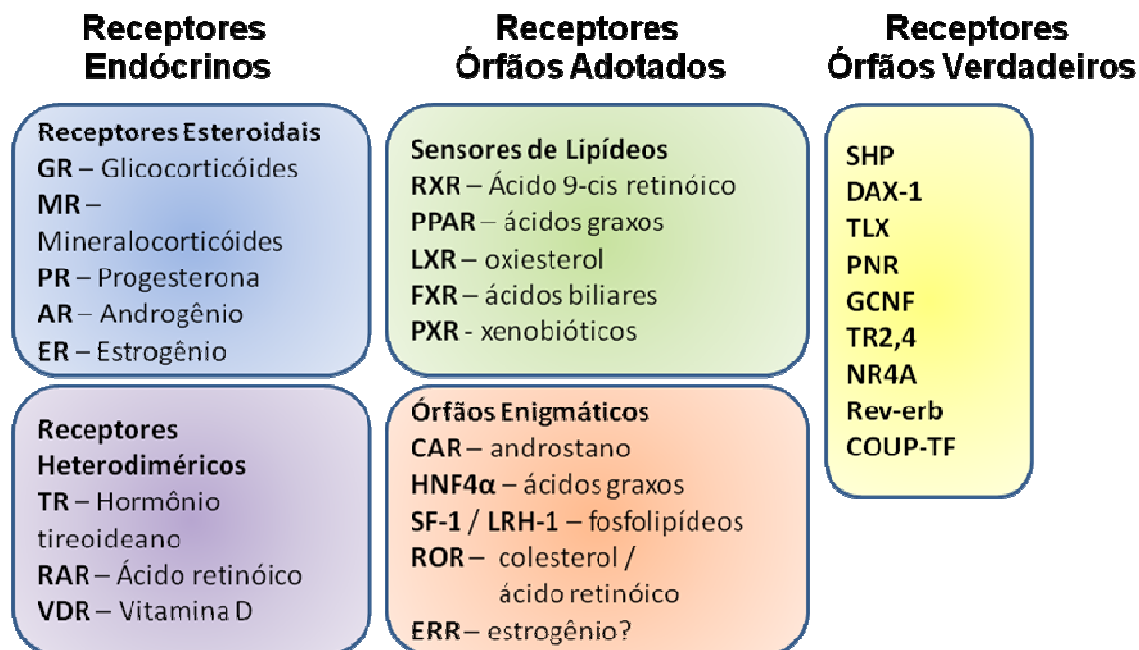


Figura 2.3. A superfamília dos NRs inclui 48 membros. Os ligantes naturais estão descritos à direita. Os receptores endócrinos (em azul, os receptores esteroidais que atuam como homodímeros; e em lilás, os receptores que se heterodimerizam com o RXR) e os receptores órfãos adotados sensores de lipídeos (em verde) já têm sua importância fisiológica estabelecida. A função fisiológica dos receptores órfãos adotados enigmáticos (em laranja) e dos receptores órfãos verdadeiros (em amarelo) ainda não foi definida (9).

Os representantes dos *receptores heterodiméricos* são os receptores do hormônio tireoideano (TRs), do ácido retinóico (RAR) e da vitamina D (VDR). Na ausência do hormônio, estão localizados predominantemente no núcleo da célula, em solução ou ligados ao HRE associados a outro receptor nuclear, o receptor retinóide X (RXR) (15).

A segunda classe de receptores engloba os **receptores órfãos adotados**. Esses receptores foram originalmente identificados devido à homologia de sua seqüência com os receptores endócrinos. Foram denominados receptores órfãos devido à ausência de um ligante conhecido, mas posteriormente correlacionados com a identificação dos ligantes. Esses receptores atuam como heterodímeros com o RXR. Entre os receptores dessa classe, encontram-se os receptores dos proliferadores peroxissomais ativados (PPARs), o receptor do derivado do ácido retinóico, 9-cis ácido

retinóico (RXR), o receptor X hepático (LXR), receptor X do pregnano (PXR), receptor X farnesóide (FXR) (9, 12).

Incluídos nessa classe, estão os denominados *receptores órfãos enigmáticos*, aqueles para os quais o ligante foi identificado, pelo menos para um subtipo, mas a natureza da regulação ligante-depenente na fisiologia ainda não foi estabelecida. Esse grupo inclui receptores em que a atividade ou a interação com co-fatores podem ser modulados em condições não-fisiológicas por estrógenos sintéticos (receptores relacionados com o estrogênio – ERR β e γ) ou por moléculas endógenas tais como o colesterol (receptor órfão relacionado com o colesterol – ROR α), retinóides (ROR β), o androstano (receptor constitutivo de androstano – CAR) ou os fosfolipídeos (fator esteroidogênico – SF1; receptor hepático X homólogo – LRH-1). Também está incluído nesse grupo, o receptor que está constitutivamente ligado a moléculas de ácidos graxos como um componente estrutural (fator nuclear de hepatócito 4 α - HNF4 α) (9, 12).

A terceira classe é composta pelos *receptores órfãos verdadeiros*, para os quais os ligantes, naturais ou sintéticos, ainda não foram identificados. Esses receptores não parecem ser regulados pelos ligantes, mas sim pela disponibilidade de co-ativadores ou expressão do receptor. Apesar de os receptores dessa classe serem de difícil manipulação farmacológica, evidências genéticas indicam que alguns deles estão envolvidos na regulação metabólica (9, 12).

2.1.2 Receptores dos Homônios Tireoideanos

O TR α e o TR β são produtos da expressão de dois genes localizados nos cromossomos 17 e 3, sendo denominados respectivamente THRA e THRB. Por *splicing* alternativo ou utilização de promotores distintos, cada gene produz várias isoformas de TRs: TR α 1, TR α 2, TR α 3, TR α Δ 1, TR α Δ 2, TR β 1, TR β 2, TR β 3 e TR β Δ 3. Está bem descrito que somente as formas α 1, β 1, β 2 e β 3 se ligam ao hormônio (2, 16).

As isoformas TR α 2 e TR α 3 resultam de *splicing* alternativo e diferem do TR α 1 na região carboxi-terminal. TR α Δ 1 e TR α Δ 2 são versões truncadas do TR α 1 e TR α 2, respectivamente, e seus RNA têm origem em um promotor presente no intron 7. Em células transfectadas, as isoformas TR α 2, TR α Δ 1 e TR α Δ 2 impedem a ativação

transcricional induzida por T_3 , mas esse mecanismo ainda é pouco entendido. Inícios alternativos no mRNA do TR α 1 fornecem outras isoformas. Uma dessas isoformas é o p43, que parece ser um receptor presente nas mitocôndrias que regula a transcrição gênica mitocondrial. As isoformas TR β 1, β 2 e β 3 diferem na região amino-terminal (16). A **figura 2.4** apresenta os produtos protéicos dos genes α e β do TR e algumas propriedades (8).

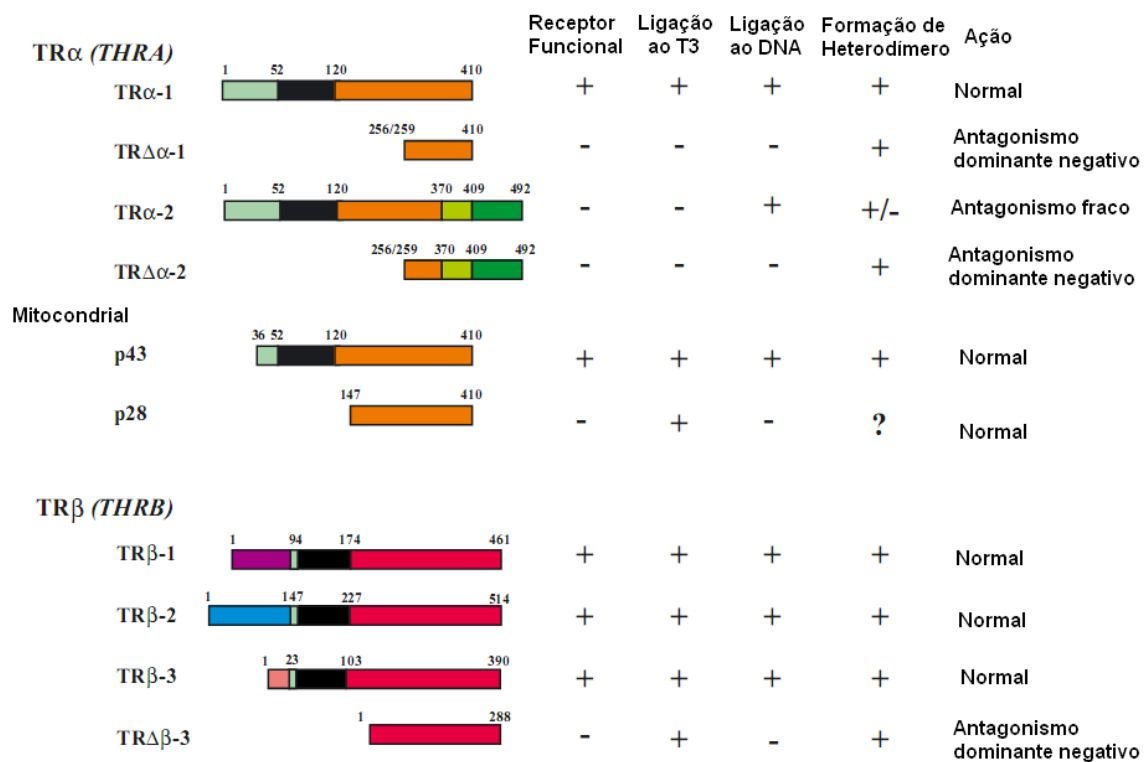


Figura 2.4. Produtos protéicos dos genes α e β do TR (*THRA* e *THRB*). As cores representam regiões idênticas ou divergentes resultante do *splicing* alternativo do mRNA. As regiões em preto representam o DBD (8).

Essas isoformas são expressas de forma específica nos diversos tecidos em humanos. Os mRNAs do TR α 1, TR α 2 e TR β 1 são expressos em quase todos os tecidos, ainda que em concentrações distintas. O TR α 1 é abundante nos músculos esqueléticos, gordura marrom e no coração, o TR α 2 está presente em grande concentrações no cérebro e o TR β 1 é expresso em grande quantidade no fígado, rim e cérebro. Já o TR β 2 é expresso principalmente na glândula pituitária e em outras áreas do cérebro. O TR α Δ 1 e o TR α Δ 2 são encontrados sobretudo no epitélio do intestino delgado, pulmão e durante estágios precoces do desenvolvimento. Em ratos, o TR β 3 é expresso no fígado, rim e pulmão, e o TR β Δ 3 no músculo esquelético, coração, baço e cérebro (2).

Apesar da diferenciação das várias isoformas do TR, não está claro como cada uma delas afeta a transcrição de genes específicos. A maioria dos experimentos de co-transfecção não conseguiu mostrar diferenças transcricionais significativas entre as distintas isoformas de TR em diferentes genes-alvo. Entretanto, existem evidências de que há especificidade para os genes do TRH, TSH e hormônio do crescimento (3). Estudos de microarranjos (*microarray*) de cDNA em camundongos *knockout* para diferentes isoformas de TR sugerem que TR α e TR β possuem efeitos na regulação transcricional complementares e compensatórios em genes-alvo no fígado (17).

2.1.3 Domínios Funcionais dos Receptores do Hormônio Tireoideano

Os domínios funcionais do TR podem ser divididos em: 1) domínio amino-terminal (NTD), 2) domínio de ligação ao DNA (DBD), contendo dois “dedos de zinco”, 3) região de dobradiça (*Hinge*), contendo o sinal de localização celular e, 4) domínio de ligação ao hormônio ou ligante (LBD), e 5) região carboxi-terminal. Cada um desses domínios pode apresentar diversas funções, conforme mostrado na **figura 2.5**, como a dimerização com outro TR ou com o RXR, a localização do HRE na região promotora, e a interação com proteínas co-ativadoras e co-repressoras (1).

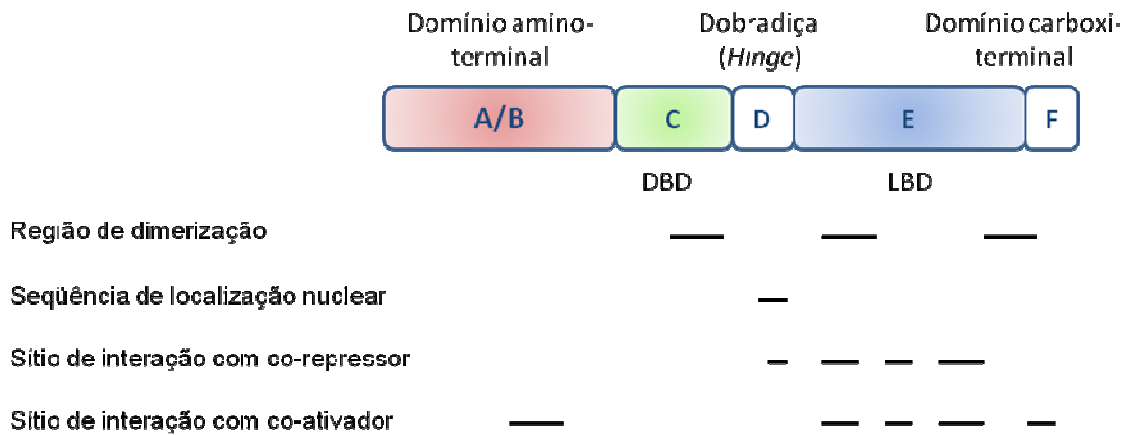


Figura 2.5. Estrutura primária dos domínios do TR com suas funções: região amino-terminal (domínio A/B), domínio de ligação ao DNA (DBD, domínio C), região de dobradiça (*hinge*, domínio D), domínio de ligação ao ligante (LBD, domínio E) e região carboxi-terminal (domínio F). O gráfico indica as regiões do TR que são responsáveis pela dimerização, localização nuclear, interação com co-repressores e co-ativadores (3).

O **domínio amino-terminal** (NTD) atua na transativação e exibe uma função de ativação transcricional independente do ligante, denominada função de ativação 1 (AF-1), importante para os genes regulados positivamente. Além disso, possui sítio de interação com co-ativadores, como o (fator transcricional IIB) (12).

O **domínio de ligação ao DNA** (DBD) tem como principal função a ligação ao DNA. Esse domínio se situa na porção central do receptor e é organizado por dois segmentos estruturais conhecidos como “dedos de zinco”, que são responsáveis pelo reconhecimento específico do HRE e pela dimerização do receptor (2, 12, 18).

A **região de dobradiça** (*hinge*) ainda não está bem caracterizada, mas parece contribuir para que o TR se ligue aos elementos responsivos ao hormônio tireoideano (TREs) com diferentes orientações. Já foi demonstrado que essa região também atua na localização nuclear e na ligação a co-repressores (19).

O **domínio de ligação do hormônio ou ligante** (LBD) localiza-se na região carboxi-terminal e possui diferentes funções, como a ligação ao hormônio, dimerização do receptor e interação com co-ativadores e co-repressores, ou seja, a repressão transcricional e a ativação induzida pelo hormônio. O LBD contém uma superfície que é

fundamental para a ativação transcricional, formada com a ligação do hormônio ao receptor. Após a ligação do hormônio, essa região, denominada função de ativação 2 (AF-2), passa a interagir com os co-ativadores permitindo a formação do complexo protéico envolvido na ativação da transcrição (2, 20).

A estrutura cristalográfica do LBD do TR ligado ao hormônio e do DBD do TR já foram determinadas (21-24). O LBD do TR é composto por 12 α -hélices (H) e 4 folhas β -pregueadas organizadas em três camadas (**figura 2.6**). Esses resultados sugerem que, após a ligação do T_3 , ocorre o dobramento da hélice 12 sobre as hélices 3, 4 e 5 criando uma superfície hidrofóbica que propicia a interação com co-ativadores e impede a ligação com co-repressores (16).

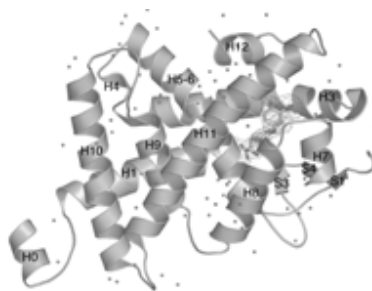


Figura 2.6. Demonstração das α -hélices e das folhas β -pregueadas que compõem o LBD em presença do hormônio, que se aloja no centro da proteína. Observações: H0 hélice representa a última hélice do DBD. H2 e S2 não são visualizadas. A cristalização e a determinação da estrutura do TR β foi realizada pelo Grupo de Cristalografia de Proteínas e Biologia Estrutural do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (2).

2.1.4 Elementos Responsivos ao Hormônio Tireoideano (TREs)

Para regular a transcrição de proteínas, os TRs se ligam a sítios específicos na sequência de DNA, denominados elementos responsivos ao hormônio tireoideano (TREs) (2, 9, 25). Essa ligação pode ocorrer na forma de monômeros, homodímeros ou heterodímeros (2, 12, 18).

Os TREs estão localizados na região promotora dos genes-alvo. O promotor de um gene (**figura 2.7**), situado na região não-transcrita 5' (antes da parte transcrita), contém sítios de ligação para os fatores de transcrição, como a enzima RNA polimerase, por exemplo. Sua função é sinalizar como o processo de transcrição irá ocorrer, onde será o início da transcrição, quando e quanto do gene será transcrito (26).

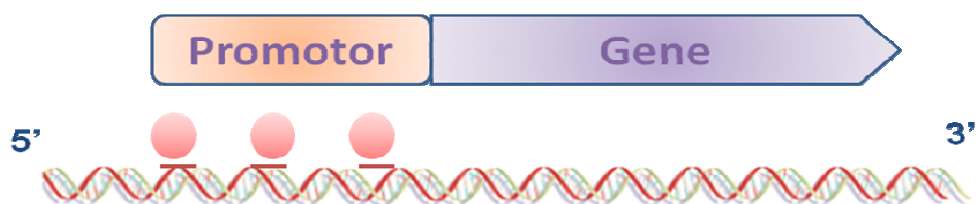


Figura 2.7. O promotor de um gene, localizado na região 5', contém pequenas seqüências (<10 pares de base – pb) que se estendem pela região onde a transcrição se inicia. A região promotora pode conter 200 pb. Os círculos em vermelho no promotor ilustram diversas regiões específicas que são reconhecidas por fatores de transcrição.

As regiões no DNA reconhecidas pelo DBD do TR são compostas pela seqüência hexanucleotídica AGGTCA e podem estar organizadas em três orientações diferentes: na forma de repetição direta espaçada por quatro nucleotídeos quaisquer (DR-4), na forma de palíndromo invertido espaçada por seis nucleotídeos quaisquer (F2) ou na forma de palíndromo sem nenhum espaçamento (TREpal) (**figura 2.8**). Aproximadamente 30 TREs naturais já foram identificados, sendo que a maioria é DR-4, seguido por F2 e menos freqüentemente o TREpal (27).

A ordem, a orientação e a distância entre os hexâmeros dos TREs acarretam diferenças na interação TR-TRE. Por exemplo, DR-4 é descrito como o principal sítio para a interação do heterodímero TR-RXR, enquanto os homodímeros TR-TR aparentemente se ligam de forma mais eficiente ao palíndromo invertido (F2) (27, 28).

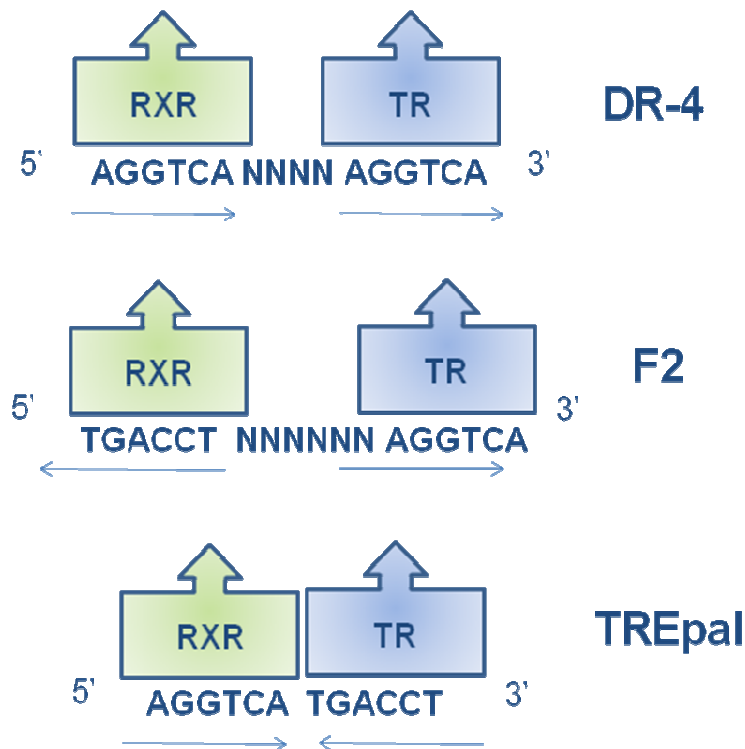


Figura 2.8. Elementos responsivos ao TR (TREs): repetição direta (DR-4), palíndromo invertido (F2) e palíndromo (TREpal). O N indica o número de nucleotídeos entre os hexâmeros (2).

2.1.5 Mecanismo de Ação do Hormônio Tireoideano

A ligação do TH altera a estrutura tridimensional do TR e sua capacidade de ligação a outras proteínas. O TR, na ausência do hormônio, encontra-se associado ao DNA em um complexo com proteínas co-repressoras (29, 30) como, por exemplo, o NCoR (co-repressor de receptor nuclear) e o SMRT (mediador silencioso para o TR e RAR) (31-33). Essas proteínas se associam a outros co-repressores como Sin3 e HDAC (complexo de desacetilase das histonas) (15, 34-36) (**figura 2.9**). A desacetilação das histonas da cromatina próxima aos TREs auxilia a manter a estrutura da cromatina em um estado que reprime a transcrição basal (a histona desacetilada torna a cromatina mais condensada) (26).

Após a ligação do TH, ocorre uma alteração na conformação do TR, que resulta na liberação das proteínas co-repressoras (30, 31) e no recrutamento de proteínas co-

ativadoras (7). Vários co-ativadores foram identificados como GRIP-1 (proteína 1 que interage com GR) e SRC-1 (co-ativador 1 do receptor esteróide) (37). As proteínas co-ativadoras possuem atividade de acetilação das histonas, promovendo o relaxamento da cromatina, o que facilita a interação deste complexo com os componentes da maquinaria de transcrição basal (MTB) no promotor dos genes-alvo (**figura 2.9**) (26). O recrutamento de um determinado co-ativador e seu padrão temporal de recrutamento são determinantes para a especificidade e força da transcrição de um gene (3).

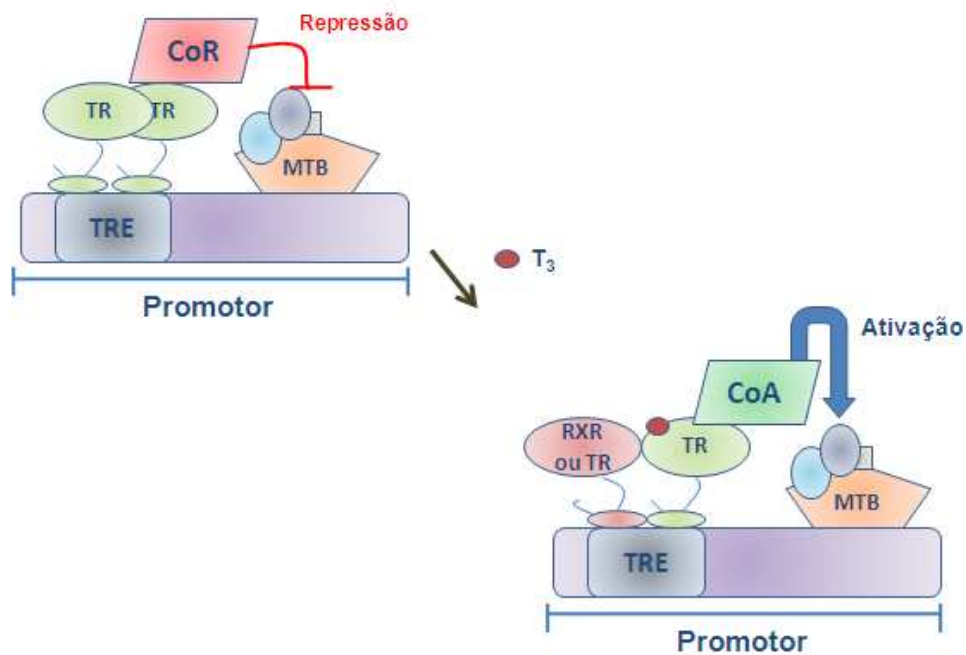


Figura 2.9. Representação do mecanismo de ação do TR. Na ausência do TH, o TR está ligado ao TRE como homodímero associado a co-repressores que atuam inibindo a maquinaria de transcrição basal (MTB). A ligação do TH ao TR propicia mudanças conformacionais que conduzem à dissociação de homodímeros (TR/TR) e associação de heterodímeros (TR/RXR), liberação dos co-repressores e associação com co-ativadores que agem sobre a MTB ativando a transcrição de genes-alvo (2).

2.1.6 Regulação Transcricional dos Receptores do Hormônio Tireoideano

A interação do TH com seus receptores nucleares leva à ativação ou inibição da expressão dos genes-alvo, o que implica no estímulo ou bloqueio da síntese de proteínas específicas, mecanismo pelo qual o TH exerce os seus efeitos biológicos nas células (38).

Como exemplo de genes-alvo regulados positivamente, há o gene do hormônio do crescimento (39), mecanismo pelo qual o TH participa ativamente do processo de crescimento. Também ativa a transcrição do gene da miosina de cadeia pesada tipo I e II (MHC I e II) (40), responsáveis pelo aumento da velocidade de contração no músculo cardíaco e esquelético, respectivamente.

O efeito de repressão clássica do TR ocorre com os genes do TSH (41) e do TRH (42), o que constitui a base molecular do mecanismo de retroalimentação negativa sobre a hipófise e o hipotálamo, respectivamente.

A) Regulação Transcricional Positiva

Para os genes positivamente regulados, o TR ativa a transcrição quando ligado aos THs. Por outro lado, na ausência dos THs, o TR encontra-se ligado ao TRE e reprime (ou silencia) a transcrição basal (**figura 2.10.a**) (3). As proteínas co-repressoras recrutadas pelo TR não ligado são responsáveis pela repressão basal (35, 43).

Quando o TR não está presente na célula ou não tem capacidade funcional, como, nos pacientes com mutações no DBD do TR que impedem sua ligação ao DNA, observa-se uma transcrição residual dos genes-alvo (**figura 2.10.b**) (44, 45).

O fato de o TR alterar a transcrição de genes-alvo na ausência e na presença dos THs traz importantes implicações para sua ação. Em baixas concentrações de hormônio, tal como ocorre no hipotireoidismo, o receptor não ligado reprime a expressão gênica mais do que se o receptor fosse não funcional. Esse modelo é comprovado por experimentos realizados com camundongos *knockout* para os genes THRA e THRB. Os fenótipos desses camundongos, que não possuem a proteína TR, são mais brandos justamente devido à transcrição residual dos genes-alvo quando comparados ao fenótipo dos camundongos com hipotireoidismo congênito, que

possuem a proteína TR, mas o hormônio está presente em baixas concentrações (3, 17, 46).

Como visto anteriormente, a ligação do T_3 ao TR provoca mudanças conformacionais na estrutura do receptor, favorecendo a dissociação do TR com os co-repressores e a interação com proteínas co-ativadoras, ativando a expressão gênica (**figura 2.10.c**) (2).

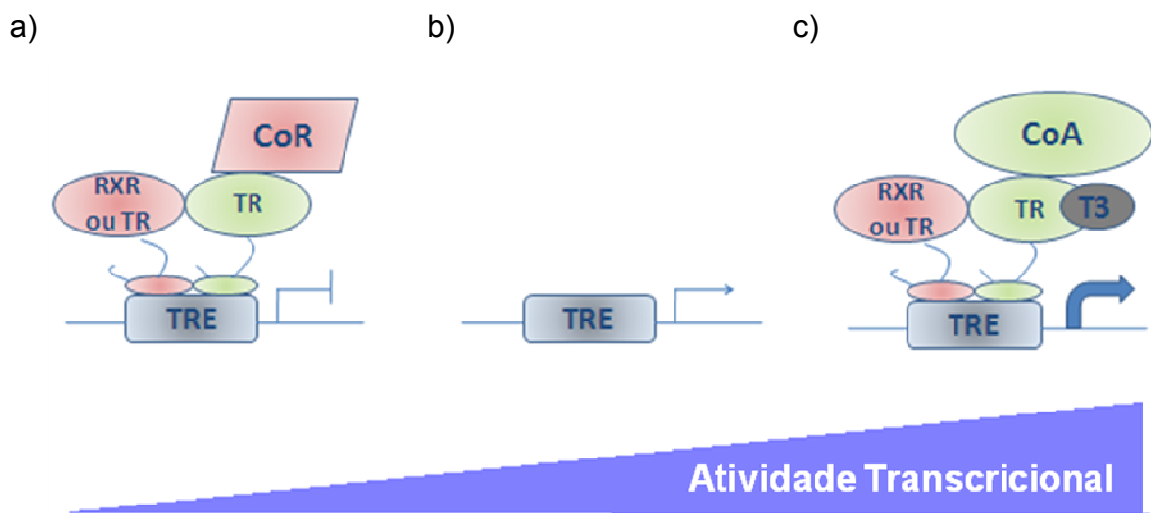


Figura 2.10. Regulação da expressão gênica do TR em um TRE positivo em três situações: **(a)** O TR ligado ao TRE como homo ou heterodímero com RXR na ausência do ligante recruta moléculas co-repressoras (CoR), interferindo na MTB, promovendo a repressão; **(b)** Na situação de ausência do TR (*knockout*), há a transcrição basal de genes-alvo; **(c)** Na presença do ligante, o TR/TR ou TR/RXR libera os co-repressores e recruta os co-ativadoras (CoA), e interagem diretamente com a maquinaria basal, o que leva a um aumento da atividade transcripcional do receptor (47).

B) Regulação Transcricional Negativa

Os TRs também podem influenciar negativamente a expressão gênica. Ao contrário do que ocorre com os genes regulados positivamente, a atividade transcripcional dos genes regulados negativamente pode ser ativada na ausência do hormônio e diminuída em sua presença (3).

Ao contrário dos genes-alvo regulados positivamente por T_3 , cujo mecanismo de ação está melhor caracterizado, o mecanismo molecular envolvido na regulação negativa é complexo e ainda não está totalmente compreendido. Alguns desses mecanismos de regulação negativa do TR vêm sendo propostos, no entanto nenhum deles até o momento conseguiu elucidar todas as questões. Várias explicações têm sido aventadas: 1) ligação direta do TR ao DNA, via DBD. Nesse caso, diferentemente do descrito na regulação positivo, o TR ligado a correpresores é capaz de ativar a transcrição e com a chegada do T_3 recruta co-ativadores que reprimem a transcrição (**figura 2.11.a**); 2) ligação indireta do TR ao DNA, via interação com outras proteínas que reprimem a transcrição (**figura 2.11.b**); e 3) TR não ligado ao DNA, na ausência de T_3 “seqüestraria” co-repressores da região promotora ativando a transcrição. Por outro lado, ao se ligar ao T_3 , TR sequestraria co-ativadores ligados ao promotor reprimindo indiretamente a transcrição (**figura 2.11.c**) (48).

Nesse sentido, alguns estudos demonstraram que na ausência do ligante, os co-repressores aumentam a transcrição basal dos genes regulados negativamente. Paradoxalmente, na presença do ligante, os co-ativadores parecem estar envolvidos na repressão desses genes (3). Assim, os mutantes de TR que não interagem com moléculas co-repressoras apresentam redução na ativação da transcrição dos genes regulados negativamente na ausência do hormônio e a superexpressão de co-repressores provoca efeito contrário (2).

Um exemplo de regulação negativa promovida pelo TR é o efeito desse receptor sobre o promotor da superóxido dismutase 1 (SOD-1), uma enzima que atua no metabolismo de espécies reativas de oxigênio. Foi demonstrado que o promotor da SOD-1 é significativamente ativado pelo TR não-ligado e a presença de T_3 reprime a transcrição do promotor da SOD-1 através da interação do DBD do TR com um elemento inibitório no promotor da SOD-1. Além disso, o TR também necessita da interação com co-repressores para ativar a transcrição da SOD-1 na ausência de T_3 e da interação com co-ativadores para a repressão na presença de T_3 (49).

A necessidade da presença de uma superfície intacta de ligação a co-ativadores para a repressão da transcrição mediada por TR ligado ao T_3 foi confirmada em um modelo de camundongos transgênicos com uma mutação na região AF-2 de

TR β , que abole completamente a ligação a co-ativadores. Nesses animais observou-se concentrações de TSH e T₃ inapropriadamente elevadas na glândula pituitária. O tratamento com hormônio não diminuiu as concentrações de TSH na pituitária, demonstrando a necessidade da ligação TR/co-ativadores para a repressão gênica (50).

Na repressão da transcrição que não envolve a associação do TR ao DNA, o TR pode interagir com outras proteínas que estão ligadas diretamente ao DNA, como, por exemplo, o complexo AP-1 (um fator de transcrição heterodimérico composto por c-jun e c-fos). Há indícios de que a repressão do promotor da prolactina mediada por T₃ ocorra devido à inibição da ligação de AP-1 (2, 3). Entretanto, existem casos em que a interação TR-DNA não é absolutamente necessária. Conforme abordado anteriormente, o TR pode agir seqüestrando co-ativadores e co-repressores de outros fatores de transcrição que utilizem os mesmos co-fatores, como por exemplo, o complexo AP-1 (48). O mecanismo preciso pelo qual o TR exerce essa regulação negativa ainda é desconhecido.

Como descrito anteriormente, o TH regula a transcrição de genes envolvidos em diferentes processos biológicos. Dentre eles, as proteínas do sistema da coagulação e fibrinólise, tais quais o fibrinogênio, o fator de coagulação X e a trombina, por exemplo, têm-se mostrado alvos de regulação deste hormônio, (51).

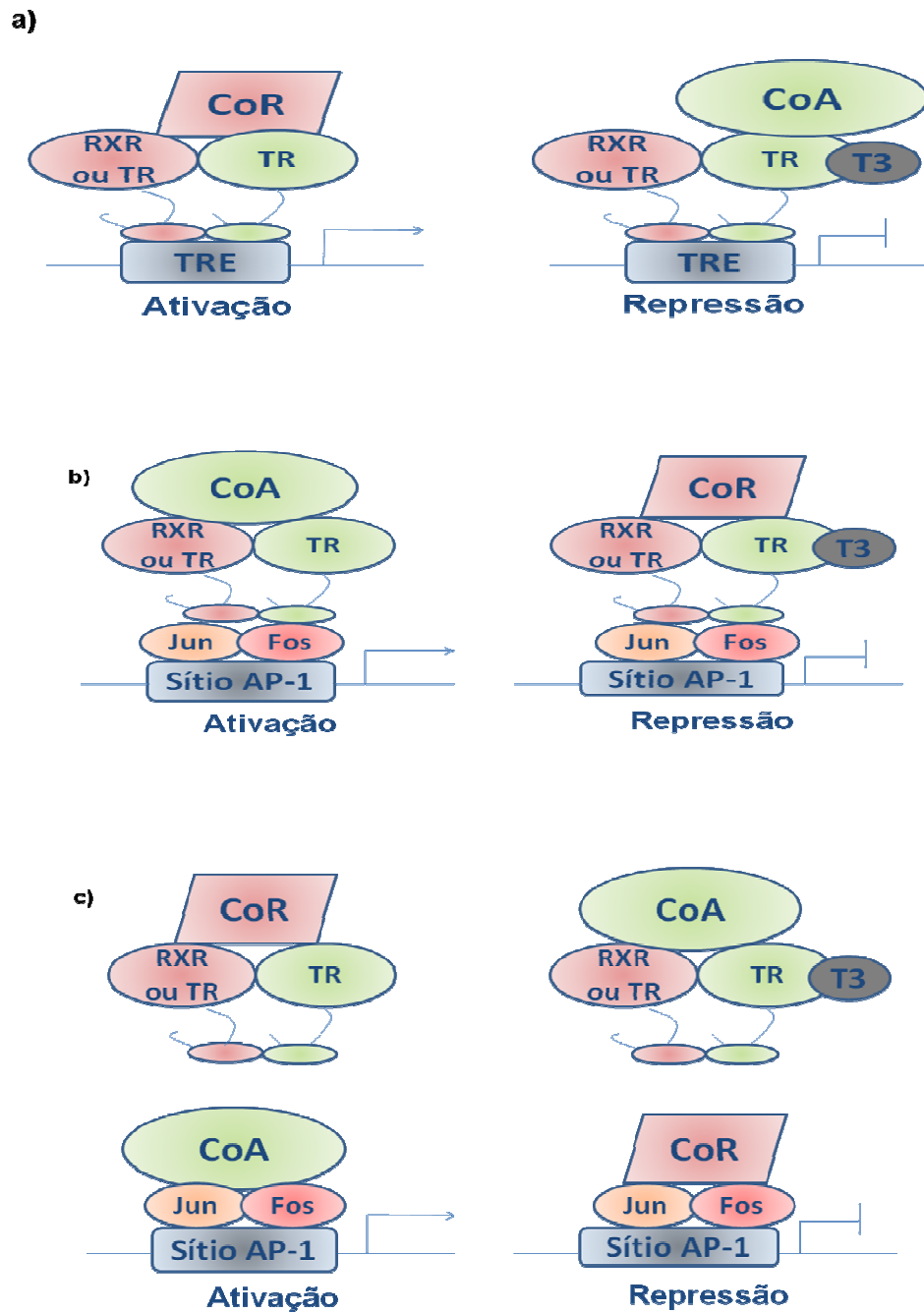


Figura 2.11. Um mecanismo proposto para a regulação gênica negativa mediada pelo TH. **a)** O TH liga-se ao TR promovendo a troca de co-repressores por co-ativadores ligados ao TR no nTRE. Esse mecanismo requer necessariamente a ligação direta do TR ao DNA. **b)** TH liga-se ao TR promovendo a troca de co-ativadores por co-repressores ligados em um contexto de interação proteína-proteína ao DNA, mostrado nessa ilustração com o complexo AP-1 (jun/fos). **c)** TH liga-se ao TR e recruta co-ativadores previamente ligados a outros fatores de transcrição, como o complexo AP-1 (48).

2.2 O Hormônio Tireoideano e O Sistema Hemostático

As doenças da tireóide constituem uma das endocrinopatias mais comuns. Diversos fatores estão envolvidos na gênese das disfunções tireoideanas, entre os quais os mecanismos auto-ímmunes, os fatores genéticos associados ao sistema HLA (antígenos leucocitários humanos) e os ambientais. A deficiência de THs no período intra-uterino e neonatal pode causar desde leves problemas no desenvolvimento cognitivo, até graves danos neurológicos, limitado crescimento ósseo e surdez neurosensorial (52, 53).

O hipertireoidismo é uma síndrome na qual os tecidos são expostos a quantidades excessivas de TH, tendo como causas principais a doença de Graves, o bócio multinodular tóxico e o adenoma tóxico. A maioria dos sinais e sintomas é comum a todos os tipos de hipertireoidismo, independentemente de sua etiologia. A apresentação clínica depende da gravidade do hipertireoidismo, duração da doença, susceptibilidade individual ao TH e da idade do paciente (52, 53).

O hipotireoidismo é a causa mais freqüente de deficiência hormonal, apresentando amplo espectro de manifestações clínicas que variam desde um quadro assintomático até o coma, com falência de múltiplos órgãos e sistemas. A maioria dos casos (90 a 95%) têm origem em anormalidades da própria glândula tireóide (hipotireoidismo primário), porém também pode ser causado por doença hipofisária ou hipotalâmica (hipotireoidismo secundário ou terciário), respectivamente. Nos adultos, a causa mais comum é a doença auto-ímmune, sendo o principal exemplo a doença de Hashimoto ou tireoidite linfocítica crônica (52, 53).

O quadro clínico apresentado por pacientes com disfunções da tireóide inclui grande variedade de comorbidades associadas. Dentre elas, encontram-se os distúrbios relacionados com o sistema hemostático. Os primeiros relatos clínicos descrevendo a associação entre tireotoxicose e trombose em veia cerebral foram descritos por Kaliebe (1913) e Doyle (1927) (54). Posteriormente, outros casos clínicos relacionando eventos trombóticos com o hipertireoidismo, especialmente com a doença de Graves, foram publicados (55-61).

Além disto, há evidências de que o hipertireoidismo piora o prognóstico de algumas condições clínicas, como por exemplo, a fibrilação atrial. A fibrilação atrial é uma das complicações cardiovasculares mais freqüentes em pacientes com hipertireoidismo, com prevalência de 10% a 15%. Alguns estudos epidemiológicos evidenciam que há associação positiva entre a fibrilação atrial tireotóxica e a ocorrência de acidente vascular cerebral e embolismo sistêmico (54, 62, 63).

Entretanto, não se sabe ao certo se os eventos trombóticos descritos sejam causados diretamente pelo aumento do TH ou sejam secundários a outros processos concomitantes como, por exemplo, as alterações imunológicas presentes no hipertireoidismo da doença de Graves (64).

Por outro lado, o aumento na morbidade cardiovascular observada nos pacientes com hipotireoidismo pode ser atribuído a tradicionais fatores de risco como a elevação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a hipertensão diastólica (65, 66). Entretanto, dados clínicos evidenciam outros fatores de risco para a aterosclerose, como a hiperhomocisteinemia e a disfunção endotelial, que podem estar presentes mesmo no hipotireoidismo subclínico (67, 68).

A disfunção endotelial é um evento que ocorre precocemente nos processos ateroscleróticos e pode ser o elo que explica a ocorrência de doenças vasculares nos pacientes com hipotireoidismo. Há estudos clínicos que relatam a melhora da função endotelial com o tratamento do hipotireoidismo com o TH (67, 69).

Em uma revisão sistemática, Squizzato *et al.* (2007) avaliou diversos estudos de caso-controle (70, 71) e de intervenção (69, 72-77) com o objetivo de resumir sistematicamente o efeito do excesso ou deficiência do TH no sistema hemostático *in vivo*. Apesar de existir vários resultados conflitantes, esse grupo concluiu que a soma dos resultados dos trabalhos sugere que as disfunções da tireóide alteram o balanço coagulação-fibrinólise, promovendo um risco aumentado para sangramento no hipotireoidismo e de trombose no hipertireoidismo (64).

Uma dificuldade para se estabelecer a relação entre a função tireoideana e o balanço hemostático é o fato de muitas proteínas reguladas por T₃ participarem desse processo. Entretanto, pode-se destacar o inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1 (PAI-1), um fator inibitório da fibrinólise cujo aumento está associado a um maior risco

de complicações trombóticas. Vários estudos clínicos realizados com pacientes com disfunções da tireóide evidenciam uma alteração nas concentrações plasmáticas de PAI-1 (64).

2.2.1 Hormônio Tireoideano e Inibidor do Ativador do Plasminogênio 1 (PAI-1)

Diversos ensaios clínicos já tentaram elucidar a relação existente entre o hormônio tireoideano e o PAI-1 (74, 78-83). Os autores encontraram uma forte correlação positiva entre as concentrações de PAI-1 e as concentrações de T₃ e T₄. Esses autores observaram que os pacientes com hipotireoidismo apresentavam a capacidade fibrinolítica aumentada, promovendo risco de sangramento, e aqueles com hipertireoidismo apresentavam a capacidade fibrinolítica diminuída, favorecendo a formação de trombos (74, 80, 81, 83). Esse resultado está em concordância com alguns estudos realizados na década de 70 (78, 79).

Outro estudo avaliou as alterações em proteínas do sistema fibrinolítico em pacientes que tinham câncer de tireóide e passaram um período em terapia de supressão do hormônio tireoideano. Os autores observaram que quando os pacientes estavam no estado hipertireoideo, as concentrações de fator VIII, fibrinogênio, antitrombina, t-PA e PAI-1 estavam aumentadas em relação ao período em que estavam no estado hipotireoideo. Concluíram que, em nível bioquímico, o TH parece ser pró-coagulante e antifibrinolítico (82).

Os resultados parecem convergir para o fato de os pacientes com hipertireoidismo manifestado e hipotireoidismo subclínico terem o nível do PAI-1 aumentado e, conseqüentemente, diminuída capacidade fibrinolítica, favorecendo a formação de trombos. Para os pacientes com hipotireoidismo manifestado, parece que o nível plasmático de PAI-1 é baixo.

Apesar de estar evidente que existe relação entre a função tireoideana e concentrações plasmáticas de PAI-1, o mecanismo responsável por essa relação não é conhecido (64).

2.3 O Inibidor do Ativador de Plasminogênio Tipo 1 (PAI-1)

2.3.1 O Sistema Fibrinolítico

Sob condições fisiológicas, os sistemas de coagulação e de fibrinólise garantem simultaneamente que não ocorra perda excessiva de sangue e formação de trombos intravasculares. Quando um vaso se rompe, uma série de mecanismos para a constrição vascular, formação de tampão de plaquetas, de coágulo de fibrina e crescimento de tecido fibrótico permanente no vaso sanguíneo são ativados. A formação de coágulos de fibrina em sítios de lesão endotelial representa um processo crítico para a manutenção da integridade vascular. Por outro lado, a ativação do sistema fibrinolítico permite a precisa remoção de depósitos de fibrina formados, garantindo a fluidez do sangue. O equilíbrio funcional desses sistemas é garantido por vários mecanismos, como interações entre proteínas, respostas celulares complexas e regulação do fluxo sanguíneo (84-86).

A fibrinólise é definida como a degradação da fibrina mediada pela plasmina. No sangue, é responsável pela degradação da fibrina e por manter a integridade vascular. Nos outros tecidos, é responsável por quebrar a matriz extracelular e controlar a adesão e migração celular, nos processos de fibrose tecidual (84, 87).

O sistema fibrinolítico é composto por diversas proteínas (proteases séricas e inibidores). A plasmina, produzida a partir do plasminogênio ativado, é a enzima responsável por produzir os produtos de degradação da fibrina (PDF) (84).

A degradação da fibrina produz uma série de produtos moleculares distintos. Quando a fibrina, que está ligada ao fator XIII, é degradada pela plasmina, fragmentos conhecidos como dímeros-D são liberados. Altas concentrações de dímeros-D na corrente sanguínea indicam, na prática clínica, estados de coagulação disseminada. Outros PDFs formados também parecem ter atividade biológica, como inibição da função plaquetária, potencialização dos efeitos hipotensores da bradicinina, quimiotaxia e imunomodulação (85).

São conhecidos dois ativadores fisiológicos do plasminogênio: o ativador do plasminogênio do tipo tecidual (t-PA) e o ativador do plasminogênio do tipo uroquinase (u-PA). O t-PA, considerado o ativador primário da fibrinólise, liga-se à fibrina e converte

o plasminogênio em plasmina presente no coágulo (88). De forma distinta, o u-PA possui baixa afinidade pela fibrina, mas é a principal forma expressa de ativadores de plasminogênio (PAs) em células migratórias e sua atividade é mediada pelo receptor de u-PA (u-PAR). O u-PA se liga ao u-PAR presente na superfície das células para iniciar sua atividade de proteinase, levando indiretamente à ativação da plasmina (89).

A repressão desse sistema ocorre por meio da inibição dos ativadores do plasminogênio (PAs) mediante ação de inibidores específicos (PAIs), cujo principal representante é o PAI-1, e diretamente sobre a plasmina, função inibitória exercida pela α 2-antiplasmina (**figura 2.12**) (90).

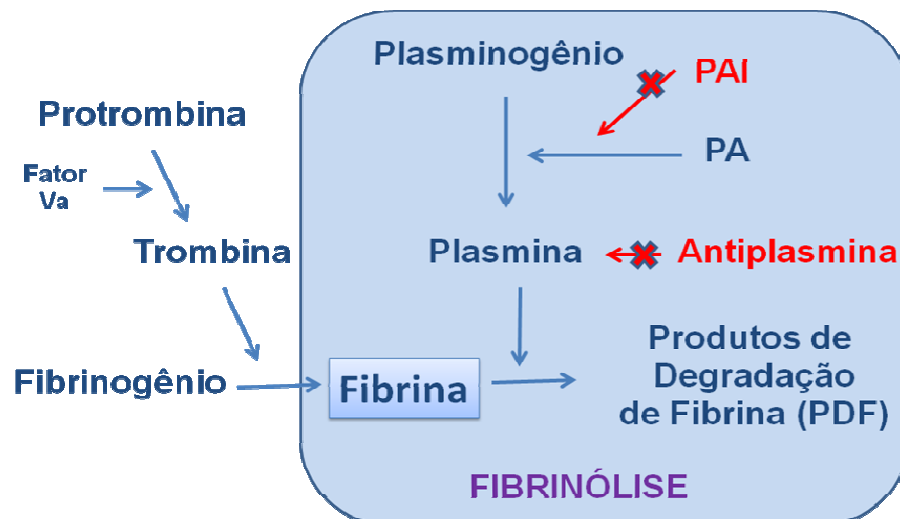


Figura 2.12. Mecanismo de formação e degradação de fibrina pelo sistema fibrinolítico. O fator de coagulação Va ativa a protrombina, formando a trombina (fator de coagulação IIa) que converte o fibrinogênio em fibrina. O coágulo sangüíneo é composto por uma rede de fibrinas, que se adere a qualquer abertura vascular, impedindo a perda de sangue. Os ativadores de plasminogênio (PA) favorecem a formação da plasmina a partir do plasminogênio. A plasmina promove a degradação da fibrina em produtos de degradação da fibrina (PDF). Esse sistema pode ser reprimido mediante a inibição dos ativadores de plasminogênio (PAI) ou por meio da inibição direta da plasmina (antiplasmina).

A fibrinólise é regulada principalmente pelos inibidores de PA, que freiam o potencial destrutivo desse sistema proteolítico. Os inibidores de PA, ao inibir a fibrinólise, perpetuam o estado pró-trombótico e aumentam a predisposição para a formação de placas ateroscleróticas. Atualmente são conhecidas cinco moléculas que inibem os PA *in vitro*: **PAI-1**, **PAI-2**, **PAI-3**, **protease nexina (PN-1)** e **neuroserpina** (91).

O PAI-1 é o inibidor fisiológico primário de t-PA e u-PA *in vivo* e tem se mostrado o principal inibidor do sistema fibrinolítico (85). Os aspectos relacionados a sua descoberta, estrutura, mecanismo de ação, propriedades, conseqüências patológicas e expressão gênica serão explorados ao longo deste trabalho.

O PAI-2 é o regulador primário da ativação do plasminogênio no compartimento extravascular. O gene que codifica o PAI-2 está localizado no cromossomo 18 (92). O PAI-2 inibe o u-PA e t-PA de cadeia dupla, mas é um inibidor fraco de t-PA de cadeia simples (93). Altas concentrações de PAI-2 são encontrados em queratinócitos e macrófagos, sugerindo sua atuação na manutenção e integridade da epiderme e na defesa contra invasores. Também são encontrados altas concentrações de PAI-2 no trofoblasto humano, indicando possível participação no desenvolvimento embrionário (94). Concentrações significantes de PAI-2 são detectados no plasma humano somente durante a gestação (85).

O PAI-3 inibe os ativadores de plasminogênio, mas tem como principal substrato a proteína C. A proteína C é uma serino-protease dependente de vitamina K presente no plasma e que, quando ativada, atua como um potente anticoagulante, regulando a atividade de alguns fatores de coagulação, como o Fator Va e VIIIa (95-97). Seu gene está localizado no cromossomo 14 e possui similaridade estrutural com o PAI-1 (98).

A protease nexina 1 (PN-1) tem como substrato a trombina, mas também é um inibidor de u-PA. Seu gene está localizado no cromossomo 2 (99). A PN-1 é expressa em grande quantidade no sistema nervoso, onde se concentra nas junções neuromusculares e nas sinapses centrais do hipocampo e do estriato, exercendo atividade sobre o desenvolvimento, manutenção e remodelamento das sinapses nervosas (100).

A **neuroserpina**, descoberta recentemente, regula a atividade de t-PA no cérebro (101). O gene que codifica a neuroserpina está localizado no cromossomo 3 (102). A análise de distribuição tecidual revela que a expressão neuronal ocorre predominantemente durante os estágios tardios da neurogênese e, no cérebro adulto, em áreas em que as sinapses nervosas estão associadas com a aprendizagem e memória (plasticidade sináptica) (103). A neuroserpina também promove proteção neuronal em doenças como a isquemia cerebral e epilepsia, pois previne a atividade excessiva do t-PA (104).

2.3.2 PAI-1: Aspectos Gerais

A) Descoberta

Muitos esforços foram realizados para o entendimento do sistema fibrinolítico. Em 1950, Tagnon e Palade demonstraram a existência de um PA em células de mamíferos. A presença dessa proteína explicou o quadro de fibrinólise nos pacientes com choque hemorrágico, por queimadura ou trauma (105).

Depois desse primeiro estudo, outros aspectos do sistema fibrinolítico foram elucidados. Um ponto fundamental foi a descoberta de que o endotélio participa ativamente do processo hemostático, não só por ser a interface entre o sangue e os tecidos, mas porque sintetiza e secreta moléculas biologicamente funcionais, como, por exemplo, a trombosmodulina, o fator de Von Willebrand, o fator de crescimento endotelial vascular e o óxido nítrico (91, 106, 107).

Após a descoberta dos ativadores de plasminogênio (o u-PA e o t-PA), foi identificada a existência dos inibidores dos ativadores do plasminogênio (PAI), cujo principal representante é o PAI-1 (87, 91, 108-119). O gene PAI-1 humano está localizado no braço longo do cromossomo 7 (120, 121). Muitos estudos têm sido realizados na tentativa de entender a regulação gênica dessa proteína (122-124).

A geração de camundongos PAI^{-/-} (que não expressavam a proteína PAI-1) possibilitou o início dos estudos do papel de PAI-1 na trombose (125, 126). Ao provocar lesão arterial e trombose por cloreto de ferro (FeCl₃) em camundongos PAI^{-/-},

pesquisadores demonstraram que o trombo formado na carótida lesionada era menos estável e formava êmbolos com maior frequência quando comparado aos camundongos PAI^{+/+} (que expressavam a proteína PAI-1) (127-129). Nos camundongos PAI^{-/-}, a instabilidade do trombo reflete a exacerbada atividade dos PAs levando a um aumento na produção de plasmina e desenvolvimento de um estado hiperfibrinolítico (130).

B) Propriedades

O PAI-1 é uma glicoproteína de cadeia simples pertencente à família das serpinas contendo 402 aminoácidos com um peso molecular de 45 kDa (proteína não glicosilada) (131). A forma madura secretada de PAI-1 consiste em 379 aminoácidos e contém aproximadamente 13% de carboidrato, o que aumenta o peso molecular para 50kDa (132).

A origem do PAI-1 circulante em condições normais e patológicas ainda constitui fonte de especulação. Estudos em humanos sugerem que o fígado seja a fonte primária. Entretanto, o PAI-1 também pode ser identificado em células endoteliais, plaquetas, placenta, células vasculares musculares, células mesangiais, fibroblastos, monócitos/macrófago, no estroma do tecido adiposo e no plasma. Após sua síntese, é rápida e constitutivamente secretado. Não é armazenado no interior das células, exceto nas plaquetas, que contém a forma inativa de PAI-1 (91).

Os complexos entre PAs e PAI-1 são desfeitos pela via dependente dos receptores de lipoproteínas de baixo peso molecular (LRP) (106). Uma vez ligado ao PA, o PAI-1 perde sua capacidade de ligação à vitronectina (VN), mas aumenta sua afinidade pelos receptores de depuração como o LRP. O local de eliminação *in vivo* é o fígado (133).

C) Estrutura

A estrutura do PAI-1 humano revelou significativa homologia com membros da família de proteínas inibidoras de serino-proteases (serpinas) (131, 134-136). O PAI-1

foi caracterizado como uma arg-serpina, pois contém um resíduo de arginina em seu centro reativo (137, 138).

O modelo da estrutura terciária das proteínas da família das serpinas foi gerado a partir de estudos de cristalografia. Observou-se que as serpinas possuem uma estrutura terciária similar, contendo 3 folhas β -pregueadas (A, B e C), 9 α -hélices (A a I) e uma alça central de reação (RCL) (132, 139). A estrutura terciária do PAI-1 está demonstrada na **figura 2.13** (140).

A alça central de reação (RCL) (em vermelho, na **figura 2.13**) do PAI-1, localizada na região carboxi-terminal da molécula, contém um sítio Arg₃₄₆/Met₃₄₇ que atua como um pseudosubstrato para a serino-protease alvo e fornece a especificidade da reação (132). A inibição dos PAs pelo PAI-1 ocorre de maneira rápida e estequiométrica, e o inibidor é consumido no processo, sendo um “inibidor suicida” (140).

O PAI-1 ativado precisa se complexar com a vitronectina (VN). Essa interação não só estabiliza o inibidor, pois aumenta a meia-vida de 2 a 10 vezes, mas também altera a sua especificidade, impedindo que se ligue a outras serino-proteases, como a trombina por exemplo. Então, a VN parece ser o cofator de PAI-1 (141).

O sítio de afinidade por PAI-1 na molécula de VN já foi mapeado e é denominado domínio somatomedina B (SMB). A estrutura cristalográfica do complexo PAI-SMB sugere que o mecanismo para a estabilização da atividade de PAI-1 pelo SMB seja devido ao fato de ele impedir o movimento da α -hélice F (em azul, na **figura 2.13**) sobre a folha β -pregueada A (em verde, na **figura 2.13**). Este movimento altera a especificidade e a estabilidade do PAI-1 (142, 143).

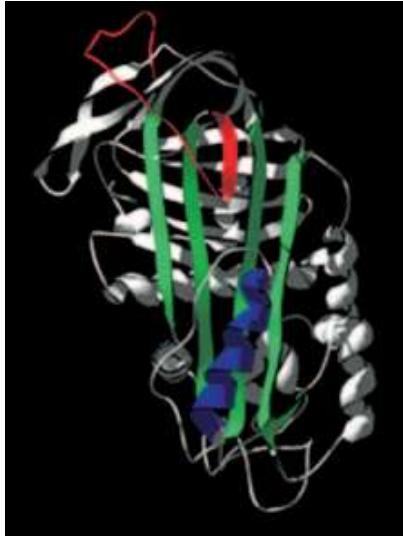


Figura 2.13. Modelo conformacional do PAI-1 nativo construído a partir do mapeamento da seqüência primária do PAI-1 humano. A alça central de reação (RCL) está representada em vermelho, a folha β -pregueada A em verde e a α -hélice F em azul (140).

D) Mecanismo de Ação

O PAI-1 pode ser detectado em três diferentes estados de atividade *in vivo*: na forma ativa, clivada e latente (**figura 2.14**). São as mudanças conformacionais na RCL do inibidor que parecem determinar seu estado (144).

Na forma ativa, a RCL está exposta na superfície da molécula e é capaz de interagir com as proteinases alvo. Os resíduos Met₃₄₇ e Arg₃₄₆ são responsáveis pelo contato com os PAs e por formar ligações covalentes irreversíveis (**figura 2.14 a**). Uma vez formada a ligação entre o RCL do PAI-1 e o PA, a ligação entre os resíduos Met₃₄₇ e Arg₃₄₆ é quebrada. A Arg₃₄₆ liga-se na região amino-terminal da molécula na α -hélice F. Este movimento causa uma distorção e conseqüente inativação do PA (**figura 2.14 b**). Além das formas ativa e clivada, existe a forma latente, na qual a parte amino-terminal da RCL está inserida na folha β -pregueada A. Esta forma possui maior estabilidade, porém menor atividade inibitória (**figura 2.14 c**) (145)

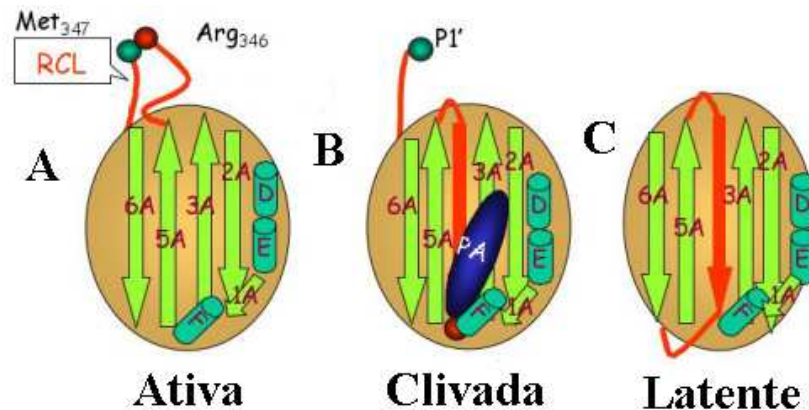


Figura 2.14. Estrutura molecular esquematizada dos três estados em que o PAI-1 é encontrado *in vivo*: (A) forma ativa; (B) forma clivada e; (C) forma latente (145). Os resíduos de aminoácido Met₃₄₇/Arg₃₄₆, presentes na RCL da proteína reconhecem os PA (A). Quando a RCL reconhece o PA, a ligação entre os resíduos Met₃₄₇/Arg₃₄₆ é rompida e a RCL ligada ao PA se sobrepõe à folha β -pregueada A e α -hélice F, tornando a enzima inativa (B). Na forma latente (C), a RCL está inserida na folha β -pregueada A. E esta conformação é mais estável, mas apresenta menor capacidade inibitória.

A forma ativa é sintetizada e secretada pelas células, mas é instável em solução e espontaneamente convertida para a forma inativa (latente), com uma meia-vida de 1 a 2 horas à 37°C. O tratamento com desnaturantes ou a interação com fosfolípidos negativamente carregados (presentes na membrana celular de plaquetas ativadas, por exemplo) promove a conversão da forma latente para a forma ativa (144).

O PAI-1 reage com t-PA de cadeia simples e dupla e com a u-PA de cadeia dupla, mas não reage com u-PA de cadeia simples. Como as outras serpinas, o PAI-1 inibe as proteinases-alvo, formando um complexo na razão estequiométrica de 1:1, por uma ligação covalente entre o grupo hidroxila dos resíduos de serina do sítio reativo da proteinase e do grupo carboxi-terminal da RCL do PAI-1 (91).

Nos vasos sanguíneos, o PAI-1 bloqueia a geração de plasmina dependente de t-PA e a degradação de coágulos de fibrina. Nas áreas extravasculares, PAI-1 impossibilita o *turnover* da matriz por sua interação com o u-PA, que impede a degradação da plasmina. A plasmina é uma protease de amplo espectro que degrada várias proteínas da matriz: colágeno tipo IV, fibronectina, laminina, proteoglicanas,

assim como a fibrina. A fibrina também ativa as metaloproteinases de matriz (MMPs) (146).

Entretanto, a ação do PAI-1 na adesão e migração celular pode ocorrer independentemente de sua ação proteolítica. O mecanismo proposto é que esse efeito tenha relação com sua propriedade de se ligar à VN, uma importante glicoproteína adesiva que contém um sítio de ligação para integrinas, responsáveis por “ancorar” as células à matriz celular, e um sítio de ligação para receptor de u-PA (uPAR), que atua na migração celular e transdução de sinais. O PAI-1, ao inibir competitivamente a ligação da VN a essas duas moléculas, bloqueia a ligação VN-integrinas, promovendo o “descolamento” das células da matriz extracelular e impede a ligação com uPAR, atrapalhando a migração celular (91, 106, 141, 147).

2.3.3 PAI-1 e o Desenvolvimento de Doenças

O PAI-1 é utilizado na prática clínica como um marcador molecular de risco para doenças cardiovasculares. Porém, sua importância não se resume ao fato de atuar na manutenção da integridade vascular. Exerce também diversas funções em outros processos patológicos do organismo, como no câncer, por seu efeito na angiogênese, nas doenças metabólicas, por sua significativa correlação com o índice de massa corporal, triglicerídeos e insulina, e na glomeruloesclerose renal, por sua função no remodelamento da matriz celular (91, 148).

As alterações nas concentrações do PAI-1 estão relacionadas com várias doenças vasculares, desde a trombose a anormalidades de remodelamento vascular, refletindo o papel do PAI-1 no sistema fibrinolítico e nos processos de adesão e migração celular. As concentrações aumentadas de PAI-1 resultam na diminuição da capacidade fibrinolítica e estão associados com várias doenças trombóticas, como o tromboembolismo venoso, doença da artéria coronariana e infarto agudo do miocárdio (149). Também está associado com a progressão da aterosclerose, por inibir o *clearance* de fibrina incorporada nas placas ateroscleróticas (91).

O PAI-1 também é um componente importante da síndrome metabólica (SM) e parece contribuir para o estado pró-trombótico e risco para doenças cardiovasculares (DCV) aumentado nesses pacientes (91).

A SM pode ser definida como um grupo de anormalidades, dentre as quais obesidade, a resistência à insulina, hiperinsulinemia ou intolerância à glicose, hipertensão e hipertrigliceridemia/dislipidemia. Ela está associada a um aumento no risco de desenvolvimento de DCV. A expressão do PAI-1 é induzida por muitos componentes da SM, constituindo uma possível explicação para a relação entre o risco aumentado de DCV e a SM (106).

Na obesidade, o tecido adiposo tem a capacidade aumentada de produzir PAI-1, constituindo a principal fonte de PAI-1 nessa situação (150). Além disso, a insulina e glicocorticóides induzem a produção de PAI-1 em adipócitos de camundongos (151) e há evidências de que a administração de insulina em humanos diminui as concentrações plasmáticas de PAI-1 (152). A melhora da resistência à insulina pela perda de peso ou tratamento com rosiglitazona está associada a uma redução nas concentrações plasmáticas de PAI-1 (153).

O sistema renina-angiotensina exerce importante papel no controle da pressão arterial. A angiotensina II é outro hormônio que estimula a expressão do PAI-1 em cultura de adipócitos (154), e a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) reduz as concentrações plasmáticas de PAI-1 (155). Por fim, concentrações elevadas de PAI-1 estão associados com a hipertrigliceridemia e a secreção de PAI-1 em células endoteliais pode ser induzida por lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e ácidos graxos livres (AGL) (156).

Outro aspecto relevante é o papel de PAI-1 na promoção de crescimento de tumores. Muitos estudos clínicos sugerem que existe uma correlação positiva entre as concentrações de PAI-1 em tumores e um pior prognóstico de sobrevivência. Nesse sentido, o PAI-1 surge como sendo um marcador importante para o prognóstico para identificar o risco de reincidência. O mecanismo exato de como o PAI-1 influencia o crescimento tumoral e disseminação ainda não é completamente compreendido, mas é provável que PAI-1 atue em diferentes aspectos da biologia do tumor: pela inibição da

proteólise via inibição de u-PA e destruição da matriz extracelular, e por seu efeito na migração celular e angiogênese (106).

A) PAI-1 e Nefropatia Diabética

Um aspecto do PAI-1 relacionado ao desenvolvimento de doenças é a sua participação nos processos fibróticos. A fibrose é caracterizada pelo acúmulo excessivo de matriz extracelular na membrana basal e nos tecidos intersticiais. As duas principais proteases que limitam a deposição anormal de matriz são a plasmina e as metaloproteinases de matriz (MMPs). Há relatos de que a própria plasmina ative as MMPs e os dois sistemas degradem as proteínas de matriz. O PAI-1 reduz a produção de plasmina, diminuindo também a ativação das MMPs, aumentando então a formação de matriz. Esse conceito está amparado por estudos realizados com modelos animais de doenças fibróticas que mostram que o PAI-1 é regulado positivamente na glomeruloesclerose induzida por hipertensão arterial (147).

A nefropatia diabética, caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular (ECM), é uma das principais causas de insuficiência renal crônica e está relacionada com aumento na proliferação de células mesangiais (153).

Já foi demonstrado que a expressão do gene PAI1 está aumentada nos rins de pacientes com nefropatia diabética. Esse aumento se deve provavelmente ao aumento das concentrações de TGF β , TNF α , renina, angiotensina II e fatores metabólicos, como a glicose e lipoproteínas (157, 158).

Os receptores do proliferador ativado de peroxissomos (PPARs) são fatores transcricionais dependentes de ligante, que fazem parte da superfamília de receptores nucleares. Já foram identificadas 3 isoformas dos receptores PPAR (PPAR α , PPAR δ e PPAR γ). Após a ativação os PPARs se heterodimerizam com o RXR e ligam-se aos elementos resposivos na região promotora dos genes-alvo (159). Os PPARs atuam no controle transcricional de diversos processos celulares, incluindo o metabolismo de lipídeos, glicose, homeostasia, diferenciação celular, inflamação e remodelamento da ECM (153)

Todas as isoformas de PPAR são expressas nos rins. As células mesangiais humanas sintetizam predominantemente o PPAR γ . As tiazolidinedionas, como a rosigliazona, são agonistas específicos do PPAR γ . Os fibratos, como o bezafibrato, são agonistas específicos para os PPAR α e PPAR δ (159). A ativação do PPAR γ por seus agonistas implica na significativa prevenção da nefropatia em ratos diabéticos (153).

Observa-se a participação do sistema fibrinolítico na progressão dessas doenças. Já foi demonstrado que a concentração sérica de PAI-1 está aumentada em pacientes com obesidade, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e diabetes *mellitus* (153).

Nesse contexto, vários estudos vêm tentando elucidar o mecanismo de regulação que possivelmente os PPARs exercem sobre a atividade de PAI-1 (160-168). Entretanto, os resultados são controversos e sugerem que esta regulação seja tecido-específica e dependente do ligante utilizado.

2.3.4 Deficiência em Humanos

O primeiro relato de deficiência da proteína PAI-1 em humanos foi observado em uma menina de 9 anos de idade foi descrito em 1992. Uma mutação ocasionada pela inserção de um dinucleotídeo (TA) no exon 4 resultou na síntese de uma proteína truncada e não funcional (a proteína produzida não possuía a RCL). Como consequência, a menina apresentava episódios hemorrágicos, todos em resposta a traumas e cirurgias (169).

Entretanto, uma descrição mais compreensiva da deficiência de PAI-1 em humanos foi realizada em um estudo que identificou uma família com 19 indivíduos heterozigotos e 7 homozigotos com deficiência completa para a mesma mutação descrita anteriormente. As manifestações clínicas observadas foram restritas a sangramento anormal em indivíduos homozigotos após trauma ou cirurgia. Os inibidores da fibrinólise, incluindo-se o ácido aminocapróico, foram efetivos para o tratamento e prevenção destes sangramentos (170).

A análise da deficiência de PAI-1 em humanos sugere que a ausência de PAI-1 não leva a sangramentos severos ou outros eventos adversos de maior proporção. Além disto, observa-se que a inibição da atividade de PAI-1 inibe a formação de trombos em modelos animais. Então, novas pesquisas são realizadas com o objetivo de desenvolver moléculas que sejam inibidoras de PAI-1, dando início a uma nova classe de fármacos antitrombóticos. Os inibidores de PAI-1 podem apresentar potencial benefício nas doenças em que as concentrações plasmáticas de PAI-1 estiverem elevados, como na trombose venosa profunda, câncer e diabetes mellitus tipo 2. Um exemplo de inibidor de PAI-1 em estudo é o PAI-039, tiplaxtinina. Entretanto, o mecanismo de inibição ainda é desconhecido (171-174).

2.3.5 Expressão Gênica

A produção de PAI-1 pode ser induzida por uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e hormônios, o que sugere que o PAI-1 seja uma das moléculas mais reguladas do sistema fibrinolítico e sua expressão ocorra sob um restrito controle (106).

A regulação do PAI-1 é alcançada primariamente por alterações em sua taxa de expressão. O gene PAI-1 em humanos contém aproximadamente 12,2kb e é composto por 8 íntrons. Dois mRNA distintos (aproximadamente 2,3 e 3,2 kb) são expressos em células humanas, e diferem em sua região 3' não traduzida, como consequência de poliadenilação alternativa. Essa região contém uma seqüência rica em AT que possui importante papel na regulação da estabilidade do mRNA. A região 5' flanqueada do gene humano contém o sítio de transcrição inicial, TATA Box (seqüência de DNA do promotor de eucariotos, conservada entre as espécies e importante para a atuação da RNA polimerase), e seqüências regulatórias que conferem responsividade transcricional a uma grande variedade de mediadores (175-177).

As endotoxinas, componentes da parede celular de bactérias gram-negativas, são indutores potentes da produção de PAI-1 *in vivo* (178) e *in vitro* em diferentes tipos celulares (179). As citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF α) (180) e a interleucina 1 e interleucina-6 (181), liberadas por células inflamatórias, representam um

grupo de moléculas que também regulam a expressão gênica do PAI-1. Os fatores de crescimento, como o fator de crescimento transformante β (TGF β), liberado de plaquetas ativadas, induzem a expressão gênica do PAI-1 em muitos tecidos. A liberação de TGF β das plaquetas em sítios de lesão vascular, inflamação e trombose pode induzir o PAI-1 nas células endoteliais adjacentes e, então, suprimir o sistema fibrinolítico na parede vascular (182).

Outros fatores já foram descritos na literatura como indutores da expressão do PAI-1 *in vitro*. Dentre eles estão incluídos o fator de crescimento epidermal (183), o fator ativador de plaquetas (184), o fator de crescimento vascular endotelial (185), a insulina (186), a aldosterona (187), a angiotensina II, os corticoesteróides (188) e o estrogênio (189).

Por fim, alterações nas concentrações plasmáticas do PAI-1 podem ser correlacionadas com variações genéticas no promotor do PAI-1. A variação genética encontrada com maior frequência é a simples deleção ou inserção de uma guanina na posição 675 (polimorfismo 4G/5G) da região promotora do PAI-1. A presença deste variante produz efeitos distintos na expressão gênica do PAI-1. O alelo 4G, no polimorfismo 4G/5G, parece aumentar a taxa transcricional comparada ao alelo 5G, e humanos homozigotos para o alelo 4G apresentam concentrações superiores de PAI-1 e maior risco de desenvolvimento de trombose venosa em comparação a sujeitos 5G/5G (190).

3 JUSTIFICATIVA

Considerando que:

- a) as disfunções da tireóide alteram o balanço coagulação-fibrinólise;
- b) existe uma forte associação entre a função tireoideana e as concentrações plasmáticas de PAI-1;
- c) a regulação transcricional de PAI-1 é importante para a manutenção da hemostasia e também para a prevenção de aterosclerose e de fibrose de diversos tecidos e;
- d) até o momento, nenhum estudo avaliou o efeito de T_3 sobre a atividade transcricional de PAI-1;

Esse estudo investiga o efeito do TH e das diferentes isoformas do TR (TR α e TR β) sobre a regulação da transcrição do promotor do PAI-1.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estudar o efeito do T_3 e de seu receptor sobre a atividade transcricional no promotor do gene PAI-1 e esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na regulação desse gene.

4.2 Objetivos Específicos

1. Estudar o efeito do T_3 na regulação da atividade transcricional do receptor do hormônio tireoideano no promotor do gene PAI-1.
2. Estudar o efeito das diferentes isoformas de TR ($TR\alpha$ e $TR\beta$) na regulação e na expressão gênica do PAI-1.
3. Avaliar a importância da interação direta de TR com o promotor do PAI-1.
4. Estudar o papel das proteínas co-reguladoras na regulação transcricional causada por T_3 .

4.3 Objetivo Secundário

1. Estudar a ação de $PPAR\alpha$, $PPAR\delta$ e $PPAR\gamma$ na regulação transcricional do promotor do PAI-1 em células mesangiais humanas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares auto-replicáveis, independentes do DNA cromossomal. Pode existir um grande número de cópias do mesmo plasmídeo em uma única célula. Todos os plasmídeos possuem pelo menos uma seqüência de DNA que contém uma origem de replicação, que permite ao DNA plasmídeo replicar-se independentemente do DNA cromossômico (**Figura 5.1**) (26).

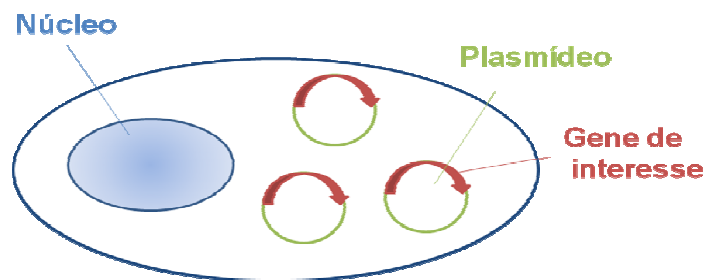


Figura 5.1. Desenho esquemático de uma célula eucariótica contendo DNA plasmídeo com um gene de interesse.

É uma ferramenta importante para a biologia molecular, pois, dentre outras aplicações, são usados para expressar proteínas específicas em diferentes células. Inicialmente, o gene a ser expresso é inserido no plasmídeo. Esse plasmídeo é, então, introduzido em células de mamíferos por meio de um processo denominado transfecção (que pode ser feita mediante a aplicação de uma corrente elétrica nas células, propiciando a abertura de poros em sua membrana e a entrada dos plasmídeos em seu interior). A célula de mamífero passará, então, a expressar as proteínas desejadas.

Para a realização dos experimentos foram utilizados os plasmídeos pCMX, pCMV-CTR α , pCMV-TR β 1, pCDNA3-PPAR α , pCDNA3-PPAR γ e pCDNA3-PPAR δ .

Os vetores pCMV e pCDNA3 contêm o promotor do citomegalovírus. A transcrição do RNA codificado pelo cDNA é controlada pelo promotor do citomegalovírus, o que permite a expressão desses RNAs em mamíferos, possibilitando a expressão destes RNAs em sistema de transcrição e tradução em células.

Além disto, foram utilizados plasmídeos que codificam o TR β 1 com as mutações específicas em diferentes regiões do DNA.

O mutante I280M é um mutante em que a isoleucina da posição 280 é trocada por uma metionina. Estudos anteriores demonstraram que mutações no resíduo I280 impedem que o receptor se associe a co-repressores, diminuem a capacidade de ligação ao T₃, mas não impedem a sua capacidade de ligação a co-ativadores (30).

O mutante F451X é um mutante do TR em que os dez últimos aminoácidos, a partir da fenilalanina 451, foram suprimidos. É uma mutação natural do TR, descrita na síndrome de resistência ao TH em que a hélice 12 (H12) está ausente e apresenta baixa afinidade pelo T₃, sendo incapaz de se associar aos co-ativadores, mas interagindo com co-repressores (30, 49).

O mutante L422R é um mutante em que a leucina da posição 422 é trocada por uma arginina. Estudos demonstraram que a região de aminoácidos hidrofóbicos presentes na H10 e H11 estão envolvidos na dimerização do TR. A leucina na posição 422 cumpre papel crítico tanto para a homo quanto para a heterodimerização do TR. Portanto, o mutante L422R diminui a capacidade de dimerização do TR, por afetar a estabilidade dos dímeros (191).

O mutante GAL-TR β -LBD é uma quimera composta pelo LBD do receptor TR β 1 (aminoácidos 174 a 461) e o DBD do GAL4 – fator de transcrição de levedura ativado por galactosidase – (aminoácidos 1 a 147). Esse mutante não é capaz de reconhecer os TREs e se ligar ao DNA (192). O receptor quimérico GAL-TR β -LBD foi generosamente cedido por Dr. John D. Baxter do *Metabolic Research Unit, University of California San Francisco*.

Os plasmídeos repórteres utilizados foram três: PAI-1-LUC, contendo a região promotora do gene PAI-1 humano; F2-LUC, contendo o elemento responsivo de TR na forma de palíndromo invertido (F2); e PPRE-LUC, o elemento responsivo dos receptores PPAR dirigindo a expressão do gene da luciferase (LUC).

5.2 Cultura de Células

As células U937, uma linhagem pró-monocítica humana, foram obtidas do Centro de Cultura de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640, adicionado de 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 50U/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina 50µg/mL, e mantidas em frascos para cultura de células, marca Corning® de 75cm², em incubadora a 37°C com 5% de CO₂.

As células mesangiais humanas, obtidas da *American Type Cultured Collection* (ATCC), Estados Unidos, foram cultivadas em placas para cultura de tecidos de 25cm² (Corning®) com meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) adicionado de 10% de soro fetal bovino, 2mM de glutamina, 50U/mL de penicilina e 50µg/mL de estreptomicina em um ambiente úmido com 5% de CO₂ à 37°C. Quando as células se tornavam confluentes, foram tripsinizadas com 3mL de solução de tripsina a 0,25% em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e repicadas para outras placas de cultura.

5.3 Ensaios de Gene Repórter Por Meio de Transfecção Transiente

O ensaio de gene repórter é um método empregado para a pesquisa da atividade transcricional de receptores nucleares ou de outros fatores de transcrição. Esse ensaio consiste na inserção de plasmídeo de expressão e de plasmídeo repórter no interior do núcleo das células de interesse (transfecção), seguida de tratamento das células com os ligantes. Na presença de substâncias agonistas, o gene repórter (no caso, a luciferase) tem sua produção aumentada e serve de indicador para a atividade transcricional de um determinado receptor.

Por este motivo, este ensaio foi utilizado para avaliar a atividade do T₃, na presença de TR, sobre a expressão gênica de PAI-1 em células U937 e em células mesangiais humanas. A transfecção foi realizada segundo o protocolo já estabelecido e utilizado em nosso laboratório (191).

O método de eletroporação foi utilizado para a transfecção. Esse método consiste na aplicação de pulsos de correntes elétricas a uma suspensão de células,

com geração de poros nas membranas plasmática e nuclear e, assim, entrada do DNA plasmidial de interesse.

As células foram coletadas por centrifugação (2000g por 5 minutos) e ressuspendidas em solução PBS contendo cálcio na concentração de 2×10^7 células/mL, dextrose e os plasmídeos. As células foram transferidas para cubetas e submetidas à eletroporação mediante um gerador de pulso Bio-Rad® nas condições de 300mV e 950 μ F para as células U937 e 350mV e 750 μ F para as células mesangiais humanas. Após a eletroporação, as células foram transferidas para o meio de cultura e distribuídas em placas para cultura de células de 12 poços, marca Corning®.

Após 24 horas, as células foram coletadas por centrifugação (14.000 rpm, por 2 minutos) e lisadas em tampão de lise 1X (Promega®). Para a determinação da atividade da liciferase, o sistema de ensaio de luciferase (*Luciferase Assay System*) da marca Promega® foi utilizado, conforme instruções do fabricante. A luciferase catalisa a conversão da luciferina em oxiluciferina, e essa reação resulta em emissão de luz, quantificada em um luminômetro (Turner®), o qual gera resultados em unidades relativas de luz.

5.4 Cálculo da Taxa de Ativação da Transcrição e Análise Estatística

As células transfectadas foram tratadas com o veículo dimetilsulfóxido e etanol, na razão 2:3 (DMSO/ETOH 2:3) e com agonistas dos receptores nucleares (T_3 , bezafibrato e rosiglitazona). Assim, a taxa de ativação da transcrição dos receptores nucleares testados foi calculada pela razão entre a atividade das células induzidas pelo hormônio T_3 ou pelos ligantes sintéticos dos receptores PPARs, bezafibrato ou rosiglitazona, sobre a atividade das células tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3). O cálculo da taxa de ativação pode ser expresso pela fórmula:

$$\text{Taxa de Ativação} = \frac{\text{Leitura da luciferase com ligante}}{\text{Leitura da luciferase sem ligante}}$$

Leitura da luciferase sem ligante

Em se tratando de repressão, a porcentagem da leitura da luciferase é calculada levando-se em consideração que a leitura do TR ou do vetor vazio é de 100% na ausência do hormônio; a partir dessa correlação calcula-se a porcentagem para as outras leituras. Já a porcentagem da taxa de repressão é calculada para representar a diferença entre leitura sem T₃ da leitura com T₃ pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Taxa de Repressão} = \frac{[(\% \text{ leitura da luciferase sem ligante}) - (\% \text{ leitura da luciferase com ligante})]}{\% \text{ leitura da luciferase sem ligante} / 100\%}$$

Os resultados apresentados nesse trabalho representam a média dos experimentos \pm erro padrão de pelo menos três ensaios em triplicata. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA seguido por *Newman-Keuls Multiple Comparison*, utilizando o Programa PRISM 4.0 (GraphPad Software, Inc.), assim como o cálculo do IC₅₀. Foram consideradas significativas as variâncias $p < 0,05$.

As diferenças e semelhanças entre os tratamentos estudados foram apresentadas como letras em conjunto. A mesma letra para grupos distintos indica que não há diferença estatística entre eles, e letras diferentes para grupos distintos indicam diferença estatística entre eles.

5.5. Transcrição e Tradução de Proteínas *in vitro*

Os receptores utilizados para os ensaios de ligação com o DNA foram sintetizados utilizando-se um kit de transcrição e tradução *in vitro* (TNT T7 – Quick Coupled Transcription/Translation System – Promega®) (193). Nessa técnica, os plasmídeos contendo o cDNA que codifica o TR β 1 humano nativo e RXR α humano nativo regulados pelo promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7 foram adicionados a um sistema que contém toda a maquinaria necessária para a transcrição e tradução da proteína. Esse sistema contém a RNA polimerase do bacteriófago T7, ribonucleotídeos, inibidor de RNase e um lisado de reticulócitos de coelho suplementado com 40 μ M ZnCl₂ e aminoácidos (exceto a metionina). A metionina

marcada ou não com enxofre 35 (^{35}S -Metionina, Perkin Elmer®), foi adicionada no momento da reação, dependendo se o objetivo era a síntese de receptores radioativamente marcados ou não, respectivamente. As reações foram realizadas em microtubos com capacidade para 1,5 mL com adição de 1 μg do plasmídeo aos componentes necessários para a transcrição e tradução, seguindo-se uma incubação a 28°C por 90 minutos. Ao término da reação, foram coletadas amostras (1 – 2 μL) para a realização de eletroforese de proteínas, sendo o restante da reação congelado a -80°C.

A eletroforese de proteínas, em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (sulfato duodecil sódico, SDS) (194) foi utilizada para confirmar a eficiência da síntese protéica *in vitro*, assim como o tamanho da proteína gerada. Após a corrida eletroforética (100-150v), o gel foi fixado em uma solução de 30% metanol e 10% ácido acético glacial durante 30 minutos, sob agitação, a temperatura ambiente. Em seguida, exposto por 30 minutos a uma solução amplificadora (Amplify, Amersham®) para intensificar a transmissão da energia radioativa, e secado a vácuo a 70°C por 40 minutos (Geldryer, Biorad®). O gel seco foi submetido à autorradiografia, utilizando-se um filme de raios-X (Kodak®) por um período de 24 horas, sendo posteriormente revelado (**figura 5.2**).

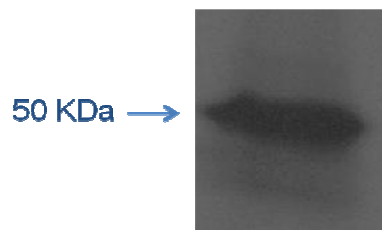


Figura 5.2. Síntese *in vitro* do TR β 1 marcado radioativamente pelo kit TNT T7-Quick.

5.6 Ensaio de Alteração de Mobilidade em Gel (EMSA ou *Gel Shift*)

Para testar se o TR β 1 e RXR α traduzidos *in vitro* se ligavam a regiões específicas no promotor de PAI-1, utilizamos o ensaio de alteração de mobilidade em gel ou *Gel Shift Assay* (193).

O ensaio de *gel shift* é uma técnica utilizada para se estudar a interação DNA-proteína. Esse procedimento pode determinar se uma proteína ou uma mistura de proteínas podem se ligar a fragmentos do DNA (oligonucleotídeos) (195).

Os oligonucleotídeos utilizados nos experimentos foram:

F2 F: GAGCCGCAAGTGA CT CAGCGCGGGGCGTGTGCAGG

F2 R: CCTGCACACGCCCCGCGCTGAGTCACTTGCGGCTC

PAI-1wt 1 F: GGGGTCTAGGCTTTTTGGGTCACCCGGCATGGC

PAI-1wt 1 R: CCCCAGGATCCGAAAAACCCAGTGGGCGGTACCG

PAI-1wt 2 F: GCAGAGGGCAGAAAGGTCAAGGGAGGTTCTCAGCCAAGGCTATTGGGGTTTGCTCAATTG

PAI-1 wt 2 R: CGTCTCCCGTCTTTCCAGTTCCTCCAAGAGTCCGGTTCGATAACCCCAAACGAGTTAAC

PAI-1mut 1 F: GGGGTCTAGGCTTATGCATTACCCGGCATGGC

PAI-1mut 1 R: CCCCAGGATCCGAATACGTAAGTGGGCGGTACCG

PAI-1mut 2 F: CGTCTCCCGTCTTTAGTTCCTAAGAGTGGTTGATAACAAACGAGTTAAC

PAI-1mut 2 R: GCAGAGGGCAGAAATCAAGGGATTCTACCAACTATTGTTTGCTCAATTG

As reações foram feitas em microtubos de 1,5mL de capacidade, mantidos no gelo. Após a adição dos componentes da reação de ligação: receptores sintetizados TR β 1 e RXR α) oligonucleotídeos dupla fita, tampão de ligação N0 (mono NaPO₄ 0,2M, Di NaPO₄ 0,2M, glicerol 100%, MgCl₂ 1M e EDTA 0,5M) e DMSO/ETOH ou T3. Os microtubos foram transferidos do gelo para a temperatura ambiente por 20 minutos e, ao final desse período, as amostras do meio reacional foram submetidas à eletroforese em um gel de poliácridamida a 5%, sob condições não desnaturante. Nessa condição, os complexos de proteínas que não se ligarem ao DNA, permanecem intactos e não são afetados pela eletroforese. Isto ocorre devido ao fato de que a carga do complexo proteína-DNA é fornecida pelo DNA e pela proteína, que se encontra em seu estado nativo

O gel foi preparado com 5% de acrilamida/bisacrilamida em um tampão TAE composto de 67mM Tris-Base, 10mM EDTA e 33mM Acetato de Sódio, pH 7,5 a 25°C. Após a adição de 200 μ L de persulfato de amônio (BioRad ®) e 25 μ L de N, N,N, N',N'-tetrametilenodiamina (TEMED, Amersham ®), essa mistura foi transferida para um sistema vertical de eletroforese (Hoeffer) até que ocorresse a polimerização. O gel foi

submetido à eletroforese por 30 minutos (pré-corrída), 200V a 4°C para a remoção de possíveis contaminantes presentes na solução de acrilamida e equalização da solução. Ao término desta pré-corrída, as amostras foram aplicadas nas canaletas, iniciando-se a eletroforese por 2 horas, 250V a 4°C com o mesmo tampão TAE utilizado no gel.

Após a eletroforese, o gel foi fixado com uma solução fixadora de 30% metanol e 10% ácido acético glacial por um período de 30 minutos. Em seguida, foi colocado em uma solução amplificadora (Amplify, Amersham ®). A seguir, o gel foi seco (Geldryer, Biorad ®) por 1 hora e 30 minutos e exposto a um filme de raios-X, para autorradiografia a temperatura ambiente, e posteriormente revelado.

6 RESULTADOS

6.1 O Promotor do Gene PAI-1 é Negativamente Regulado pelo Hormônio Tireoideano

O primeiro passo dessa investigação consistiu em determinar se a expressão do PA-1 era regulada pelo TR. Para tanto, foram realizados ensaios de transfecção transiente para avaliar o efeito do TR sobre o promotor do PAI-1. Foi utilizada uma linhagem de células pró-monocíticas humana U937 com plasmídeo repórter contendo a região proximal do promotor do PAI-1, fundido com o gene da luciferase (PAI-1-LUC).

Os resultados obtidos revelaram que os receptores TR α e TR β transfectados foram responsáveis por um aumento na expressão de PAI-1, com relação à transcrição basal observada com a trasfecção do plasmídeo pCMX. O tratamento com T₃ (10⁻⁷M) ocasionou uma repressão de 70% quando comparado com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) para o TR β 1 e de 40% para o TR α 1. A repressão promovida pelo T₃ mediada pelo TR α 1 não foi estatisticamene significativa (**figura 6.1**).

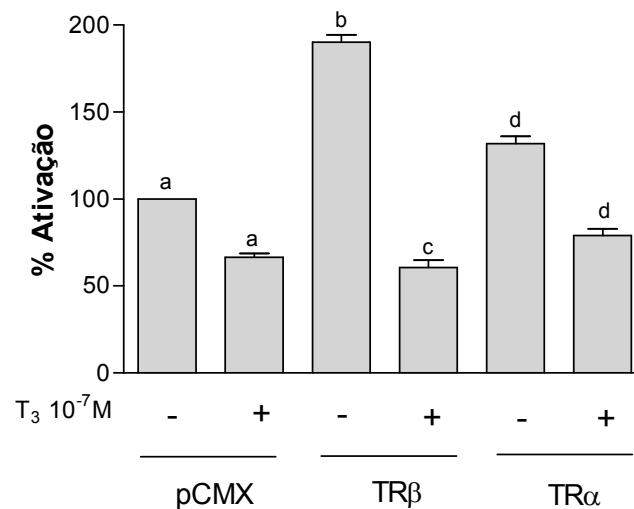


Figura 6.1. T₃ reprime a atividade transcricional do promotor do gene PAI-1. Resposta ao T₃ promovida pela adição de 1μg dos vetores de expressão TRα1 ou TRβ1 em células pró-monocíticas humanas U937. As células foram co-transfectadas com 2μg do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou T₃ 10⁻⁷M. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células, e os números do eixo vertical representam a média do percentual da leitura da luciferase na ausência ou presença de T₃. A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0, considerando-se P < 0,05. n=6.

Como foi observado o efeito de repressão ocasionado pelo T₃ no promotor do gene PAI-1, o segundo passo da investigação consistiu em determinar se esse efeito era de fato mediado pelo TR.

Para responder a essa pergunta, existem diversos métodos que podem ser empregados. Foram realizar ensaios de transfecção transiente com TRα1 e TRβ1 com diferentes concentrações de T₃ como tratamento (10⁻¹⁰M a 10⁻⁶M). O resultado desse experimento consiste na construção de uma curva dose-resposta. Se a repressão observada for mediada pelo receptor nuclear, a taxa de repressão deverá ser diferente para cada concentração, até atingir um platô, devido à saturação do receptor.

Os resultados obtidos mostraram que o efeito do T₃ na repressão do TRα1 e TRβ1 sobre o promotor do PAI-1 foi dose-dependente (**figura 6.2**). Isso indica que essa alteração na taxa de transcrição do PAI-1 podia ser mediada pelo TR.

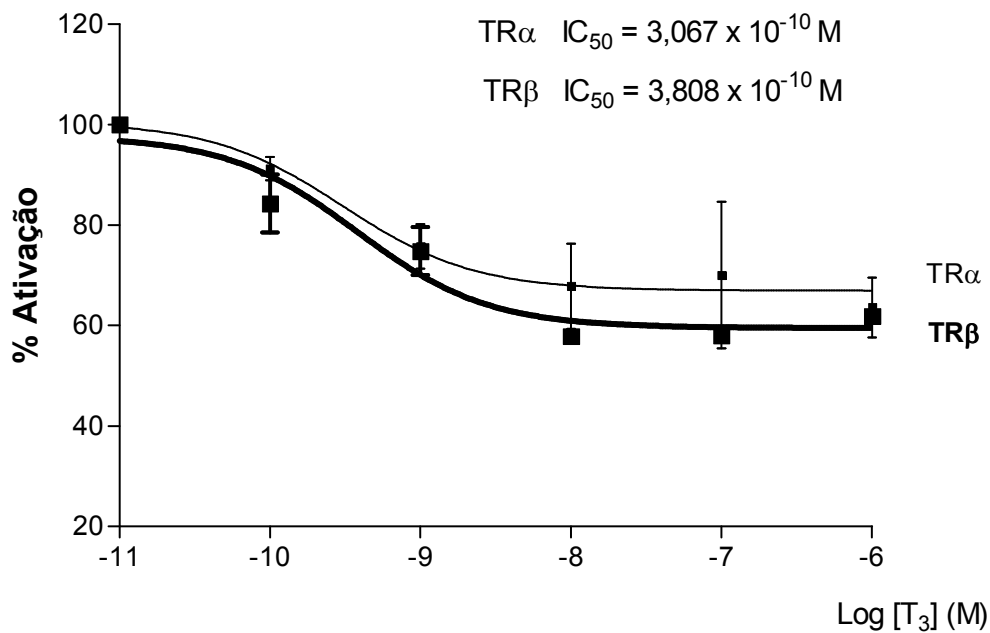


Figura 6.2. A repressão da atividade transcricional do promotor do gene PAI-1 por T₃ é dose-dependente em células U937. Curva dose-resposta ao T₃ promovida pela adição de 1 μg do vetor de expressão TRβ1 ou TRα1 em células pró-monocíticas humanas U937. As células foram co-transfectadas com 2 μg do vetor para o gene repórter PAI-1 (PAI-1-LUC) e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou concentrações crescentes de T₃ (10⁻¹⁰M, 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M e 10⁻⁶M). A atividade do gene repórter foi medida após 22hs com a lise das células, e os números representam o percentual de ativação em relação ao respectivo receptor na ausência de T₃. O IC₅₀ do TRα1 é igual à 3,067 x 10⁻¹⁰ M e do TRβ1 é igual a 3,808 x 10⁻¹⁰ M. n=3. O IC₅₀ foi calculado utilizando-se o programa GraphPad Prism 4.0.

O IC₅₀ (concentração inibitória para 50% da atividade) é uma medida que indica a efetividade da inibição de uma função biológica. Essa medida quantitativa sugere quanto do inibidor é necessário para inibir pela metade um processo biológico. O IC₅₀ encontrado para o TRα1 foi de 3,067 x 10⁻¹⁰ M e do TRβ1, 3,808 x 10⁻¹⁰ M. O IC₅₀ do TRα e do TRβ foram similares.

Também foram realizados experimentos para avaliar a repercussão da concentração do receptor sobre a atividade transcricional do promotor do PAI-1 em células U937. A **figura 6.3** mostra o percentual de repressão promovido por cada concentração de TRβ1. Os resultados indicam que o percentual de repressão foi maior

com o aumento da concentração do TR nas células (embora não tenha havido diferença estatística entre as diferentes concentrações do receptor).

O experimento realizado para avaliar o efeito TR β 1 sobre o elemento responsivo F2-LUC (em detalhe na **figura 6.3**), demonstrou que o T₃ promoveu uma ativação de aproximadamente 12 vezes quando comparado com o veículo (DMSO/ETOH 2:3). Este resultado confirmou que o TR β 1 utilizado nos experimentos era transcricionalmente ativo.

Realizamos também esses experimentos em células mesangiais humanas. Os resultados obtidos foram semelhantes aos encontrados com os pró-monócitos humanos U937. Os gráficos com os resultados estão apresentados no **Apêndice A (figura A.1 e figura A.2)**.

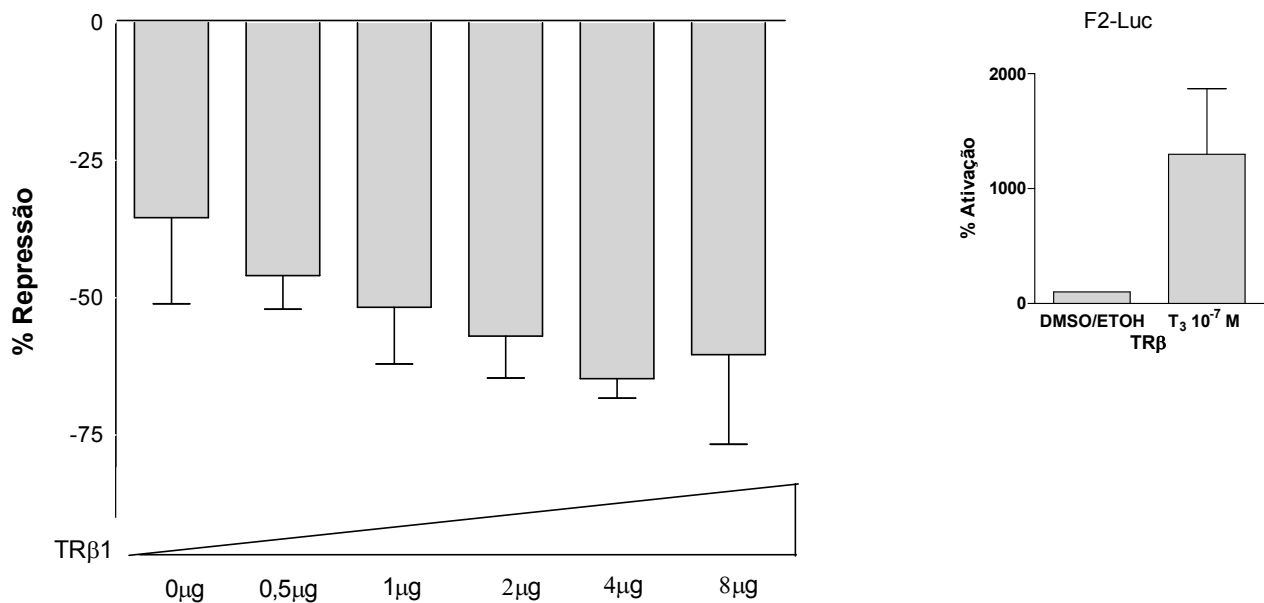


Figura 6.3. A repressão da atividade transcricional do promotor do gene PAI-1 por T₃ depende da concentração de TR β 1 em células U937. Resposta ao T₃ promovida pela adição de 0,5 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 4 μ g e 8 μ g do vetor de expressão TR β 1 em células pró-monocíticas humanas U937. As células foram co-transfectadas com 2 μ g do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC ou 4 μ g F2-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou T₃ 10⁻⁷M. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números do eixo vertical representam a média do percentual da repressão na ausência e presença de T₃. n=3. A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0, considerando-se P < 0,05. n=3

Para o estudo da repressão gênica, é relevante avaliar o efeito desse repressor sob condições em que o mesmo gene tem sua transcrição estimulada. Então, a próxima pergunta a ser respondida foi se mesmo com a superexpressão de PAI-1, haveria repressão efetiva promovida pelo T₃.

Para aumentar a transcrição do PAI-1, foi utilizada uma substância denominada éster de forbol PMA (12-miristato 13-acetato forbol). Essa substância atua como um ativador de proteína quinase C e já foi demonstrado que é um potente indutor da expressão gênica de PAI-1 (196).

Os resultados desses experimentos são apresentados na **figura 6.4**. Observou-se que, mesmo na presença deste potente indutor da transcrição gênica do PAI-1, o efeito do T₃ na repressão do TR α e TR β sobre o promotor do PAI-1 foi significativo.

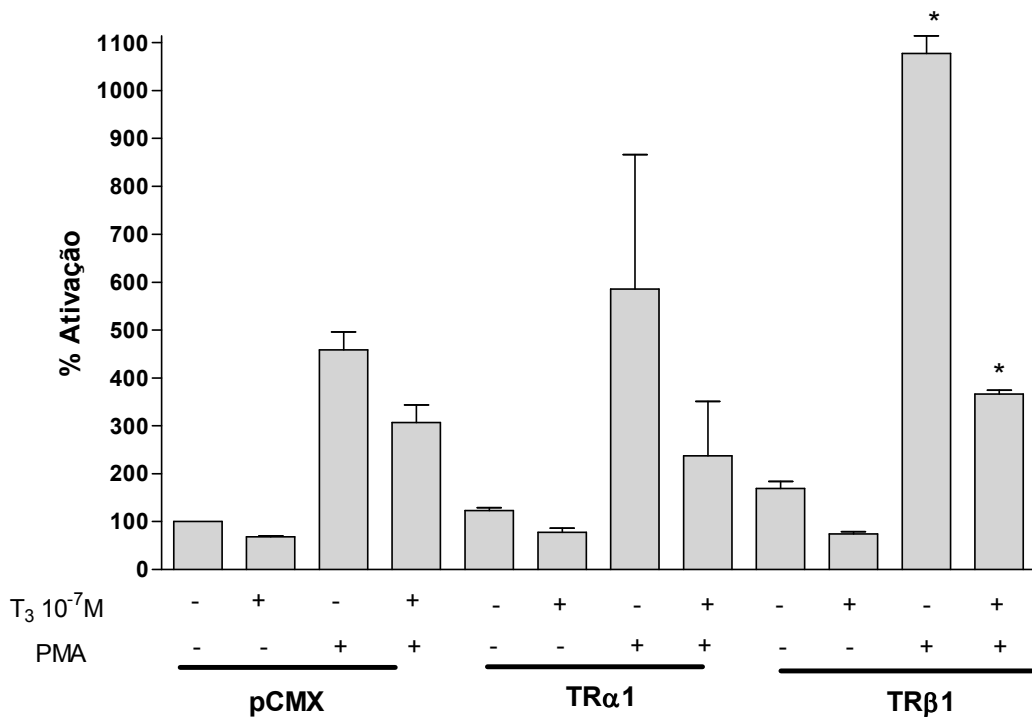


Figura 6.4. T₃ reprime a transcrição de PAI-1 na presença de um potente indutor, o PMA, em células U937. Resposta ao T₃ promovida pela adição de 1 μg dos vetores de expressão TRα1 ou TRβ1 em células pró-monocíticas humanas U937. As células foram co-transfectadas com 2 μg do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou T₃ 10⁻⁷M e PMA. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células, e os números do eixo vertical representam a média do percentual da leitura da luciferase na ausência ou presença de T₃. A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0, considerando-se P < 0,001. n=3

6.2 Efeitos de Mutantes do TRβ na Regulação da Expressão do Promotor do PAI-1

Para melhor entender o mecanismo por meio do qual o TR regula a expressão gênica do PAI-1, foram realizados ensaios de transfecção com mutantes do TR que apresentam algumas particularidades, como a perda da capacidade de ligação a co-ativadores, a co-repressores e ao DNA e a perda da capacidade de formação de dímeros. As características de cada mutante do Tβ1 utilizados no próximo experimento está descrita, sumariamente, na **figura 6.5**.

Mutante	Efeito
I280M	Diminui interação com co-repressores
F451X	Diminui a interação com co-ativadores e aumenta a ligação a co-repressores
L422R	Diminui a homo e heterodimerização
GAL-TR β -LBD	Não se liga ao DNA do promotor

Figura 6.5. Mutantes do TR β 1. Principais características dos mutantes I280M, F451X, L422R e Gal-TR β -LBD.

Esse experimento nos permite avaliar o efeito de determinado aspecto sobre a repressão no promotor do PAI-1 promovida pelo T₃. Assim, por exemplo, se o mutante do TR que não é capaz de se dimerizar (formar homo ou heterodímeros), como acontece com o L422R, abole a repressão promovida pelo T₃, isso pode significar que o TR precisa estar dimerizado para exercer essa regulação negativa (ou seja, não atua como monômero). Dessa forma, avaliando os resultados obtidos com as transfecções mediante a utilização dos diferentes mutantes de TR, é possível começar a construir o mecanismo de ação por meio do qual o TR reprime a expressão gênica.

Dessa forma, com este experimento o objetivo foi o de responder às seguintes perguntas:

- 1) a repressão da transcrição do gene PAI-1 deve-se por intermédio da interação do TR com co-fatores?;
- 2) seu efeito depende da dimerização do TR?; e
- 3) seu efeito ocorre por interação direta do TR com o promotor do PAI-1?

A **figura 6.6** mostra o resultado de experimentos realizados em células U937 e a **figura 6.7**, os resultados realizados em células mesangiais humanas.

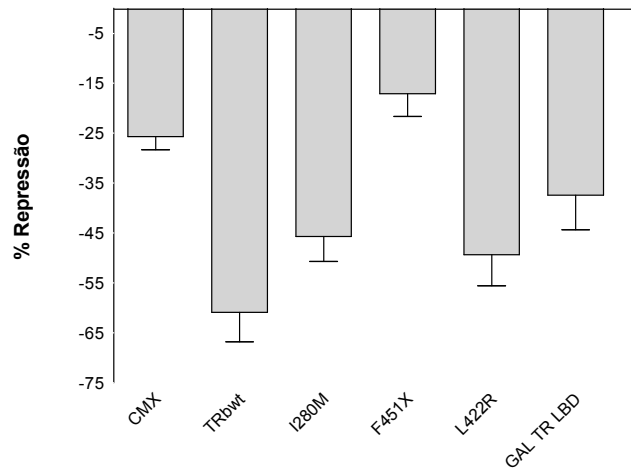


Figura 6.6. Para a regulação da atividade transcricional do promotor do gene do PAI-1, TRβ1 necessita se ligar ao DNA e interagir com co-ativadores em células U937. Resposta ao T₃ promovida pela adição de 1μg dos vetores de expressão TRβ1 wt e mutantes I280M, F451X, L422R e GAL-TRβ-LBD em células pró-monocíticas humanas U937. As células foram co-transfectadas com 2μg do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou T₃ 10⁻⁷M. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células, e os números do eixo vertical representam a média do percentual da repressão na ausência ou presença de T₃. A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0, considerando-se P < 0,05. n=3

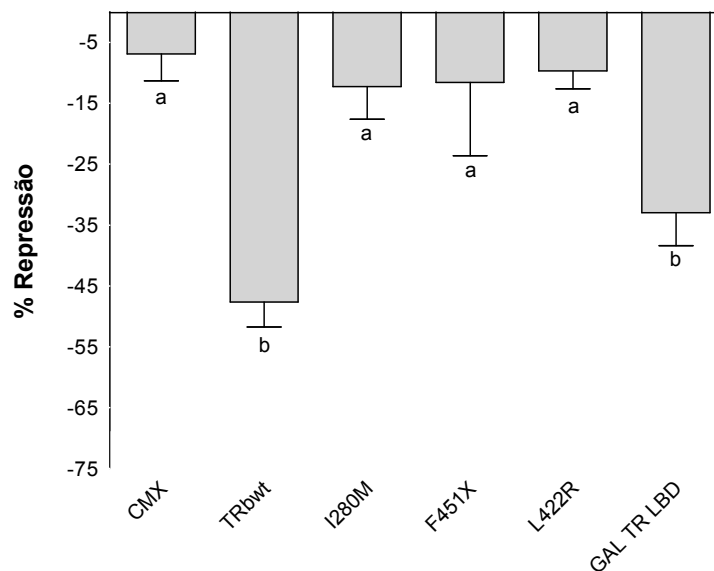


Figura 6.7. Para a regulação da atividade transcricional do promotor do gene PAI-1, TRβ1 necessita se ligar ao DNA, interagir-se com co-reguladores e dimerizar-se em células mesangiais humanas. Resposta ao T₃ promovida pela adição de 1μg dos vetores de expressão TRβ1 wt e mutantes I280M, F451X, L422R e GAL-TRβ-LBD em células mesangiais humanas. As células foram co-transfectadas com 2μg do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou T₃ 10⁻⁷M. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células, e os números do eixo vertical representam a média do percentual da repressão na ausência ou presença de T₃. A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0, considerando-se P < 0,05. n=4

Os mutantes I280M e L422R reprimiram, significativamente, a transcrição do PAI-1, de forma similar à TR β 1 (50 e 45% respectivamente) nas células U937. O receptor quimérico que não se liga ao DNA, GAL-TR β -LBD, e o mutante F451X não foram capazes de reprimir a transcrição da mesma forma que o TR β wt. A taxa de repressão foi de 38% e 20%, respectivamente. Esses valores foram não significativos e semelhantes ao basal (pCMX).

Nas células mesangiais humanas, todos os mutantes I280M, F451X, L422R e GAL-TR β -LBD não foram capazes de reprimir a transcrição gênica promovida pelo promotor do PAI-1. O mutante I280M promoveu uma repressão de 12%; o mutante F451X, 11%, L422R, 10% e GAL-TR β -LBD, 32% (*versus* uma repressão de 50% promovida pelo TR β 1).

6.3 Identificação do Elemento Responsivo ao TR β 1 no Promotor do PAI-1

Tendo em vista que o resultado obtido com as transfecções realizadas com os receptores TR β mutados indicou que a ligação do receptor ao DNA é necessária para a repressão promovida pelo T₃ sobre o promotor de PAI-1, buscamos identificar qual região do promotor do PAI-1 é reconhecida pelo TR como seu elemento responsivo.

Ao analisar a seqüência de nucleotídeos da região promotora identificamos 2 seqüências que já foram descritas em outros trabalhos, que poderiam corresponder aos elementos responsivos negativos ao TR (nTRE), seqüência AGGTCA (seq 1) espaçada por 4 nucleotídeos, caracterizando um elemento responsivo DR-4 e a seqüência TTTGGG (seq. 2) (49, 197, 198).

Por este motivo, utilizamos regiões do promotor do gene PAI-1 contendo essas seqüências nativas e mutadas para a realização do experimento que analisa a capacidade de uma determinada proteína (no caso o TR β) reconhecer e se ligar a essas seqüências de oligonucleotídeos. Esse experimento é denominado ensaio de alteração de mobilidade em gel ou gel *shift*.

A **figura 6.8** mostra que o TR β , como homo e heterodímero, foi capaz de se ligar ao elemento responsivo nativo F2 (linhas 1 e 2; e 11 e 12), mostrando a

capacidade de a proteína sintetizada *in vitro* de se ligar ao seu elemento responsivo nativo.

O TR β , como homodímero, não foi capaz de se ligar às seqüências específicas da região promotora nativa do gene PAI-1 (seq 1 e seq 2) (linhas 3 a 6). Também não se ligou a nenhuma região mutada do *promotor* do PAI-1 (seq 1 mut e seq 2 mut) (linhas 7 a 10).

Na presença do RXR, o TR β ligou-se ao oligonucleotídeo que continha uma seqüência DR-4 (seq 1) (linhas 13 e 14), mas aboliu a ligação nesta mesma região mutada (seq 1 mut) (linhas 17 e 18). Também observamos que o heterodímero TR β -RXR ligou-se de maneira fraca à seqüência que contém a região TTTGGG (seq 2) (linhas 15 e 16) e não se ligou à essa mesma região mutada (seq 2 mut) (linhas 19 e 20).

Seq 1: GCAGAGGGCAGAA**AGGTCAAGGGAGGTTCT**CAGGCCAAGGCTATTGGGGTTTGCTCAATTG

Seq 2: GGGTCCTAGGC**TTTTTGGG**TCACCCGGCATGGC

Seq 1 mut: CGTCTCCCGTCTTTAGTTCCCTAAGAGTGGTTGATAACAAACGAGTTAAC

Seq 2 mut: GGGTCCTAGGCTTATGCATTCACCCGGCATGGC

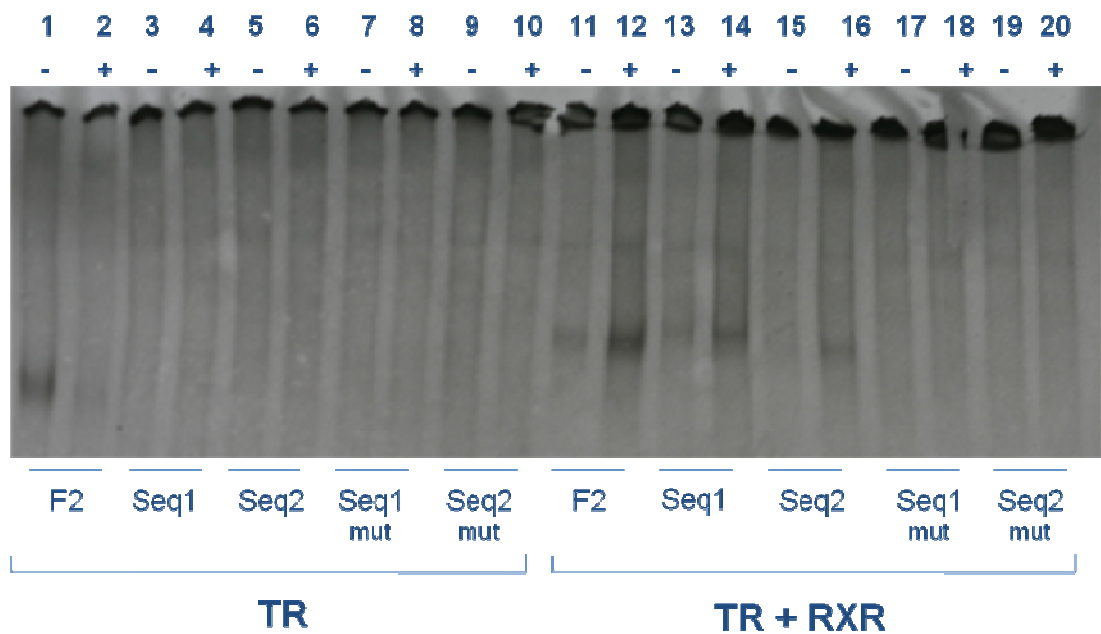


Figura 6.8. O TR liga-se, como heterodímero, à seqüência específica no promotor do gene de PAI-1. O ensaio de ligação proteína-DNA foi realizado empregando-se 1µg de TRβ1wt sintetizado *in vitro* radio-marcado (³⁵S-metionina) e 3µg de RXRwt sintetizado *in vitro* não radio-marcado, na ausência e na presença de T3 e 20ng do oligo (F2, PAI-1wt1, PAI-1wt2, PAI-1mut1 e PAI-1mut2). As reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida 5% não desnaturante e à autoradiografia.

6.4 Efeitos dos Receptores Nucleares PPARs Sobre a Regulação do Promotor do PAI-1

Dando continuidade à avaliação da especificidade da regulação transcricional do promotor do gene PAI-1, foi realizado o ensaio de transfecção transiente para avaliar o efeito dos receptores dos proliferadores peroxissomais nas isoformas α, δ e γ (PPARα, PPARδ e PPARγ) sobre o promotor do PAI-1.

A **figura 6.9** mostra os resultados obtidos com os receptores PPAR α , PPAR δ e PPAR γ em células mesangiais humanas. Na presença de bezafibrato 10^{-4} M, PPAR α e PPAR δ não regularam de forma estatisticamente significativa a transcrição de PAI-1-LUC. O mesmo resultado foi verificado com PPAR γ na presença de rosiglitazona 10^{-5} M.

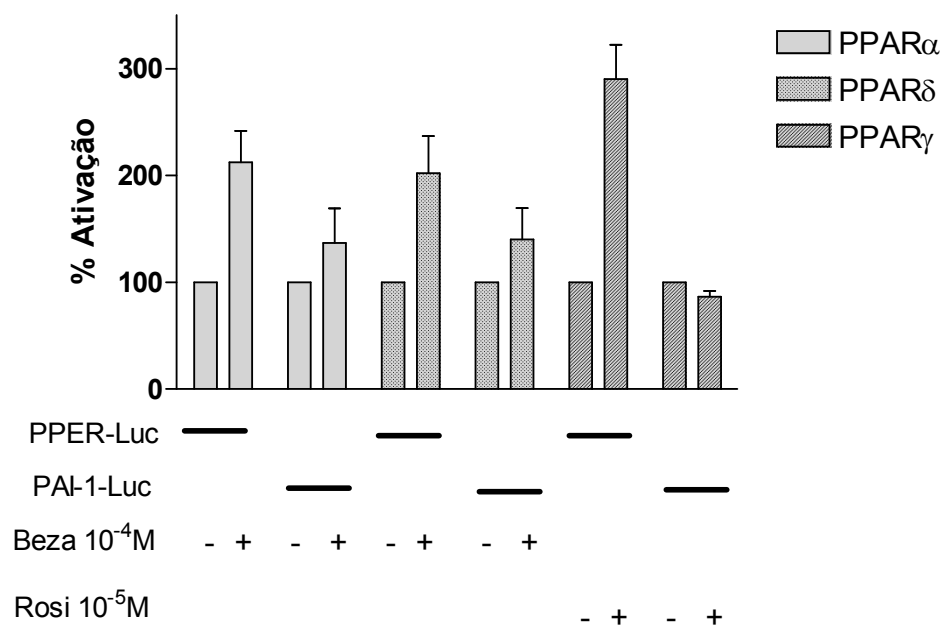


Figura 6.9. PPAR α , PPAR δ e PPAR γ não alteram a transcrição do gene PAI-1 em células mesangiais humanas. Resposta bezafibrato (BEZA) e Rosiglitazona (ROSI) promovida pela adição de $1,5\mu\text{g}$ do vetor de expressão PPAR α , PPAR δ e PPAR γ em células mesangiais humanas. As células foram co-transfectadas com $2\mu\text{g}$ do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC e PPER-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3), ROSI 10^{-5} M ou BEZA 10^{-4} M. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células, e os números do eixo vertical representam a média do percentual da leitura da luciferase na ausência ou presença dos ligantes. A estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 4.0, considerando-se $P < 0,05$. $n=3$

7 DISCUSSÃO

Os THs são hormônios que participam de muitos processos fisiológicos e patológicos. Devido ao fato de exercer sua ação por meio de receptores nucleares, seu principal papel nestes processos consiste na regulação da expressão gênica. Por sua vez, essa regulação pode ocorrer estimulando ou reprimindo a expressão das proteínas (1).

Muitos estudos já foram realizados no sentido de buscar quais genes são regulados pelos THs. O advento dos estudos de microarranjo de DNA (*DNA microarray*) possibilitou a identificação dos genes regulados pelos THs de forma mais ágil. Essa técnica objetiva medir as concentrações de expressão de transcritos em larga escala, ou seja, medir muitos transcritos ao mesmo tempo. Portanto, sua grande vantagem consiste na possibilidade de se realizar estes estudos em diversos tecidos, como o fígado, e em cultura de células, como fibroblastos, de maneira mais rápida (26).

Dessa maneira, inúmeras proteínas reguladas, tanto positiva quanto negativamente pela presença do T_3 , foram identificadas (197, 199-202). Como exposto anteriormente, o mecanismo da regulação positiva está mais bem estabelecido. Entretanto, o mecanismo de regulação negativa é complexo e ainda controverso. Provavelmente, o melhor exemplo de regulação negativa seja a do gene da tireotrofina (TSH) na glândula pituitária como parte do mecanismo de retroalimentação negativa do eixo hipotálamo-hipófise-tireóide (41).

O estudo de microarranjo de DNA realizado por Lin *et al.* (2003) demonstrou que o THs regulam a expressão gênica de várias proteínas relacionadas com a coagulação sangüínea e fibrinólise, como o fibrinogênio, o plasminogênio, o fator de coagulação X e o fator de coagulação II (51).

Entretanto, estudos de fisiologia molecular também já identificaram genes que são regulados pelos THs. Shih *et al.* (2004) mostraram que uma cultura de células hepáticas que expressavam $TR\alpha$ de maneira estável, quando tratadas com T_3 , proporcionavam aumento nas concentrações de fibrinogênio (RNA e proteína). A

utilização de um inibidor da síntese protéica, a cicloheximida, mostrou que a regulação pelo T_3 ocorria de forma direta, sem a necessidade da síntese de outras proteínas (51).

Também foi demonstrado que a regulação exercida pelos THs sobre as concentrações de RNA da neuroserpina (inibidor do ativador de plasminogênio encontrado no sistema nervoso central) em diversas áreas do cérebro. Em algumas áreas do cérebro, como na camada cortical V, os THs reprimem a produção da neuroserpina. Entretanto, em outras áreas, tal como a camada cortical V, já foi demonstrado que as concentrações de RNA da neuroserpina não estão diminuídos no estado hipotireoideo (203).

Os autores mostraram que o T_3 aumenta a expressão da neuroserpina (RNA e proteína) sem alterar, no entanto, a taxa da transcrição gênica em cultura de células de neurônios da camada cortical V. O mecanismo proposto para essa regulação positiva do T_3 sobre a neuroserpina nesta região do cérebro envolve a regulação que o T_3 exerce sobre a proteína HuD. A proteína HuD liga-se à porção 3'-UTR do RNA, conferindo maior estabilidade a este (203).

A camada cortical V possui grande quantidade da proteína HuD, e no hipotireoidismo ocorre a regulação positiva dessa proteína. Assim, devido à superexpressão da proteína HuD nessa região do cérebro, ocorre um aumento na meia-vida do RNA da neuroserpina, aumentando a disponibilidade dessa proteína nesse tecido (203).

Do ponto de vista do mecanismo de regulação gênica, o fenômeno da repressão pode ser estudado em experimentos de transfecção transiente em cultura de células. Isso porque nesse modelo experimental, aspectos relevantes do metabolismo *in vivo* dos THs, tais como a disponibilidade local do hormônio, que é controlado por transportadores de membrana, e sua ativação ou inativação por desidases, estão incluídos nesse cenário (197).

Tendo em vista que a regulação positiva e negativa ocorrem no interior de um mesmo contexto celular, esses mecanismos de regulação divergentes podem ser atribuídos à natureza dos diferentes elementos responsivos encontrados na sequência de DNA da região promotora dos genes-alvo (197). Entretanto, a questão persistente é: como a regulação negativa efetivamente ocorre?

Esse tema vem sendo alvo de inúmeras tentativas de explicações e alguns autores já tentaram listar didaticamente formas de mecanismos possíveis de como a regulação gênica negativa ocorre (vide Capítulo 2. Revisão da Literatura, figura 2.9, pg 18). Essas conclusões são derivadas de observações de estudos isolados que identificaram genes regulados negativamente e detalharam seu mecanismo de ação.

Por esse motivo, esse estudo buscou explicar o mecanismo de repressão observado no gene PAI-1, e contribuir para o entendimento da regulação transcricional negativa. Isto porque cada proteína pode ser regulada de maneira distinta. Ademais, não se pode perder de vista as repercussões clínicas das concentrações de PAI-1 nos pacientes com disfunções da tireóide.

Os resultados obtidos revelam que o T_3 reprime a expressão do gene PAI-1 em células pró-monocíticas humanas e em células mesangiais humanas. O comportamento da expressão gênica do PAI-1 é similar a de outros genes regulados negativamente, como o gene da SOD-1 (49), em que a presença do receptor na ausência do hormônio eleva a taxa de transcrição gênica. A adição do hormônio, na concentração de 10^{-7} M, nas células transfectadas com $TR\beta$, promoveu uma repressão de 70% em relação à taxa basal. A repressão observada nas células transfectadas com $TR\alpha$ foi de 40%.

Mesmo a superexpressão do PAI-1 (no caso, promovida pelo PMA) não foi capaz de impedir a repressão promovida pelo T_3 . A curva dose-resposta demonstra que essa repressão é dependente da concentração de T_3 . Além disso, quanto maior a concentração de $TR\beta 1$, maior a taxa de repressão do promotor do PAI-1. Observamos também que o $TR\alpha 1$ e $TR\beta 1$ reprimem a expressão de PAI-1 de maneira similar nas duas linhagens celulares estudadas.

Para testar a hipótese de o $TR\beta 1$ se ligar ao promotor do gene PAI-1, foi realizado o ensaio de gel *shift* com o $TR\beta 1$ radiomarcado e utilizamos duas seqüências do promotor do PAI-1.

A **figura 7.1** mostra as regiões que testamos como possíveis elementos responsivos no promotor do gene PAI-1. A primeira região, em vermelho, é a seqüência contida entre os nucleotídeos -422 e -389 e possui uma região TTTGGG. O mutante desta região foi construído trocando-se a seqüência TTTGGG por ATGCAT. A segunda

seqüência está contida entre os nucleotídeos -346 e - 286 e traz uma região DR-4 (retângulo lilás). O mutante desta região foi construindo excluindo-se as guanosinas (G) que estão sublinhadas.

```

351 TTCCACGTTT TGATGGAGGT TATCTTTGAT AACTCCACAG TGACCTGGTT
401 CGCCAAAGGA AAAGCAGGCA ACGTGAGCTG TTTTTTTTTT CTCCAAGCTG
451 AACACTAGGG GTCCTAGGCT TTTTGGGTCA CCCGGCATGG CAGACAGTCA
501 ACCTGGCAGG ACATCCGGGA GAGACAGACA CAGGCAGAGG GCAGAGAGGT
551 CAAGGGAGGT TCTCAGGCCA AGGCTATTGG GGTTTGCTCA ATTGTTCCTG
601 AATGCTCTTA CACACGTACA CACACAGAGC AGCACACACA CACACACACA
651 CATGCCTCAG CAAGTCCCAG AGAGGGAGGT GTCGAGGGGG ACCCGCTGGC

```

Figura 7.1. Região promotora do gene PAI-1 apresentando as possíveis regiões identificadas como elementos responsivos ao receptor do hormônio tireoideano. Em vermelho, a região que contém a seqüência TTTGGG. Em verde, a região que contém a seqüência AGGTCAagggAGGTCT (na caixa em lilás), caracterizando um elemento responsivo DR-4.

Como esperado, o TR β se ligou como homo e heterodímero na ausência do ligante e essa ligação foi revertida com a presença do T₃. Foi observada a ligação do TR β 1, como heterodímero, em uma região do promotor do PAI-1. Essa seqüência contém os nucleotídeos AGGTCAAnnnnAGGTCT (caixa lilás). Essa é uma seqüência conhecida como DR-4, já bem estabelecida como um elemento responsivo do hormônio tireoideano. Além disto, podemos afirmar que essa é uma ligação específica, visto que o TR β não foi capaz de se ligar a essa seqüência com mutações nessa região DR-4.

Um resultado que corroborou para a relevância da ligação do TR β 1 ao promotor do PAI-1 foi o fato de o mutante GAL-TR β -LDB não ter sido capaz de promover a regulação negativa.

Também já foi demonstrado que o mutante do TR β , G125S, que se liga ao elemento responsivo o elemento responsivo dos glicocorticóides (GRE) e não ao TRE, aboliu a regulação negativa dos genes do TSH (204) e da SOD-1 (49).

Foi observado também que a ligação do TR β ao promotor do PAI-1 no ensaio de gel *shift* foi mais fraca do que sua ligação ao elemento responsivo F2. Esse

resultado é similar ao observado em outros estudos que avaliaram nTREs. Entretanto, a causa desse fenômeno ainda não foi determinada (49, 198, 205).

Kim *et al.* (2005) demonstraram que os co-repressores de receptores nucleares ativaram o promotor do CD44 por uma fraca ligação TR-DNA (100 vezes menor quando comparada ao DR-4). Essa ligação fraca foi essencial para a regulação do CD44 pelo T_3 (198).

O promotor do gene PAI-1 já foi alvo de diversos estudos. Alguns elementos responsivos já foram caracterizados (**figura 7.2**), incluindo o elemento responsivo a glicocorticóides (GRE) (123), que também é responsável pela ação da aldosterona (187, 206), o elemento responsivo ao VLDL (VLDRE) (207), que se encontra adjacente ao sítio comum de polimorfismo (4G/5G), localizado na região -675, e dois sítios Sp1 que parecem mediar a resposta à glicose e o elemento responsivo do $TNF\alpha$ (208). Foram incluídos nesta figura as possíveis as regiões que caracterizam os elementos responsivos ao $TR\beta 1$ (TRE) no promotor do PAI-1, localizadas nos nucleotídeos -408 (TTTGGG) e -333 (DR-4).



Figura 7.2. Localização esquemática das regiões promotoras do gene PAI-1 humano.

Também foi observada a necessidade da preservação da superfície de interação do TR a co-ativadores para a repressão do PAI-1. Isto porque, o receptor que continha mutação nessa superfície não foi capaz de reprimir a transcrição gênica do PAI-1. Esse resultado foi observado nas duas linhagens celulares estudadas. Concluímos que a ligação do TR aos co-ativadores é fundamental para a repressão do PAI-1 promovida pelo TR.

Alguns estudos já demonstraram a importância da superfície de ligação a co-ativadores no TR para a regulação transcricional negativa (50). Os co-ativadores são proteínas capazes de remodelar a cromatina via modificações enzimáticas das histonas promovendo sua acetilação ou via regulação da transcrição na região promotora por interação com a RNA polimerase ou outros fatores de transcrição (209).

Entretanto, como explicado anteriormente, para a regulação gênica negativa, o TR β 1, quando não ligado ao hormônio, está associado a proteínas co-repressoras, e dessa forma, promove a ativação da transcrição dos genes-alvo. Com a ligação do hormônio ao receptor, o TR β 1 se dissocia dos co-repressores e associa-se aos co-ativadores, causando a repressão dos genes-alvo (vide Capítulo 2. Revisão da Literatura, figura 2.9.a) (210). Por esse motivo, a manutenção da integridade da superfície de ligação às proteínas co-ativadoras têm se mostrado essencial para a ação dos THs na repressão gênica (50).

Outro aspecto refere-se à diferença dos resultados obtidos com os mutantes nesses dois tipos celulares, sugerindo que exista diferença com relação ao mecanismo de ação.

Outros receptores nucleares já demonstraram exercer regulação gênica diferenciada dependendo do tecido estudado (vide, abaixo, os comentários sobre os receptores PPARs). Isto porque o contexto celular determina: a) a taxa de entrada e saída do hormônio nas células; b) a presença e a concentração de proteínas co-ativadoras e co-repressoras; c) o metabolismo intracelular do hormônio; e d) a presença de outras proteínas que reprimem indiretamente a ação do TR, por exemplo, sequestrando co-ativadores ou co-repressores.

Por esse motivo, entender o mecanismo de ação do TR em cada tipo celular é fundamental para, no futuro, delinear novas estratégias terapêuticas para o tratamento

de trombose, hemorragia e até mesmo fibrose tecidual, em pacientes com disfunções da tireóide.

As duas linhagens de células que estudamos a regulação do promotor do PAI-1 pelos THs são produtoras de PAI-1 *in vivo* (91). As células U937 são pró-monócitos humanos. A importância de se estudar a regulação de PAI-1 nesse tipo celular reside no fato de essas células atuarem em processos inflamatórios. Isso porque já está bem demonstrado a relação entre a inflamação, PAI-1 e processos trombóticos (156).

Por outro lado, as células mesangiais humanas funcionam como um elemento de ligação entre os capilares glomerulares e participam das glomerulonefrites e o PAI-1 é um importante fator envolvido na fibrose renal (147). Por esse motivo, é necessário entender o papel dos THs nessas células e se esses elementos estão envolvidos na regulação gênica de PAI-1.

O resultado obtido está em aparente contradição com o observado clinicamente em pacientes com hipo ou hipertireoidismo. Observou-se nos estudos epidemiológicos uma associação positiva entre as concentrações plasmáticas do PAI-1 e dos THs. Isso significa que, quanto maior a concentração plasmática de THs, maior a concentração do PAI-1 (64).

Entretanto, a concentração plasmática de PAI-1 depende de sua síntese pelos principais tecidos produtores, que são o fígado, o endotélio e também dos adipócitos (nos indivíduos obesos) (91) Em nosso estudo, avaliamos somente as células leucocitárias e mesangiais humanas. Assim, é possível que a regulação de PAI-1 pelos THs seja tecido-específica e novos estudos deverão abordar essa questão.

Outros receptores nucleares já foram identificados como reguladores da expressão do PAI-1. Estudos indicam que tanto a aldosterona quanto a angiotensina II e IV, por meio do receptor de mineralocorticóides (MR) aumentam a expressão de PAI-1 em algumas linhagens celulares como, astrocitos, células endoteliais, células epiteliais dos túbulos proximais e células mesangiais de ratos (187, 211-213).

Outro receptor nuclear que já foi alvo de investigação sobre a possibilidade de regular a expressão do PAI-1, foi o receptor de estrogênio (ER). A associação entre o estrogênio e o sistema fibrinolítico foi demonstrada em estudos observacionais e ensaios clínicos, evidenciando que mulheres na pré-menopausa apresentam

concentrações plasmáticas de PAI-1 menores do que mulheres na pós-menopausa, e que a terapia de reposição hormonal (TRH) atenua a produção de PAI-1 (214).

Smith *et al.* (2004) estudaram o mecanismo molecular por meio do qual o ER regula a expressão gênica em células vasculares. Observaram que o ER α ativou a transcrição do PAI-1 enquanto o ER β causou sua repressão. Esse estudo demonstrou que o ER α ativou a transcrição por uma ligação direta à região em seu promotor, localizado na região -427 (identificado nesse estudo). Esses autores não conseguiram identificar o mecanismo por meio do qual o ER β reprimiu a transcrição (189).

Outros receptores nucleares que têm sido investigados quanto à possibilidade de regular a expressão gênica do PAI-1, são os receptores PPARs. Isso porque, observa-se nos pacientes com diabetes mellitus (DM) altas concentrações plasmáticas de PAI-1 (215). Por esse motivo, é uma hipótese que os PPARs possam estar relacionados com a regulação da expressão de PAI-1.

Os resultados dos estudos realizados são controversos e sugerem que esta regulação seja tecido-específica e dependente do ligante utilizado (160, 162-165, 168). Por exemplo, Marx *et al.* (1999), demonstrou que a ativação do PPAR γ , em células endoteliais humanas, por ligantes naturais, aumentou a expressão de PAI-1. Isso sugere que PPAR γ atua como um regulador positivo da expressão gênica do PAI-1 nesse tipo celular (162). Por outro lado, o estudo de Kato *et al.* (1999) mostrou a inibição da expressão de RNA mensageiro (mRNA) de PAI-1 ao utilizar ligantes sintéticos de PPARs, também em células endoteliais humanas, sugerindo que a secreção de PAI-1 é regulada negativamente em nível transcricional (163).

Devido ao fato de ainda não terem sido realizados experimentos em células mesangiais humanas, esse trabalho se propôs a testar se os PPARs estariam envolvidos na regulação gênica do PAI-1 nesse tipo celular. Os resultados revelaram que os PPARs e seus ligantes, bezafibrato e rosiglitazona, não promoveram alterações na transcrição do promotor do PAI-1.

Assim, são necessários estudos adicionais para esclarecer o mecanismo pelo qual os PPARs regulam a expressão do gene PAI-1. A elucidação desse mecanismo é importante para o entendimento da relação entre doenças metabólicas e distúrbios cardiovasculares e pode ser uma futura contribuição para evitar a progressão de

processos patológicos tais como a síndrome metabólica, a resistência à insulina, o diabetes *mellitus*, obesidade e a dislipidemia.

Em conclusão, esse estudo revelou que o promotor do gene PAI-1 é um novo alvo para a ação do TR. Dado que o PAI-1 é o principal regulador do sistema fibrinolítico e está envolvido em processos de fibrose tecidual, isso associa o hormônio tireoideano aos processos trombóticos e ao risco de hemorragia.

Além disso, esse estudo destaca que o promotor do PAI-1 é uma ferramenta útil para o estudo dos genes que são regulados negativamente pelo hormônio tireoideano, fornecendo nova percepção sobre a regulação negativa promovida pelos receptores nucleares.

Entretanto, alguns experimentos ainda são necessários para complementar o entendimento sobre o mecanismo por meio do qual os THs regulam a expressão gênica do PAI-1, principalmente: a) demonstrar o efeito do T₃ sobre a expressão do RNA mensageiro (mRNA) e sobre a proteína; e b) confirmar se o efeito do TR é mediado diretamente sobre o promotor do PAI-1 ou por meio da modulação da expressão de outro fator de transcrição.

8 CONCLUSÃO

1. Os estudos em células pró-monocíticas (U937) e mesangiais humanas sugerem que o promotor de PAI-1 seja regulado negativamente, de maneira dose dependente pelo T_3 e esse efeito é igual para TR α e TR β .
2. O mecanismo de regulação da repressão da transcrição do gene PAI-1 parece depender da ligação do receptor do hormônio tireoideano ao DNA.
3. Foram identificados dois possíveis elementos responsivos ao TR no promotor do PAI-1 entre o nucleotídeo -422 e -389, que contém uma seqüência TTTGGG, e entre o nucleotídeo -346 e -286, que contém uma seqüência DR-4. O TR se liga como heterodímero às seqüências de DNA citadas.
4. A preservação da superfície de interação do TR com os co-ativadores parece ser importante para a regulação negativa do promotor do PAI-1.
5. Os PPARs (PPAR α , PPAR δ E PPAR γ) e seus ligantes, bezafibrato e rosiglitazona, não promoveram alterações na transcrição do promotor do gene PAI-1.

9 APÊNDICE A

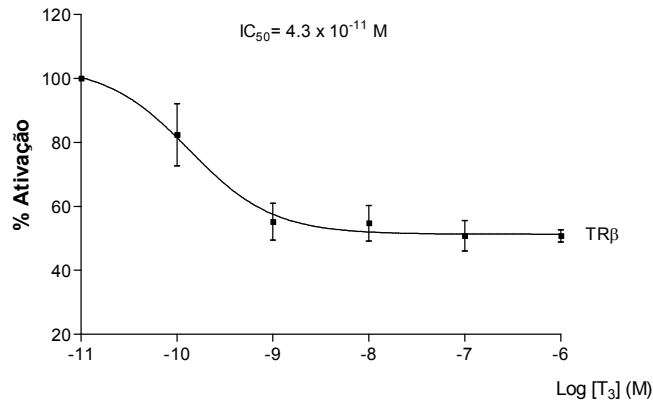


Figura A.1. Efeito do T₃ na repressão do TRβ1 no promotor do PAI-1 em células mesangiais humanas. Curva dose-resposta ao T₃ promovida pela adição de 1μg do vetor de expressão TRβ1 em células mesangiais humanas. As células foram co-transfectadas com 2μg do vetor para o gene repórter PAI-1 (PAI-1-LUC) e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou concentrações crescentes de T₃ (10⁻¹⁰M, 10⁻⁹M, 10⁻⁸M, 10⁻⁷M e 10⁻⁶M). A atividade do gene repórter foi medida após 22hs com a lise das células, e os números representam o percentual de ativação em relação ao respectivo receptor na ausência de T₃. O IC₅₀ do TRβ1 é igual a 4,3 x 10⁻¹⁰ M. n=3.

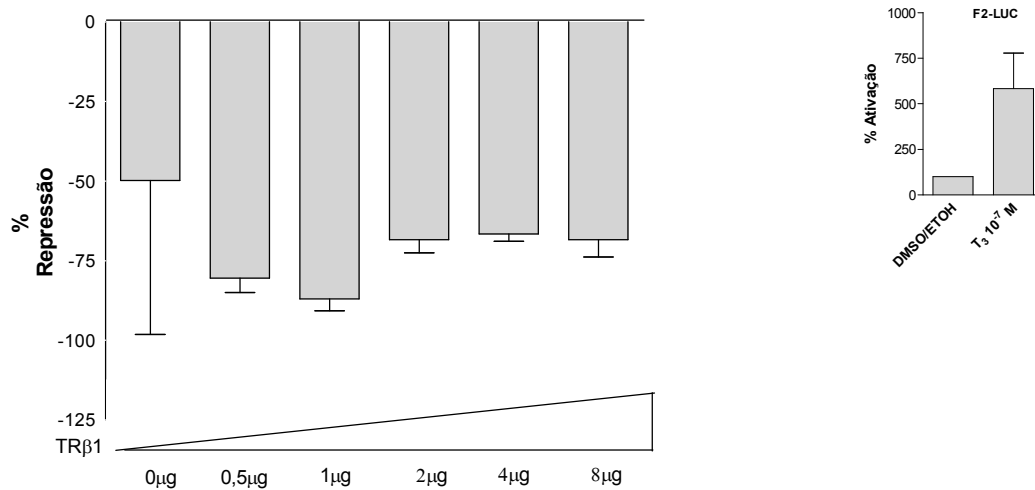


Figura A.2. Efeito de diferentes concentrações do TRβ1 sobre o promotor do PAI-1 em células mesangiais humanas. Resposta ao T₃ promovida pela adição de 0,5μg, 1μg, 2μg, 4μg e 8μg do vetor de expressão TRβ1 em células mesangiais humanas. As células foram co-transfectadas com 2μg do vetor para o gene repórter PAI-1-LUC ou 4μg F2-LUC e tratadas com o veículo (DMSO/ETOH 2:3) ou T₃ 10⁻⁷M. A atividade do gene repórter foi medida após 22h com a lise das células e os números do eixo vertical representam a média do percentual da repressão na ausência e presença de T₃. n=4.

10 REFERÊNCIAS

1. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev* 2001 Jul;81(3):1097-142.
2. Barra GB, Velasco LF, Pessanha RP, Campos AM, Moura FN, Dias SM, et al. [Molecular mechanism of thyroid hormone action]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004 Feb;48(1):25-39.
3. Oetting A, Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007 Jun;21(2):193-208.
4. Moura EG, Moura CC. [Regulation of thyrotropin synthesis and secretion]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004 Feb;48(1):40-52.
5. Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP, Visser TJ. Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev* 2001 Aug;22(4):451-76.
6. Samuels HH, Tsai JS. Thyroid hormone action in cell culture: demonstration of nuclear receptors in intact cells and isolated nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1973 Dec;70(12):3488-92.
7. Ribeiro RC, Apriletti JW, Wagner RL, West BL, Feng W, Huber R, et al. Mechanisms of thyroid hormone action: insights from X-ray crystallographic and functional studies. *Recent Prog Horm Res* 1998;53:351-92; discussion 92-4.
8. Bassett JH, Harvey CB, Williams GR. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. *Mol Cell Endocrinol* 2003 Dec 31;213(1):1-11.
9. Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS Lett* 2008 Jan 9;582(1):2-9.
10. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends Genet* 2001 Oct;17(10):554-6.
11. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev* 2006 Dec;58(4):685-704.
12. Olefsky JM. Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 2001 Oct 5;276(40):36863-4.

13. Glass CK. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2006 Mar;116(3):556-60.
14. Neves FAR WP, Ribeiro RCJ, Baxter, JD. Syndrome of Resistance to glucocorticoid and mineralocorticoid hormones. *Genetics in Endocrinology*: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.
15. Wu Y, Xu B, Koenig RJ. Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. *J Biol Chem* 2001 Feb 9;276(6):3929-36.
16. Flamant F, Baxter JD, Forrest D, Refetoff S, Samuels H, Scanlan TS, et al. International Union of Pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors. *Pharmacol Rev* 2006 Dec;58(4):705-11.
17. Yen PM, Feng X, Flamant F, Chen Y, Walker RL, Weiss RE, et al. Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice. *EMBO Rep* 2003 Jun;4(6):581-7.
18. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev* 2001 Jul;81(3):1269-304.
19. Nascimento AS, Dias SM, Nunes FM, Aparicio R, Ambrosio AL, Bleicher L, et al. Structural rearrangements in the thyroid hormone receptor hinge domain and their putative role in the receptor function. *J Mol Biol* 2006 Jul 14;360(3):586-98.
20. Wu Y, Delerive P, Chin WW, Burris TP. Requirement of helix 1 and the AF-2 domain of the thyroid hormone receptor for coactivation by PGC-1. *J Biol Chem* 2002 Mar 15;277(11):8898-905.
21. Wagner RL, Huber BR, Shiau AK, Kelly A, Cunha Lima ST, Scanlan TS, et al. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 2001 Mar;15(3):398-410.
22. Borngraeber S, Budny MJ, Chiellini G, Cunha-Lima ST, Togashi M, Webb P, et al. Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Dec 23;100(26):15358-63.
23. Nunes FM, Aparicio R, Santos MA, Portugal RV, Dias SM, Neves FA, et al. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of isoform alpha1 of the human thyroid hormone receptor ligand-binding domain. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2004 Oct;60(Pt 10):1867-70.
24. Sandler B, Webb P, Apriletti JW, Huber BR, Togashi M, Cunha Lima ST, et al. Thyroxine-thyroid hormone receptor interactions. *J Biol Chem* 2004 Dec 31;279(53):55801-8.

25. Glass CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocr Rev* 1994 Jun;15(3):391-407.
26. Lewin B. *Genes VIII*: Pearson Prentice Hall; 2004.
27. Velasco LF, Togashi M, Walfish PG, Pessanha RP, Moura FN, Barra GB, et al. Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor. *J Biol Chem* 2007 Apr 27;282(17):12458-66.
28. Ribeiro RC, Kushner PJ, Apriletti JW, West BL, Baxter JD. Thyroid hormone alters in vitro DNA binding of monomers and dimers of thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol* 1992 Jul;6(7):1142-52.
29. Apriletti JW, Ribeiro RC, Wagner RL, Feng W, Webb P, Kushner PJ, et al. Molecular and structural biology of thyroid hormone receptors. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1998 Nov;25:S2-11.
30. Marimuthu A, Feng W, Tagami T, Nguyen H, Jameson JL, Fletterick RJ, et al. TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor. *Mol Endocrinol* 2002 Feb;16(2):271-86.
31. Horlein AJ, Naar AM, Heinzl T, Torchia J, Gloss B, Kurokawa R, et al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 1995 Oct 5;377(6548):397-404.
32. Chen JD, Evans RM. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 1995 Oct 5;377(6548):454-7.
33. Ordentlich P, Downes M, Xie W, Genin A, Spinner NB, Evans RM. Unique forms of human and mouse nuclear receptor corepressor SMRT. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Mar 16;96(6):2639-44.
34. Nagy L, Kao HY, Chakravarti D, Lin RJ, Hassig CA, Ayer DE, et al. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* 1997 May 2;89(3):373-80.
35. Hu X, Lazar MA. The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature* 1999 Nov 4;402(6757):93-6.
36. Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev* 2000 Jan 15;14(2):121-41.
37. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999 Jun;20(3):321-44.
38. Nunes FM. Thyroid hormone: mechanism of action and biological significance. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2003;47(6):639-43.

39. Flug F, Copp RP, Casanova J, Horowitz ZD, Janocko L, Plotnick M, et al. cis-acting elements of the rat growth hormone gene which mediate basal and regulated expression by thyroid hormone. *J Biol Chem* 1987 May 5;262(13):6373-82.
40. dos Santos RA, Giannocco G, Nunes MT. Thyroid hormone stimulates myoglobin expression in soleus and extensorum digitorum longus muscles of rats: concomitant alterations in the activities of Krebs cycle oxidative enzymes. *Thyroid* 2001 Jun;11(6):545-50.
41. Shupnik MA. Thyroid hormone suppression of pituitary hormone gene expression. *Rev Endocr Metab Disord* 2000 Jan;1(1-2):35-42.
42. Guissouma H, Ghorbel MT, Seugnet I, Ouatas T, Demeneix BA. Physiological regulation of hypothalamic TRH transcription in vivo is T3 receptor isoform specific. *FASEB J* 1998 Dec;12(15):1755-64.
43. Rosenfeld MG, Glass CK. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem* 2001 Oct 5;276(40):36865-8.
44. Nagaya T, Madison LD, Jameson JL. Thyroid hormone receptor mutants that cause resistance to thyroid hormone. Evidence for receptor competition for DNA sequences in target genes. *J Biol Chem* 1992 Jun 25;267(18):13014-9.
45. Kopp P, Kitajima K, Jameson JL. Syndrome of resistance to thyroid hormone: insights into thyroid hormone action. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996 Jan;211(1):49-61.
46. Flamant F, Samarut J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab* 2003 Mar;14(2):85-90.
47. Flamant F, Gauthier K, Samarut J. Thyroid hormones signaling is getting more complex: STORMs are coming. *Mol Endocrinol* 2007 Feb;21(2):321-33.
48. Lazar MA. Thyroid hormone action: a binding contract. *J Clin Invest* 2003 Aug;112(4):497-9.
49. Santos GM, Afonso V, Barra GB, Togashi M, Webb P, Neves FA, et al. Negative regulation of superoxide dismutase-1 promoter by thyroid hormone. *Mol Pharmacol* 2006 Sep;70(3):793-800.
50. Ortiga-Carvalho TM, Shibusawa N, Nikrodhanond A, Oliveira KJ, Machado DS, Liao XH, et al. Negative regulation by thyroid hormone receptor requires an intact coactivator-binding surface. *J Clin Invest* 2005 Sep;115(9):2517-23.
51. Shih CH, Chen SL, Yen CC, Huang YH, Chen CD, Lee YS, et al. Thyroid hormone receptor-dependent transcriptional regulation of fibrinogen and coagulation proteins. *Endocrinology* 2004 Jun;145(6):2804-14.

52. Grazia YRB, A. R. Estudo da procedência dos pacientes e dos tipos de tireoidopatias encontradas no ambulatório de Endocrinologia do HSL-PUCRS nos anos de 2005 e 2006. *Scientia Medica* 2006;16(2):97-102.
53. McPhee SJP, M. A. *Current Medical Diagnosis and Treatment*. Tierney LM, editor: McGraw Hill; 2007.
54. Squizzato A, Gerdes VE, Brandjes DP, Buller HR, Stam J. Thyroid diseases and cerebrovascular disease. *Stroke* 2005 Oct;36(10):2302-10.
55. Siegert CE, Smelt AH, de Bruin TW. Superior sagittal sinus thrombosis and thyrotoxicosis. Possible association in two cases. *Stroke* 1995 Mar;26(3):496-7.
56. De Schryver EL, Hoogenraad TU, Banga JD, Kappelle LJ. Thyrotoxicosis, protein C deficiency and lupus anticoagulant in a case of cerebral sinus thrombosis. *Neth J Med* 1999 Oct;55(4):201-2.
57. Verberne HJ, Fliers E, Prummel MF, Stam J, Brandjes DP, Wiersinga WM. Thyrotoxicosis as a predisposing factor for cerebral venous thrombosis. *Thyroid* 2000 Jul;10(7):607-10.
58. Ra CS, Lui CC, Liang CL, Chen HJ, Kuo YL, Chen WF. Superior sagittal sinus thrombosis induced by thyrotoxicosis. Case report. *J Neurosurg* 2001 Jan;94(1):130-2.
59. Maes J, Michotte A, Velkeniers B, Stadnik T, Jochmans K. Hyperthyroidism with increased factor VIII procoagulant protein as a predisposing factor for cerebral venous thrombosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2002 Oct;73(4):458.
60. Molloy E, Cahill M, O'Hare JA. Cerebral venous sinus thrombosis precipitated by Graves' disease and Factor V Leiden mutation. *Ir Med J* 2003 Feb;96(2):46-7.
61. Mouton S, Nighoghossian N, Berruyer M, Derex L, Philippeau F, Cakmak S, et al. Hyperthyroidism and cerebral venous thrombosis. *Eur Neurol* 2005;54(2):78-80.
62. Bar-Sela S, Ehrenfeld M, Eliakim M. Arterial embolism in thyrotoxicosis with atrial fibrillation. *Arch Intern Med* 1981 Aug;141(9):1191-2.
63. Petersen P, Hansen JM. Stroke in thyrotoxicosis with atrial fibrillation. *Stroke* 1988 Jan;19(1):15-8.
64. Squizzato A, Romualdi E, Buller HR, Gerdes VE. Clinical review: Thyroid dysfunction and effects on coagulation and fibrinolysis: a systematic review. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Jul;92(7):2415-20.
65. Saito I, Saruta T. Hypertension in thyroid disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994 Jun;23(2):379-86.
66. Duntas LH. Thyroid disease and lipids. *Thyroid* 2002 Apr;12(4):287-93.

67. Papaioannou GI, Lagasse M, Mather JF, Thompson PD. Treating hypothyroidism improves endothelial function. *Metabolism* 2004 Mar;53(3):278-9.
68. Morris MS, Bostom AG, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia associated with hypothyroidism in the third US National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis* 2001 Mar;155(1):195-200.
69. Burggraaf J, Lalezari S, Emeis JJ, Vischer UM, de Meyer PH, Pijl H, et al. Endothelial function in patients with hyperthyroidism before and after treatment with propranolol and thiamazol. *Thyroid* 2001 Feb;11(2):153-60.
70. Coban E, Aydemir M, Yazicioglu G, Ozdogan M. Endothelial dysfunction in subjects with subclinical hyperthyroidism. *J Endocrinol Invest* 2006 Mar;29(3):197-200.
71. Dorr M, Robinson DM, Wallaschofski H, Schwahn C, John U, Felix SB, et al. Low serum thyrotropin is associated with high plasma fibrinogen. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 Feb;91(2):530-4.
72. Liu L, Wang X, Lin Z, Wu H. Elevated plasma levels of VWF:Ag in hyperthyroidism are mediated through beta-adrenergic receptors. *Endocr Res* 1993;19(2-3):123-33.
73. Myrup B, Bregengard C, Faber J. Primary haemostasis in thyroid disease. *J Intern Med* 1995 Jul;238(1):59-63.
74. Li Y, Chen H, Tan J, Wang X, Liang H, Sun X. Impaired release of tissue plasminogen activator from the endothelium in Graves' disease - indicator of endothelial dysfunction and reduced fibrinolytic capacity. *Eur J Clin Invest* 1998 Dec;28(12):1050-4.
75. Nagasaki T, Inaba M, Henmi Y, Kumeda Y, Ueda M, Tahara H, et al. Change in von Willebrand factor and carotid intima-media thickness in hypothyroid patients with normal thyroid function after levothyroxine replacement therapy. *Eur J Endocrinol* 2004 Feb;150(2):125-31.
76. Nagasaki T, Inaba M, Kumeda Y, Ueda M, Hiura Y, Tahara H, et al. Decrease of arterial stiffness at common carotid artery in hypothyroid patients by normalization of thyroid function. *Biomed Pharmacother* 2005 Jan-Feb;59(1-2):8-14.
77. Gullu S, Sav H, Kamel N. Effects of levothyroxine treatment on biochemical and hemostasis parameters in patients with hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2005 Mar;152(3):355-61.
78. Farid NR, Griffiths BL, Collins JR, Marshall WH, Ingram DW. Blood coagulation and fibrinolysis in thyroid disease. *Thromb Haemost* 1976 Apr 30;35(2):415-22.
79. Rennie JA, Bewsher PD, Murchison LE, Ogston D. Coagulation and fibrinolysis in thyroid disease. *Acta Haematol* 1978;59(3):171-7.

80. Chadarevian R, Bruckert E, Leenhardt L, Giral P, Ankri A, Turpin G. Components of the fibrinolytic system are differently altered in moderate and severe hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 Feb;86(2):732-7.
81. Ozcan MA, Comlekci A, Demirkan F, Yuksel F, Sari I, Demir T, et al. Plasma levels of free tissue factor pathway inhibitor in patients with various thyroid disorders. *Thromb Res* 2003 Jun 1;110(4):243-7.
82. Horne MK, 3rd, Singh KK, Rosenfeld KG, Wesley R, Skarulis MC, Merryman PK, et al. Is thyroid hormone suppression therapy prothrombotic? *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Sep;89(9):4469-73.
83. Akinci B, Comlekci A, Yener S, Demir T, Ozcan MA, Bayraktar F, et al. Thrombin activatable fibrinolysis inhibitor antigen levels are inversely correlated with plasminogen activator inhibitor-1 antigen levels in hyperthyroid patients. *Endocr J* 2007 Aug;54(4):593-9.
84. Guyton ACH, J.E. *Textbook of Medical Physiology*. Eleventh Edition ed: Elsevier; 2006.
85. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis. *Br J Haematol* 2005 May;129(3):307-21.
86. Kluff C. The fibrinolytic system and thrombotic tendency. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003 Sep-2004 Dec;33(5-6):425-9.
87. Franco RF. Fisiologia da coagulação, anticoagulação e fibrinólise. *Medicina, Ribeirão Preto* 2001;34(jil-dez):229-37.
88. Strickland S. Tissue plasminogen activator in nervous system function and dysfunction. *Thromb Haemost* 2001 Jul;86(1):138-43.
89. Ploug M. Structure-function relationships in the interaction between the urokinase-type plasminogen activator and its receptor. *Curr Pharm Des* 2003;9(19):1499-528.
90. Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000 Jun 15;342(24):1792-801.
91. Lijnen HR. Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1. *J Thromb Haemost* 2005 Jan;3(1):35-45.
92. Samia JA, Alexander SJ, Horton KW, Auron PE, Byers MG, Shows TB, et al. Chromosomal organization and localization of the human urokinase inhibitor gene: perfect structural conservation with ovalbumin. *Genomics* 1990 Jan;6(1):159-67.
93. Kruihof EK, Baker MS, Bunn CL. Biological and clinical aspects of plasminogen activator inhibitor type 2. *Blood* 1995 Dec 1;86(11):4007-24.

94. Dougherty KM, Pearson JM, Yang AY, Westrick RJ, Baker MS, Ginsburg D. The plasminogen activator inhibitor-2 gene is not required for normal murine development or survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Jan 19;96(2):686-91.
95. Jackson C, Whitmont K, Tritton S, March L, Sambrook P, Xue M. New therapeutic applications for the anticoagulant, activated protein C. *Expert Opin Biol Ther* 2008 Aug;8(8):1109-22.
96. Esmon CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 2000 Mar 7;1477(1-2):349-60.
97. Geiger M. Protein C inhibitor, a serpin with functions in- and outside vascular biology. *Thromb Haemost* 2007 Mar;97(3):343-7.
98. Meijers JC, Chung DW. Organization of the gene coding for human protein C inhibitor (plasminogen activator inhibitor-3). Assignment of the gene to chromosome 14. *J Biol Chem* 1991 Aug 15;266(23):15028-34.
99. Carter RE, Cerosaletti KM, Burkin DJ, Fournier RE, Jones C, Greenberg BD, et al. The gene for the serpin thrombin inhibitor (PI7), protease nexin I, is located on human chromosome 2q33-q35 and on syntenic regions in the mouse and sheep genomes. *Genomics* 1995 May 1;27(1):196-9.
100. Vivien D, Buisson A. Serine protease inhibitors: novel therapeutic targets for stroke? *J Cereb Blood Flow Metab* 2000 May;20(5):755-64.
101. Yepes M, Lawrence DA. Neuroserpin: a selective inhibitor of tissue-type plasminogen activator in the central nervous system. *Thromb Haemost* 2004 Mar;91(3):457-64.
102. Schrimpf SP, Bleiker AJ, Brecevic L, Kozlov SV, Berger P, Osterwalder T, et al. Human neuroserpin (PI12): cDNA cloning and chromosomal localization to 3q26. *Genomics* 1997 Feb 15;40(1):55-62.
103. Galliciotti G, Sonderegger P. Neuroserpin. *Front Biosci* 2006;11:33-45.
104. Miranda E, Lomas DA. Neuroserpin: a serpin to think about. *Cell Mol Life Sci* 2006 Mar;63(6):709-22.
105. Tagnon HJ, Palade GE. Activation of Proplasmin by a Factor from Mammalian Tissue. *J Clin Invest* 1950 Mar;29(3):317-24.
106. Dellas C, Loskutoff DJ. Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease. *Thromb Haemost* 2005 Apr;93(4):631-40.
107. Simionescu M, Antohe F. Functional ultrastructure of the vascular endothelium: changes in various pathologies. *Handb Exp Pharmacol* 2006(176 Pt 1):41-69.

108. Pugatch EM, Foster EA, Macfarlane DE, Poole JC. The extraction and separation of activators and inhibitors of fibrinolysis from bovine endothelium and mesothelium. *Br J Haematol* 1970 Jun;18(6):669-81.
109. Stegnar M, Kopitar M, Accetto B, Lebez D. Proceedings: Fibrin plate studies of plasminogen activator and inhibitor from pig leucocytes. *Thromb Diath Haemorrh* 1975 Sep 30;34(1):339.
110. Clemmensen I, Thorsen S, Mullertz S. Purification of a plasminogen activator inhibitor indistinguishable from alpha1-antitrypsin and an urokinase inhibitor in pregnancy plasma. *Haemostasis* 1976;5(4):218-30.
111. Hegt VN. Relations between activation and inhibition of fibrinolysis in the walls of human arteries and veins. *Thromb Haemost* 1977 Aug 31;38(2):407-19.
112. Hegt VN. Localization and distribution of fibrinolysis inhibition in the walls of human arteries and veins. *Thromb Res* 1977 Jan;10(1):121-33.
113. Loskutoff DJ, Edgington TE. Synthesis of a fibrinolytic activator and inhibitor by endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 Sep;74(9):3903-7.
114. Dosne AM, Dupuy E, Bodevin E. Production of a fibrinolytic inhibitor by cultured endothelial cells derived from human umbilical vein. *Thromb Res* 1978 Mar;12(3):377-87.
115. Holmberg L, Lecander I, Persson B, Astedt B. An inhibitor from placenta specifically binds urokinase and inhibits plasminogen activator released from ovarian carcinoma in tissue culture. *Biochim Biophys Acta* 1978 Nov 15;544(1):128-37.
116. O'Donnell-Tormey J, Quigley JP. Inhibition of plasminogen activator release from transformed chicken fibroblasts by a protease inhibitor. *Cell* 1981 Nov;27(1 Pt 2):85-95.
117. Loskutoff DJ, van Mourik JA, Erickson LA, Lawrence D. Detection of an unusually stable fibrinolytic inhibitor produced by bovine endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983 May;80(10):2956-60.
118. Hekman CM, Loskutoff DJ. Endothelial cells produce a latent inhibitor of plasminogen activators that can be activated by denaturants. *J Biol Chem* 1985 Sep 25;260(21):11581-7.
119. Loskutoff DJ, Edgington TS. An inhibitor of plasminogen activator in rabbit endothelial cells. *J Biol Chem* 1981 May 10;256(9):4142-5.
120. Klinger KW, Winqvist R, Riccio A, Andreasen PA, Sartorio R, Nielsen LS, et al. Plasminogen activator inhibitor type 1 gene is located at region q21.3-q22 of chromosome 7 and genetically linked with cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987 Dec;84(23):8548-52.

121. Bosma PJ, van den Berg EA, Kooistra T, Siemieniak DR, Slightom JL. Human plasminogen activator inhibitor-1 gene. Promoter and structural gene nucleotide sequences. *J Biol Chem* 1988 Jul 5;263(19):9129-41.
122. Riccio A, Lund LR, Sartorio R, Lania A, Andreasen PA, Dano K, et al. The regulatory region of the human plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) gene. *Nucleic Acids Res* 1988 Apr 11;16(7):2805-24.
123. van Zonneveld AJ, Curriden SA, Loskutoff DJ. Type 1 plasminogen activator inhibitor gene: functional analysis and glucocorticoid regulation of its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Aug;85(15):5525-9.
124. Keeton MR, Curriden SA, van Zonneveld AJ, Loskutoff DJ. Identification of regulatory sequences in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor beta. *J Biol Chem* 1991 Dec 5;266(34):23048-52.
125. Carmeliet P, Kieckens L, Schoonjans L, Ream B, van Nuffelen A, Prendergast G, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J Clin Invest* 1993 Dec;92(6):2746-55.
126. Carmeliet P, Stassen JM, Schoonjans L, Ream B, van den Oord JJ, De Mol M, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis. *J Clin Invest* 1993 Dec;92(6):2756-60.
127. Kurz KD, Main BW, Sandusky GE. Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride. *Thromb Res* 1990 Nov 15;60(4):269-80.
128. Farrehi PM, Ozaki CK, Carmeliet P, Fay WP. Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice. *Circulation* 1998 Mar 17;97(10):1002-8.
129. Konstantinides S, Schafer K, Thinnes T, Loskutoff DJ. Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice. *Circulation* 2001 Jan 30;103(4):576-83.
130. Koschnick S, Konstantinides S, Schafer K, Crain K, Loskutoff DJ. Thrombotic phenotype of mice with a combined deficiency in plasminogen activator inhibitor 1 and vitronectin. *J Thromb Haemost* 2005 Oct;3(10):2290-5.
131. Ginsburg D, Zeheb R, Yang AY, Rafferty UM, Andreasen PA, Nielsen L, et al. cDNA cloning of human plasminogen activator-inhibitor from endothelial cells. *J Clin Invest* 1986 Dec;78(6):1673-80.
132. Huber R, Carrell RW. Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins. *Biochemistry* 1989 Nov 14;28(23):8951-66.

133. Stefansson S, Muhammad S, Cheng XF, Battey FD, Strickland DK, Lawrence DA. Plasminogen activator inhibitor-1 contains a cryptic high affinity binding site for the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 1998 Mar 13;273(11):6358-66.
134. Pannekoek H, Veerman H, Lambers H, Diergaarde P, Verweij CL, van Zonneveld AJ, et al. Endothelial plasminogen activator inhibitor (PAI): a new member of the Serpin gene family. *EMBO J* 1986 Oct;5(10):2539-44.
135. Ny T, Sawdey M, Lawrence D, Millan JL, Loskutoff DJ. Cloning and sequence of a cDNA coding for the human beta-migrating endothelial-cell-type plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986 Sep;83(18):6776-80.
136. Antalis TM, Clark MA, Barnes T, Lehrbach PR, Devine PL, Schevzov G, et al. Cloning and expression of a cDNA coding for a human monocyte-derived plasminogen activator inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988 Feb;85(4):985-9.
137. Andreasen PA, Riccio A, Welinder KG, Douglas R, Sartorio R, Nielsen LS, et al. Plasminogen activator inhibitor type-1: reactive center and amino-terminal heterogeneity determined by protein and cDNA sequencing. *FEBS Lett* 1986 Dec 15;209(2):213-8.
138. Jensen JK, Gettins PG. High-resolution structure of the stable plasminogen activator inhibitor type-1 variant 14-1B in its proteinase-cleaved form: a new tool for detailed interaction studies and modeling. *Protein Sci* 2008 Oct;17(10):1844-9.
139. Baumann U, Huber R, Bode W, Grosse D, Lesjak M, Laurell CB. Crystal structure of cleaved human alpha 1-antichymotrypsin at 2.7 Å resolution and its comparison with other serpins. *J Mol Biol* 1991 Apr 5;218(3):595-606.
140. Li SH, Gorlatova NV, Lawrence DA, Schwartz BS. Structural differences between active forms of plasminogen activator inhibitor type 1 revealed by conformationally sensitive ligands. *J Biol Chem* 2008 Jun 27;283(26):18147-57.
141. Zhou A, Huntington JA, Pannu NS, Carrell RW, Read RJ. How vitronectin binds PAI-1 to modulate fibrinolysis and cell migration. *Nat Struct Biol* 2003 Jul;10(7):541-4.
142. Ehrlich HJ, Gebbink RK, Keijer J, Linders M, Preissner KT, Pannekoek H. Alteration of serpin specificity by a protein cofactor. Vitronectin endows plasminogen activator inhibitor 1 with thrombin inhibitory properties. *J Biol Chem* 1990 Aug 5;265(22):13029-35.
143. Lawrence DA, Berkenpas MB, Palaniappan S, Ginsburg D. Localization of vitronectin binding domain in plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 1994 May 27;269(21):15223-8.
144. Binder BR, Christ G, Gruber F, Grubic N, Hufnagl P, Krebs M, et al. Plasminogen activator inhibitor 1: physiological and pathophysiological roles. *News Physiol Sci* 2002 Apr;17:56-61.

145. Lee C, Huang, T. Plasminogen activator inhibitor: the expression, biological functions, and effects on tumorigenesis and tumor cell adhesion and migration. *Journal of Cancer Molecules* 2005;1(1):25-36.
146. Rerolle JP, Hertig A, Nguyen G, Sraer JD, Rondeau EP. Plasminogen activator inhibitor type 1 is a potential target in renal fibrogenesis. *Kidney Int* 2000 Nov;58(5):1841-50.
147. Eddy AA, Fogo AB. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol* 2006 Nov;17(11):2999-3012.
148. Mulligan-Kehoe MJ, Schwartz GN, Zacharski LR. The functions of plasminogen activator inhibitor-1: do we have all the pieces of PAI? *Thromb Res* 2006;117(5):483-6.
149. Fay WP, Garg N, Sunkar M. Vascular functions of the plasminogen activation system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 Jun;27(6):1231-7.
150. Lundgren CH, Brown SL, Nordt TK, Sobel BE, Fujii S. Elaboration of type-1 plasminogen activator inhibitor from adipocytes. A potential pathogenetic link between obesity and cardiovascular disease. *Circulation* 1996 Jan 1;93(1):106-10.
151. Morange PE, Aubert J, Peiretti F, Lijnen HR, Vague P, Verdier M, et al. Glucocorticoids and insulin promote plasminogen activator inhibitor 1 production by human adipose tissue. *Diabetes* 1999 Apr;48(4):890-5.
152. Carmassi F, Morale M, Ferrini L, Dell'Omo G, Ferdeghini M, Pedrinelli R, et al. Local insulin infusion stimulates expression of plasminogen activator inhibitor-1 and tissue-type plasminogen activator in normal subjects. *Am J Med* 1999 Oct;107(4):344-50.
153. Yu X, Li C, Li X, Cai L. Rosiglitazone prevents advanced glycation end products-induced renal toxicity likely through suppression of plasminogen activator inhibitor-1. *Toxicol Sci* 2007 Apr;96(2):346-56.
154. Skurk T, Lee YM, Hauner H. Angiotensin II and its metabolites stimulate PAI-1 protein release from human adipocytes in primary culture. *Hypertension* 2001 May;37(5):1336-40.
155. Brown NJ, Agirbasli M, Vaughan DE. Comparative effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II type 1 receptor antagonism on plasma fibrinolytic balance in humans. *Hypertension* 1999 Aug;34(2):285-90.
156. Juhan-Vague I, Alessi MC, Mavri A, Morange PE. Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk. *J Thromb Haemost* 2003 Jul;1(7):1575-9.
157. Chen LL, Zhang JY, Wang BP. Renoprotective effects of fenofibrate in diabetic rats are achieved by suppressing kidney plasminogen activator inhibitor-1. *Vascul Pharmacol* 2006 May;44(5):309-15.

158. Zhou G, Li C, Cai L. Advanced glycation end-products induce connective tissue growth factor-mediated renal fibrosis predominantly through transforming growth factor beta-independent pathway. *Am J Pathol* 2004 Dec;165(6):2033-43.
159. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002;53:409-35.
160. Arts J, Kockx M, Princen HM, Kooistra T. Studies on the mechanism of fibrinolytic-inhibited expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cultured hepatocytes from cynomolgus monkey. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 Jan;17(1):26-32.
161. Nicholas SB, Kawano Y, Wakino S, Collins AR, Hsueh WA. Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mesangial cells. *Hypertension* 2001 Feb;37(2 Part 2):722-7.
162. Marx N, Bourcier T, Sukhova GK, Libby P, Plutzky J. PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999 Mar;19(3):546-51.
163. Kato K, Satoh H, Endo Y, Yamada D, Midorikawa S, Sato W, et al. Thiazolidinediones down-regulate plasminogen activator inhibitor type 1 expression in human vascular endothelial cells: A possible role for PPARgamma in endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 May 10;258(2):431-5.
164. Lopez S, Peiretti F, Bonardo B, Juhan-Vague I, Nalbone G. Effect of atorvastatin and fluvastatin on the expression of plasminogen activator inhibitor type-1 in cultured human endothelial cells. *Atherosclerosis* 2000 Oct;152(2):359-66.
165. Nordt TK, Peter K, Bode C, Sobel BE. Differential regulation by troglitazone of plasminogen activator inhibitor type 1 in human hepatic and vascular cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Apr;85(4):1563-8.
166. Suzuki Y, Urano T, Ihara H, Nakajima T, Nagai N, Takada Y, et al. Bezafibrate attenuates the overexpression of plasminogen activator inhibitor-1 messenger RNA by a combination of mono-unsaturated fatty acid and insulin in hepG2 cells. *Life Sci* 2001 Mar 9;68(16):1827-37.
167. Jiang Z, Seo JY, Ha H, Lee EA, Kim YS, Han DC, et al. Reactive oxygen species mediate TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 upregulation in mesangial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2003 Oct 3;309(4):961-6.
168. Hong HK, Cho YM, Park KH, Lee CT, Lee HK, Park KS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma mediated inhibition of plasminogen activator inhibitor type 1 production and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract* 2003 Oct;62(1):1-8.

169. Fay WP, Shapiro AD, Shih JL, Schleef RR, Ginsburg D. Brief report: complete deficiency of plasminogen-activator inhibitor type 1 due to a frame-shift mutation. *N Engl J Med* 1992 Dec 10;327(24):1729-33.
170. Fay WP, Parker AC, Condrey LR, Shapiro AD. Human plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) deficiency: characterization of a large kindred with a null mutation in the PAI-1 gene. *Blood* 1997 Jul 1;90(1):204-8.
171. Wu Q, Zhao Z. Inhibition of PAI-1: a new anti-thrombotic approach. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2002 Jun;2(1):27-42.
172. Izuhara Y, Takahashi S, Nangaku M, Takizawa S, Ishida H, Kurokawa K, et al. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1: its mechanism and effectiveness on coagulation and fibrosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 Apr;28(4):672-7.
173. Cale JM, Lawrence DA. Structure-function relationships of plasminogen activator inhibitor-1 and its potential as a therapeutic agent. *Curr Drug Targets* 2007 Sep;8(9):971-81.
174. Gorlatova NV, Cale JM, Elokda H, Li D, Fan K, Warnock M, et al. Mechanism of inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by a small molecule inhibitor. *J Biol Chem* 2007 Mar 23;282(12):9288-96.
175. Irigoyen JP, Munoz-Canoves P, Montero L, Koziczak M, Nagamine Y. The plasminogen activator system: biology and regulation. *Cell Mol Life Sci* 1999 Oct 1;56(1-2):104-32.
176. Nagamine Y, Medcalf RL, Munoz-Canoves P. Transcriptional and posttranscriptional regulation of the plasminogen activator system. *Thromb Haemost* 2005 Apr;93(4):661-75.
177. Stasinopoulos S, Tran H, Chen E, Sachchithanathan M, Nagamine Y, Medcalf RL. Regulation of protease and protease inhibitor gene expression: the role of the 3'-UTR and lessons from the plasminogen activating system. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2005;80:169-215.
178. Sawdey MS, Loskutoff DJ. Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in vivo. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 1991 Oct;88(4):1346-53.
179. Hasselaar P, Loskutoff DJ, Sawdey M, Sage EH. SPARC induces the expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in cultured bovine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 1991 Jul 15;266(20):13178-84.
180. Swiatkowska M, Szemraj J, Cierniewski CS. Induction of PAI-1 expression by tumor necrosis factor alpha in endothelial cells is mediated by its responsive element located in the 4G/5G site. *FEBS J* 2005 Nov;272(22):5821-31.

181. Dong J, Fujii S, Imagawa S, Matsumoto S, Matsushita M, Todo S, et al. IL-1 and IL-6 induce hepatocyte plasminogen activator inhibitor-1 expression through independent signaling pathways converging on C/EBPdelta. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007 Jan;292(1):C209-15.
182. Kortlever RM, Nijwening JH, Bernards R. Transforming growth factor-beta requires its target plasminogen activator inhibitor-1 for cytostatic activity. *J Biol Chem* 2008 Sep 5;283(36):24308-13.
183. Hopkins WE, Westerhausen DR, Jr., Sobel BE, Billadello JJ. Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 mRNA in Hep G2 cells by epidermal growth factor. *Nucleic Acids Res* 1991 Jan 11;19(1):163-8.
184. Ottino P, Taheri F, Bazan HE. Platelet-activating factor induces the gene expression of TIMP-1, -2, and PAI-1: imbalance between the gene expression of MMP-9 and TIMP-1 and -2. *Exp Eye Res* 2002 Mar;74(3):393-402.
185. Olofsson B, Korpelainen E, Pepper MS, Mandriota SJ, Aase K, Kumar V, et al. Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) binds to VEGF receptor-1 and regulates plasminogen activator activity in endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Sep 29;95(20):11709-14.
186. Banfi C, Eriksson P, Giandomenico G, Mussoni L, Sironi L, Hamsten A, et al. Transcriptional regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 gene by insulin: insights into the signaling pathway. *Diabetes* 2001 Jul;50(7):1522-30.
187. Yuan J, Jia R, Bao Y. Aldosterone up-regulates production of plasminogen activator inhibitor-1 by renal mesangial cells. *J Biochem Mol Biol* 2007 Mar 31;40(2):180-8.
188. Yamamoto Y, Ishizu A, Ikeda H, Otsuka N, Yoshiki T. Dexamethasone increased plasminogen activator inhibitor-1 expression on human umbilical vein endothelial cells: an additive effect to tumor necrosis factor-alpha. *Pathobiology* 2004;71(6):295-301.
189. Smith LH, Coats SR, Qin H, Petrie MS, Covington JW, Su M, et al. Differential and opposing regulation of PAI-1 promoter activity by estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in endothelial cells. *Circ Res* 2004 Aug 6;95(3):269-75.
190. Tsantes AE, Nikolopoulos GK, Bagos PG, Tsiara CG, Kapsimali V, Travlou A, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism and risk of ischemic stroke: a meta-analysis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007 Jul;18(5):497-504.
191. Ribeiro RC, Feng W, Wagner RL, Costa CH, Pereira AC, Apriletti JW, et al. Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2001 May 4;276(18):14987-95.

192. Collingwood TN, Butler A, Tone Y, Clifton-Bligh RJ, Parker MG, Chatterjee VK. Thyroid hormone-mediated enhancement of heterodimer formation between thyroid hormone receptor beta and retinoid X receptor. *J Biol Chem* 1997 May 16;272(20):13060-5.
193. Ribeiro RC, Apriletti JW, Yen PM, Chin WW, Baxter JD. Heterodimerization and deoxyribonucleic acid-binding properties of a retinoid X receptor-related factor. *Endocrinology* 1994 Nov;135(5):2076-85.
194. Sambrook JM, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 1989.
195. Garner MM, Revzin A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* 1981 Jul 10;9(13):3047-60.
196. Arts J, Grimbergen J, Bosma PJ, Rahmsdorf HJ, Kooistra T. Role of c-Jun and proximal phorbol 12-myristate-13-acetate-(PMA)-responsive elements in the regulation of basal and PMA-stimulated plasminogen-activator inhibitor-1 gene expression in HepG2. *Eur J Biochem* 1996 Oct 15;241(2):393-402.
197. Weitzel JM. To bind or not to bind - how to down-regulate target genes by liganded thyroid hormone receptor? *Thyroid Res* 2008;1(1):4.
198. Kim SW, Ho SC, Hong SJ, Kim KM, So EC, Christoffolete M, et al. 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* 2005 Apr 15;280(15):14545-55.
199. Feng X, Jiang Y, Meltzer P, Yen PM. Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Mol Endocrinol* 2000 Jul;14(7):947-55.
200. Weitzel JM, Radtke C, Seitz HJ. Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat. *Nucleic Acids Res* 2001 Dec 15;29(24):5148-55.
201. Flores-Morales A, Gullberg H, Fernandez L, Stahlberg N, Lee NH, Vennstrom B, et al. Patterns of liver gene expression governed by TRbeta. *Mol Endocrinol* 2002 Jun;16(6):1257-68.
202. Moeller LC, Dumitrescu AM, Walker RL, Meltzer PS, Refetoff S. Thyroid hormone responsive genes in cultured human fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 Feb;90(2):936-43.
203. Navarro-Yubero C, Cuadrado A, Sonderegger P, Munoz A. Neuroserpin is post-transcriptionally regulated by thyroid hormone. *Brain Res Mol Brain Res* 2004 Apr 7;123(1-2):56-65.

204. Shibusawa N, Hollenberg AN, Wondisford FE. Thyroid hormone receptor DNA binding is required for both positive and negative gene regulation. *J Biol Chem* 2003 Jan 10;278(2):732-8.
205. Belandia B, Latasa MJ, Villa A, Pascual A. Thyroid hormone negatively regulates the transcriptional activity of the beta-amyloid precursor protein gene. *J Biol Chem* 1998 Nov 13;273(46):30366-71.
206. Brown NJ, Kim KS, Chen YQ, Blevins LS, Nadeau JH, Meranze SG, et al. Synergistic effect of adrenal steroids and angiotensin II on plasminogen activator inhibitor-1 production. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Jan;85(1):336-44.
207. Eriksson P, Nilsson L, Karpe F, Hamsten A. Very-low-density lipoprotein response element in the promoter region of the human plasminogen activator inhibitor-1 gene implicated in the impaired fibrinolysis of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 Jan;18(1):20-6.
208. Hou B, Eren M, Painter CA, Covington JW, Dixon JD, Schoenhard JA, et al. Tumor necrosis factor alpha activates the human plasminogen activator inhibitor-1 gene through a distal nuclear factor kappaB site. *J Biol Chem* 2004 Apr 30;279(18):18127-36.
209. Fondell JD, Guermah M, Malik S, Roeder RG. Thyroid hormone receptor-associated proteins and general positive cofactors mediate thyroid hormone receptor function in the absence of the TATA box-binding protein-associated factors of TFIID. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Mar 2;96(5):1959-64.
210. Tagami T, Madison LD, Nagaya T, Jameson JL. Nuclear receptor corepressors activate rather than suppress basal transcription of genes that are negatively regulated by thyroid hormone. *Mol Cell Biol* 1997 May;17(5):2642-8.
211. Ullian ME, Schelling JR, Linas SL. Aldosterone enhances angiotensin II receptor binding and inositol phosphate responses. *Hypertension* 1992 Jul;20(1):67-73.
212. Ullian ME, Walsh LG, Morinelli TA. Potentiation of angiotensin II action by corticosteroids in vascular tissue. *Cardiovasc Res* 1996 Aug;32(2):266-73.
213. Brown NJ, Nakamura S, Ma L, Nakamura I, Donnert E, Freeman M, et al. Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo. *Kidney Int* 2000 Sep;58(3):1219-27.
214. Saucedo R, Basurto L, Zarate A, Martinez C, Hernandez M, Galvan R. Effect of estrogen therapy on insulin resistance and plasminogen activator inhibitor type 1 concentrations in postmenopausal women. *Gynecol Obstet Invest* 2007;64(2):61-4.
215. Alessi MC, Juhan-Vague I. PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 Oct;26(10):2200-7.