

**RILVA GRIGÓRIO PINHO SOARES**

**RELAÇÃO ENTRE OS DOMÍNIOS DAS ISOFORMAS ALFA E BETA DO  
RECEPTOR DO HORMÔNIO TIREOIDEANO E A FUNÇÃO TRANSCRICIONAL**

**BRASÍLIA**

**2017**

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

**RILVA GRIGÓRIO PINHO SOARES**

**RELAÇÃO ENTRE OS DOMÍNIOS DAS ISOFORMAS ALFA E BETA DO  
RECEPTOR DO HORMÔNIO TIREOIDEANO E A FUNÇÃO TRANSCRICIONAL**

**Dissertação apresentada como Requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

**Orientador: Profa. Dra. Marie Togashi**

**BRASÍLIA**

**2017**

RILVA GRIGÓRIO PINHO SOARES

RELAÇÃO ENTRE OS DOMÍNIOS DAS ISOFORMAS ALFA E BETA DO  
RECEPTOR DO HORMÔNIO TIREOIDEANO E A FUNÇÃO TRANSCRICIONAL

Dissertação apresentada como Requisito parcial  
para obtenção do Título de Mestre em Ciências da  
Saúde pelo Programa de Pós-graduação em  
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Francisco de Assis rocha Neves. (interno)  
Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Ranieri Rodrigues de Oliveira. (externo)  
Centro Universitário de Brasília (UniCEUB)

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato. (suplente)  
Universidade de Brasília (UnB)

*Dedico este trabalho aos meus pais, Eleusa e Gerson (in memoriam) por sempre me trilhar por um caminho correto, me ensinando as virtudes da vida.*

*Ao meu esposo Agmar, meu namorado, amante, amigo e companheiro, pelo exemplo de vida simples, mas com caráter e honestidade.*

*E aos meus filhos Murilo e Isabella. Espero muito em Deus que eles cresçam e se tornem adultos maduros e responsáveis, que tenham iniciativas, sejam idôneos e tenham sempre Deus em primeiro lugar. Porque creio que estas são as virtudes do alicerce da vida.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela dádiva da vida, que em si, tudo encerra! E por permitir que eu conseguisse conciliar meu estudo, com meu trabalho e minha família.

À minha família, meu esposo Agmar, que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem para que eu concluísse mais esta etapa de minha vida. Aos meus filhos Murilo e Isabella, que com muito carinho e paciência souberam entender o motivo de minhas ausências mesmo quando estava presente.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Marie Togashi, mais que uma orientadora, uma amiga de todas as horas, toda minha gratidão e admiração. Obrigada por me mostrar que eu seria capaz, pelo incentivo que me fez ser forte para continuar diante de tantas dificuldades encontradas independente do contexto. Muito obrigada por ter me dado a oportunidade de compartilhar de seus ensinamentos e sabedoria, pelo apoio despendido que muito contribuíram em diferentes momentos desse percurso.

Ao Professor Dr. Francisco Neves, mais que um chefe, um grande amigo, um exemplo de pessoa, dedicação e liderança. Obrigada pelo apoio, carinho e dedicação.

À Professora Angélica, pelos valiosos conselhos, pela paciência e exemplo de profissionalismo.

À professora Ana Caroline Migliorine, suas alunas Michelle Alexandrino e Natália Bernardi, por toda ajuda e colaboração.

Aos Professores do Laboratório de Farmacologia Molecular, Luiz, Carine, Fátima, Djane, Adriana, Guilherme e Michella que sempre compartilharam suas experiências e aprendizados que com certeza foram muito gratificantes. Obrigado pela atenção e carinho.

À querida amiga Mariella, por todo o carinho e colaboração, pelo exemplo de dedicação e determinação.

Às amigas, Érica, Carol, Fernanda, Bel, Cibelle, Wanessa Flora, Bruna, Janice, Camila, Alana, Yuri, Gleice, Laíza, Dani, Ádria, Nathalia, Cinthia, Sarah e Ráiza, pelo apoio, pelo carinho e momentos de descontração que sempre faz a diferença.

Aos amigos Pedro, Enrique, Kaian e Sidney pelo apoio e paciência, pela disposição em sempre ajudar. Às amigas Simone e Carol Lourenzo, pelo carinho, pela alegria e sorriso contagiante que deu mais luz aos nossos dias!

À amiga Cristina, por todo seu carinho e preocupação, que mesmo agora não estando presente deixou sua parcela de colaboração. Obrigada pelo carisma, amizade e alegria que compartilhamos juntas. Ao Luciano, pelo incentivo e carinho, pelo suporte despendido a todo o momento.

E a toda minha família pelo apoio e incentivo. A minha mãe Eleusa pelas palavras amigas, aos meus irmãos e familiares pela compreensão e incentivo, por acreditarem em mim. Meu obrigado especial a minha cunhada Eliene e família, pelo apoio e paciência, pela disponibilidade em sempre ajudar. Pelo carinho por cuidar dos meus filhos nas várias vezes que precisei deixá-los em sua casa, para que eu pudesse terminar um experimento ou chegar em casa mais tarde.

Aos estagiários, Isadora, Yasmim, Hanna, Mariana, Paulo, Ana Paula, Paloma, Thaís, Vinicius e muitos outros que por aqui passaram e contribuíram para o bom desempenho do laboratório de um modo geral. Obrigada pelo afeto e colaboração.

À banca examinadora, por ter aceitado o convite e pela disponibilidade dispensada.

Aos alunos, amigos e amigas do Farmol, que aqui não foram citados, mas que com certeza de alguma forma em especial contribuíram para que hoje eu estivesse aqui. Meu muito obrigado!

*“Eu me esforço para ser cada dia melhor, pois bondade também se aprende”.*

*“Se a gente cresce com os golpes duros da vida, também podemos crescer com os toques suaves na alma”.*

**Cora Coralina**

## RESUMO

O hormônio tireoideano (HT) regula a transcrição de redes complexas de genes e controlam diversos aspectos do desenvolvimento em humanos. Seus efeitos são mediados pelos receptores do hormônio tireoideano (TR), que são fatores de transcrição que se ligam ao DNA, em regiões denominadas de elementos responsivos ao TR (TRE), regulando positivamente e negativamente a transcrição. Comparação entre a isoforma alfa 1 (TR $\alpha$ 1) e beta 1 (TR $\beta$ 1) indicam que, com exceção do domínio N-terminal (NTD), estas isoformas possuem alta homologia em sua estrutura primária, especificamente 85% no domínio de ligação ao DNA (DBD), 64% na *Hinge* e 84% no domínio de ligação ao ligante (LBD). Dos 370 aminoácidos (aa) que compõem o DBD, *Hinge* e LBD, apenas 61 aa os tornam diferentes entre si, dos quais 17 aa estão localizados no DBD, 04 aa na *Hinge* e 40 aa no LBD. Ainda, o que difere TR $\beta$ 1 da isoforma beta 2 (TR $\beta$ 2) é somente o domínio NTD. Apesar de possuírem alta homologia de sequência, evidências bioquímicas mostram que essas isoformas desempenham papéis específicos ao mediar a ação dos HT. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de cada domínio das isoformas TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 na atividade transcricional do TR, fazendo a correlação entre os diferentes domínios e sua função em TRE positivamente e negativamente regulados, F2 e *TSHA*, respectivamente. Para tanto, foram utilizadas 11 construções de quimeras contendo sequências alternadas das regiões dos domínios NTD, DBD e LBD de TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 e 2 construções de deleções do NTD de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1. Transfecções e ensaios de gene repórter foram realizados para estudar o papel dos diferentes domínios. A atividade transcricional das quimeras mostrou os efeitos dos domínios na ativação e repressão. Em F2, o NTD de TR $\beta$ 2 mostrou ser responsável por maior ativação. Os resultados sugeriram ainda um sinergismo entre DBD de TR $\alpha$ 1 e LBD de TR $\beta$ 1, que pôde ser observado tanto na presença como na ausência de T3. Tanto o NTD de TR $\alpha$ 1 quanto o de TR $\beta$ 1 parecem inibir a ativação. O LBD de TR $\alpha$ 1 parece exercer importante papel repressor, sugerindo que este possa ser o domínio responsável por TR $\alpha$ 1 apresentar menor ativação que TR $\beta$ 1, enquanto o LBD de TR $\beta$ 1 parece ser o responsável por sua maior ativação. Em *TSHA*, observou-se sinergismo entre DBD de TR $\beta$ 1 e LBD de TR $\alpha$ 1, diferente daquele observado em F2. As maiores repressões foram observadas nas quimeras que

apresentavam LBD de TR $\beta$ 1 e DBD de TR $\alpha$ 1, sugerindo que estes interagem sinergisticamente entre si. As maiores respostas de ativação independente do ligante ocorreram nas quimeras com a presença de qualquer um dos domínios de TR $\alpha$ 1. Nestes, contudo, os NTDs do TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 exerceram papéis distintos. Assim, o NTD de TR $\beta$ 1 atua na ativação independente do ligante e na repressão dependente do ligante, enquanto o NTD de TR $\alpha$ 1 não parece exercer influência em ambas as condições. Em conclusão, a relação entre os domínios observada na atividade transcricional do TR é de fundamental importância para a compreensão das características funcionais das isoformas do TR. O uso das quimeras poderá ser uma ferramenta importante para auxiliar na compreensão da ação do TR em promotores naturais, e no desenvolvimento de tiromiméticos seletivos.

Palavras chaves: Receptor do hormônio tireoideano, domínios, quimeras, atividade transcricional.

## ABSTRACT

Thyroid hormone (HT) regulates the transcription of complex gene networks and controls various aspects of development in humans. Its effects are mediated by thyroid hormone receptors (TRs), which are transcription factors that bind to DNA, in regions called TR-responsive elements (TRE), regulating the transcription in positively and negatively ways. Comparison between TR $\alpha$ 1 and TR $\beta$ 1 isoforms indicates that, except for the N-terminal domain (NTD), these isoforms present high homology in its primary structure, specifically 85% in the DNA binding domain (DBD), 64% in the *Hinge* domain and 84% in the ligand binding domain (LBD). Among the 370 amino acids (aa) only 61 aa differed from each other, 17 aa in DBD, 04 aa in *Hinge*, and 40 aa in LBD. Further, what differs from TR $\beta$ 1 of the  $\beta$ 2 isoform (TR $\beta$ 2) is only the NTD domain. Despite this high homology, biochemical evidence shows that they exert isoform specific roles in mediating the action of HT. The aim of this study was to investigate the effects of each domain of TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 on TR transcriptional activity, correlating the different domains to transcription activity function on positively and negatively regulated TREs, F2 and *TSHA*, respectively. For this, 11 constructions of chimeras which contained alternate sequences of the NTD, DBD, and LBD of TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 and TR $\beta$ 2 and 2 constructions of NTD deletions of TR $\alpha$ 1 and TR $\beta$ 1 were used. Transfections and reporter gene assays were carried out to study the role of different domains. Transcriptional activity of chimeras showed the effects of the different domains on activation and repression. In F2, TR $\beta$ 2-NTD showed the highest transcriptional activation. The results also suggested a synergism between TR $\alpha$ 1-DBD and TR $\beta$ 1-LBD that could be observed in the presence and absence of T3. The NTD of TR $\alpha$ 1 and TR $\beta$ 1 appears to inhibit activation. TR $\alpha$ 1-LBD seems to play an important repressor role, suggesting that it may be the domain responsible for the lower activation exhibited by TR $\alpha$ 1 to in comparison to TR $\beta$ 1, whereas TR $\beta$ 1-LBD seems to be responsible for its higher activation. In *TSHA*, synergism was observed between TR $\beta$ 1-DBD and TR $\alpha$ 1-LBD, different from that observed in F2. The major values obtained for repression were observed in the chimeras which contained TR $\beta$ 1-LBD and TR $\alpha$ 1-DBD, suggesting that they synergistically interact with each other. The highest ligand-independent activation responses occurred in the chimeras which contained any of the TR $\alpha$ 1

domains. In these, however, the NTDs of TR $\alpha$ 1 and TR $\beta$ 1 played different roles. Thus, TR $\beta$ 1-NTD acts on ligand-independent activation and binding-dependent repression, whereas NTD- $\alpha$  does not appear to exert influence on both conditions. In conclusion, the relationship between TR domains and its effect on the transcriptional activity of TR are of fundamental importance for understanding the functional characteristics of TR isoforms. The use of chimeras may be an important tool to aid in the understanding of TR action in natural promoters, and in the development of selective thyromimetics.

Keywords: thyroid hormone receptor, domains, chimeras, transcriptional activity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do Hormônio Tireoideano. ....	26
Figura 2. Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. ....	27
Figura 3. A superfamília dos Receptores Nucleares. ....	29
Figura 4. Estrutura comum dos receptores nucleares e representação dos domínios funcionais.....	31
Figura 5. Domínio de ligação de receptores nucleares ao DNA.....	33
Figura 6. Representação em fitas do LBD do r TR $\beta$ .....	34
Figura 7. Complexos oligoméricos dos RNs aos elementos responsivos. ....	36
Figura 8. Esquema representando a dinâmica da cromatina no mecanismo de ação dos receptores nucleares.....	38
Figura 9. Representação esquemática das isoformas do TR.....	39
Figura 10. Elementos responsivos ao TR (TREs). ....	43
Figura 11. Mecanismos de Regulação Positiva do TR.....	44
Figura 12. Modelo das diferentes funções do SMRT em pTRE e nTRE. ....	46
Figura 13. Mecanismo de sequestro da regulação negativa do <i>TSHA</i> .....	47
Figura 14. Representação esquemática da regulação negativa com interação indireta do TR ao DNA. ....	48
Figura 15. Estrutura do promotor do TSH alfa e beta.....	50
Figura 16. Promotor do hTRH com a localização e sequência dos sítios ( 3 a 6). ....	51
Figura 17. Esquema das construções dos TRs nativos e quiméricos. ....	59
Figura 18. Alinhamento das sequências de TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2. ....	60
Figura 19. Atividade transcricional dos controles na presença e na ausência de T3 em F2.....	66
Figura 20. Atividade transcricional do TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 em F2. ....	67
Figura 21 Panorama geral da atividade transcricional do TR na ausência e presença de T3 em F2. ....	69
Figura 22. Efeito do NTD do TR $\beta$ 2 em F2 na presença de T3. ....	71
Figura 23. Efeito do NTD do TR $\beta$ 2 em F2, na repressão na ausência de T3.....	72
Figura 24. Efeito da deleção do NTD de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 em F2 na presença de T3. ...	74
Figura 25. Efeito da deleção do NTD de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 em F2, na ausência de T3. .	76
Figura 26. Efeito das trocas dos domínios entre as isoformas TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 em F2.	80

Figura 27. Atividade transcricional dos controles na ausência e presença de T3 em promotor de <i>TSHA</i> .....	84
Figura 28. Atividade transcricional de TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 em promotor de <i>TSHA</i> .	85
Figura 29. Panorama geral da atividade transcricional do TR na ausência e presença de T3 em promotor de <i>TSHA</i> .....	86
Figura 30. Modulação diferenciada de um complexo correpressor funcional com TR. ....	88
Figura 31. Efeito do NTD do TR $\beta$ 2 em promotor de <i>TSHA</i> na ausência e presença de T3.....	90
Figura 32. Efeito da ausência do NTD em TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 em promotor de <i>TSHA</i> na ausência e presença de T3.....	92
Figura 33. Efeito das trocas dos domínios entre as isoformas TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 em promotor <i>TSHA</i> na ausência e presença de T3.....	94

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo dos resultados em F2.....	82
Tabela 2 – Resumo dos resultados em promotor de <i>TSHA</i> .....	95
Tabela 3 - Efeito da troca dos domínios na interação na ativação transcricional em F2.....	98
Tabela 4 - Efeito da troca dos domínios na ativação transcricional em F2.....	98
Tabela 5 - Efeito da troca dos domínios na interação na ativação transcricional em promotor de <i>TSHA</i> .....	99
Tabela 6 - Efeito da troca dos domínios na ativação transcricional em <i>promotor de TSHA</i> .....	100

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa – aminoácido

AF-2 – Função de ativação 2

AP-1 – Proteína ativa 1, do complexo de fatores de transcrição das proteínas c-jun e c-fos

AR – Receptor de Andrógeno

CaAs – Coativadores

CaA – Coativador

cAMP – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP ou AMP cíclico) é uma molécula importante na transdução de sinal em uma célula.

CAR – Receptor Androstano Constitutivo

CBP – Proteína que se liga a CREB

cDNA – DNA complementar

c-fos – Fator de transcrição do complexo AP-1

c-jun – Fator de transcrição do complexo AP-1

CMV Tag2B – Plasmídeo que contém o promotor do Citomegalovírus para expressão de proteínas em células de mamíferos. Tag2B -marcação da proteína com um determinante antigênico FLAG N-terminal.

CO<sub>2</sub> – Dióxido de Carbono

complexo p160/SRC -

COOH – Compostos orgânicos que possuem o grupo carboxila – região carboxi terminal

CoR (s) – Corressor (es)

COUP-TF – Fator I de transcrição *upstream* de ovalbumina de galinha

CREB – proteína ligante ao elemento de resposta do cAMP

CTE – Extensão Carboxi - Terminal (*Carboxy Terminal Extension*)

*Downstream* – Região proximal

DAX1 – Sexo reverso dosagem sensível região crítica de hipoplasia adrenal, gene 1

DBD – Domínio de Ligação ao DNA

D-box – Posição distal da caixa TATA

DH5 $\alpha$  – Cepa de *E.coli* para propagação de plasmídeos

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs – mistura de desoxirribonucleotídeos fosfatados

DR – Repetições Diretas

DR4 – Repetições diretas da sequência AGGTCA espaçadas por 4 nucleotídeos - elemento responsivo consenso do TR

DRIP – Complexo de proteína que interage com o receptor de vitamina D

DRIP/TRAP – Complexo de proteína que interage com o receptor de vitamina D e proteína associada ao TR

DTT – (*dithiothreitol*)

EDTA – Etilenodiaminotretacético

ER – Receptor do Estrógeno

erb-A - Oncogene viral homólogo do TR

ERR – Receptor Relacionado ao Estrógeno

ETOH – Etanol (*ethanol*)

F2 – Sequência correspondente a um palíndromo invertido da sequência AGGTCA – elemento responsivo consenso do TR

*Feedback* negativo – Mecanismo de retroalimentação negativa

FSH – Hormônio Folículo Estimulante da Gonadotropina Coriônica humana

FXR – Receptor Farnesoide X

GCNF – Fator nuclear de células germinativas

GR – Receptores dos hormônios de esteroides, Glicocorticoide

GRIP – Proteína 1 que interage com GR

GTF – Fator de Transcrição Geral

H1 a H12 – Representa as 12 alfas hélices

HAT – Histona acetilase, (*histone acetyltransferase*)

HDAC – Histona desacetilases (*histone deacetyltransferase*)

HeLa – Células de carcinoma de cérvix humano

HepG2 – células de carcinoma de fígado humano

*Hinge* – dobradiça

HNF4 – Fator nuclear hepatocitário 4

hPRL – Gene da Prolactina humana

HPT – Eixo Hipotálamo-Pituitária/hipófise-Tireoide)

HREs – Elementos Responsivos aos Hormônios (*Hormone Response Elements*)

HSPs – Proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*)

HT – Hormônio Tireoideano

IUPHAR – União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica

JNKs – Complexo Jun amino-terminal kinase

kDa – Medida de peso molecular ou massa. (kilodaltons)

*Knowdown* – Diminuição da Expressão

LB – Luria Bertani, meio de cultura para cultivo de bactérias.

LBD – Domínio de Ligação ao Ligante

LH – Hormônio Luteinizante

LRH1 – Receptor Humano homólogo 1 Hepático

LUC – Gene que codifica Luciferase

LXR – Receptor Hepático X

LXXLL – Sequência consenso de interação e CoA com TR (em que L corresponde a leucina e X a um aminoácido qualquer)

LXXXIXXX(I/L) – Região consenso de interação do CoR com TR (em que L corresponde a leucina e X a um aminoácido qualquer)

MCS – Sítio Múltiplo de Clonagem

*Microarray* – microarranjo

mM – mili Molar

MR – Receptor do Mineralocorticoide

mRNA – RNA mensageiro

NCBI – Centro Nacional para Informação Biotecnológica dos Estados Unidos

NcoR – Correpessor de Receptores Nucleares

ng – nano grama

nM – nano Molar

RN – Receptor Nuclear

NR1-6 – Receptores Nucleares humanos em seis grupos evolucionários ou subfamílias

NR4A – Receptor nuclear 4A

NTD – Domínio N-terminal,

nTRE – Elemento responsivo negativo do TR

p/CAF – Proteína Associada a CBP/p300

p/CIP – Proteína cointegrador p300/CBP

p160 – Família de proteínas da família p160, coativadores de receptores nucleares

Pal ou TREpal – Sequência correspondente a um palíndromo da sequência (AGGTCATGACCT) não espaçados

pb – Pares de bases da fita dupla do DNA

P-box – Posição proximal da caixa TATA

PBS – Solução Salina e Fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

pCMV-Tag2B – Plasmídeo que contém o promotor do Citomegalovírus para expressão de proteínas em células de mamíferos. Tag2B - marcação da proteína com um determinante antigênico FLAG N-terminal, Agilent Technologies

PCR – Reação da Cadeia da Polimerase (*Reaction Polymerase Chain*)

Pit 1 – Fator de transcrição da Pituitária

PPAR – Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissomais

PR – Receptor de Progesterona

*primer* – sequência de DNA que funciona como um iniciador para a síntese de DNA

– Ácido desoxirribonucleico

PRN – Receptor Nuclear Protorreceptor célula específico

pTRE – Elemento Responsivo positivo doTR

PXR – Receptor Pregnano X

RAR – Receptor de Ácido Retinoico

RAR - Receptor do Ácido Retinoico

Rev-erb – Repressor Transcricional

RNA – Ácido ribonucleico

*ROR* – Receptor Órfão relacionado ao Retinóide

RXR – Receptores de Retinoide X

*SF1* – Fator Esteroidogênico1

SFB – Soro Fetal Bovino

SHP – Parceiro Heterodímero Curto (*short*)

siRNA – RNA de interferência sintético

SMRT – Silenciador Mediador do receptor de retinóide e receptor do Hormônio da Tireoide

SOD-1 – Promotor da Superóxido Dismutase-1 (*Superoxide Dismutase-1*)

SOE-PCR – Técnica de PCR baseado em mutagênese sítio dirigida com sequências alternadas e sobrepostas (*Splicing by overlap PCR*)

SRC1, SRC2, SRC3 – coativadores do receptor de esteroides1, 2, e 3

T3 – Forma 3,5,3'-Triiodotironina do Hormônio Tireoideano

T4 – Forma 3,5,3',5'-Tetraiodo-L-Tironina ou Tiroxina do Hormônio Tireoideano

TATA Box – Sequência de DNA do promotor de eucariotos, conservada entre as espécies e importante para atuação da RNA polimerase a transcrição de um gene

TBP – Proteína de Ligação à caixa TATA box

TFIIB – Fator de Transcrição IIB

TFIID – Fator de Transcrição IID

*THRA* – NR1A1 - Gene que codifica a isoforma  $\alpha$  do TR

*THRB* – NR1A2E - Gene que codifica a isoforma  $\beta$  do TR

TLL – Homólogo do gene sem cauda de *Drosophila*

TR – Receptor do hormônio tireoideano

TRE – Elemento Responsivo do TR

TRH – Hormônio Liberador da Tireotropina (*Thyrotropin-releasing hormone*)

TRs – Receptores dos Hormônios Tireoideanos

TSH $\alpha$  – Hormônio Estimulador da Tireotropina isoforma  $\beta$  (*thyroid stimulating hormone*)

TSH $\beta$  – Hormônio Estimulador da Tireotropina isoforma  $\beta$  (*thyroid stimulating hormone*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	26
2.1 O HORMÔNIO TIREOIDEANO .....	26
2.2 SUPERFAMÍLIA DOS RECEPTORES NUCLEARES.....	28
<b>2.2.1 Classificação dos Receptores Nucleares Baseada na Natureza dos Ligantes e Funções Fisiológicas</b> .....	28
<b>2.2.2 Domínios Funcionais dos Receptores Nucleares</b> .....	30
<b>2.2.3 Mecanismo de regulação da expressão gênica dos receptores nucleares</b> .....	35
<b>2.2.4 Receptores do Hormônio Tireoideano</b> .....	38
2.2.4.1 Mecanismos de Regulação Positiva da Expressão Gênica do TR.....	42
2.2.4.2 Mecanismos de Regulação Negativa da Expressão Gênica do TR.....	44
2.2.4.2.1 <i>Promotores regulados negativamente</i> .....	49
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	52
<b>4 OBJETIVO</b> .....	57
4.1 OBJETIVO GERAL.....	57
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	57
<b>5 MÉTODOS</b> .....	58
5.1 PLASMÍDEOS.....	58
5.2 AMPLIFICAÇÕES DE PLASMÍDEOS.....	61
5.3 CULTURA DE CÉLULAS.....	61
5.4 ENSAIOS DE GENE REPÓRTER POR MEIO DE TRANSFEÇÃO TRANSIENTE.....	62
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	65
6.1 AÇÃO DO TR EM F2.....	65
6.2 ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO TR EM F2.....	67
<b>6.2.1 Influência do NTD do TR<math>\beta</math>2 na Ativação Transcricional</b>	70
<b>6.2.2 Influência do NTD de TR<math>\beta</math>2 na Repressão Transcricional</b> .....	

	71
<b>6.2.3 Importância do NTD de TR<math>\alpha</math>1 e TR<math>\beta</math>1 na Ativação Transcricional.....</b>	<b>73</b>
<b>6.2.4 Importância do NTD de TR<math>\alpha</math>1 e TR<math>\beta</math>1 na Repressão Transcricional .....</b>	<b>75</b>
<b>6.2.5 Efeito das Trocas dos Domínios entre as TR<math>\alpha</math>1 E TR<math>\beta</math>1 na Ativação e Repressão Transcricional.....</b>	<b>76</b>
<b>6.3 AÇÃO DO TR EM PROMOTOR DE <i>TSHA</i>.....</b>	<b>84</b>
<b>6.4 ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO TR EM PROMOTOR DE <i>TSHA</i>.....</b>	<b>85</b>
<b>6.4.1 Influência do NTD do TR<math>\beta</math>2 em Promotor de <i>TSHA</i> na Repressão Transcricional – Presença de T3.....</b>	<b>86</b>
<b>6.4.2 Influência do NTD do TR<math>\beta</math>2 em Promotor de <i>TSHA</i> na Ativação Transcricional - Ausência de T3.....</b>	<b>89</b>
<b>6.4.3 Importância do NTD do TR<math>\alpha</math>1 e TR<math>\beta</math>1 em Promotor de <i>TSHA</i> na Ativação Transcricional - Presença de T3.....</b>	<b>91</b>
<b>6.4.4 Importância do NTD do TR<math>\alpha</math>1 e TR<math>\beta</math>1 em Promotor de <i>TSHA</i> na Ativação na - Ausência de T3.....</b>	<b>91</b>
<b>6.4.5 Efeito das Trocas dos Domínios entre TR<math>\alpha</math>1 e TR<math>\beta</math>1 em Promotor de <i>TSHA</i> na Repressão e Ativação Transcricional</b>	<b>93</b>
<b>7 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>97</b>
<b>7.1 EM F2.....</b>	<b>97</b>
<b>7.2 EM PROMOTOR DE <i>TSHA</i>.....</b>	<b>98</b>
<b>7.3 PERSPECTIVAS FINAIS .....</b>	<b>100</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O hormônio tireoideano (HT) possui papel crítico no desenvolvimento, metabolismo, proliferação e diferenciação celular. Ele regula as atividades biológicas desde a embriogênese até a vida adulta, sendo essencial para a manutenção da qualidade de vida.

Produzido pela glândula tireoide, a síntese, a secreção e a regulação dos HT (T4 e T3) são reguladas por meio do mecanismo de retroalimentação negativa (*feedback* negativo) que envolve o eixo hipotálamo - hipófise ou glândula pituitária - glândula tireoide (HPT). Dentre os HTs, o T<sub>3</sub> é a forma mais potente do hormônio, responsável pela maioria das ações dos hormônios tireoideanos.

No núcleo da célula, o T<sub>3</sub> liga-se a receptores específicos, os receptores dos hormônios tireoideanos (TRs). Estes são os responsáveis pela ação do HT ligando-se direto ou indiretamente, por meio de outros cofatores transcricionais, na região promotora dos genes-alvo, regulando a transcrição gênica em quase todos os tecidos de mamíferos.

Os TRs são produtos da expressão de dois genes *THRA* e *THRB*. E são traduzidos em duas isoformas, TR $\alpha$  /NR1A1 e TR $\beta$ /NR1A2.

Ao regular a transcrição mediante a interação com o DNA, (Ácido desoxirribonucleico) o TR reconhece sítios específicos em sua sequência, denominados elementos responsivos ao hormônio (HREs) (*hormone responsive elements*) localizados nos promotores dos genes-alvo de T3. A partir destes HREs, o TR recruta uma série de proteínas correguladoras nucleares que têm a capacidade de modificar a estrutura da cromatina, modulando a atividade de transcrição do TR de forma dependente de T3, para promover ou reprimir a transcrição dos seus genes-alvo. Na ausência de T3, recrutam correpressores que agem para reprimir a atividade de transcrição basal, enquanto que, na presença de T3, recrutam coativadores funcionais para ativar a transcrição.

Uma das características funcionais do TR é a sua capacidade para ativar ou reprimir a transcrição do gene, dependendo do contexto do promotor e do estado de ligação ao ligante. Por exemplo, a atividade transcricional de genes regulados negativamente por TR pode ser ativada na ausência do hormônio e reprimida na presença. Entre os genes regulados negativamente pelo T3 estão o *TSH* e o *TRH*,

estes genes são estimulados na ausência de T3, e a adição de hormônio induz a repressão da transcrição. Em contraste com a transcrição regulada positivamente por T3, que já está bem caracterizada, o mecanismo de regulação negativa ainda não está muito bem elucidado. Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a ação do TR em elementos responsivos negativos do TR (nTRE). Uma hipótese é a de que o TR regula diretamente a transcrição por meio de ligação direta ao DNA estimulados por correpressores, e outra, é que pode ocorrer sem uma ligação direta, por meio de interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição.

Quanto às isoformas, o TR $\alpha$ 1 é abundante nos músculos esqueléticos, gordura marrom e no coração; o TR $\beta$ 1 é expresso em grande quantidade no fígado, rim e cérebro; e o TR $\beta$ 2 é expresso principalmente na glândula pituitária e em outras áreas do cérebro.

Estes padrões diferenciais de expressão revelam que as isoformas TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 desenvolvem distintos papéis funcionais, na fisiologia hormonal tireoidiana, durante vários estágios do desenvolvimento. Sabe-se hoje que o TR $\alpha$ 1 medeia os efeitos deletérios na frequência cardíaca, enquanto os benéficos são mediados pelo TR $\beta$ 1. Os efeitos benéficos incluem, por exemplo, fatores importantes contra a aterosclerose, indução da perda de peso e gordura corporal. No coração, seus efeitos são complexos podendo melhorar a função cardíaca e, por outro lado, induzir taquicardia quando em excesso, resultando posteriormente em falha cardíaca e arritmias atriais. Os TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 possuem ainda papéis fundamentais na regulação endócrina e no desenvolvimento dos sentidos da audição e visão.

Estudos mutacionais de inativação de gene indicam que as isoformas TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 podem cooperar um com o outro para mediar algumas ações de T3, mediar funções específicas para cada isoforma, e ainda mediar vias comuns entre eles.

Ao mesmo tempo, estudos *in vitro* demonstraram algumas preferências de específicas para isoformas para TREs e análises de *microarray* demonstraram que as isoformas TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 regulam um grande repertório de sobreposição de genes-alvo em resposta ao hormônio T3.

A superfície de dimerização do TR e as preferências de dimerização nos diferentes TREs também foram caracterizadas por vários estudos. Dentre eles, um estudo mutacional e funcional em TR $\beta$ 1 sugerem que muitos dos resíduos de aminoácidos que participam da superfície de homodimerização se sobrepõem àquela de heterodimerização e alguns resíduos difeririam nessa interação em DR4 e

F2. Há poucos estudos sobre as formas oligoméricas do TR $\alpha$  em diferentes elementos responsivos. Sabemos por meio de ensaios em gel de poli(acrilamida) nativo que o LBD do TR $\alpha$  consegue se homodimerizar, porém, o receptor completo só consegue formar dímero com RXR ligado ao elemento responsivo. Isto indica que, no receptor completo, ocorre interferência por algum outro domínio funcional impedindo a formação de homodímero observada com o LBD isolado. Isto sugere que domínios do receptor interferem na interação e função do domínio funcional de outro receptor.

Alguns estudos com uso de quimeras do TR já foram realizados. O primeiro estudo, realizado por Hollenberg e cols. (1995), foi muito limitado por construção de quimeras utilizando estratégia de digestão com endonucleases de restrição, o que torna restrita a delimitação de domínios para a outra isoforma, assim este autor avaliou apenas o NTD. Outro estudo realizado por Zhu e cols. (1997) utilizou-se também de sequências de digestão com endonucleases para transferir os domínios funcionais dos receptores e avaliou as quimeras somente no elemento responsivo F2, considerando a formação de homodímero e heterodímero. Um estudo mais recente de Guissouma e cols. (2002) foi realizado no hipotálamo de camundongo, e teve também como foco o NTD.

Recentemente Hahm e cols. (2013/2014) também realizaram estudos com quimeras de TR, neste investigaram a capacidade da superfície de contato do NTD de TR $\beta$ 2 em recrutar cofatores transcricionais que interagem seletivamente com este. Observaram que as propriedades biológicas e da transcrição de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, embora sobrepostas, podem diferir no recrutamento de proteínas parceiras que podem ser responsáveis por suas funções biológicas divergentes.

Entretanto, hoje com uso das técnicas de manipulação do DNA, que possibilita a transferência de grandes segmentos de DNA não limitadas às regiões de reconhecimento por endonucleases, acreditamos que os domínios do TR possam ser melhor caracterizados.

Realizamos alinhamento das sequências do TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 e comparação entre as sequências de aminoácidos indica que, com exceção do domínio N-terminal (NTD), estes receptores possuem alta homologia na estrutura primária, especificamente 85% no domínio de ligação ao DNA (DBD), 64% na *Hinge* e 84% no domínio de ligação ao ligante (LBD). Dentre os 370 aa analisados, apenas 61 aa as

diferem entre si, sendo 17 aa no DBD, 04 aa na *Hinge* e 40 aa no LBD. O que difere TR $\beta$ 1 da isoforma TR $\beta$ 2 é somente o domínio NTD.

Pelo exposto, tendo em mente a importância de se entender como cada domínio do TR pode interferir na atividade transcricional em um mesmo promotor de gene-alvo do TR, utilizamos construções de quimeras contendo domínios alternados de TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2, e propomo-nos a estudar o efeito da troca dos domínios NTD, DBD e LBD na atividade transcricional.

Ressaltamos aqui, tratar-se este presente estudo, do primeiro a utilizar-se de construções que alternam todos os domínios de TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 que foi realizado de forma tão detalhada. Tal estratégia permitiu estudar a interferência de cada domínio na função do receptor em um dado TRE em promotor de gene-alvo regulados positivamente e negativamente, na ausência e presença de T3.

É de fundamental importância entender como o receptor interage com TREs, e como o ligante influencia na conformação TR/LBD para desenvolver melhores produtos farmacêuticos que modulam a atividade do receptor.

Este estudo contribuirá para a elucidação das diferenças estruturais e funcionais entre o TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1. Desta forma, tornará possível entender melhor os efeitos diferenciados das isoformas na regulação transcricional e, portanto, suas funções fisiológicas.

Entendemos que o uso das construções de quimeras de TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 é uma importante ferramenta para o entendimento de ações das isoformas, e que o presente estudo traz resultados e contribuições interessantes para tal entendimento.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O HORMÔNIO TIREOIDEANO

O HT possui papel crítico no desenvolvimento, metabolismo, proliferação e diferenciação celular, é necessário para o funcionamento normal de quase todos os tecidos, desde a embriogênese até a vida adulta (1-4).

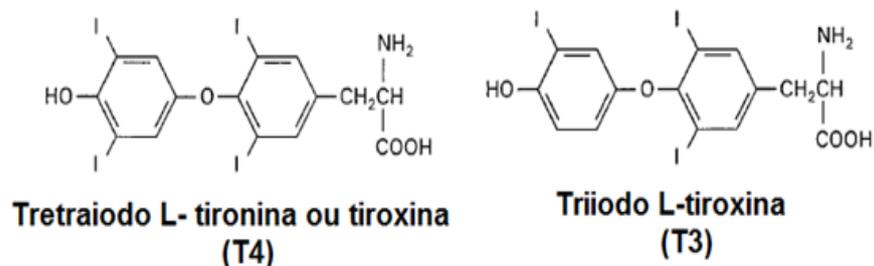


Figura 1. **Estrutura do Hormônio Tireoideano.**

Formulação química das moléculas forma 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina ou tiroxina (T4) e forma 3,5,3'-triiodotironina (T3) de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4). Adaptado de Yen, 2001 (1).

Dentre suas ações, os HTs os regulam a frequência cardíaca, contração e relaxamento do miocárdio. Seus efeitos afetam a motilidade gastrointestinal, modula o gasto energético, a geração de calor e metabolismo de carboidratos e lipídios. (5), razões pelas quais os hormônios tireoideanos são considerados essenciais para a manutenção da qualidade de vida.

A síntese e secreção do HT dependem da integridade do eixo hipotálamo - hipófise/glândula pituitária - glândula tireoide (HPT) e da ação de enzimas específicas, como as deiodinases (2, 6) (Figura 2). São reguladas por meio do mecanismo de retroalimentação negativa (*feedback* negativo). Em condições normais, o hipotálamo produz o hormônio liberador da tireotropina (TRH) (7) o qual estimula a hipófise a liberar as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da tireotropina (TSH) (7-9). O TSH estimula a glândula tireoide a produzir os HTs que por sua vez fazem um *feedback* negativo, e inibem em nível transcricional, a síntese do TRH e TSH, no hipotálamo e na pituitária, respectivamente (7).

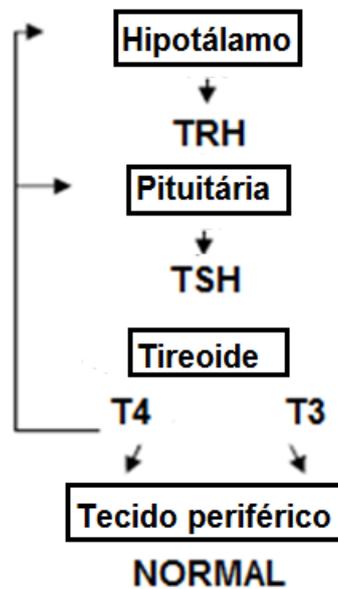


Figura 2. **Representação esquemática do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide.**

Em condições normais, o hipotálamo produz TRH, o qual estimula a hipófise a produzir TSH que, por sua vez, estimula a glândula tireoide a produzir principalmente T4 que é metabolizado nos tecidos periféricos em T3. O hormônio T3 inibe a produção de TRH e TSH, agindo diretamente no hipotálamo e na hipófise, determinando o *feedback* negativo. Carvalho e Ramos, 2004 (10).

O hormônio tireoideano (HT), produzido na glândula tireoide é secretado predominantemente na forma 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina ou tiroxina (T4) da qual deriva, por desidodação, a maior parte da 3,5,3'-triiodotironina (T3) circulante. (Figura1) (2, 11). Ao ser secretado aproximadamente 0,03% de T4 e 0,3% de T3 circulam livres no sangue ligados às proteínas plasmáticas (1). O T3 é a forma mais potente do hormônio, pois se liga ao receptor (12) com uma afinidade dez vezes maior que o T4 (2).

No núcleo da célula, o T3 liga-se a receptores específicos, chamados receptores dos hormônios tireoideanos (TRs), que são responsáveis pela ação do HT ligando-se direto ou indiretamente por meio de outros cofatores na região promotora dos genes-alvo, regulando a transcrição gênica em quase todos os tecidos em humanos (3).

## 2.2 SUPERFAMÍLIA DOS RECEPTORES NUCLEARES

A superfamília dos receptores nucleares (RNs) em humanos compreende 48 genes. Codificam 75 proteínas diferentes envolvidas na transdução de sinais extracelulares (13, 14).

À medida que os receptores nucleares foram descobertos, foram atribuídas diferentes nomenclaturas para um mesmo receptor (15). No intuito de padronizar, o Comitê de Nomenclatura dos Receptores Nucleares, juntamente com a União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (IUPHAR) (*International Union of Basic and Clinical Pharmacology*), definiu em 1999 uma nomenclatura de acordo com a árvore filogenética, que classifica a superfamília de receptores nucleares humanos em seis grupos (NR1-6) e recomenda que, nos trabalhos científicos, o receptor nuclear seja identificado pelo menos uma vez pelo seu nome oficial (15, 16).

### **2.2.1 Classificação dos Receptores Nucleares Baseada na Natureza dos Ligantes e Funções Fisiológicas**

Os RNs são divididos em três subgrupos ou classes, de acordo com a natureza dos seus ligantes endógenos e suas potenciais funções fisiológicas. Os receptores endócrinos, os receptores órfãos adotados e os receptores órfãos verdadeiros (13, 17, 18) (Figura 3).

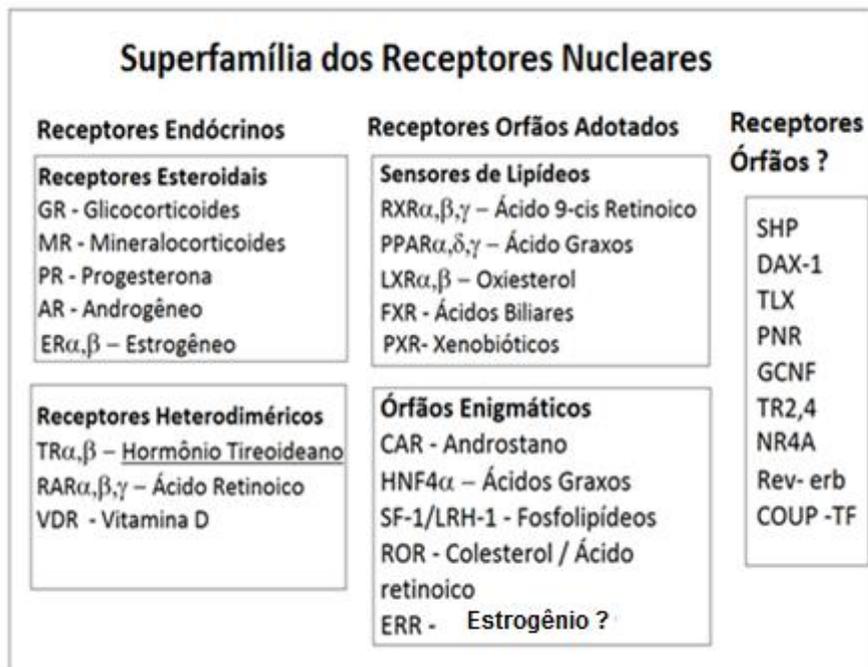


Figura 3. **A superfamília dos Receptores Nucleares.**

Estão divididos em três grupos: Os receptores endócrinos (esteroidais e heterodiméricos), os ligantes naturais e que atuam como homodímeros. Os receptores órfãos adotados (sensores de lipídeos e órfãos enigmáticos), que têm sua importância fisiológica estabelecida. E os receptores órfãos, chamados receptores órfãos verdadeiros, devido a sua função fisiológica não ter sido ainda definida. Sonoda e cols., 2008 (13).

A primeira classe compreende os receptores endócrinos que apresentam alta afinidade por hormônios lipossolúveis e vitaminas e são essenciais para o controle endócrino (13). Desta classe fazem parte os receptores dos hormônios esteroides, de glicocorticoide (GR), de mineralocorticoide (MR), de progesterona (PR), de andrógeno (AR), de estrogênio (ER), de hormônio tireoideano (TR), de ácido retinoico (RAR) e de vitamina D (VDR) (13, 17, 18).

A segunda classe é composta pelos receptores órfãos adotados, composta por receptor retinoide X (RXR), receptor ativado por proliferadores peroxissomais (PPAR), receptor hepático X, (LXR), receptor farnesoide X (FXR) e receptor pregnano X, (PXR) (13). Estes foram originalmente identificados pela organização estrutural comum e a homologia de sequência com os receptores endócrinos (13). Essas características possibilitaram a identificação de receptores sem ligantes endógenos conhecidos, ou receptores órfãos. Contudo, com a subsequente identificação de ligantes endógenos estes passaram a ser conhecidos como receptores órfãos adotados (13).

Essa classe compreende os receptores que possuem baixa afinidade por lipídeos dietéticos e xenobióticos e são alvos de fármacos mais promissores para o tratamento de distúrbios metabólicos por regular a homeostase de lipídeos e / ou glucose controlando a sua absorção e síntese (13). Receptores desta classe desempenham papel importante na sinalização do receptor nuclear como parceiro para diferentes receptores que se ligam como heterodímeros, como o receptor de ácido retinoico (RXR) (17).

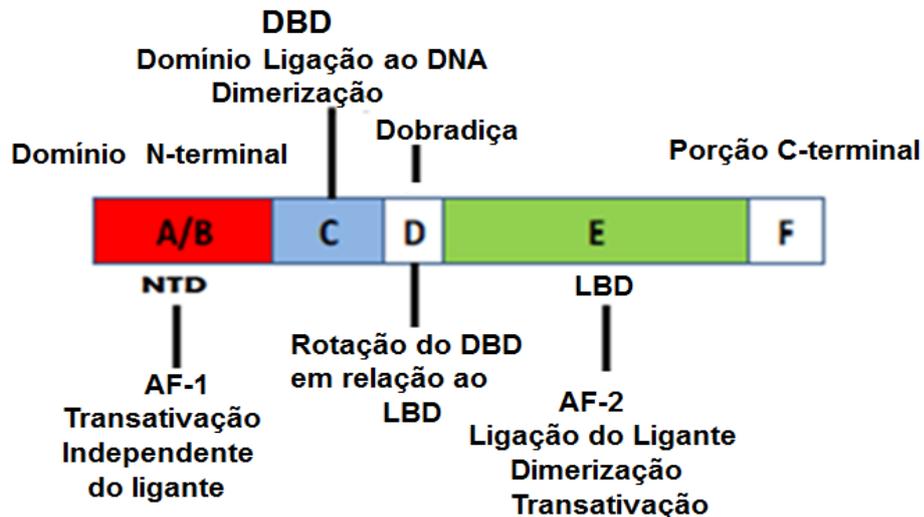
Dentre os receptores órfãos adotados estão ainda os receptores órfãos adotados enigmáticos. Nestes, seus ligantes já foram identificados, contudo o papel de sua regulação na presença de ligantes ainda não foi completamente elucidada. Estes compreendem o receptor relacionado ao estrógeno (ERR), o receptor órfão relacionado ao retinóide (ROR), o receptor androstano constitutivo (CAR), o fator esteroideogênico1 (SF1), o receptor humano homólogo 1 hepático (LRH1) e o fator nuclear hepatocitário 4 (HNF4) (13).

A terceira classe compreende os receptores órfãos verdadeiros, cujos ligantes naturais ou sintéticos ainda não foram identificados (13, 17). Dentre eles estão o parceiro heterodimérico curto (SHP), o sexo reverso dosagem sensível região crítica de hipoplasia adrenal, gene 1 (DAX1), o homólogo do gene sem cauda de *Drosophila* (TLL), o receptor nuclear fotorreceptor célula específico, (PNR), o fator nuclear de células germinativas, (GCNF), o receptor testicular, (TR), o receptor nuclear 4A,(NR4A) e o Rev-erb e o fator I de transcrição do promotor *upstream* de ovalbumina de galinha (COUP-TF) (13).

### **2.2.2 Domínios Funcionais dos Receptores Nucleares**

Os RNs são definidos por uma organização estrutural comum, caracterizada por diferentes regiões que correspondem aos domínios funcionais (13, 16, 17, 19, 20). Essa estrutura compreende a região amino-terminal variável conhecida por N-terminal ou domínio N-terminal (NTD), que compreende o domínio A/B, uma conservada região de ligação ao DNA (DBD), domínio C, a região de dobradiça que conecta os domínios DBD e LBD, denominada *Hinge*, domínio D, a região carboxi-terminal ou C-terminal que compreende o domínio de ligação ao ligante (LBD),

domínio E. Alguns receptores contêm também uma região F, de função desconhecida (12) (Figura 4).



**Figura 4.** Estrutura comum dos receptores nucleares e representação dos domínios funcionais. A; Estrutura primária, com a representação da região amino-terminal (domínio A/B), em que se AF-1, implicada na ativação independente do ligante, domínio de ligação ao DNA (DBD, domínio C), região de dobradiça (*Hinge*, domínio D), região carboxi-terminal ou domínio de ligação ao ligante (LBD, domínio E), e domínio F. Adaptado de Glass, 2006 (21) e Barra e cols., 2004 (22).

A região N-terminal contém um domínio de ativação independente do ligante, denominado função de ativação 1 (AF-1) (*Activation Function 1*) (13, 16, 17), independente de interações do LBD com ligante (19). Compreende o domínio A/B que é o mais variável em tamanho e sequência de aminoácidos (13, 17, 19), revelando pouca conservação evolutiva entre os diversos RNs (16).

Esta região é alvo de modificações pós-traducionais como a fosforilação (15, 16) que mediada por diferentes vias de sinalização, pode interagir com cofatores, tais como coativadores (CoAs) ou outros cofatores transcricionais (16), que podem modular a atividade transcricional tanto positivamente quanto negativamente. (17). Várias isoformas do receptor divergem nas suas regiões de A/B, seja por processamento alternativo ou pela utilização de promotores distintos, como é o caso das isoformas TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2. Estas são similares na estrutura do DBD e LBD, mas diferem na sua região amino-terminal (17).

A região central, ou DBD, é a mais conservada dos receptores nucleares (16, 17) e confere a capacidade de reconhecer sequências alvo específicas no promotor de genes alvo e ativar genes (17). O DBD contém nove cisteínas, bem como outros

resíduos, necessários para a elevada afinidade de ligação ao DNA. Este domínio é formado por uma região altamente conservada de 66 resíduos de aminoácidos que compreende duas estruturas conhecidos como “dedos de zinco” (13) (Figura 5). É por meio dele que o receptor nuclear se liga a sequências específicas (16, 17, 20) denominadas elementos responsivos aos hormônios, (HREs) (*Hormone Response Elements*) (13, 16).

Cada um dos dedos de zinco possui quatro das cisteínas invariáveis que coordenam tetraedricamente um íon de zinco, e ambos os módulos de dedo de zinco dobram em conjunto para formar uma estrutura compacta e interdependente (17, 23, 24).

O centro do DBD compreende duas alfa hélices. A primeira começa a partir do terceiro aminoácido sendo responsável pela identificação dos HREs (hélice de reconhecimento) que liga ao sulco maior do DNA fazendo contato com as bases específicas, caixa P-Box. E a segunda forma a caixa D-box, e abrange para a chamada extensão carboxi-terminal COOH (CTE) (*Carboxy Terminal Extension*) (23, 24), que forma um ângulo reto com a hélice de reconhecimento (17, 20, 23), região envolvida na dimerização do receptor (16, 17). Por estar em posição proximal do domínio é denominada caixa P-box e em posição distal caixa D-box (25). O DBD também é alvo de modificações pós-traducionais que envolvem interação com fatores transcricionais e CoAs (16).

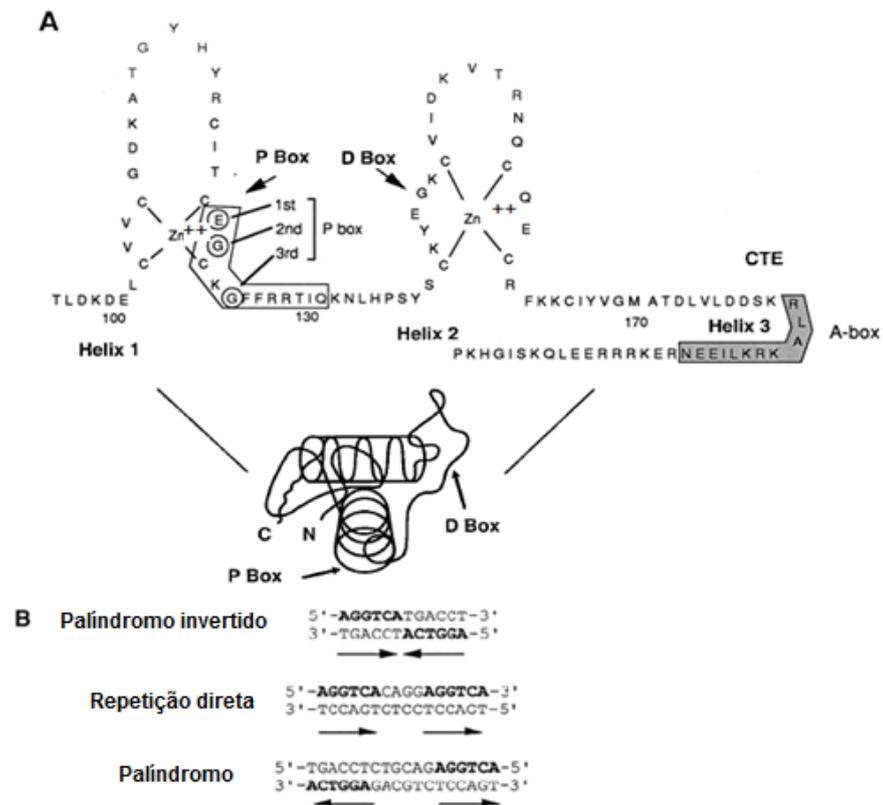


Figura 5. Domínio de ligação de receptores nucleares ao DNA.

A, diagrama dos dois dedos de zinco e da extensão carboxi-terminal (CTE). Cada dedo de zinco é composto por quatro resíduos de cisteína coordenados por um íon de zinco. A hélice 1 contém a região P Box envolvida na discriminação do elemento responsivo. Aminoácidos no segundo dedo de zinco, região D Box, formam a interface de dimerização. B, três classes dos elementos responsivos mostrando a orientação e espaçamento entre eles. Adaptado de Aranda e cols., 2001 (17) e Nelson e cols., 1995 (23).

O domínio D, denominado *Hinge* (dobradiça), é uma região menos conservada entre os diferentes receptores nucleares (17). Este conecta os domínios DBD e LBD e comporta-se como uma dobradiça conferindo maior flexibilidade estrutural ao receptor, o que permite que sua dimerização com outro RN e ligação ao DNA ocorram simultaneamente, permitindo a rotação do DBD (13, 16, 17).

A região carboxi-terminal ou domínio E contém o LBD, que determina especificidade da resposta aos ligantes por meio do reconhecimento de ligantes específicos (13). O LBD exibe uma maior variação estrutural comparado ao DBD (16). É um domínio multifuncional responsável por diversas funções dos RN, a maioria delas induzida por ligantes, como a função de ativação 2 (AF-2), dimerização e interação com cofatores da transcrição (16, 17).

O LBD contém quatro estruturas distintas, mas funcionalmente associadas à superfície de dimerização, que medeia: a) a interação com o LBD de outros receptores nucleares, responsável pela formação de homodímeros ou heterodímeros, b) o bolso de ligação ao ligante, que interage com moléculas lipofílicas; c) a superfície de ligação a corretores transcricionais, que se liga a cofatores que modulam a positivamente ou negativamente a atividade transcricional e, d) a função de ativação 2 (AF-2) requerida para a ativação transcricional dependente do ligante e recrutamento de corretores (16, 17). Alguns receptores contêm também uma região F com estrutura e função não conhecida (14).

A ilustração de como hélice 12 forma superfície de ativação da função de 2 (AF-2) foi proposta pela primeira vez por Cavailles e cols. (1994) (26, 27).

Vários estudos de cristalografia de raios X do LBD, ligado também ao hormônio (28, 29), RAR (30), RXR (31), ER (32) e PPAR (26) demonstraram que o LBD dos receptores da superfamília tem uma estrutura tridimensional conservada e constituída por 12  $\alpha$ -hélices conservadas, numeradas de 1 a 12 (H1 a H12) (17) (Figura 6).

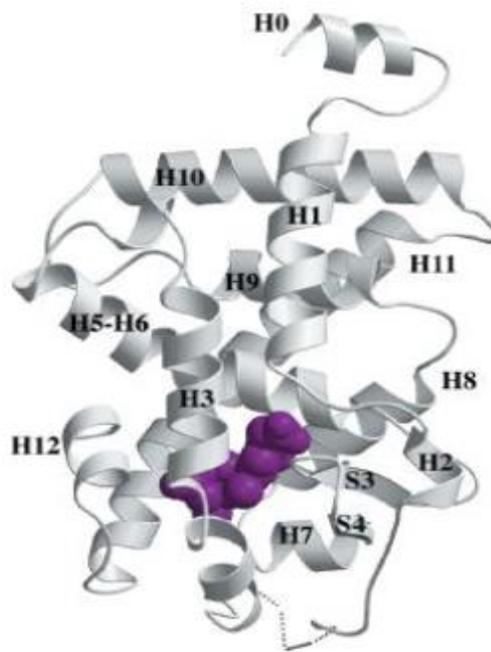


Figura 6. **Representação em fitas do LBD do r TR $\beta$ .**

A qual mostra as 12  $\alpha$ -hélices, numeradas de 1 a 12 (H1 a H12), e o ligante (em roxo) que se encontra dentro do bolso de ligação no LBD Wagner e cols., 1995 (29).

Tais estudos demonstraram ainda, que o ligante se aloja no interior do receptor sendo fundamental na formação da estrutura final do receptor. Observou-se que a função ativadora AF-2 envolve predominantemente as 3  $\alpha$ -hélices (H3, H5 e H6) criando uma superfície hidrofóbica que favorece a interação com coativadores. A estrutura tridimensional do LBD alojando o ligante foi de suma importância para se entender o mecanismo estrutural envolvido na ativação do receptor dependente do ligante (28, 29, 33).

### **2.2.3 Mecanismo de regulação da expressão gênica dos receptores nucleares**

Ao regular a transcrição mediante a interação com o DNA, os RNs reconhecem sítios específicos em sua sequência, denominados elementos responsivos ao hormônio (HREs) (13, 16, 34) que estão localizados na região promotora dos genes-alvo e compostos por duas cópias degeneradas de um hexanucleotídeo consenso, AGGTCA, que podem ser arranjadas em diferentes orientações, com espaçamento e sequências flanqueadoras diferentes (3, 17).

Em 1995, Mangelsdorf e cols, propuseram quatro categorias para a classificação da vasta variedade de estados diméricos dos RNs que podem ocorrer em forma de monômeros, homodímeros ou heterodímeros (18). Alguns receptores fazem parceria com o RXR formando heterodímeros de maneira dependente do ligante, os receptores órfãos funcionam como homodímeros, ligando-se a HREs com repetições diretas (DR) de sequências específicas de DNA, os receptores de esteroides funcionam também como homodímeros em elementos de repetição invertida palíndromo (Pal), enquanto outros receptores formam monômeros com sítio de ligação de um único local (18, 35) (Figura 7).

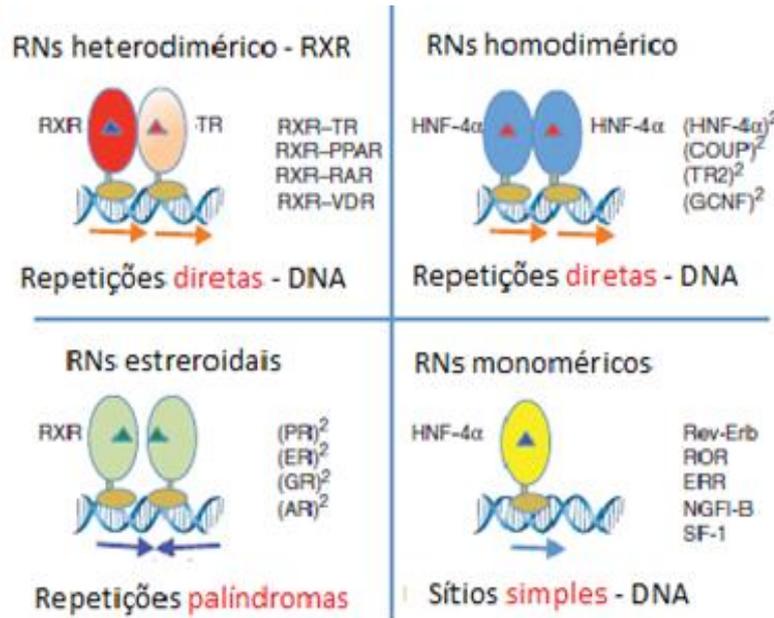


Figura 7. **Complexos oligoméricos dos RNs aos elementos responsivos.**

Os receptores podem ser organizados em distintos estados oligoméricos como heterodímero, com o parceiro comum, o receptor de retinoide X (RXR), como homodímeros, ou monômeros. Os receptores não esteroidais, se ligam aos ERs de repetição direta formando heterodímero e homodímeros. Os receptores de esteroides homodimerizam principalmente a elementos palíndromos de repetição invertida. Outros receptores usam sítios monoméricos estendidos com sequencias curtas Vários exemplos de receptores caem em cada uma destas quatro categorias mostrada. Rastenejad e cols., 2013 (35).

Na ausência do ligante os receptores de esteroides estão associados a um complexo de múltiplas proteínas que incluem proteínas de choque térmico (HSPs) (*heat shock proteins*). A interação com o ligante faz com que estes se dissociem das HSPs, sejam translocados ao núcleo e se liguem como homodímeros e preferencialmente aos HREs com sequências palíndromo, espaçado por 3 nucleotídeos (AGAACA(N3)TGTTCT). Ligam-se diretamente ou indiretamente ao DNA regulando a transcrição. (36).

Em contraste, com os TRs, os RAR, VDR, PPARs e vários receptores órfãos ligam-se como heterodímeros com RXR para repetições diretas (DRs) (AGGTCA(N4)AGGTCA) (36), mas também se ligam a sequências de palíndromos não espaçados por nucleotídeos (AGGTCA(0)TGACCT) (TREpal/Pal) ou palíndromos invertidos, espaçados por 6 nucleotídeos (TGACCT(N6) AGGTCA) (IP6/F2) (36). A especificidade de ligação destes receptores é determinada pelo espaçamento como, por exemplo, os PPARs, VDR, TR e os RAR se ligam preferencialmente a DRs espaçadas por 1, 3, 4, ou 5 nucleotídeos, respectivamente

(36, 37). Ao contrário de PPAR, VDR, RAR, o TR também se liga ao DNA como monômeros e como homodímeros em DRs e palíndromos invertidos (DR4/ F2) (18, 36, 37).

A partir destes elementos responsivos, os NRs recrutam complexos correguladores que têm a capacidade de modificar as histonas e alterar a estrutura da cromatina para promover ou reprimir a transcrição dos seus genes-alvo (17, 35). Estas modificações da estrutura definem o estado da cromatina (ativa ou silenciosa) por meio da modificação das histonas (20, 38) (Figura 8). Os RNs se ligam a proteínas correpessoras como, correpessor nuclear 1 (N-COR1) ou silenciador mediador do receptor de retinóide e receptor do hormônio da tireoide (SMRT) (35) e reprimem a expressão do gene-alvo na ausência de ligante. CoRs são encontrados em complexos multicomponentes que confere atividade de histona desacetilase (HDAC) (17, 35). A desacetilação leva à compactação da cromatina e a repressão transcricional (17, 20)

A adição do ligante induz a translocação do receptor do citoplasma para o núcleo da célula e promove a mudança conformacional no receptor permitindo que o complexo CoR se dissocie e permita o recrutamento de proteínas que formam o complexo CoA (17, 20, 35). O recrutamento de complexo coativador ao promotor alvo, como os CoAs do receptor de esteroide 1 (SRC-1) ou proteína 1 que interage com GR (GRIP) (39), envolve algumas proteínas que atuam como fatores de remodelação da cromatina ou possuem atividade de histona acetiltransferase (HAT), que estimula a atividade transcricional causando a descompactação da cromatina enquanto outras podem interagir diretamente com a maquinaria de transcrição basal ativando a transcrição (17, 20, 35).

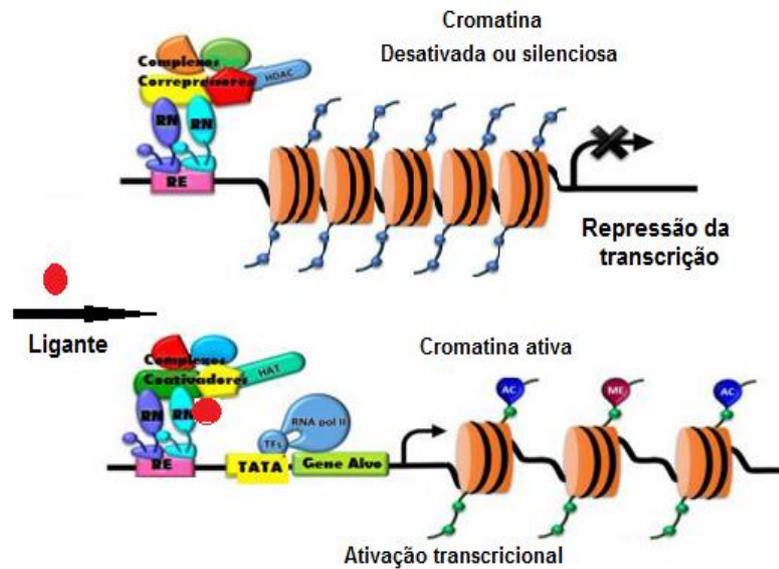


Figura 8. Esquema representando a dinâmica da cromatina no mecanismo de ação dos receptores nucleares.

Na parte superior a (cromatina desativada), os RNs ligados ao HRE e associado com o complexo corressor, e a ação das histonas desacetilalases HDAC desativada determinam o silenciamento do gene alvo. Embaixo, com a entrada do ligante há uma dissociação do complexo corressor formação de heterodímeros de NRs ligados ao HRE, associado com complexo coativador e ocorrem as modificações de histonas acetiltransferase (HAT), que por sua vez, altera a estrutura da cromatina permite a entrada da maquinaria de transcrição basal ativando o gene. Fattori e cols.2014 (20).

A caracterização dos complexos de CoRs e CoAs, em conjunto com a identificação dos motivos específicos de interação nos receptores, demonstra a existência de um mecanismo molecular, geral pelo qual diferentes receptores induzem respostas transcricionais em genes-alvo (17).

#### 2.2.4 Receptores do Hormônio Tireoideano

Os TRs são produtos da expressão de dois genes localizados nos cromossomos 17 e 3, sendo denominados respectivamente *THRA* e *THRB* (1, 34). Os TRs são homólogos celulares do oncogene viral erb-A, um produto envolvido na eritroblastose de galinha (12, 40).

Por *splicing* alternativo ou utilização de promotores distintos, cada gene gera várias isoformas de TR (34). São assim apresentadas: TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2, TR $\alpha$ 3, TR $\Delta\alpha$ 1,

TR $\Delta\alpha$ 2, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2, TR $\beta$ 3 e TR $\Delta\beta$ 3 (Figura 9). Somente as isoformas  $\alpha$ 1,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2 e  $\beta$ 3 se ligam ao hormônio. As isoformas TR $\alpha$ 2 e TR $\alpha$ 3 diferem de TR $\alpha$ 1 em sua região carboxi-terminal, enquanto TR $\alpha\Delta$ 1 e TR $\Delta\alpha$ 2 são versões truncadas do TR $\alpha$ 1 e TR $\alpha$ 2, respectivamente(3, 34). As diferenças entre TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 se encontram na região amino-terminal. As isoformas completas apresentam 3 domínios: NH2 ou NTD, DBD e LBD (23, 24).

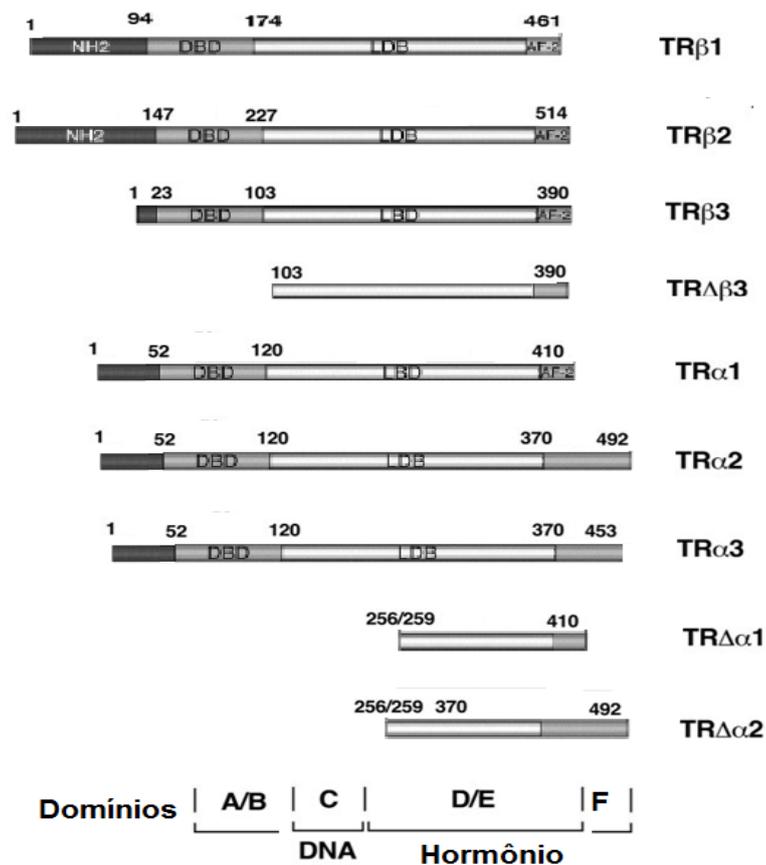


Figura 9. **Representação esquemática das isoformas do TR.**

Mostra as diferenças e semelhanças entre os domínios e as diferentes proporções em relação ao tamanho, indicados pelos números. Os domínios NTD (A/B) são variáveis em comprimento e sequência de aminoácidos, já o domínio de ligação ao DNA (C) e o domínio de ligação à hormônio (D/E/F) possuem uma alta homologia nas sequências de aminoácidos. Cheng e cols., 2010 (3).

Recentemente Zhao e cols. (2014) identificaram na glândula pituitária de rato adulto uma nova isoforma de TR $\beta$ , chamado de TR beta 2 Delta (TR $\beta$ 2 $\Delta$ ) (41). A nova isoforma se liga com alta afinidade ao T3 e reconhece os sítios de interação com DNA, evidências sugerem que seja uma nova isoforma funcional do TR. Toda sequência da nova isoforma foi publicada no Banco Genético do Centro Nacional para informações Biotecnológicas (NCBI) (*National Center for Biotechnology*

*Information*) (*Gene Bank*) (HM043807.1). O novo exon N (108pb) foi encontrado entre o exon3 e 4 e codifica uma proteína de 58,2 kiloDaltons (kDa) (41).

O TR $\alpha$ 1 produz proteína com tamanho já conhecido de 47 kDa (40) e TR $\beta$ 1 de 55 kDa (42), diferença essa que é devida, principalmente, ao distinto NTD de ambos. No entanto, TR $\beta$ 2 também apresenta tamanho maior que TR $\beta$ 1, 62 kDa, compatível com a diferença no NTD de ambos (43).

A expressão relativa dos RNAs mensageiros (mRNAs) codificada por ambos os genes dos TRs variam nos diferentes estágios do desenvolvimento e com a diferenciação celular e sua expressão ocorre de forma específica em diversos tecidos em humanos (1, 6, 12). Os mRNAs de TR $\alpha$ 1, TR $\alpha$ 2 e TR $\beta$ 1 são expressos em quase todos os tecidos em diferentes níveis de expressão. TR $\alpha$ 1 é constitutivamente expresso no desenvolvimento embrionário, e TR $\beta$ 1 é expresso em fase posterior do desenvolvimento (3).

Dentre as isoformas, o TR $\alpha$ 1 é abundante nos músculos esqueléticos, coração e gordura marrom, o TR $\alpha$ 2 é abundante no cérebro e o TR $\beta$ 1, está expresso em grande quantidade no fígado, rim e cérebro (3, 12, 34, 44). O TR $\beta$ 2 é expresso principalmente na glândula pituitária, retina e em outras áreas do cérebro (43). O TR $\alpha$ 2 é expresso no epitélio do intestino delgado e pulmão, durante os estágios precoces do desenvolvimento (3, 45). O TR $\alpha$ 2, não se liga ao T3, e sua expressão em um determinado tecido impede que a ação de T3 seja exercida. TR $\alpha$ 2 pode competir com TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 para se ligar aos HREs e inibir que estes formem heterodímeros com RXR (28, 44). O TR $\Delta\alpha$ 1e o TR $\Delta\alpha$ 2 são encontrados principalmente no epitélio do intestino delgado, pulmão, durante os estágios precoces do desenvolvimento do cérebro (46). O TR $\beta$ 3 é expresso predominantemente no fígado, rim e pulmão e em baixo níveis, no músculo esquelético, coração, baço e cérebro(46).

Os TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 possuem papéis fundamentais na regulação endócrina e no desenvolvimento dos sentidos da audição e cores da visão (3, 47). Esses padrões de expressão diferenciados revelam que as isoformas de TR exercem papéis funcionais distintos durante o desenvolvimento.

Alguns estudos realizados com deleções de genes corroboram com os papéis diferenciados e específicos das isoformas do TR no organismo. Por exemplo, Wikstrom e cols. (1998) observaram que camundongos com deficiência do TR $\alpha$  apresentaram níveis baixos de T4 e TSH circulante, redução da frequência cardíaca

e da temperatura do corpo (48). Tal observação contrastou com outros estudos em camundongos nos quais o gene *THRB* é seletivamente inativado, fazendo com que ocorra uma leve disfunção do eixo hipófise-tireoide, prejudica a função auditiva e o desenvolvimento do olho (47, 49).

Fraichard e cols. (1997) observaram que em animais com distinta mutação em TR $\alpha$ , na qual são excluídos ambos os TR $\alpha$ 1 e TR $\alpha$ 2, há prejuízo no desenvolvimento pós-natal, como hipotireoidismo, má formação intestinal, retardo do crescimento e diminuição da sobrevivência pós-natal (50).

Quando ambos os genes do *THRA E THRB* são inativados ao mesmo tempo, observa-se uma variedade de fenótipos, como severa disfunção do eixo HPT, retardo do crescimento e da maturação óssea e déficit da fertilidade feminina, estes não são encontrados nos camundongos deficientes em receptores individuais (50). Estes fenótipos diferentes exibidos pelos camundongos, em que os genes individuais das isoformas do TR são seletivamente deletados, indicam que as isoformas medeiam funções específicas.

Estudos de inativação de gene, no entanto, fornecem evidências *in vivo* para indicar que ambas isoformas do TR, específicas para dado subtipo, podem ter sobreposição dos papéis funcionais (3, 49, 51). Por exemplo, Refetoff e cols. (1993) relataram a síndrome de resistência ao hormônio tireoidiano (SRTH) (*syndrome of resistance to thyroid hormone*) que é causada por mutações dentro do LBD do TR $\beta$  e apresenta elevadas concentrações séricas de T3 e T4 livres, associada a um TSH elevado ou inapropriadamente normal (52). No entanto, os autores observaram que camundongos com deleção do TR $\beta$ 1 apresentam sinais semelhantes à resistência ao hormônio tireoidiano, como, por exemplo, elevação dos níveis séricos de T3, T4 não suprimindo os níveis de TSH, apresentaram também frequência cardíaca basal elevada, má formação da cóclea e da retina (52). Outros estudos também demonstraram, que camundongos com deleção do TR $\beta$ 1, apresentaram concentrações basais de T4 e TSH aumentadas, e exibiram supressão parcial do TSH, após administração de T3 (49, 53). Abel e cols. (2001) propuseram que a supressão parcial da produção de TSH neste modelo sugere que o TR $\alpha$ 1 residual é capaz, em parte, de mediar por meio de T3, a inibição da produção de TSH (54). Em estudo posterior, os mesmos autores a haviam observado que anormalidades hormonais apresentadas em camundongos TR $\beta$ 1 nulos são, em grande parte, normalizadas em camundongo com ablação seletiva para TR $\beta$ 2 (55). Observaram

ainda que a expressão basal de TRH foi aumentada em camundongos com TR $\beta$ 2 nulo quando comparado aos camundongos de tipo selvagem e não sofreu alterações quando induzido ao hipotireoidismo ou tratamento com T3 (54). Baseados nestes resultados, esses autores sugeriram, então, que a isoforma TR $\beta$ 2 pode ser mediador importante da regulação negativa da produção de TSH e TRH por T3 (54).

Outros estudos também revelaram distintos papéis dos TR na regulação do organismo. Por exemplo, Chiamolera e cols. (2012) mostraram diferentes papéis do TR na regulação negativa do TSH $\beta$ , mediado pelo T3. Com o uso da estratégia de diminuição da expressão de genes denominada *knockdown*, foi possível observar que o “*knockdown*” do TR $\alpha$  não afetou a regulação negativa em TSH $\beta$  mediada por T3, enquanto o “*knockdown*” do TR $\beta$  aboliu a regulação do mRNA do TSH $\beta$  na presença de baixo níveis de T3 (10nM), mas não em altos níveis (100nM) (56). Em ensaios de imunoprecipitação da cromatina (ChIP), mostrou-se que TR $\alpha$  tornou-se enriquecido sobre o promotor do *TSHB*, após “*knockdown*” do TR $\beta$ , e que tal fato, pode ser baseado na afinidade diferencial de ligação para o promotor (56).

#### 2.2.4.1 Mecanismos de Regulação Positiva da Expressão Gênica do TR

Dentre as características funcionais de TR destaca-se sua capacidade de reprimir ou silenciar a transcrição basal na ausência de ligante (3, 57). Geralmente, na ausência do ligante, o TR interage com proteínas com atividade de histona desacetilase e complexo correpessor, que inibem a atividade transcricional (20, 58).

No mecanismo clássico de regulação da expressão gênica regulada positivamente, o TR se liga a HREs (3, 13, 16). Os elementos responsivos positivos do TR (pTRE), podem estar organizados em três orientações diferentes: na forma de repetição direta espaçada por quatro nucleotídeos quaisquer, DR-4 (AGGTCA(N4)AGGTCA), palíndromos invertidos espaçados por 6 nucleotídeos, F2/IR6 (TGACCT(N6)AGGTCA ou na forma de palíndromos não espaçados, TREpal/Pal (AGGTCA(0)TGACCT) (3, 17, 18) (Figura 10).

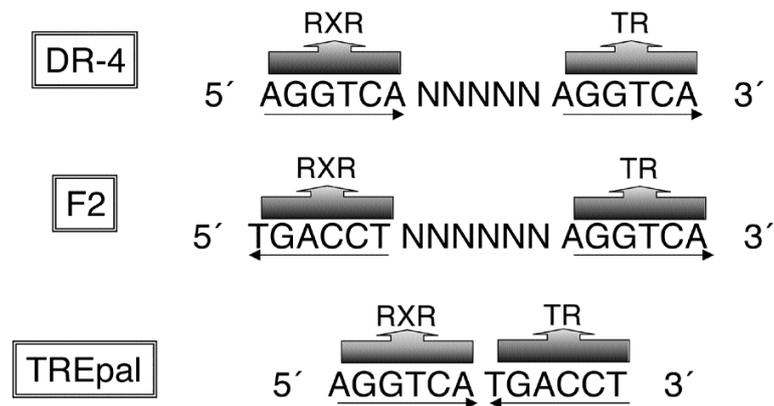


Figura 10. Elementos responsivos ao TR (TREs).

Repetição direta DR4, AGGTCA(N4)AGGTCA; palíndromo invertido F2 ou IP6, TGACCT(N6)AGGTCA; e palíndromo Pal, AGGTCA(0)TGACCT. O "N" indica o número de nucleotídeos entre os hexâmeros. Barra e cols., 2004 (22)

O TR se liga aos TREs como monômeros, homodímeros ou heterodímeros (36, 59) e compartilham o mesmo mecanismo de ação (20). Na ausência do ligante, o TR se liga ao DNA na forma de homodímero ou heterodímero e recruta CoRs, como NCoR e SMRT, formando um largo complexo correpressor com Sin3 (1, 2, 60), que interage com as histonas desacetilases (HDAC) mantendo a cromatina compactada (20). Nestas condições o TR interage diretamente com o fator de transcrição basal TFIID (61, 62) que impede o recrutamento da maquinaria de transcrição, resultando na repressão da transcrição gênica, denominada repressão basal (62).

A ligação de T3 ao TR provoca uma alteração na conformação deste receptor que se liga aos TREs formando heterodímero com RXR. Há dissociação do complexo CoR e recrutamento do complexo CoA (17, 20). Exemplos de CoAs são a proteína 1 que interage com GR (GRIP), o complexo p160/SRC, e o complexo de proteína que interage com o receptor de vitamina D e com a proteína associada ao TR(DRIP/TRAP) (57), membro da família dos CoAs do receptor de esteroide (SRC) (2, 60), dentre outras proteínas que possuem atividades de histona acetiltransferase (HAT) (1, 20, 57), que mantêm a cromatina descompactada. Dessa forma, facilitam o acesso de outros fatores de transcrição pela RNA polimerase II (28, 57), promovendo a atividade transcricional do gene (60) (Figura 11).

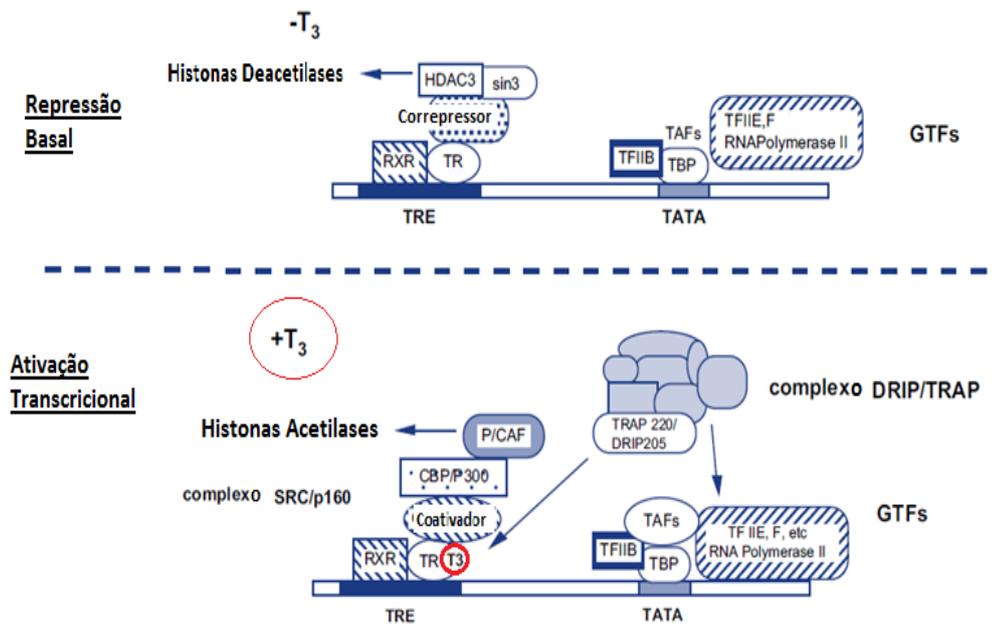


Figura 11. **Mecanismos de Regulação Positiva do TR.**

(A) Na ausência de T<sub>3</sub>, o TR interage com o complexo CoR e proteínas associadas resultando na repressão da transcrição. (B) Na presença de T<sub>3</sub>, o TR interage com complexo CoA (por exemplo, complexo DRIP/TRAP) que leva à ativação da transcrição. Oetting A. e Yen P.M. 2007 (2)

Quando o receptor nuclear funciona como heterodímero, o parceiro preferencial é o receptor do ácido retinoico (RXR) que medeia a atividade do hormônio tireoideano (13, 59). A heterodimerização do TR com o RXR aumenta a ligação aos HREs, e, conseqüentemente, aumenta a capacidade de resposta ao T<sub>3</sub> e a ativação da transcrição (3). Assim, a heterodimerização fornece um meio importante para modular as funções do TR (59).

Após a ligação ao hormônio, o receptor induz mudanças na expressão gênica e ativa a transcrição de genes-alvo (3, 20).

#### 2.2.4.2 Mecanismos de Regulação Negativa da Expressão Gênica do TR

Uma das características funcionais de TR é a sua capacidade para ativar ou reprimir a transcrição do gene, dependendo do estado de ligação ao ligante ou do promotor em questão (58). Por exemplo, a atividade transcricional de genes regulados negativamente por TR pode ser ativada na ausência do hormônio e reprimida na sua presença (2). Este modo de atuação do TR difere daquele

observado, em geral, nos receptores do hormônio esteroide que são transcricionalmente inativos na ausência de ligante (63).

Entre os genes regulados negativamente pelo TR estão *TSHA* (7), *TSHB* (8, 64) e o *TRH* (7), que são inibidos por T3 por um mecanismo de *feedback* negativo fisiológico que modula a circulação dos níveis do hormônio tireoideano. Outro gene é o complexo ativador da proteína 1 (AP-1), essencial para a expressão da collagenase humana (65, 66). Estes genes são estimulados na ausência de T3, e a adição de hormônio induz a repressão da transcrição de maneira intensa (7). Os CoRs aumentam a transcrição basal desses genes, quando o TR não está ligado ao T3 (9, 67).

Em contraste com a transcrição regulada positivamente por T3 que já está bem caracterizada, o mecanismo de regulação negativa ainda não está muito bem elucidado (2), mas tem sido extensivamente estudado, por ser considerado um ponto crítico para o controle do *feedback* do eixo HPT inibido por T3 (9).

Sabe-se que, em genes regulados negativamente, o domínio LBD do TR interagem com o fator de transcrição TFIIB e que esta ligação pode exercer um papel na repressão por receptor não ligado, sendo a mesma abolida pela interação com T3 (61).

Há também relatos de que, no promotor do *TSHA*, mutações no TR impediram a ligação com proteínas CoAs e a repressão foi abolida na presença do T3, mas não impediu a ativação da transcrição mediada pelo TR na ausência de T3 (68).

Há evidências de que os genes alvos do TR podem adotar mecanismos distintos na regulação negativa mediada por T3. No caso dos genes *TRH*, *TSH*, ocorre a repressão da transcrição na presença de T3 e a ativação quando o TR não está ligado ao T3. Diferente do que ocorre na ativação da transcrição de genes regulados positivamente, existem relatos de que os CoRs também estão envolvidos na ativação da transcrição do TR na ausência do ligante (67).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a ação do TR em elementos responsivos negativos do TR (nTRE) (69). É incerto se a regulação do TR ocorre por ligação direta ao DNA ou se de fato pode ocorrer por ligação indireta ao DNA por meio de interação proteína-proteína com outros cofatores, ou mecanismo de sequestro de cofatores transcricionais. Contudo, tal mecanismo está sendo aos poucos mais esclarecido (64, 67, 70-72)

Segundo Tagami e cols. (1997), os genes regulados negativamente são estimulados por proteínas classificadas como CoR, a adição de T3 reverte esta ativação e as interações entre TR e proteína CoR desempenha um importante papel no controle de genes regulados negativamente (67).

Berghagen e cols. (2002) sugerem hipótese de que o TR regula diretamente a transcrição por meio de ligação direta com o HRE para atingir os promotores (70). Na ausência do hormônio, o complexo TR-SMRT pode adotar diferentes conformações modulando o complexo de iniciação da transcrição dependendo do elemento responsivo (negativo/positivo) em que o complexo é formado, resultando na repressão ou ativação do gene. Por exemplo, quando o complexo TR/SMRT está ligado ao pTRE, este atua como coativador e recruta proteínas correguladoras que inibem a maquinaria de transcrição basal. Por outro lado, quando o TR/SMRT está ligado ao nTRE, atua como correpressor e assume uma conformação diferente que recruta outras proteínas que estimulam o complexo de iniciação transcrricional e ativam a transcrição (70) (Figura 12).

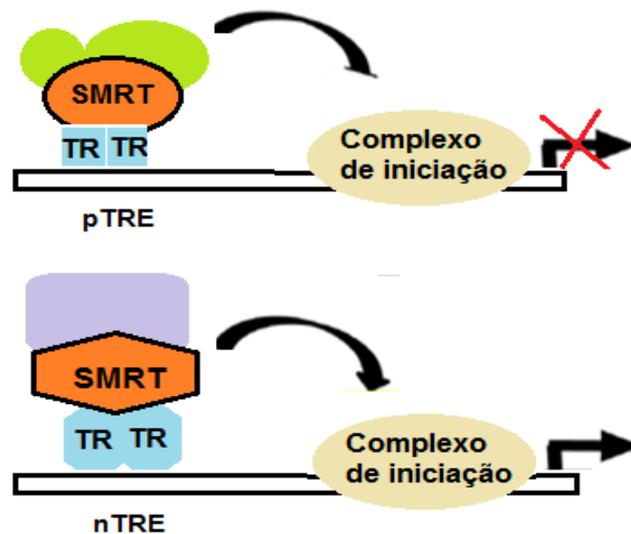


Figura 12. Modelo das diferentes funções do SMRT em pTRE e nTRE.

Na ausência do ligante, o TR se liga ao pTRE e o SMRT é recrutado juntamente com outros polipeptídios inibindo a maquinaria de transcrição basal. Por outro lado, quando o TR está associado ao nTRE na ausência do hormônio, o SMRT também está presente, porém o complexo TR/SMRT assume uma conformação diferente, que recruta outras proteínas que estimulam o complexo de iniciação transcrricional e ativam a transcrição. Berghagen e cols., 2002 (70).

Estudos com o promotor de *TSHA* também propuseram que a repressão dependente de T3 era susceptível de envolver interações proteína-proteína entre TR

e outros fatores de transcrição, e que esta proposta diferiria de modelos mais tradicionais em que o TR liga-se a sítios-alvo com elevada afinidade no promotor (73).

Segundo Tagami e cols. (1999), a regulação da atividade do promotor do *TSHA* pode ser explicada pelo mecanismo de sequestro no qual o TR em solução não se liga diretamente ao DNA. Esses autores ainda propuseram que os genes regulados negativamente são controlados por dois mecanismos (68), representados esquematicamente na Figura 13.

1) O TR, na ausência de T3, recruta os CoRs que, por sua vez, sequestram as histonas desacetilases (HDAC) não permitindo a condensação da cromatina favorecendo a ativação da transcrição. 2) Com a ligação de T3 ao TR, ocorre a dissociação do complexo CoR/HDAC e a associação com CoAs que, por sua vez, sequestram as histonas acetilases (HAT) e outros fatores de transcrição, o que favorece a repressão da transcrição (68).

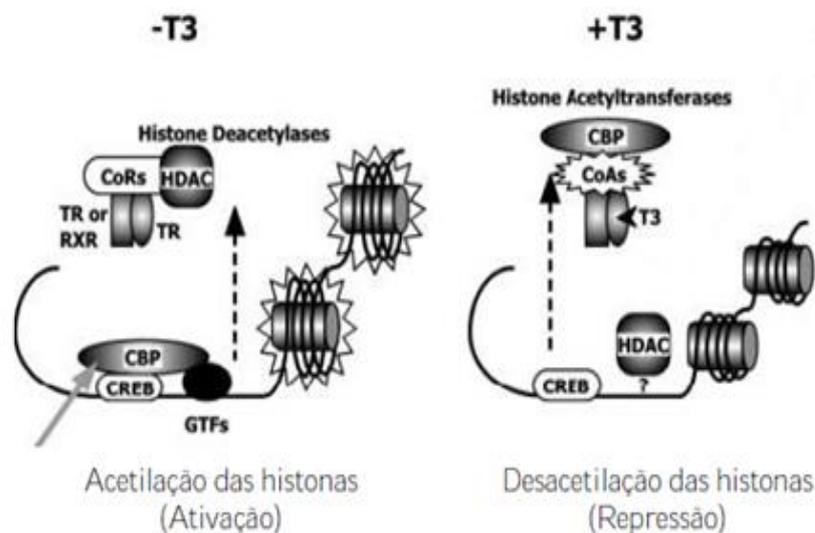


Figura 13. **Mecanismo de sequestro da regulação negativa do *TSHA*.**

O TR em solução se liga a CoRs que recrutam HDAC da região promotora, resultando no aumento da acetilação das histonas e ativação transcricional. Na presença de T3, o TR se dissocia dos CoRs e recruta os CoAs, deixando a região promotora livre para a atuação das HDAC, que compactam a cromatina e reprimem a transcrição. GTF - Fatores gerais de transcrição. Tagami e cols.,1999 (68).

O mecanismo de ação pelo qual o TR interfere na atividade do AP-1 ainda não está muito claro. Uma das hipóteses é que a ativação do TR necessita da ação do coativador **CBP/p300** (*CREB-binding protein*) que inibe a atividade de AP-1 que compete por um cofator comum para ambas as proteínas (74). Outra hipótese é a de

que ocorre impedimento da fosforilação de c-Jun inibido por JNK (Jun amino-terminal kinase) que potencializa ação de c-jun sobre AP-1 ocorrendo a ligação a CBP, que por outro lado na presença de seus ligantes inibem a ligação da CBP a Jun, o que reprime a transcrição dos genes regulados por AP-1 (75).

A regulação negativa, no entanto, pode ocorrer sem uma ligação direta TR/DNA, por meio de interações proteína-proteína com outros fatores de transcrição (67). Esse mecanismo pode ser observado com o dímero c-Jun / c-Fos, que por meio de interação com o sítio AP-1, promotor do gene da collagenase que regulado negativamente pelo T3, ativa a transcrição na ausência do hormônio e reprime em sua presença. (65, 69) (Figura 14).

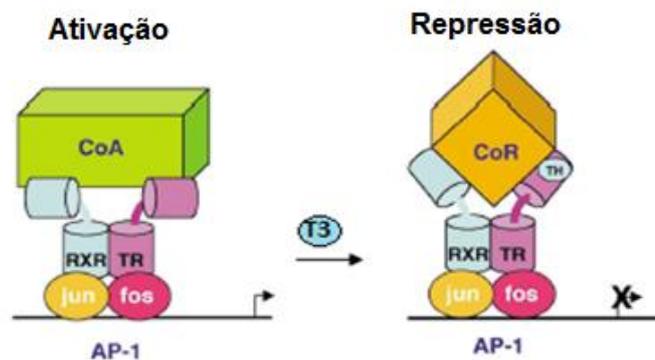


Figura 14. **Representação esquemática da regulação negativa com interação indireta do TR ao DNA.**

Neste potencial mecanismo de regulação negativa, a interação indireta do TR ao DNA ocorre por meio da interação (TR-fos/jun\_AP-1) ativando a transcrição na ausência do hormônio e reprimindo em sua presença. Lazar, 2003 (69).

O gene da prolactina humana (hPRL) é estimulado pelo AP-1 também é regulado pelo TR, tanto por elementos responsivos positivos quanto negativos. Quando o TR interage com o AP-1 exerce um efeito negativo mais forte que o positivo (65).

O TR também exerce regulação negativa sobre o promotor da superóxido dismutase-1 (SOD-1; *Superoxide Dismutase-1*), uma enzima que age no metabolismo de espécies reativas de oxigênio. Na ausência de T3, a interação do TR com CoRs ativa o promotor da SOD-1 e, na presença de T3, a interação com CoAs reprime sua transcrição por interação do DBD do TR que recruta um elemento inibitório no próprio promotor da SOD-1 (76).

Estudos de Wang e cols. (2009 e 2010) demonstraram o papel crítico do complexo CoRs e histonas desacetilases 3 (NCoR/HDAC3) na regulação negativa da expressão do gene *TSHA* (77) e observaram que modificações epigenéticas como modificações distintas e específicas de histonas medeiam a regulação transcricional positiva e negativa do promotor de *TSHA* (77, 78)

#### 2.2.4.2.1 Promotores regulados negativamente

a) Promotor (AP-1): O AP-1, promotor do gene da collagenase, é um fator de transcrição dimérico composto por duas proteínas (*jun* e *fos*), que podem se homodimerizar (c-Jun/c-Jun) ou heterodimerizar (c-jun/c-fos). Fazem parte da família dos proto-oncogenes, e são capazes de se ligar a um sítio específico do DNA, o sítio AP-1 que é composto pela sequência consenso (5'-TGAG/CTCA-3') (79). Esse sítio está localizado na posição -61pb e -54pb região proximal do promotor e existe uma forte interferência entre as vias de sinalização regulatória de TR e AP-1 (65, 74).

b) Promotor do TSH: O TSH é o principal estimulador da hormonogênese da tireoide e pertence à família de hormônios de glicoproteína na pituitária que inclui o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo-estimulante (FSH). Consiste em duas subunidades alfa ( $\alpha$ ) e beta ( $\beta$ ), codificadas por genes diferentes em cromossomos diferentes (7, 8). As subunidades  $\alpha$  de diferentes glicoproteínas são idênticas dentro de uma determinada espécie, enquanto a subunidade  $\beta$  é distinta e confere especificidade biológica a cada hormônio (8). O TR regula negativamente em nível transcricional a síntese de ambas as subunidades de TSH (8).

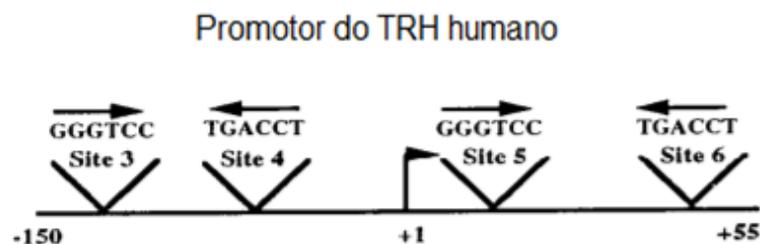
A região promotora da subunidade TSH $\alpha$  está envolvida na repressão mediada pelo T3, consiste em poderoso sítio de ligação do TR. Foi localizada imediatamente a jusante da caixa TATA box e compreende uma sequência palíndromo entre -22 e +7pb, (80) constituído por uma sequência consenso 5' TCAGGTCATGACCTGA 3' descrito por Glass e cols. (1998) (81) (Figura 15A).

A região promotora da subunidade TSH $\beta$  está envolvida na repressão mediada pelo T3 (51) e foi localizada na região proximal (*downstream*) do promotor nTRE e é composta por dois domínios, conforme (Figura 15B) (64). O TR se liga ao



c) Promotor do TRH: Hormônios hipotalâmicos tais como o TRH tem efeitos profundos sobre a secreção do TSH e também tem um profundo efeito modulador sobre a síntese de TSH. É considerado o principal regulador positivo da secreção basal de TSH (7, 8). Tem um papel importante na regulação da homeostase energética, comportamento alimentar, termogênese e regulação autonômica (72).

Foram identificados vários sítios envolvidos na regulação do promotor de *TRH* em humanos, sítios 1 a 6 entre -250pb e +55pb. Estes são compostos por sequências únicas (*half-sites*), contudo, apenas três sítios, 4, 5 e 6, estão realmente envolvidos na regulação negativa do TRH (9). Os sítios 5 e 6 estão localizados entre as bases +14pb e +19pb e +37pb e +42pb, constituídos pelas sequências GGGTCC e TGACCT (83) (Figura 16).



**Figura 16. Promotor do hTRH com a localização e sequência dos sítios ( 3 a 6).**

O sítio 3 não teve nenhum efeito na regulação negativa do TRH. As setas indicam a orientação dos sítios. O sítio 4 é o de maior importância na regulação negativa, enquanto 5 e 6 exercem menor importância. Hollenberg e cols., 1995 (9).

O Sítio 4 exerce uma maior importância na regulação negativa pelo T3, exibindo com uma forte interação TR-DNA e, por isso, considerado o principal nTRE no promotor do TRH. Sua ligação ocorre em sítios únicos formando monômeros. Está localizado entre as bases (-6pb e -55pb) com sequência TGACCT, e é bem conservado em humanos e camundongos (9, 83, 84).

### 3 JUSTIFICATIVA

Diferentes estudos demonstram a interação do TR com TREs, proteínas correguladoras bem como a flexibilidade e conformação adotada pelos domínios que potencializam sua ação.

A interação do TR com TRE não é estática como tem sido relatado com outros receptores nucleares (60), e existe uma variação no padrão de ligação que pode ser influenciado pela ligação do TR aos elementos responsivos, (60), pelas preferências das sequências dos TRE na interação de isoforma do TR com ligantes (59), pelo distinto padrão de recrutamento de CoAs (85), CoRs (33), pela preferência de dimerização (86), e pela flexibilidade estrutural do receptor (13, 33, 87, 88).

Estudos de inativação de gene indicam que TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 podem cooperar um com o outro para mediar algumas ações de T3 e também mediar funções específicas para cada isoforma e ainda, que as principais ações de T3 são mediadas por vias comuns entre eles (3, 51).

Estudos *in vitro* demonstraram ainda algumas preferências específicas para dada isoforma do TR para TREs, revelando a especificidade das isoformas do TR em elemento responsivos regulados positivamente (59) Neste estudo, Velasco e cols. (2007) observaram algumas comparações entre as isoformas de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 pelas preferências aos diferentes TREs em cultura celular e mostraram diferentes respostas ao T3 em relação aos pTREs, (F2, DR4 e Pal). A atividade transcricional de TR $\beta$ 1 foi significativamente maior em F2. Ambos TRs formaram heterodímeros com RXR, em todos os três TREs, com ligação preferencial ao DR4 (DR-4 > F2 > PAL). O TR $\beta$  ativa a transcrição de forma mais eficiente do que TR $\alpha$  em F2 e isto correlata com a melhor formação de homodímero em F2 *in vitro* (59). O estudo mostra ainda que o receptor completo só consegue formar dímero com RXR ligado ao elemento responsivo. (59). Isto indica que, no receptor completo, ocorre interferência por algum outro domínio funcional impedindo a formação de homodímero observada com o LBD isolado. Isto sugere que domínios do receptor estejam interferindo na função de outro domínio funcional do receptor.

A superfície de dimerização do TR e as preferências de dimerização nos diferentes elementos responsivos ao hormônio tireoideano (TREs) foram caracterizadas por vários estudos.

Um estudo mutacional e funcional em TR $\beta$ , realizado por Ribeiro e cols. (2001), sugeriram que muitos dos resíduos de aminoácidos que participam da superfície de homodimerização se sobrepõem àquela de heterodimerização, e alguns resíduos difeririam nessa interação em DR4 e F2 (86).

Nascimento e cols. (2006) em estudos de dimerização e rearranjos estruturais propuseram que o domínio D (*Hinge*) do TR tem o potencial para formar extensões funcionalmente importantes entre DBD e LBD ou capacidade de se desdobrar para permitir que o TR se adapte a diferentes elementos responsivos ao DNA (89). Mostrou ainda, em experimentos de transfecção em células de mamíferos, que mutações no motivo LXXLL no domínio D, inibiram seletivamente as interações do TR com palíndromo invertido (F2) bem como a atividade *in vitro* do TR neste elemento de responsivo (89) revelando seu importante papel na função do receptor.

Evidências de que o bolso de ligação do NR é capaz de se reorganizar para acomodar ou adaptar diferentes agonistas tem sido alvo de vários estudos.

Chiellini e cols. (1998) e Wagner e cols. (2001) relataram que as abordagens baseadas na estrutura para desenvolver ligantes com melhoramentos adicionais na especificidade da isoforma são limitados pelo fato de que os LBDs de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 são cerca de 75% idênticos na sequência de aminoácidos, e que as cavidades hidrofóbicas internas que alojam o hormônio diferem apenas em um aminoácido (Ser-277 em TR $\alpha$  Versus Asn-331 em TR $\beta$ ) (90). Segundo Wagner e cols (2001) essa única diferença de aminoácidos no bolso de ligação ao hormônio dos subtipos de TR poderia explicar a seletividade de TR $\beta$ 1 para o análogo de T3, o composto GC-1 (90, 91).

Borngraeber e cols. (2003) observaram que a seletividade do composto agonista GC-24, (análogo de T3) para a isoforma TR $\beta$  ocorria por meio de reconhecimento da estrutura hidrofóbica no bolso de ligação.

Bleicher e cols. (2008) observaram em estudo baseado nas estruturas cristalográficas das isoformas humanas do receptor TR $\alpha$  e TR $\beta$ , que, o composto GC-1, (análogo de T3), tem propriedade de ligar preferencialmente ao TR $\beta$ , e mostrou que a seletividade para tal composto se deve a mudanças consideráveis no modo de ligação ao TR $\alpha$  e TR $\beta$ , dependente das diferenças de alguns aminoácidos entre eles (92).

Segundo Figueira e cols. (2011), as diferenças fundamentais no bolso de ligação do ligante do TR $\alpha$  ou TR $\beta$ , também revelaram a concepção de ligantes que interagem de maneira específica para uma isoforma do receptor (88).

Por outro lado, Chan e cols. (2009) observaram em estudos com as células Hep G2 e análise de *microarray* que as isoformas TR $\alpha$  1 e TR $\beta$ 1 regulam um grande repertório sobreposição de genes-alvo em resposta ao hormônio (85).

Buscando entender melhor a função de cada domínio do TR, alguns estudos utilizando quimeras dos receptores do TR foram realizados, no entanto, os domínios eram delimitados.

O primeiro estudo realizado com quimeras dos domínios do TR por Hollenberg e cols., em 1995, avaliaram apenas o domínio NTD, apesar de ter sido analisado nos três elementos responsivos positivo do TR (93). O estudo mostrou a importância do domínio NTD para as diferenças entre a atividade transcricional das isoformas TR $\alpha$  e TR $\beta$ , relatando ainda que o domínio NTD do TR $\alpha$  inibe a formação de homodímero em DR4 e PAL (93)

No entanto, Zhu e cols. (1997) em estudo utilizando quimeras dos receptores TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 avaliaram algumas quimeras somente no elemento responsivo F2 considerando a formação de homodímero e heterodímero. E observaram que as atividades de transativação das isoformas TR são mediadas pela interação de seus domínios e podem servir como um importante mecanismo regulador para alcançar a diversidade e especificidade do efeito T3 (94).

Todavia, Guissouma e cols. (2002) observaram o efeito de quimeras no hipotálamo de camundongos, que TR $\alpha$ 1 e quimeras com NTD- $\alpha$  reduziram a ativação transcricional independente de T3 e bloquearam a repressão transcricional dependente de T3 (84). Observaram ainda que o domínio NTD da isoforma TR $\beta$ 1 é suficiente para conferir repressão transcricional dependente do ligante, em TRH, e sugeriram que o feedback do TRH sobre o hipotálamo é dependente do NTD (84).

Por meio de técnicas de GST *pull down*, imunoprecipitação de proteínas e ensaios de transfecção e gene repórter, Hahm e cols (2013) utilizaram-se de quimeras de TR para estudar a larga superfície de contato do NTD da isoforma TR $\beta$ 2. Os autores identificaram uma série de proteínas que interagem seletivamente com o TR $\beta$ 2, mostrando a grande capacidade desse domínio NTD em recrutar proteínas correguladoras (95).

Estudos remotos já sugeriam que TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 poderiam interagir um com o outro para mediar algumas ações de T3 e também mediar funções específicas para cada isoforma e também mediadas por vias comuns entre eles (3, 44, 51).

Hahm e cols. (2014) relatam que as propriedades biológicas e transcricionais de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, embora sobrepostas, podem diferir no recrutamento de um número distinto de proteínas parceiras (96). Curiosamente este estudo revela que a TR $\alpha$ 1 recruta mais proteínas que TR $\beta$ 1. Inicialmente, esperava-se que as proteínas interagissem com NTD, por ser o domínio na qual diferem, ou que fosse uma interação secundária independente de T3 no LBD, mas, surpreendentemente, algumas proteínas mostraram mais interação com BDB, *Hinge* e LBD em TR $\alpha$ 1, mas não em TR $\beta$  (96). Isso sugere que essas proteínas podem ser responsáveis pelas funções biológicas divergentes, entre as TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1.

Comparação entre o hTR $\alpha$ 1 e hTR $\beta$ 1 aqui realizada, indicam que, com exceção do domínio N-terminal (NTD), estes receptores possuem grande homologia de sequência, especificamente 85% no domínio de ligação ao DNA (DBD), 64% na *Hinge* e 84% no domínio de ligação ao ligante (LBD). Dos 370 aa, apenas 61 aa são responsáveis pela diferença entre as isoformas, sendo 17 aa no DBD, 04 aa na *Hinge* e 40 aa no LBD.

Apesar da alta homologia, as isoformas exibem padrões diferenciados de expressão, além de desenvolver distintos papéis funcionais durante o desenvolvimento, que implicam em suas propriedades e funções reguladoras. As diferenças permitem a manutenção da atividade normal dos tecidos alvos, como já descritas anteriormente. É, então, de fundamental importância entender melhor o mecanismo de ação e funções isoformas específica dos receptores do hormônio tireoideano.

Baxter e cols. (2001) relataram que inúmeros estudos tem sido uma importante ferramenta para o entendimento de como o receptor interage com TREs, e como o ligante influencia na conformação TR/LBD para desenvolver melhores produtos farmacêuticos que modulam a atividade do receptor (92, 97).

Pelo exposto, reforçando a ideia, da importância de se entender como cada domínio do TR pode interferir na atividade transcricional em um mesmo promotor de gene-alvo do TR, utilizando-nos de construções de quimeras dos domínios funcionais de TR $\alpha$  e TR $\beta$ , propomos estudar o efeito das quimeras na função transcricional do receptor. Nessas quimeras, domínios específicos de uma isoforma

(NTD, DBD e LBD) são trocados pelo domínio correspondente de outra isoforma. Estudaremos a interferência de cada domínio na função do receptor em um dado TRE em promotor de gene-alvo, regulado positivamente e negativamente pelo T3. Trata-se, o presente estudo, do primeiro a utilizar-se de construções que alternam todos os domínios de TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 que foi realizado de forma tão detalhada.

O presente estudo contribuirá para a elucidação das diferenças funcionais e até mesmo estruturais entre o TR $\alpha$  e TR $\beta$ . Com os resultados aqui obtidos esperamos entender melhor seus efeitos na regulação transcricional e, portanto, nas funções fisiológicas.

O uso das construções quiméricas de TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 pode ser considerado uma ferramenta importante para auxiliar na compreensão da ação do TR em promotores naturais e, ainda, no desenvolvimento de tiromiméticos seletivos para o desenvolvimento de drogas seletivas.

## 4 OBJETIVO

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Entender as diferenças entre TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2, por meio de estudos de correlação entre os diferentes domínios e função.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a atividade transcricional das quimeras de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 em TRE F2, regulado positivamente pelo T3, em ensaios de transfecção e gene repórter em células HeLa.

- Comparar a atividade transcricional das quimeras de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 em promotor de *TSHA*, gene regulado negativamente pelo T3, em ensaios de transfecção e gene repórter em células HeLa.

- Correlacionar os resultados obtidos com funções dos diferentes domínios de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 PLASMÍDEOS

Para investigar a relação entre estrutura e função dos diferentes domínios das isoformas TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2, foram utilizados plasmídeos que expressavam TRs quiméricos, contendo sequências alternadas dos três domínios de cada isoformas, TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2: domínio N-terminal (NTD), domínio de ligação ao DNA que compreende a *Hinge* (DBD) e domínio de ligação ao ligante (LBD). Foram ainda utilizados vetores com sequências quiméricas e sequências selvagens com deleções das sequências correspondentes ao NTD.

As construções das quimeras foram cedidas gentilmente pela Profa. Dra. Marie Togashi, do Laboratório de Farmacologia Molecular, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

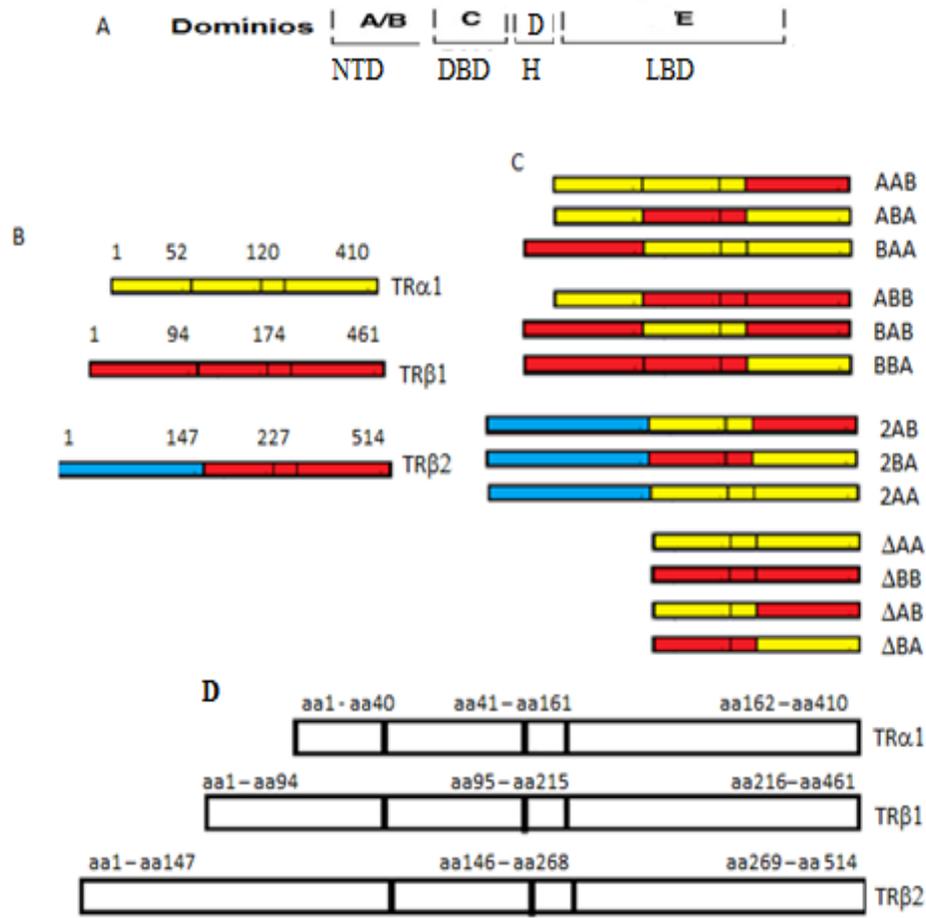
Todos os vetores de expressão dos TRs selvagens e quiméricos foram construídos utilizando-se os plasmídeos por meio da técnica de *Splicing by overlap PCR* (SOE\_PCR) (101,102).

Foram utilizadas 11 quimeras: (1) de TR $\alpha$ 1 em TR $\beta$ 1, quimeras AAB, ABA, BAA e BBA, BAB, ABB, (2) substituição pelo NTD de TR $\beta$ 2, quimeras 2AB, 2BA e 2AA e (3) deleção do NTD e quimeras  $\Delta$ AB e  $\Delta$ BA, além da deleção do NTD das isoformas TR $\alpha$ 1  $\Delta$ AA e TR $\beta$ 1  $\Delta$ BB. Nessas quimeras, o DBD abrange a região da *Hinge* (domínio D), que compreende os aminoácidos da posição 150 a 161 em TR $\alpha$ 1 e aminoácidos da posição 204 a 215 em TR $\beta$ 1.

Para a isoforma TR $\alpha$ 1, os domínios compreendem os seguintes aminoácidos (aa): NTD, aa1 a aa40, DBD, compreende os aminoácidos do DBD e *Hinge*, aa41 a aa161, e o LBD, aa162 a aa410. Na isoforma TR $\beta$ 1: NTD, aa1 a aa94, DBD, compreende os aminoácidos do DBD e *Hinge*, aa95 a aa215, e LBD, aa216 a aa461. Na isoforma TR $\beta$ 2, o que o difere de TR $\beta$ 1 é apenas o NTD que corresponde aos aa1 a aa147.

A estrutura das quimeras é representada por 3 letras, sendo a primeira o NTD, a segunda o DBD e a terceira, o LBD. A letra A se refere à isoforma  $\alpha$ , a letra

B refere-se à isoforma  $\beta$ , e em 2 temos o NTD do TR  $\beta$ 2, enquanto, o  $\Delta$  refere-se à deleção da região N-terminal (Figura 18).



**Figura 17. Esquema das construções dos TRs nativos e quiméricos.**

A, representação dos domínios. B, TR $\alpha$ 1wt em amarelo, TR $\beta$ 1wt em vermelho, TR $\beta$ 2 em vermelho C, nomenclatura das construções quiméricas: os domínios em amarelo representam os domínios do TR $\alpha$ 1wt, em vermelho, os domínios do TR $\beta$ 1wt e em azul, o NTD do TR $\beta$ 2. A primeira letra representa o domínio NTD, a segunda letra representa o DBD e a terceira letra representa o LBD. Em A temos o domínio referente a TR $\alpha$ 1, em B, domínio referente a TR $\beta$ 1, 2 como domínio do TR $\beta$ 2 e  $\Delta$  como deleção do domínio. D, posição dos aminoácidos (aa) de cada domínio.

Por meio da ferramenta de Multiple Sequence Alignment > T-Coffee, que permite avaliação e manipulação de múltiplos alinhamentos de sequências de DNA e RNA e estruturas de proteínas. As sequências dos receptores TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 foram alinhadas. Dos 370 aa, que correspondem às sequências dos domínios DBD, *Hinge* e LBD, apenas 61 aa diferem entre TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, sendo 17aa no DBD, 04 aa na *Hinge* e 40 aa no LBD e correspondem a 85% no DBD, 63% na *Hinge* e 84% no LBD. As isoformas TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 se diferem apenas no domínio NTD (Figura 18).

```

TRA1      MEQK-----PSKVECGSDPEENSARSPD
TRB1      MTP-----NSMTENGLTAWDKPKHCPD
TRB2      MNYCMQEIYEVHPAAGSNQCYMQSTDYYAYFEDSPGYSGCDAQAVPSNNIY
          *                               * * . . .

TRA1      GKRK-----
TRB1      REHDWKLVGMSEACLHR---KSHSERRSTLKNEQSSPHLIQTTWTSSIF
TRB2      MEQAWA-VNQPYTCSYPGNMFKSKSDLDLDMALNQYSQPEYFTE-----
          ::

TRA1      -----RKNQC--SLKTSMSGYIPSYLDKDEQCVCVCGDKATGYH
TRB1      HLDHDDVNDQSVSSAQTFQTEKKCKGYIPSYLDKDELQVCGDKATGYH
TRB2      -----EKPTFSQVQS--PSYSQKGYIPSYLDKDELQVCGDKATGYH
          .. * . . . *****

TRA1      YRCITCEGCKGFFRRTIQKNLHPTYSCKYDSCCVIDKITRNQCQLCRFKK
TRB1      YRCITCEGCKGFFRRTIQKNLHPSYSCKYEGKCVIDKIVTRNQCQECRFKK
TRB2      YRCITCEGCKGFFRRTIQKNLHPSYSCKYEGKCVIDKIVTRNQCQECRFKK
          *****;*****;. *****;***** *****

TRA1      CIAVGMAMDLVLDDSKRVAKRKLIEQNRERRRKEEMIRSLQQRPEPTPEE
TRB1      CIYVGMATDLVLDDSKRLAKRKLIEENREKRRREELQKSIGHKPEPTDEE
TRB2      CIYVGMATDLVLDDSKRLAKRKLIEENREKRRREELQKSIGHKPEPTDEE
          ** **** *****;*****;*****;*****;*****;*****
          *****

TRA1      WDLIHIAEAHRSTNAQGSQSHWKQRRKFLPDDIGQSPIVSMPDGDKVDLEA
TRB1      WELIKTVTEAHVATNAQGSQSHWKQRRKFLPEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEA
TRB2      WELIKTVTEAHVATNAQGSQSHWKQRRKFLPEDIGQAPIVNAPEGGKVDLEA
          *;*: . *****;*****;*****;*****;*****. *;*.*****

TRA1      FSEFTKIITPAITRVVDFAKKLFMFSELPCEDQIILLKGCCMEIMSLRAA
TRB1      FSHFTKIITPAITRVVDFAKKLFMFCELPCEDQIILLKGCCMEIMSLRAA
TRB2      FSHFTKIITPAITRVVDFAKKLFMFCELPCEDQIILLKGCCMEIMSLRAA
          ** .*****.*****.*****.*****.*****

TRA1      VRYDPESDTLTLNGEMAVKREQLKNGGLGVVSDAIFELGKSLSAFNLDLDT
TRB1      VRYDPESETLTLNGEMAVTRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSLSSFNLDDT
TRB2      VRYDPESETLTLNGEMAVTRGQLKNGGLGVVSDAIFDLGMSLSSFNLDDT
          *****;*****.*****. * *****;** ***;*****

TRA1      EVALLQAVLLMSTDRSGLLCVDKIEKSQEAYLLAFEHYVNRKHNIPHEW
TRB1      EVALLQAVLLMSSDRPGLACVERIEKYQDSFLLAFEHYINRKHVTHEFW
TRB2      EVALLQAVLLMSSDRPGLACVERIEKYQDSFLLAFEHYINRKHVTHEFW
          *****;**.* * *;:*** *::*****;*:***::**

TRA1      PKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTLFPPLFLEVFEQEV
TRB1      PKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTLFPPLFLEVFE---D
TRB2      PKLLMKVTDLRMIGACHASRFLHMKVECPTLFPPLFLEVFE---D
          *****

```

Figura 18. Alinhamento das sequências de TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2.

Dos 370 aminoácidos (aa) referentes às sequências alinhadas que compõem o DBD, Hinge e LBD, entre as três isoformas, 61 aa os tornam diferentes entre si e são representados por pontos ou espaços, os asteriscos representam a similaridade entre os aminoácidos. Destes, 17 aa se encontram no DBD e correspondem a 85%, 04 aa estão na *Hinge* e correspondem a 63% e 40 aa no LBD que corresponde a 84% de similaridade.

## 5.2 AMPLIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS

A amplificação e purificação dos vetores de expressão contendo os TRs nativos e o vetor vazio (pCMV-Tag2B vazio, pCMV-Tag2B hTR $\alpha$ 1, pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 1 e pCMV-Tag2B TR $\beta$ 2) e os vetores contendo as sequências quiméricas descritos anteriormente, bem como os plasmídeos repórteres, contendo TREs, pUC-F2-LUC e pUC-*TSHA*-LUC foram realizadas da seguinte forma: os plasmídeos foram transformados em bactérias *E. coli* cepa *DH5 $\alpha$*  quimicamente competentes. Uma colônia da bactéria transformada foi inoculada em meio Luria Bertani (LB) (Gibco) contendo Kanamicina (Sigma®) (60 $\mu$ g/ $\mu$ L) e cultivada a 37°C por 16h (*overnight*). A seguir, as células foram coletadas por centrifugação, 4000 rpm por 15 min, e purificadas por Kit de extração e purificação de DNA *QIAprep DNA Purification kit* (Qiagen ®), segundo instruções do fabricante. As concentrações dos plasmídeos purificados bem como a sua pureza foi mensurada usando o NanoDrop2000 *spectrophometer* (*Thermoscientific*). Os plasmídeos ainda foram checados por meio de eletroforese em gel de agarose. Foram então utilizados posteriormente nos ensaios de transfecção.

## 5.3 CULTURA DE CÉLULAS

As células HeLa (carcinoma de cérvix humano) (98) foram cultivadas em placas para cultura de tecidos de 25cm<sup>2</sup> (Corning®) em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), (Gibco®) com 2mM de glutamina, 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich ®), 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®), 100U/mL de penicilina (Sigma-Aldrich®), e 100 $\mu$ g/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®), em ambiente úmido com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após a confluência das células, as mesmas foram tripsinizadas com 2mL de solução de tripsina a 0,25% (Sigma-Aldrich®), em solução salina (PBS, tampão fosfato salino) e divididas para outras placas de cultura.

#### 5.4 ENSAIOS DE GENE REPÓRTER POR MEIO DE TRANSFEÇÃO TRANSIENTE

O ensaio de gene repórter é uma técnica de biologia molecular que permite o estudo da atividade transcricional de um promotor ou a expressão de um gene de interesse, em uma célula ou organismo por meio da avaliação da atividade de um gene repórter que codifica uma proteína quantificável.

O ensaio consistiu na inserção ou transfeção de plasmídeos de expressão, contendo a sequência que codifica o TR nativo ou receptores quiméricos, e plasmídeo repórter (99, 100), contendo sequência de TREs ou promotores de genes-alvo fundidos ao gene da luciferase (LUC), em células humanas, seguido de tratamento com ligantes.

Após a transfeção, o gene que codifica a proteína de interesse (TR) e o gene repórter (LUC) são transcritos e traduzidos conforme as características do gene, podendo este regulado positivamente ou negativamente pela presença de ligante no caso do TR. O gene repórter da luciferase é dirigido por um promotor contendo o elemento responsivo ao gene de interesse, e a quantificação da atividade da enzima luciferase do gene repórter representa uma medida direta da atividade transcricional do receptor. Quanto maior a quantidade de luciferase transcrita maior, maior a atividade da enzima luciferase, e maior a atividade transcricional do receptor.

No plasmídeo de expressão, a sequência que codifica o TR foi dirigida por um promotor constitutivamente ativo em células de mamíferos. No plasmídeo repórter, o gene da luciferase foi dirigido pela sequência do elemento responsivo F2 que constitui um dos elementos responsivos que regula o TR positivamente, ou pela sequência do *TSHA* que constitui elemento responsivo do TR, quando regulado negativamente.

O método químico de transfeção por lipofectamina, aqui empregado, consiste na mediação da entrada do DNA plasmidial através da membrana celular pela formação de complexos de lipossomos. É um método em que um produto químico (lipossomo) carregado positivamente forma complexos com o DNA que é carregado negativamente. Este complexo lipossomo/DNA carregado positivamente é atraído para a membrana celular que é carregada negativamente. O mecanismo exato de como o complexo formado passa através da membrana celular e do núcleo

não é bem claro, mas acredita-se que a endocitose e a fagocitose estão envolvidos no processo. (101).

As células HeLa foram cultivadas conforme condições já descritas, e plaqueadas no dia anterior à transfecção (45 mil células por poço) em placas de 48 poços, com volume final de 250  $\mu$ L de DMEM, com SFB e sem antibióticos, para atingirem de 70 a 90% de confluência no momento da transfecção. Foram realizados pelo menos três ensaios em triplicata com os plasmídeos para expressão dos receptores controles, pCMV-Tag2B vazio, pCMV-hTR $\alpha$ 1, pCMV-hTR $\beta$ 1 e pCMV-hTR $\beta$ 2, e todos os plasmídeos correspondentes às quimeras, e os plasmídeos repórteres contendo os elementos responsivos, F2 e *TSHA*, fusionados ao gene repórter LUC.

Foram cotransfectados por poço, 400ng de DNA total, destes 100ng do vetor de expressão e 300ng de plasmídeo repórter contendo os elementos responsivos regulados positivamente, na proporção de 1:3, respectivamente. Para os plasmídeos contendo o elemento responsivo regulado negativamente, o *TSHA*, após testes com diferentes concentrações (dados não mostrados), foi usada a proporção de 1:6, em 350ng de DNA total, 50ng do vetor de expressão e 300ng do vetor repórter, respectivamente. Foram utilizados 0,5 $\mu$ L de Lipofectamina 2000 (Invitrogen  $\text{\textcircled{R}}$ ) por poço, conforme instruções do fabricante. Quatro horas após a transfecção, o meio de cultura foi trocado por outro de igual teor, apenas, para a retirada da lipofectamina em solução que pode ser tóxica para as células, as mesmas foram tratadas com veículo, Dimetilsufóxido (DMSO, Sigma $\text{\textcircled{R}}$ ) e Etanol (J.T.Baker), (DMSO:Etanol, v/v, 1:9), ou ligante,  $10^{-6}$ M de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (Sigma $\text{\textcircled{R}}$ ). Após 24 horas, o meio de cultura foi descartado e as células foram lisadas em 50 $\mu$ L de tampão de lise (100mM Tris HCl pH7,6, 0,02% Triton 100X), o experimento foi realizado em triplicata.

A atividade da luciferase foi determinada em 20 $\mu$ L do lisado celular pela adição de 20 $\mu$ L da solução contendo luciferina, o substrato da luciferase, utilizando o Kit de ensaio para luciferase, *Luciferase Assay System* (Promega $\text{\textcircled{R}}$ ), de acordo com as instruções do fabricante.

A luciferase catalisa a conversão da luciferina em oxiluciferina, e essa reação resulta em emissão de luz, quantificada em um luminômetro Wallac Micro Beta JET (*Perkin Elmer*), que fornece resultados em unidades relativas de luz (URL) em contagem por segundo (cps), (URL/s) A atividade de luciferase resultante foi

quantificada para condições de ausência (veículo) e presença de T3 ( $10^{-6}$ M), em elementos responsivos regulados positivamente (F2) e regulado negativamente (TSHA).

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Molecular (Farmol), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília..

## 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo teste One-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni, utilizando o Programa GraphPad PRISM 4.0 (GraphPad Software). Resultados para (\*)  $p < 0,05$ , (\*\*)  $p < 0,01$ , e (\*\*\*)  $p < 0,001$  foram considerados estatisticamente significativos.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor compreensão, os dados obtidos foram agrupados e analisados na ausência e presença de T3:

- Grupo 1: Controle - CMV Tag2B, TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2;
- Grupo 2: Quimeras - inserção do NTD da isoforma TR $\beta$ 2, quimeras 2AB, 2BA e 2AA;
- Grupo 3: - deleção do NTD – deleção do NTD das isoformas TR $\alpha$  e TR $\beta$ 1,  $\Delta$ AA,  $\Delta$ BB, e das quimeras  $\Delta$ AB e  $\Delta$ BA;
- Grupo 4: Quimeras - troca de domínios entre as isoformas TR $\alpha$  e TR $\beta$ 1, quimeras AAB, ABA, BAA e BBA, BAB, ABB.

A comparação da atividade transcricional dos TRs nativos, aqui chamados “controles”, com a das quimeras, nos pTRE (F2) e nTRE (*TSHA*), tornou possível a observação da influência exercida por cada domínio das isoformas.

Há estudos de inativação de gene do TR $\alpha$ 1 ou TR $\beta$ 1, que fornecem evidências *in vivo* de que ambas isoformas dos TRs, de forma específica para cada subtipo, podem ter sobreposição dos papéis funcionais (3, 49, 51). Tian e cols. (2006) relatam que, as propriedades biológicas e transcricionais de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, embora algumas sejam sobrepostas, podem diferir no recrutamento de cofatores e ser responsáveis por suas funções biológicas divergentes, o que explicaria suas propriedades reguladoras em genes-alvo distintos (96). Tais diferenças de recrutamento podem ser atribuídas aos domínios e a sua interação.

Tal fato corrobora com a ideia de que uma análise minuciosa das isoformas e quimeras pode trazer informações nas quais as funções dos domínios podem se sobrepor ou divergir sob os ângulos analisados.

### 6.1 AÇÃO DO TR EM F2

Na Figura 19, a análise da atividade transcricional dos respectivos controles, CMV Tag2B, TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2, em relação ao veículo, em F2, revelou que a

atividade transcricional de TR $\beta$ 2 (1363 URL/s) é a mais alta entre as três isoformas, seguida da atividade de TR $\beta$ 1 (396 URL/s) e de TR $\alpha$ 1 (122 URL/s), quando na presença de T3. Não foi observada atividade transcricional de TR endógeno na presença de T3 (Figura 19, CMV-Tag2B, vetor vazio). Os resultados encontrados em TR $\alpha$  e TR $\beta$ 1 estão em acordo com os de outros estudos realizados por Velasco e cols. (2007) e Zhu e cols. (1997) (59, 94). Na ausência de T3, a atividade transcricional basal foi semelhante nas três isoformas.

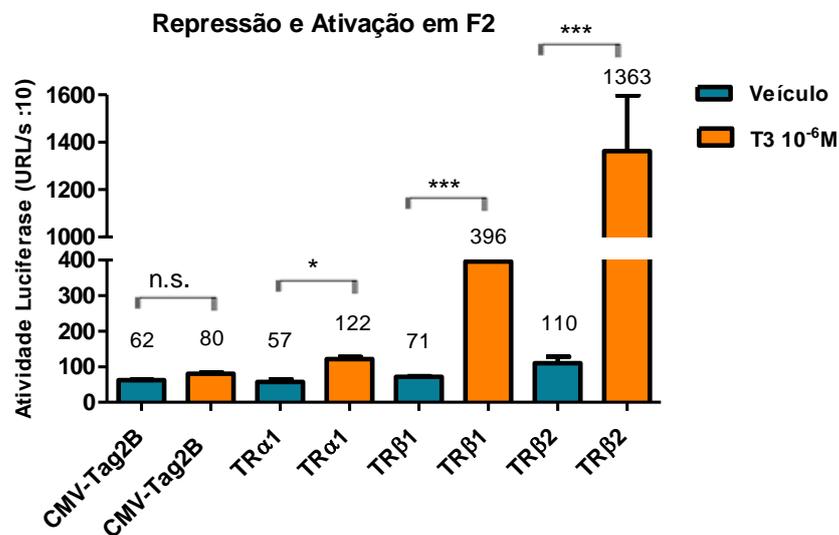


Figura 19. **Atividade transcricional dos controles na presença e na ausência de T3 em F2.**

Células HeLa foram cotransfectadas com 100ng de vetores de expressão pCMV-Tag2B, pCMV-Tag2B hTR $\alpha$ 1, pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 1 e pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 2, e 300ng de plasmídeo contendo gene repórter pUC-F2-LUC e, a seguir, tratadas com ligante (10<sup>-6</sup>M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Números acima das colunas são os resultados expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferase (URL/s) de 1 (um) experimento representativo em triplicata. Resultados significativos para \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao veículo por análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni.

Para avaliar a atividade transcricional do TR e quimeras no estudo, foi usado como referencial de comparação a isoforma TR $\beta$ 1, a qual teve sua atividade transcricional representada em 100%, na presença de T3.

Em F2, na presença de T3, o TR $\alpha$ 1 apresentou cerca de 40% da ativação de TR $\beta$ 1. Contudo, a isoforma TR $\beta$ 2 apresentou atividade transcricional cerca de três (3) vezes maior que TR $\beta$ 1 (Figura 20A).

Tian e cols. (2006) observaram que, na presença de T3, embora os LBDs dos TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 recrutassem uma ampla variedade de coativadores, o domínio NTD do TR $\beta$ 2 fazia contatos adicionais, independente do hormônio, com certos coativadores,

como CBP e p160. Estes trabalhariam em conjunto com os contatos dependentes de hormônio mediadas pelo domínio LBD, o que conferiria uma resposta transcricional mais forte ao TR $\beta$ 2 do que ao TR $\beta$ 1 (102).

Na ausência de T3, TR $\alpha$ 1 apresentou repressão semelhante ao TR $\beta$ 1, enquanto TR $\beta$ 2 não apresentou repressão comparável a de TR $\beta$ 1 (Figura 20B). Há relatos de um estudo realizado por Yang e cols. (1999), no qual, em outro elemento responsivo, o DR4, a isoforma TR $\beta$ 2 exibe única propriedade reguladora da transcrição, em contraste com outras isoformas do TR, não conseguindo reprimir na ausência de T3 (103).

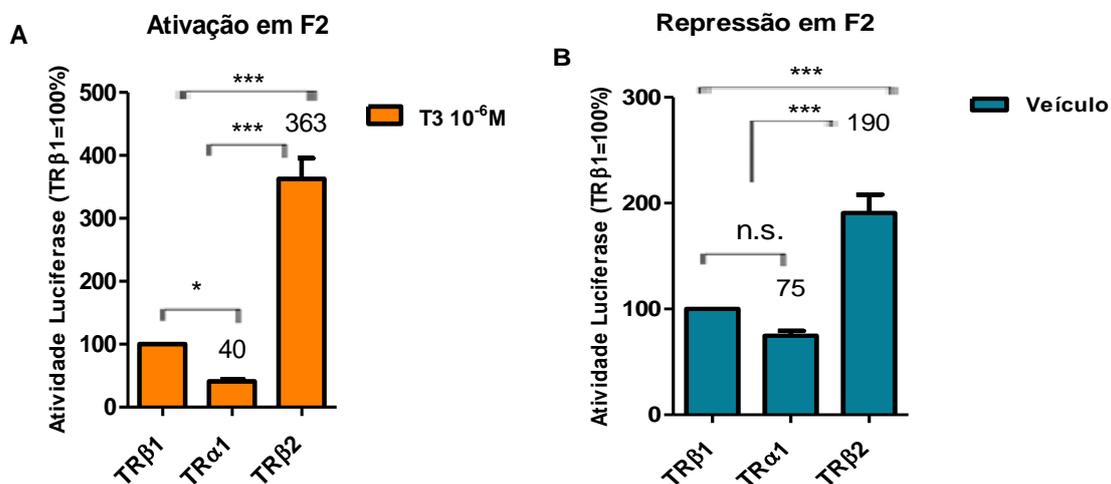


Figura 20. **Atividade transcricional do TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 em F2.**

(A), ativação na presença de T3. (B), repressão na ausência de T3. Atividade transcricional normalizada para TR $\beta$ 1=100%. Células HeLa foram cotransfectadas com 100ng de vetores de expressão pCMV-Tag2B, pCMV-Tag2B hTR $\alpha$ 1, pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 1 e pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 2, e 300ng de plasmídeo contendo gene repórter pUC-F2-LUC e, a seguir, tratadas com ligante ( $10^{-6}$ M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Números acima das colunas são os resultados expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferase de 3 experimentos independentes em triplicata. \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação a TR $\beta$ 1. Análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni.

## 6.2 ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO TR EM F2

Uma análise geral dos resultados da atividade transcricional nos mostra que as quimeras de TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 influenciaram tanto a repressão como a ativação transcricional, na ausência e presença de T3, respectivamente. É nítido que as maiores ativações, na presença do hormônio, ocorreram nas quimeras com o

NTD do TR $\beta$ 2, principalmente na quimera 2AB associada ao LBD- $\beta$ . Tal ativação, maior que a atividade observada em TR $\beta$ 1, pode também ser atribuída à interação entre DBD- $\alpha$  e LBD- $\beta$  (Figura 21). Por outro lado, as quimeras nas quais foram alternados os domínios NTDs de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 ou cujos NTDs foram deletados, apresentaram ativações bem mais modestas.

As isoformas TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 possuem homologia maior que 80% nos domínios DBD e LBD, mas possuem alta divergência no domínio NTD, como resultado do *splicing* alternativo (3, 12, 17, 34). Tian e cols. (2006) mostraram que a larga superfície de contato do NTD de TR $\beta$ 2 possui grande capacidade em recrutar proteínas coativadoras.

Hahm, JB e Privalsky, ML. (2013) observaram que as distintas propriedades reguladoras da transcrição entre as isoformas devem refletir a capacidade destes divergentes domínios NTD para elaborar ou modificar as funções mediadas por essas regiões que são compartilhados em comum (95). Estas parecem ser em grande parte conseguidas devido à capacidade do domínio NTD do TR $\beta$ 2 de fazer contatos com corre reguladores que não são feitos pelo domínio NTD do TR $\beta$ 1. Em outro estudo, Hahm e cols. (2014) revelam a importância da interação entre *Hinge* e DBD de TR $\alpha$ 1 no recrutamento de proteínas (96).

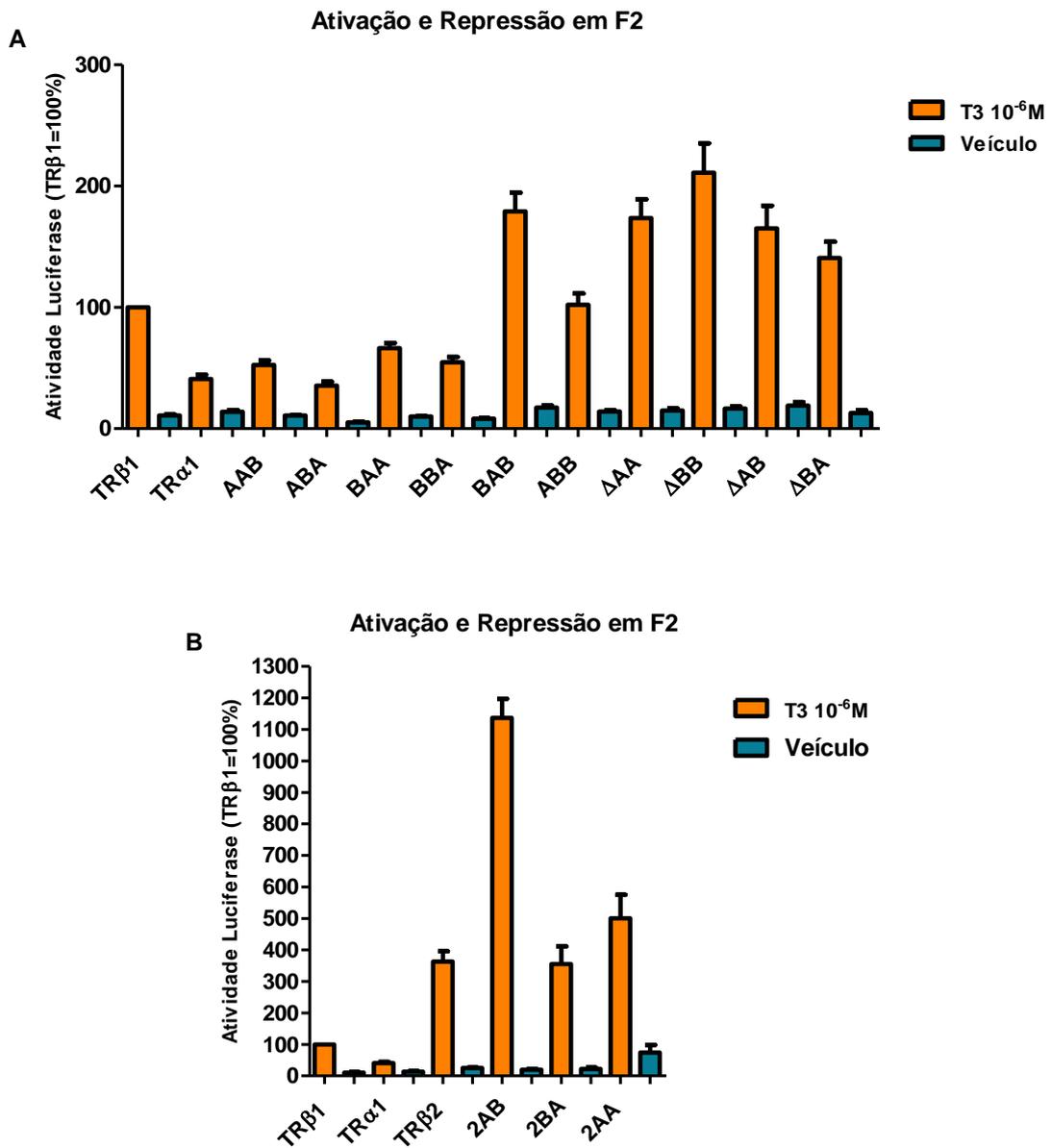


Figura 21 **Panorama geral da atividade transcricional do TR na ausência e presença de T3 em F2.**

(A), quimeras com troca de domínios entre TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1. (B), continuação; quimeras com TR $\beta$ 2. Atividade transcricional normalizada para TR $\beta$ 1=100%. Células HeLa foram cotransfectadas com 100ng de vetores de expressão, pCMV-Tag2B, pCMV-Tag2B hTR $\alpha$ 1, pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 1 e pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 2, e 300ng de vetor repórter pUC-F2-LUC, tratadas com ligante (10<sup>-6</sup>M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferase de 3 experimentos independentes em triplicata. Análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni. Figura representativa.

### 6.2.1 Influência do NTD do TR $\beta$ 2 na Ativação Transcricional

Foram analisados aqui os resultados obtidos para o Grupo Quimeras, composto pelas construções contendo o NTD de TR $\beta$ 2, as quimeras 2AB, 2BA e 2AA.

Esperava-se que, devido as interações já descritas no NTD do TR $\beta$ 2, as maiores ativações fossem observadas na presença de T3 nas quimeras que possuíam o NTD do TR $\beta$ 2, o que pode ser observado na Figura. 22.

Observou-se que, principalmente na quimera 2AB, ocorreu uma maior ativação com um valor 10 vezes maior que aquele observado em TR $\beta$ 1. Interessante notar que esta quimera apresentou valores de ativação aproximadamente 3 vezes maiores que a ativação transcricional de TR $\beta$ 2wt (Figura 22 - quarta coluna).

Tal efeito pode sugerir um sinergismo entre DBD- $\alpha$  e LBD- $\beta$ , que pode ser atribuído em especial ao DBD/Hinge de TR $\alpha$ 1, descrito por Hahm e cols. (2014), como uma região de recrutamento de cofatores transcricionais que favoreceria a ativação na presença do hormônio. Segundo Hahm e cols. (2014) existem diferenças específicas na sequência de aminoácidos nos domínios D das isoformas TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, que recrutavam seletivamente cofatores de transcrição específicos para a isoforma TR $\alpha$ . Isso ocorreu devido a ligação preferencial desses cofatores aos aminoácidos específicos presentes na isoforma TR $\alpha$ 1. Isso também poderia explicar essa ativação transcricional aumentada observada, no presente estudo, entre DBD- $\alpha$  e LBD- $\beta$  (96).

As quimeras 2BA e 2AA também apresentaram altos valores de ativação, de aproximadamente 3 vezes e 4,5 vezes, respectivamente, quando comparado aos valores obtidos para TR $\beta$ 1wt. Tais valores não diferiram significativamente daqueles obtidos para TR $\beta$ 2wt (Figura 22 - duas últimas colunas). Os resultados obtidos aqui sugerem que somente a presença do NTD de TR $\beta$ 2 nas quimeras é suficiente para que sua ativação seja semelhante a de TR $\beta$ 2 e bem maior que TR $\beta$ 1.

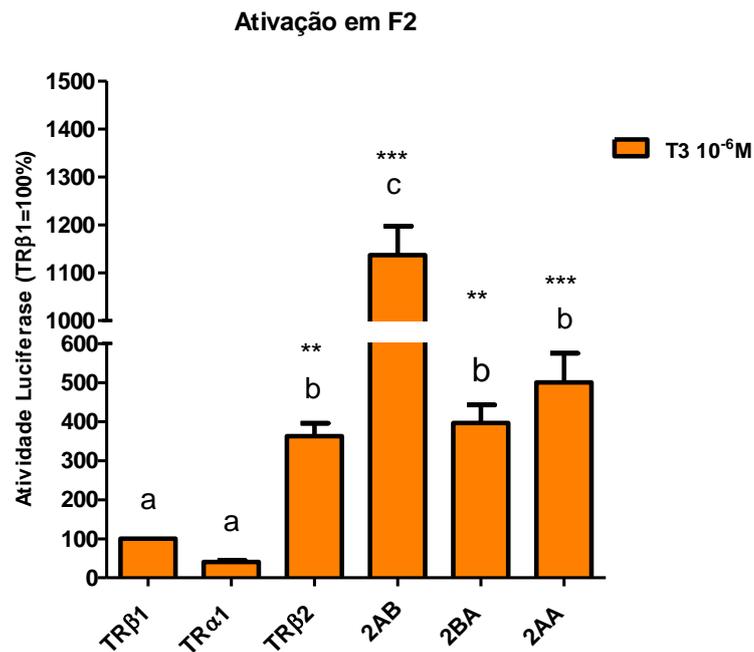


Figura 22. **Efeito do NTD do TRβ2 em F2 na presença de T3.**

Atividade transcricional normalizada para TRβ1=100%. Células HeLa foram cotransfectadas com 100ng de vetores de expressão, pCMV-Tag2B, pCMV-Tag2B hTRα1, pCMV-Tag2B hTRβ1 e pCMV-Tag2B hTRβ2, e 300ng de vetor repórter pUC-F2-LUC, tratadas com ligante ( $10^{-6}$ M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferase de pelo menos 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si, \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação a TRβ1. Análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni.

### 6.2.2 Influência do NTD de TRβ2 na Repressão Transcricional

Continuam sendo analisados aqui os resultados obtidos para o Grupo Quimeras, composto pelas construções contendo o NTD de TRβ2 (NTD-β2), as quimeras 2AB, 2BA e 2AA.

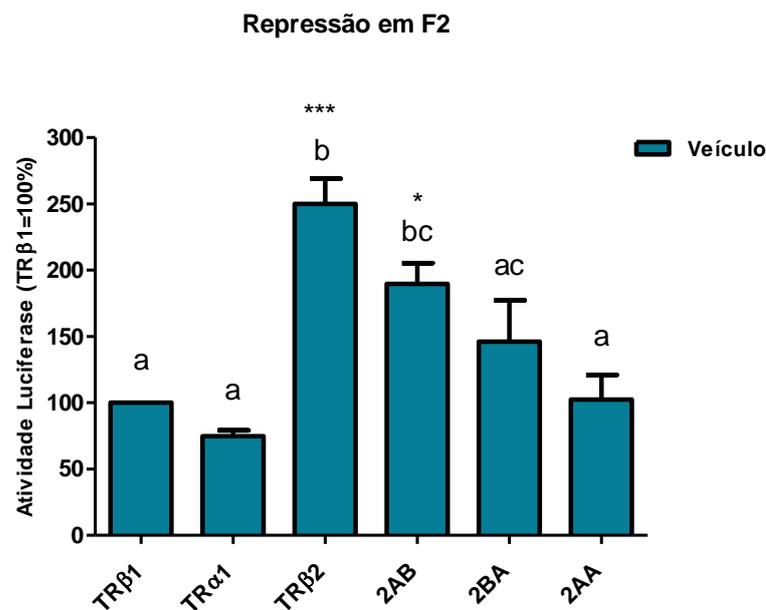
Os resultados mostram que a presença do NTD-β2 em 2AB, na ausência de T3, inibe a repressão quando comparado com TRα1 o TRβ1 (Figura 23 – quarta coluna), mas que reprime de forma semelhante ao TRβ2.

Observa-se na Figura 23 que o NTD-β2 é capaz de inibir a repressão quando interage com DBD-α e LBD-β. Consistente com os relatos de Yang e cols. (1999) de que TRβ2wt não consegue reprimir na ausência de T3 (103).

Contudo, as quimeras 2BA e 2AA apresentaram repressão semelhantes ao TRβ1 (Figura 23- duas últimas colunas). Neste, mostrando a forte influência que

LBD- $\alpha$  exerce sobre a repressão na ausência de T3, mesmo estando presente o NTD- $\beta$ 2.

De acordo com Hahm e cols. (2014), o DBD- $\alpha$  também poderia estar influenciando a repressão, visto terem observado que TR $\alpha$ 1wt recruta mais proteínas que TR $\beta$ 1wt. Segundo os autores, ao analisarem tal fato, inicialmente esperava-se que as proteínas interagissem com o NTD, por ser o domínio que as difere, ou uma secundária interação independente de T3, no LBD. Observaram, no entanto, surpreendentemente, que algumas proteínas mostraram mais interação com os domínios (DBD, *Hinge* e LBD) em TR $\alpha$ 1, e não mostraram interação em TR $\beta$ 1. Relataram ainda que muitas dessas proteínas atuavam com correpressores em ensaio de transfecção (96).



**Figura 23. Efeito do NTD do TR $\beta$ 2 em F2, na repressão na ausência de T3.**

Atividade transcricional normalizada para TR $\beta$ 1=100%. Células HeLa foram cotransfectadas com 100ng de vetores de expressão, pCMV-Tag2B, pCMV-Tag2B hTR $\alpha$ 1, pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 1 e pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 2, e 300ng de vetor repórter pUC-F2-LUC, tratadas com ligante ( $10^{-6}$ M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferase de pelo menos 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si, \*\*p< 0,01 e \*\*\*p< 0,001 em relação a TR $\beta$ 1. Análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni.

### 6.2.3 Importância do NTD de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 na Ativação Transcricional

A principal diferença estrutural entre as isoformas TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 é o NTD, domínio mais variável em tamanho e sequência de aminoácidos entre as isoformas (13, 17, 19), revelando pouca conservação evolutiva entre os diversos RNs (16). Assim como a especificidade do NTD- $\beta$ 2, visto anteriormente, os NTDs de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 também é dotado de certas funções. Por exemplo, são alvos de modificações pós-traducionais como a fosforilação além de interagir com cofatores transcricionais e coativadores que podem regular tanto positivamente quanto negativamente a atividade transcricional (16, 17, 20).

Para investigar e melhor entender a importância e influência do NTD das isoformas do TR na atividade transcricional, comparamos os resultados do efeito da atividade transcricional em sua ausência, ou seja, na deleção do NTD das quimeras.

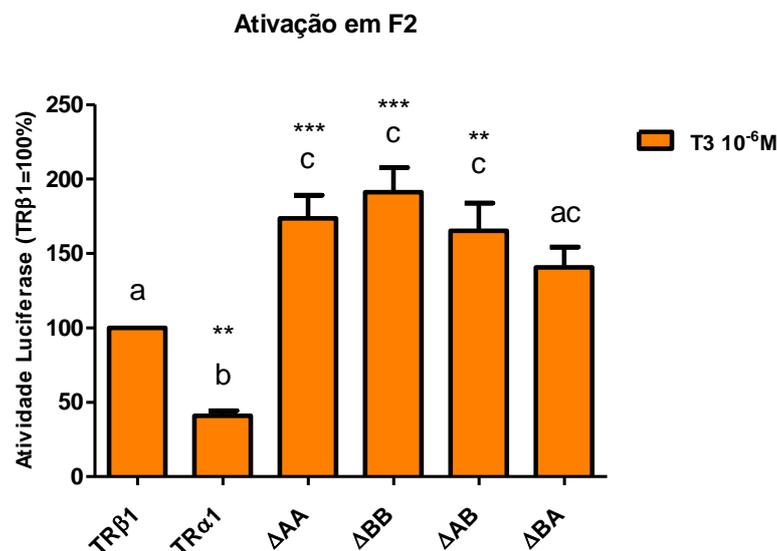
Observamos que a ausência do NTD em  $\Delta$ AA,  $\Delta$ BB,  $\Delta$ AB e  $\Delta$ BA, em F2, a ativação transcricional foi favorecida de maneira dependente do ligante, quando comparada com TR $\beta$ 1 (Figura 24 – terceira a sexta coluna).

Quando o NTD foi deletado em  $\Delta$ AA e  $\Delta$ BB, houve um expressivo aumento da atividade transcricional, resultando em ativação transcricional, aproximadamente, duas vezes maior que a de TR $\beta$ 1, na presença de T3 (Figura 24 - terceira e quarta coluna). Este achado sugere que o NTD de ambas as isoformas, TR $\alpha$ 1wt e TR $\beta$ 1wt, exerce uma ação reguladora negativa da transcrição, interferindo na atividade transcricional na presença do ligante. Sem a ação reguladora do NTD, as quimeras  $\Delta$ AA e  $\Delta$ BB apresentaram atividade transcricional semelhante.

Ressalta-se que  $\Delta$ AA, apresentou atividade transcricional, aproximadamente, 4 vezes maior do que a de TR $\alpha$ 1wt, mostrando o quanto a presença do NTD interfere de maneira mais marcante na atividade transcricional em TR $\alpha$ 1. Isso sugere que a menor atividade transcricional apresentada por TR $\alpha$ 1 pode ser atribuída ao NTD- $\alpha$ .

Esses dados em conjunto suportam a ideia de que a presença do NTD de ambas isoformas TR $\alpha$ 1wt e TR $\beta$ 1wt conduz a um efeito repressor no receptor. Tais resultados contrastam com os resultados encontrados em  $\underline{A}$ AB,  $\underline{A}$ BA,  $\underline{B}$ AA, (Figura 26A), nas quais ocorre inibição da ativação na presença do ligante, quando comparado com a TR $\alpha$ 1wt.

Embora Hollenberg e cols. (1995) tenham relatado que a atividade transcricional de TR $\alpha$ 1wt é melhor que TR $\beta$ 1wt em ensaios de transfecção nos pTRE, DR4 e PAL e que essa diferença era potencializada pelo NTD de TR $\alpha$ 1, outros estudos em F2 mostram que TR $\beta$ 1 tem uma melhor resposta transcricional que TR $\alpha$ 1 (59, 94). Resultados últimos condizentes com os resultados aqui apresentados. Zhu e cols. (1997) realizaram um estudo com quimeras que atribuiu a baixa atividade transcricional do TR $\alpha$ 1 ao LBD- $\alpha$ . O estudo, no entanto, não avaliou o domínio NTD isoladamente (94). Os resultados apresentados mostram que os NTDs, tanto de TR $\alpha$ 1 como de TR $\beta$ 1, exercem um papel regulador interferindo na ativação transcricional na presença do ligante. A diferença da atividade transcricional observada entre ambas as isoformas pode ser atribuída ao NTD.



**Figura 24. Efeito da deleção do NTD de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 em F2 na presença de T3.**

Atividade transcricional normalizada para TR $\beta$ 1=100%. Células HeLa foram cotransfectadas com 100ng de vetores de expressão, pCMV-Tag2B, pCMV-Tag2B hTR $\alpha$ 1, pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 1 e pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 2, e 300ng de vetor repórter pUC-F2-LUC, tratadas com ligante ( $10^{-6}$ M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferase de pelo menos 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si, \*\*p< 0,01 e \*\*\*p< 0,001 em relação a TR $\beta$ 1. Análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni.

Na quimera,  $\Delta$ AB, que não apresenta o NTD, também ocorreu aumento da atividade transcricional quando comparada com TR $\alpha$ 1wt e TR $\beta$ 1wt (Figura 24 - penúltima coluna). Tal resultado é indicativo de que a interação entre DBD- $\alpha$  e LBD- $\beta$ , não foi observada na ausência do NTD, na presença de T3. Podemos observar

ainda a importância do LBD- $\beta$ , o único domínio de beta na quimera em questão, ( $\Delta AB$ ), que foi capaz de favorecer a atividade transcricional quando comparada a TR $\beta$ 1.

Por outro lado, em  $\Delta BA$ , mesmo não mostrando atividade transcricional significativa em relação a TR $\beta$ 1wt, revela a importância do domínio DBD- $\beta$  em manter a atividade transcricional semelhante ao TR $\beta$ 1 na presença de T3. (Figura 24 - última coluna). Considerando que o LBD- $\alpha$  parece interferir na repressão da atividade transcricional, como apresentado em ABA, BAA, BBA na ausência de T3 (Figura 26B), sugere-se que o domínio responsável por exercer a atividade transcricional da quimera ( $\Delta BA$ ) seja o DBD- $\beta$ .

#### **6.2.4 Importância do NTD de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 na Repressão Transcricional**

Na figura 25, observamos que a deleção do NTD, em ambas as quimeras  $\Delta AA$  e  $\Delta BB$ , apresentou repressão semelhante ao TR $\beta$ 1wt (Figura 25 – terceira e quarta coluna).

Quando observamos que o efeito da deleção do NTD de TR $\alpha$ 1 e de TR $\beta$ 1 na presença do ligante interferiu na ativação transcricional, diminuindo-a, esperávamos que na ausência de T3, este, exercesse papel repressor. Contudo, ao contrário do que se esperava, a ausência do NTD, não influenciou a repressão transcricional na ausência de T3 de forma semelhante em ambas as isoformas. Observamos que a deleção do NTD em  $\Delta AA$  impediu a repressão quando comparado a sua própria isoforma TR $\alpha$ 1, indicativo que o domínio NTD exerce repressão nesta isoforma.

No caso de TR $\beta$ 1, estamos incertos de qual seria o domínio que influenciaria a repressão. Contudo, os dados deste estudo e a literatura indicam que em TR $\alpha$ 1, a repressão também seria atribuída ao domínio LBD. Tal constatação será discutida no próximo item na Figura 26B, quando serão discutidos os resultados das quimeras nas quais foram realizadas as trocas de domínios entre as isoformas TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1.

Ao observar a quimera  $\Delta AB$ , notamos que esta apresentou repressão transcricional semelhante a  $\Delta AA$  e  $\Delta BB$  quando comparado ao TR $\alpha$ 1 (Figura 25-penúltima coluna). Tal observação é indicativo que a interação DBD- $\alpha$  e LBD- $\beta$  não ocorreu na ausência do NTD.

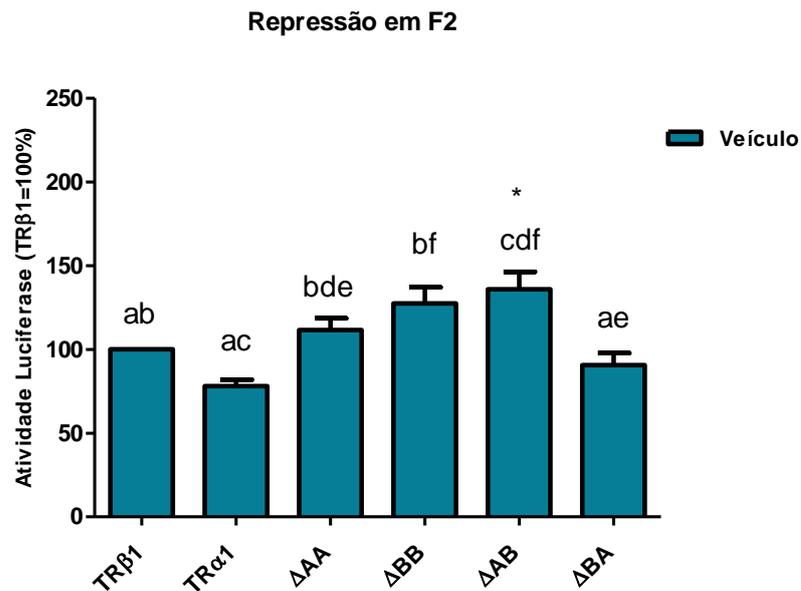


Figura 25. **Efeito da deleção do NTD de TRα1 e TRβ1 em F2, na ausência de T3.**

Atividade transcricional normalizada para TRβ1=100%. Células HeLa foram cotransfectadas com 100ng de vetores de expressão, pCMV-Tag2B, pCMV-Tag2B hTRα1, pCMV-Tag2B hTRβ1 e pCMV-Tag2B hTRβ2, e 300ng de vetor repórter pUC-F2-LUC, tratadas com ligante ( $10^{-6}$ M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferase de pelo menos 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si, \* $p < 0,05$  em relação a TRβ1. Análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni.

### 6.2.5 Efeito das Trocas dos Domínios entre TRα1 e TRβ1 na Ativação e Repressão Transcricional

O DBD é o domínio mais conservado entre os RNs (16, 17), sendo o responsável pela identificação de sequências específicas no DNA de genes alvo, os HREs. É alvo de modificações pós-traducionais e está envolvido na localização do RN no núcleo e na interação com fatores transcricionais e também, no caso do TRβ2, com coativadores (16).

O LBD, por sua vez, reconhece ligantes específicos e determina, assim, a especificidade da resposta aos ligantes. É responsável por diversas funções do receptor que em sua maioria são induzidas por ligantes, dimerização e interação com cofatores da transcrição (13). Entre o DBD e o LBD encontra-se a *Hinge* (dobradiça) que possivelmente permite que o DBD e o LBD adotem diferentes conformações, conferindo maior flexibilidade estrutural ao RN (17). Além disso, essa região permitiria que a dimerização com outro RN e a ligação ao DNA ocorressem

simultaneamente (13, 16, 17). Em nossas quimeras, o DBD abrange a região da *Hinge* (domínio D).

Para melhor compreender o papel de cada domínio, foi realizada comparação da atividade transcricional das quimeras AAB, ABA, BAA e BBA, BAB, ABB e os controles na presença e ausência de T3.

Observa-se que a quimera BAB, na qual há a interação DBD- $\alpha$  e o LBD- $\beta$ , apresentou uma elevada resposta ao T3, apresentando um aumento da atividade transcricional de quase 2 vezes mais (aproximadamente 200%) que TR $\beta$ 1 (Figura 26A - penúltima coluna). Por outro lado, essa mesma quimera (BAB), na ausência de T3, inibiu a repressão transcricional quando comparada com ambos os controles TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 (Figura 26B - penúltima coluna). Esses resultados sugerem mais uma vez que a interação entre DBD- $\alpha$  e LBD- $\beta$  favorece a atividade transcricional, na presença do ligante, como podemos observar nas quimeras BAB e 2AB. (Figuras 26A e 22) assim como inibe a repressão na ausência do ligante, como visto nas mesmas quimeras BAB e 2AB (Figuras 26B e 23 )

Observa-se também, que a presença do domínio DBD- $\alpha$  nestas quimeras, BAB, 2AB evidencia que o domínio DBD- $\alpha$ /*Hinge* exerce um importante papel na atividade transcricional dependente do ligante, aumentando-as, e impede a repressão na ausência do ligante. Esse importante papel do DBD- $\alpha$ /*Hinge* em potencializar a atividade transcricional pode ser explicado com os achados de Nascimento e cols. (2006) que propuseram que a *Hinge* do TR tem o potencial para formar extensões funcionalmente importantes entre DBD e LBD ou a capacidade de se desdobrar para permitir que o TR se adapte a diferentes elementos responsivos ao DNA (89). Os pesquisadores sugerem ainda que esta interação na *Hinge* é análoga às interações do que realizadas pelo LBD do TR, sendo dependente de contatos vizinhos com a superfície AF-2 do LBD e com peptídeos coativadores (89). Estudos de cristalografia sugerem que a *Hinge* do TR $\alpha$  pode adotar duas formas: (i) dobrar-se em uma curta  $\alpha$ -hélice (H0) ou (ii) desdobrar-se em uma longa região não estruturada, dependente de vários contatos moleculares, formando extensões funcionalmente importantes entre DBD e LBD (89). Ademais, Hahm e cols. (2014) observaram o recrutamento de algumas proteínas, em sua maioria reguladores transcricionais, também mostraram mais preferência na interação com os domínios DBD e *Hinge* de TR $\alpha$ 1 (96).

Essa capacidade da *Hinge* do TR $\alpha$  em formar extensões funcionalmente importantes entre DBD e LBD, associada à habilidade do domínio DBD- $\alpha$  e *Hinge* em recrutar proteínas reguladoras pode estar interagindo sinergicamente com LBD da isoforma TR $\beta$ , favorecendo a atividade transcricional.

Todavia, ao observar-se as quimeras AAB, ABA, BAA, a troca de quaisquer dos domínios de TR $\alpha$ 1 pelos de TR $\beta$ 1, aqui sublinhados, não apresentou ativação quando comparada ao TR $\alpha$ 1 na presença de T3, e não interferiu na ativação quando comparada com TR $\beta$ 1. (Figura 26A - terceira a sexta coluna). Ou seja, mesmo com a troca de qualquer domínio de TR $\alpha$ 1 por TR $\beta$ 1 (que tem maior ativação), estas quimeras não apresentaram melhor ativação transcricional. Tal resultado é indicativo de que a resposta do TR $\alpha$  tende a ser menor para esse elemento responsivo, ou ainda que a resposta de TR $\beta$  tende a ser maior para esse elemento responsivo.

Em contrapartida, na ausência de T3, observamos que dentre as mesmas quimeras AAB, ABA, BAA analisadas, as quimeras ABA e BAA apresentaram repressão da atividade transcricional quando comparadas ao TR $\beta$ 1 (Figura 26B - quarta e quinta coluna), evidenciando que tanto o NTD- $\alpha$  quanto o LBD $\alpha$  exercem papel repressor na atividade transcricional. Apenas AAB, com LBD- $\beta$  que apresenta capacidade de ativação, não apresentou repressão.

Contudo, considerando que, como mencionado acima, dados do presente estudo e a literatura indicam que o LBD- $\alpha$  exerce influência sobre a repressão no TR $\alpha$ 1 (94), observamos que quando o LBD- $\alpha$  está presente nas quimeras, como em ABA, BAA BBA, há significativo aumento de repressão quando comparada ao controle TR $\beta$ 1, na ausência de T3 (Figura 26B – quarta, quinta e sexta coluna). Isso corrobora com a observação de que na presença de T3, a quimera BBA com o LBD $\alpha$  impediu a ativação transcricional quando comparado ao TR $\beta$ 1 (Figura 26A – sexta coluna).

Diante destes resultados, sugere-se que o LBD- $\alpha$ , além de impedir a ativação na presença do ligante, exerce um papel importante na repressão. Zhu e cols. (1997) relatam que o domínio LBD- $\alpha$  foi responsável por diminuir em 60% a atividade transcricional de TR $\beta$ 1(94),

Observando ainda as quimeras AAB e BBA, nas quais os LBDs foram trocados, na ausência de T3, é possível observar que, enquanto na quimera AAB, apenas o LBD- $\beta$  foi o suficiente para evitar a repressão, na quimera BBA, apenas o LBD- $\alpha$  foi o suficiente para reprimir de forma semelhante ao TR $\alpha$ 1 (Figura 26B –

terceira e sexta coluna). Tais resultados são relativos à capacidade de ativação do LBD- $\beta$  e à capacidade de LBD- $\alpha$  em regular a repressão. Isso conferindo uma atividade mais elevada ao TR $\beta$ 1 e uma atividade inferior ao TR $\alpha$ 1 como relata Zhu e cols. 1997 (94).

Por outro lado, analisando as quimeras com a presença do LBD- $\beta$ , AAB, BAB e ABB, observa-se que houve uma variação na atividade transcricional entre essas quimeras. A quimera BAB apresentou um grande aumento da atividade transcricional, resultando em 2 vezes mais, quando comparado com TR $\beta$ 1, na presença de T3. E a quimera ABB foi capaz de manter a atividade transcricional semelhante ao TR $\beta$ 1, mesmo na presença do NTD- $\alpha$ , que parece exercer efeito repressor.

Na ausência de T3, as quimeras AAB e ABB, apresentaram repressão semelhantes a TR $\beta$ 1. No entanto, em BAB, houve uma resistência à repressão, quando comparado com TR $\beta$ 1, na ausência de T3, o que parece ter ocorrido provavelmente devido ao recrutamento de cofatores pelo DBD- $\alpha$ , já mostrado anteriormente. Esses resultados nos sugerem que o domínio LBD- $\beta$ , mesmo com a influência dos domínios da isoforma alfa, exerce dominância sobre a ativação dependente de T3, além de impedir a repressão na ausência de T3.

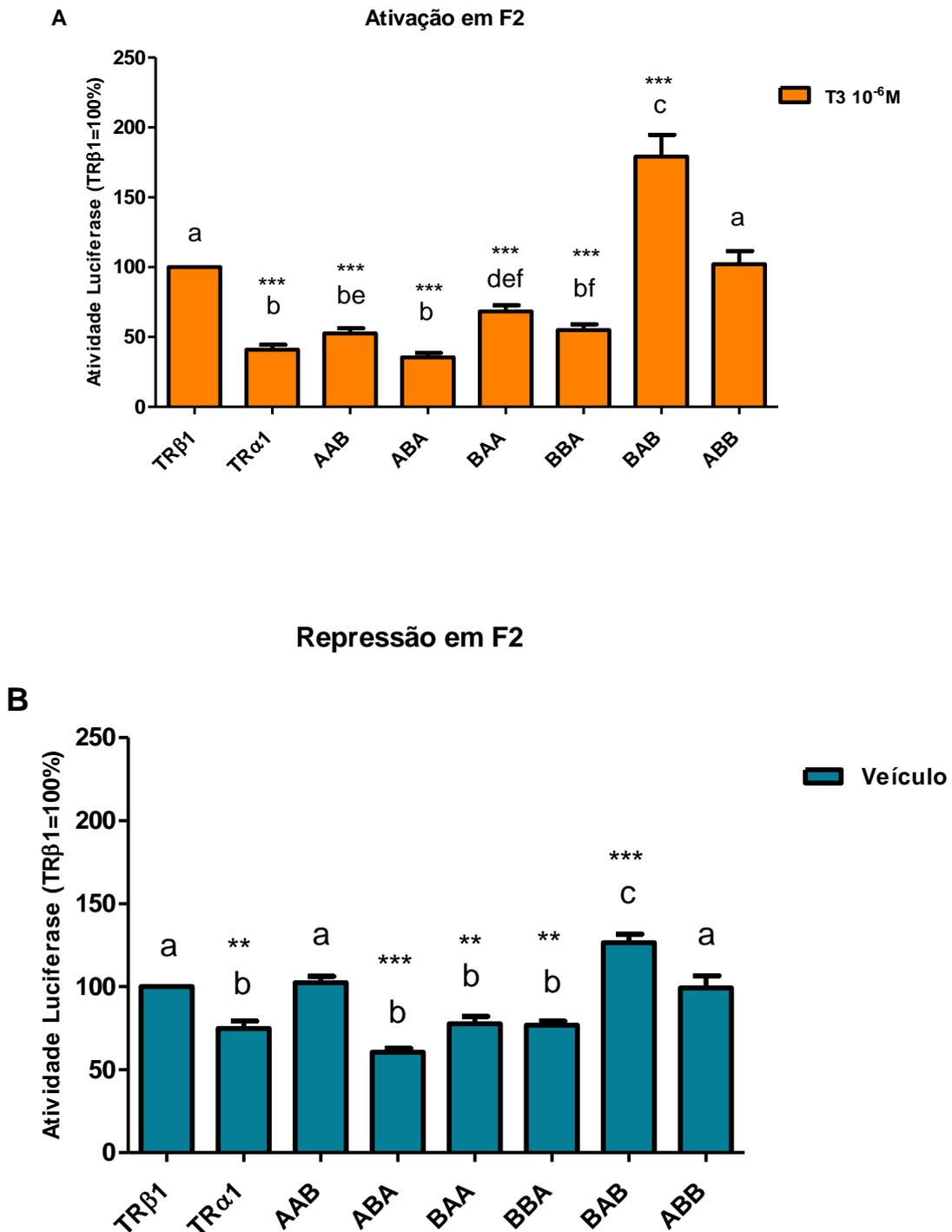


Figura 26. Efeito das trocas dos domínios entre as isoformas TRα1 e TRβ1 em F2.

(A), ativação na presença de T3. (B), repressão na ausência de T3. Atividade transcricional normalizada para TRβ1=100%. Células HeLa foram cotransfectadas com 100ng de vetores de expressão, pCMV-Tag2B, pCMV-Tag2B hTRα1, pCMV-Tag2B hTRβ1 e pCMV-Tag2B hTRβ2, e 300ng de vetor repórter pUC-F2-LUC, tratadas com ligante (10<sup>-6</sup>M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Resultados foram expressos como média ± EPM da atividade da luciferase de pelo menos 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si, \*\*p< 0,01 e \*\*\*p< 0,001 em relação a TRβ1. Análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni.

Em resumo, sugere-se que o possível sinergismo entre DBD- $\alpha$  e LBD- $\beta$  ou a presença do DBD- $\alpha$  favorece a ativação na presença do ligante e também impede a repressão na ausência do ligante. Os domínios NTD- $\alpha$  e LBD- $\alpha$  promovem a repressão transcricional na ausência do ligante e impedem a ativação transcricional na presença do ligante. No entanto, o LBD de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, exercem papéis distintos, enquanto, LBD- $\alpha$ , promove a repressão, o LBD- $\beta$  promove ativação. Ambos os DBDs de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, parece promover ativação.

Tabela 1 - Resumo dos resultados em F2.

Isoforma/ Quimera	Domínio evidência	em	Ativação (+T3)	Repressão (-T3)	Sugestão - Resultados
<b>Receptores selvagens</b>					
TR $\beta$ 1					Ativa mais que TR $\alpha$ 1, mas, não mais que TR $\beta$ 2 na presença de T3.
TR $\alpha$ 1 TR $\beta$ 1					Apresentaram repressões semelhantes na ausência de T3.
TR $\beta$ 2					Apresentou maior ativação na presença de T3 e impediu a repressão na ausência de T3.
<b>Quimeras com NTD do TR<math>\beta</math>2</b>					
2AB	NTDTR $\beta$ 2 (DBD- $\alpha$ – LBD- $\beta$ )		Ativou 10x mais que TR $\beta$ 1, interação entre domínios.	O NTD do TR $\beta$ 2 interfere impediu/ a repressão.	Interação entre domínios - Favoreceu a ativação na presença do ligante, além de interferir impedindo a repressão independente do ligante.
2BA, 2AA	NTD TR $\beta$ 2 / LBD- $\alpha$		Com LBD- $\alpha$ tem ativação semelhante ao TR $\beta$ 2, mais ainda é maior que TR $\beta$ 1.	Com LBD- $\alpha$ reprime semelhante ao TR $\beta$ 1.	O NTD TR $\beta$ 2 – melhora a ativação na presença de T3. O LBD- $\alpha$ , mesmo na presença do NTD do TR $\beta$ 2, exerce repressão semelhante ao TR $\beta$ 1, na ausência do ligante.
<b>Quimeras com deleção NTD das isoformas (TR<math>\alpha</math>1/TR<math>\beta</math>1)</b>					
Del AA	Deleção do NTD ( $\alpha$ 1/ $\beta$ 1)		Ativou 4x mais que TR $\alpha$ 1. Logo: sua presença deve prejudicar a ativação.	Repressão semelhante ao TR $\beta$ 1.	Logo: A diferença da atividade transcricional entre ambas isoformas pode ser atribuída ao NTD. Logo: outro domínio exercendo repressão – LBD- $\alpha$ ?
Del BB	Deleção do NTD ( $\alpha$ 1/ $\beta$ 1)		Ativou mais que as isoformas tipo selvagem.	Não influenciou repressão em TR $\beta$ 1.	Logo: sua presença pode exercer ação repressora, mas não ficou clara.
Del <u>AB</u>	(DBD- $\alpha$ – LBD- $\beta$ )		Ativou mais que as isoformas tipo selvagem.	Não interfere na repressão.	Interação entre domínios DBD- $\alpha$ /LBD- $\beta$ favorece a ativação dependente do ligante, mas não ocorre na ausência do NTD.
Del BA	DBD- $\beta$		Mantem a ativação semelhante ao TR $\beta$ 1.	Não interfere na repressão.	Revela a importância do DBD- $\beta$ para a ativação transcricional.

Continuação

<b>Quimeras com a troca de domínios entre as isoformas (TR<math>\alpha</math>1/TR<math>\beta</math>1)</b>				
<u>B</u> <u>A</u> <u>B</u>	(DBD- $\alpha$ – LBD $\beta$ )	Maior ativação / troca de domínios isoformas ( $\alpha$ 1/ $\beta$ 1).	Interfere na repressão.	Interação entre domínios - Favoreceu a ativação.
<u>B</u> <u>A</u> <u>B</u>	DBD- $\alpha$			Importância do DBD $\alpha$ para a ativação transcricional.
<u>B</u> <u>B</u> <u>A</u>	LBD- $\alpha$	Não apresentou ativação.	Significativa repressão.	O LBD- $\alpha$ – responsável pela repressão. O LBD- $\alpha$ – responsável por TR $\alpha$ 1 apresentar menor ativação que TR $\beta$ 1.
( <u>A</u> <u>A</u> <u>B</u> , <u>A</u> <u>B</u> <u>A</u> , <u>B</u> <u>A</u> <u>A</u> )	Troca de $\alpha$ por $\beta$	Não apresentou ativação.	Apresentou repressão.	Troca de $\alpha$ por $\beta$ – não favoreceu a ativação. Resposta de TR $\alpha$ 1 tende a ser menor em F2
( <u>A</u> <u>B</u> <u>A</u> , <u>B</u> <u>A</u> <u>A</u> , <u>B</u> <u>B</u> <u>A</u> )	LBD- $\alpha$ – comum a todas.		Acentuada repressão na ausência do ligante.	O LBD- $\alpha$ , (comum a todas) pode ser o responsável pela repressão/resposta de TR $\alpha$ menor.

Nota: Os resultados foram apresentados em forma de “Tabela de resumo dos resultados”, descritos na mesma ordem das figuras apresentadas, colocando em evidência qual quimera e domínio pareceu ser responsável por sugerir o resultado encontrado.

### 6.3 AÇÃO DO TR EM PROMOTOR DE PROMOTOR DE *TSHA*

Os TRs atuam sobre os genes alvo por meio de ligação aos TREs (13, 16, 34) e medeia a repressão dependente do ligante (3, 57), essa capacidade é dependente do contexto do promotor e do estado de ligação ao ligante (58) como ocorre em determinados genes alvo como *TSH* e *TRH*, genes regulados negativamente (10, 9). Ambos exercem uma relação bem semelhante quanto à produção de T3 e ao papel no *feedback* negativo da tireoide (7, 8).

Ao analisar as isoformas controles em relação ao veículo, em *TSH $\alpha$* , observamos que TR $\alpha$ 1wt, TR $\beta$ 1wt e TR $\beta$ 2wt apresentaram atividade transcricional semelhantes na ausência de T3, valores de 2836, 2403 e 2230URL/s, respectivamente e na presença de T3, valores de 250, 245 e 351 URL/s, respectivamente. Não observamos atividade transcricional de TR endógeno (Figura 27, CMV-Tag2B).

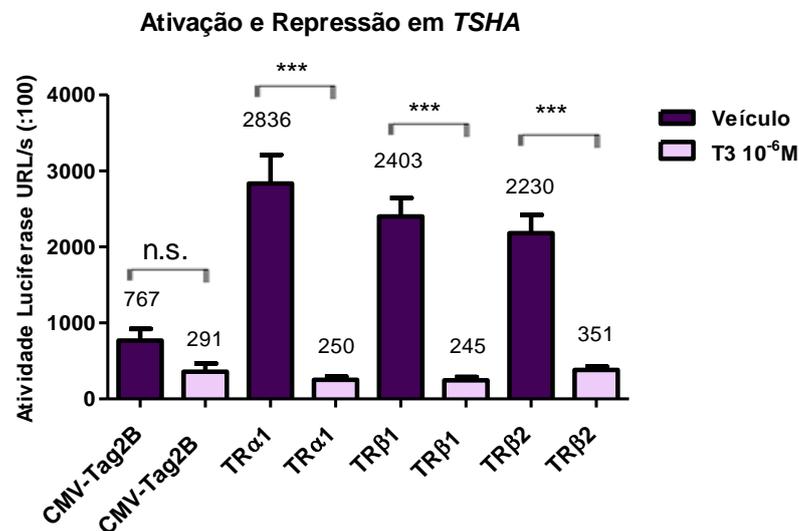


Figura 27. **Atividade transcricional dos controles na ausência e presença de T3 em promotor de *TSHA*.**

Células HeLa foram cotransfectadas com 50ng dos vetores de expressão pCMV-Tag2B, pCMV-Tag2B hTR $\alpha$ 1, pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 1 e pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 2 e 300ng de vetor repórter *TSHA* -LUC, e tratadas com ligante (10<sup>-6</sup>M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Números acima das colunas são os resultados expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferase (URL/s) de 1 (um) experimento representativo em triplicata. \*\*\*p < 0,001 em relação ao veículo. Análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni.

Para avaliar a atividade transcricional em TSH $\alpha$  (nTRE) do TR e quimeras no estudo, assim como em F2, foi usado como referencial de comparação a isoforma TR $\beta$ 1, a qual teve sua atividade transcricional representada em 100%.

Na Figura 28A, observou-se que na presença de T3, TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 apresentaram valores para repressão transcricional semelhantes, contudo TR $\beta$ 2 inibiu a repressão na presença de T3. Na ausência de T3, as três isoformas apresentaram ativações semelhantes (Figura 28B).

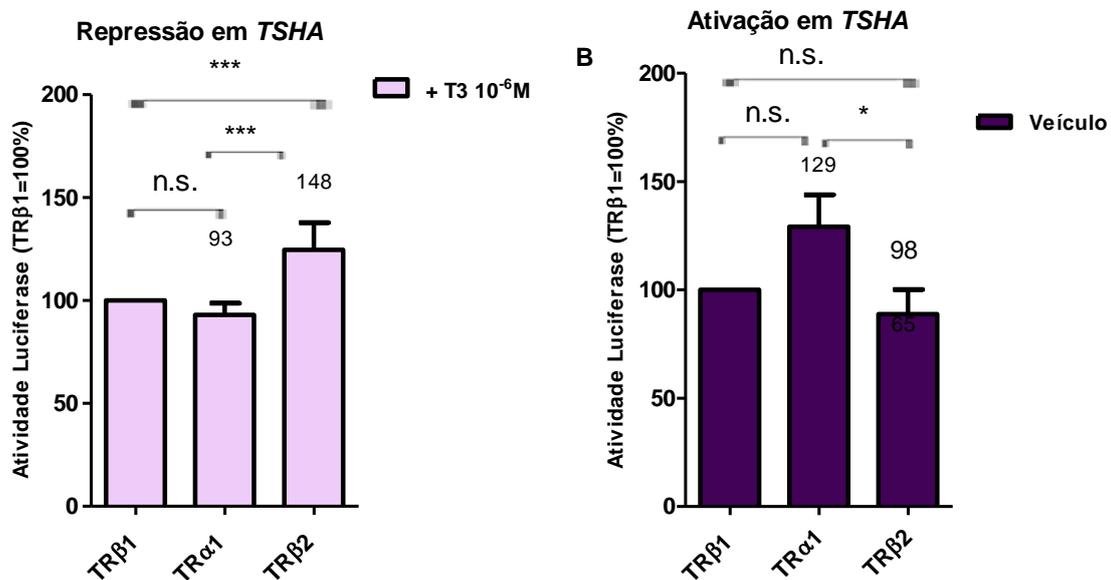


Figura 28. **Atividade transcricional de TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 em promotor de TSHA.**

(A), repressão na presença de T3. (B), ativação na ausência de T3. Atividade transcricional normalizada para TR $\beta$ 1=100%. Células HeLa foram cotransfectadas com 50ng de vetores de expressão, pCMV-Tag2B hTR $\alpha$ 1, pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 1 e pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 2 e 300ng de vetor repórter TSHA -LUC, tratadas com ligante (10<sup>-6</sup>M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Números acima das colunas são os resultados expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferase de 3 experimentos independentes em triplicata. \* $p$  < 0,05 e \*\*\* $p$  < 0,001 em relação ao TR $\beta$ 1. Análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni.

#### 6.4 ATIVIDADE TRANSCRICIONAL DO TR EM PROMOTOR DE TSHA

Na Figura 29, uma análise geral dos resultados nos mostra que as trocas de domínios entre TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 influenciaram tanto a ativação quanto a repressão transcricional, na ausência e presença de T3, em TSHA. Observou-se a

repressão, na presença de T3, de forma mais evidente nas quimeras ABA e 2BA, nas quais há a presença do DBD- $\beta$  e LBD- $\alpha$  associada aos NTDs de TR $\alpha$ 1 ou TR $\beta$ .

Por outro lado, observou-se que as maiores ativações transcricionais, na ausência de T3, ocorreram nas quimeras BBA, BAB, ABB, nas quais cada domínio de TR $\beta$ 1 foi substituído pelo de TR $\alpha$ 1. As demais quimeras apresentaram atividade transcricional moderadas.

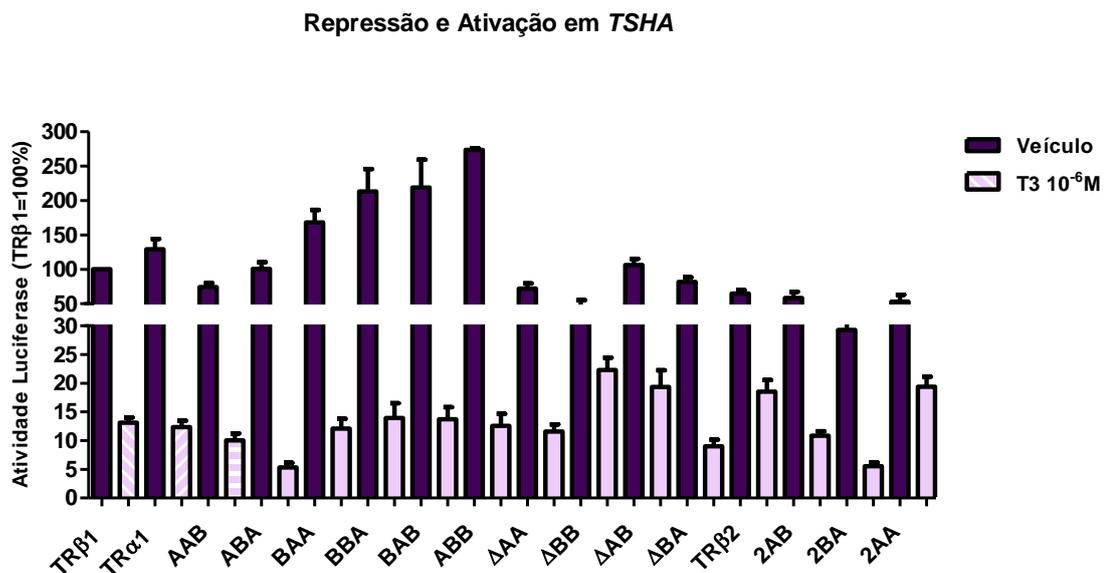


Figura 29. **Panorama geral da atividade transcricional do TR na ausência e presença de T3 em promotor de *TSHA*.**

Atividade transcricional normalizada para TR $\beta$ 1=100%. Células HeLa foram cotransfectadas com 50ng de vetores de expressão, pCMV-Tag2B hTR $\alpha$ 1, pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 1 e pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 2 e 300ng de vetor repórter *TSHA* -LUC, tratadas com ligante (10<sup>-6</sup>M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferase de 3 experimentos independentes em triplicata. Análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni. Figura representativa.

#### 6.4.1 Influência do NTD do TR $\beta$ 2 em Promotor de *TSHA* na Repressão Transcricional – Presença de T3

O TSH é hormônio estimulante da tireoide, apresenta duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , e tem uma relação bem semelhante ao TRH quanto à produção de T3 e ao papel no *feedback* negativo da tireoide (10, 9). A regulação de sua produção e, portanto, de sua ação é modulada por meio do TR regulado negativamente pelo promotor do

*TSHA*, que ao contrário do pTRE-F2, é reprimido por T3, ao invés de ser estimulado (9).

TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 possuem alta divergência no domínios NTD (17, 34), como resultado de um *splicing* alternativo de mRNA (43). Os TRs são normalmente encontrados ligados a proteínas correpressoras específica como SMRT e NCOR (33), e inibem a transcrição em pTRE, exceto TR $\beta$ 2. Hollenberg e cols. (1996) e Langois e cols. (1997), assim, observaram que a maioria das isoformas do TR reprime a transcrição na ausência de hormônio, porém, TR $\beta$ 2 não consegue reprimir nestas condições, e que, consistente com isso, parecia que NCoR, não parece ter ação em TR $\beta$ 2 (104, 105). Nossos resultados corroboram com essas informações e indica que a isoforma TR $\beta$ 2 inibiu repressão ou seja, reprimiu menos quando comparado com TR $\beta$ 1 na presença de T3 em *TSHA*, o que se observa na Figura 28A.

É interessante notar que a quimera na qual se observou sinergismo no nTRE-TSH $\alpha$ , foi 2BA, (Figura 31A - penúltima coluna), diferente daquela na qual se observou sinergismo em pTRE-F2. Em 2BA, observou-se que a interação entre o DBD- $\beta$  e LBD- $\alpha$  foi responsável por um aumento de aproximadamente, 50% da repressão dependente de T3, quando comparado com TR $\beta$ 1. Tal resultado sugere que a interação do DBD- $\beta$  e LBD- $\alpha$  aumenta a repressão na presença de T3 em *TSHA*.

Ainda, na inversão para DBD- $\alpha$  e LBD- $\beta$  da quimera 2AB, no qual ressaltamos a presença do DBD- $\alpha$ , restaurou a repressão a valores semelhantes aos de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1. o que se observa na Figura 31A na antepenúltima coluna.

Diante dos dados, esperava-se que, em 2AA, o efeito da repressão fosse ainda mais presente. Mas, no entanto, a quimera 2AA mostrou resultado contrário, interferindo em, aproximadamente, 200%, na repressão na presença de T3. Comportou-se, dessa forma, semelhante a isoforma TR $\beta$ 2 (Figura 31A - ultima coluna). Isso indica que provavelmente essa “não repressão” se deve ao NTD do TR $\beta$ 2.

Há relatos de que os domínios (DBD *Hinge* e LBD) de TR $\alpha$ 1 exercem grande potencial em recrutar cofatores transcripcionais, que atuavam como correpressores (96). Soma-se a isso que TR $\beta$ 1 e TR $\beta$ 2 interagem com os correpressores igualmente bem no DNA, e esta interação sugeriria que o domínio NTD do TR $\beta$ 2 poderia inativar ou mascarar a função do correpressor (104). Ainda, Yang e

Privalsky 1999, observaram que o TR $\beta$ 2 se ligava fortemente a SMRT e NCoR e que apenas NTD do TR $\beta$ 2, era suficiente para fazer interação com a região silenciadora de SMRT e NCoR. Relataram também que o NTD de outras isoformas do TR não interage com SMRT e NCoR (103). Os autores se perguntavam por que TR $\beta$ 2 não consegue reprimir.

Para explicar como a composição do complexo correpressores pode ser modulada, em TR $\beta$ 2, baseado em um estudo anterior de Yang e cols (1999), Privalsky M.L. propôs em 2004, um modelo (Figura 30). Nesse modelo, sabendo-se que TR $\beta$ 2 é único receptor que possui capacidade em seu domínio N-terminal de fazer contatos adicionais com a região repressora de SMRT e NCoR é mostrado como os contatos adicionais inibem o recrutamento de componentes correpressores adicionais, como o mSin3, e previnem a repressão (33, 103).

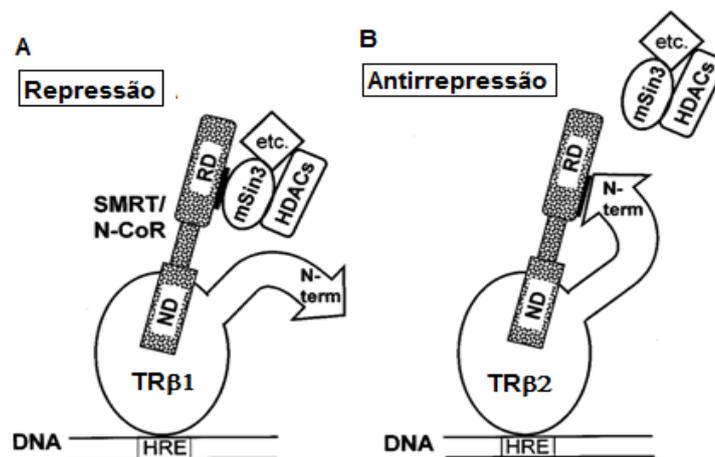


Figura 30. **Modulação diferenciada de um complexo correpressor funcional com TR.**

As isoformas do TR fazem contatos com correpressores SMRT/NCoR por meio de sua superfície de acoplamento do LBD nas hélices 3,5 e 6. No entanto, apenas a isoforma TR $\beta$ 2 contém uma interação adicional com correpressor, por meio da superfície de interação em seu domínio NTD (B). Esta interação adicional específica de TR $\beta$ 2 inibe o recrutamento de mSin3 por SMRT e NCoR e, conseqüentemente, interfere na repressão. Este fenômeno denota antirrepressão. (ND – região no domínio C-terminal que interage com receptor nuclear, RD - região no domínio no N-terminal que interage com complexo de correpressores). Privalsky, 2004 (33).

Diante do exposto, sugere-se que a isoforma TR $\beta$ 2 inibiu a repressão dependente de T3 em *TSHA*, em nosso estudo, devido aos contatos adicionais que seu distinto NTD pode realizar com SMRT e NCoR, que inibem o recrutamento de componentes correpressores adicionais prevenindo, assim, a repressão.

O NTD de TR $\beta$ 2 parece ser o responsável por a isoforma não apresentar repressão na presença de T3.

#### **6.4.2 Influência do NTD do TR $\beta$ 2 em Promotor de *TSHA* na Ativação Transcricional - Ausência de T3**

Observa-se que na ativação independente de T3, em *TSHA* as quimeras com NTD de TR $\beta$ 2, 2AB, 2BA e 2AA inibiram a atividade transcricional quando comparadas ao TR $\beta$ 1. (Figura 31B - quarta a sexta colunas). Porém, mostrando um efeito maior em 2BA, sugerindo que a interação entre DBD $\beta$  e LBD $\alpha$  tanto pode atuar na repressão na presença do ligante, (Figura 31A) como pode inibir a ativação na ausência de T3 (Figura 31B).

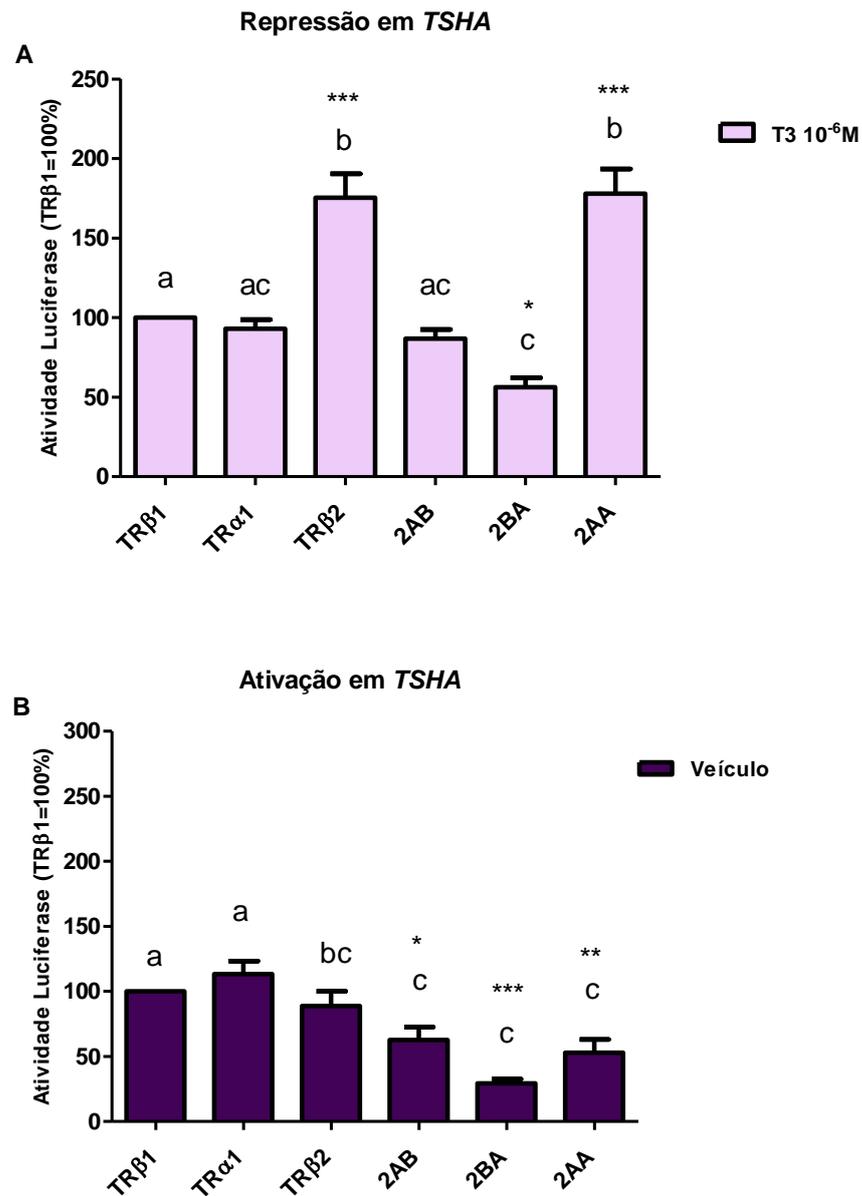


Figura 31. Efeito do NTD do TRβ2 em promotor de *TSHA* na ausência e presença de T3.

(A), repressão na presença de T3. (B), ativação na ausência de T3. Atividade transcricional normalizada para TRβ1=100%. Células HeLa foram cotransfectadas com 50ng de vetores de expressão, pCMV-Tag2B hTRα1, pCMV-Tag2B hTRβ1 e pCMV-Tag2B hTRβ2 e 300ng de vetor repórter *TSHA* -LUC, tratadas com ligante ( $10^{-6}$ M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferase (URL/s) de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação a TRβ1. Análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni.

### 6.4.3 Importância do NTD do TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 em Promotor de *TSHA* na Repressão Transcricional - Presença de T3

A deleção do NTD em TR $\beta$ 1, em  $\Delta$ BB, interferiu intensamente na repressão na presença de T3 (Figura 32A – primeira e quarta colunas). Tal resultado é indicativo de que a presença do NTD- $\beta$  é necessária para que ocorra a repressão transcricional de TR $\beta$ 1, na presença de T3, no promotor de *TSHA*.

As quimeras  $\Delta$ AA,  $\Delta$ AB,  $\Delta$ BA não influenciaram a repressão, comportando-se semelhantes ao TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, na presença de T3 (Figura 32A - três últimas colunas). Ressalta-se que a interação observada entre DBD $\alpha$  e LBD $\beta$  somente ocorreu no receptor que possuía três domínios, ou seja, não ocorreu na quimera com deleção do NTD, quimera  $\Delta$ AB.

### 6.4.4 Importância do NTD do TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 em Promotor de *TSHA* na Ativação Transcricional - Ausência de T3

Quando analisada a ativação transcricional, na ausência de T3 em promotor de *TSHA*, observou-se que a quimera  $\Delta$ BB, com deleção do NTD, impediu em 50% a ativação transcricional quando comparado com TR $\beta$ 1 (Figura 32B - quarta coluna). Tal resultado é indicativo de que a presença do NTD- $\beta$  é importante para a ativação transcricional em TR $\beta$ 1, na ausência de T3, quando regulado em promotor de *TSHA*. (Figura 32B – quarta coluna).

No entanto, a ausência de NTD na quimera  $\Delta$ AA, fez com que esta apresentasse repressão transcricional semelhante ao TR $\alpha$ 1 na presença de T3 e impediu a ativação transcricional na ausência de T3, quando comparada a TR $\alpha$ 1. (Figura 32B – terceira coluna)

As demais quimeras com deleção do NTD,  $\Delta$ AB  $\Delta$ BA, não influenciaram a repressão ou ativação.

Os dados sugerem que os NTDs de ambas as isoformas desempenham papéis distintos em gene regulado negativamente, promotor de *TSHA*. O NTD- $\beta$  desempenha um importante papel na repressão dependente do ligante e na ativação

independente do ligante, e o NTD $\alpha$  parece exercer influência apenas na ativação dependente do ligante.

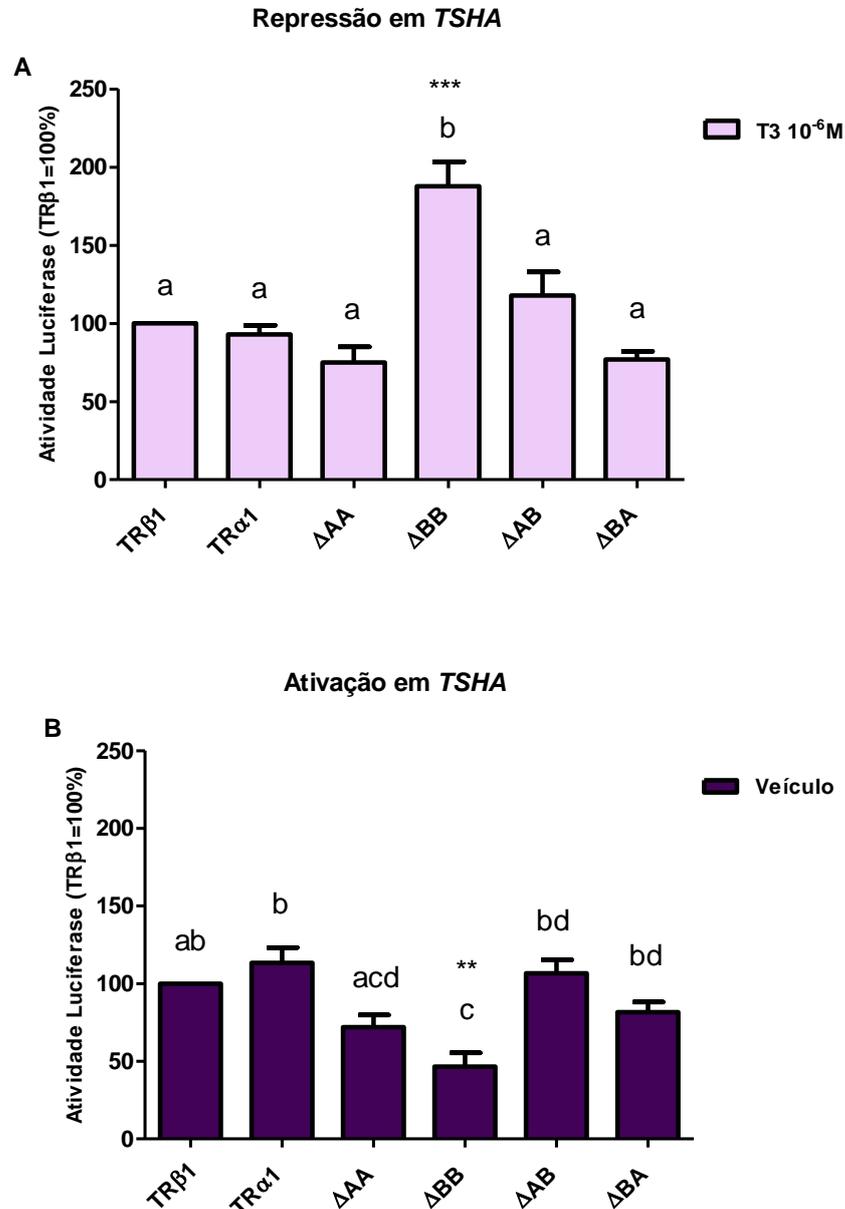


Figura 32. Efeito da ausência do NTD em TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 em promotor de *TSHA* na ausência e presença de T3.

(A), repressão na presença de T3. (B), ativação na ausência de T3. Atividade transcricional normalizada para TR $\beta$ 1=100%. Células HeLa foram cotransfectadas com 50ng de vetores de expressão, pCMV-Tag2B hTR $\alpha$ 1, pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 1 e pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 2 e 300ng de vetor repórter *TSHA*-LUC, tratadas com ligante ( $10^{-6}$ M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferasa de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si, \* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação a TR $\beta$ 1. Análise de variância One-Way (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni.

#### **6.4.5 Efeito das Trocas dos Domínios entre TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 2 em Promotor de *TSHA* na Repressão e Ativação Transcricional**

A troca dos domínios entre TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, em promotor de TSH na presença de T3, mostra-nos que ABA, com o diferencial do DBD- $\beta$  ou interação entre DBD- $\beta$  e LBD- $\alpha$ , reprimiu 2 vezes mais a atividade transcricional quando comparada a ambos os controles TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, na presença de T3 (Figura 33A - quarta coluna). Tal resultado sugere que a melhora na repressão pode ter sido ocasionada pela interação entre DBD- $\beta$  e LBD- $\alpha$ , já que o domínio DBD- $\beta$  não parece ter favorecido a repressão nas demais quimeras.

Nas quimeras com troca de domínios de TR $\beta$ 1 por TR $\alpha$ 1, BBA, BAB e ABB, na presença de T3, não foi diferente dos controles TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 (Figura 33A - três últimas colunas).

Todavia, as maiores respostas de ativação ocorreram nestas mesmas quimeras BBA, BAB e ABB, indicando que a troca de quaisquer dos domínios de TR $\beta$ 1 por TR $\alpha$ 1 favoreceu a ativação na ausência de T3 (Figura 33B - três últimas colunas).

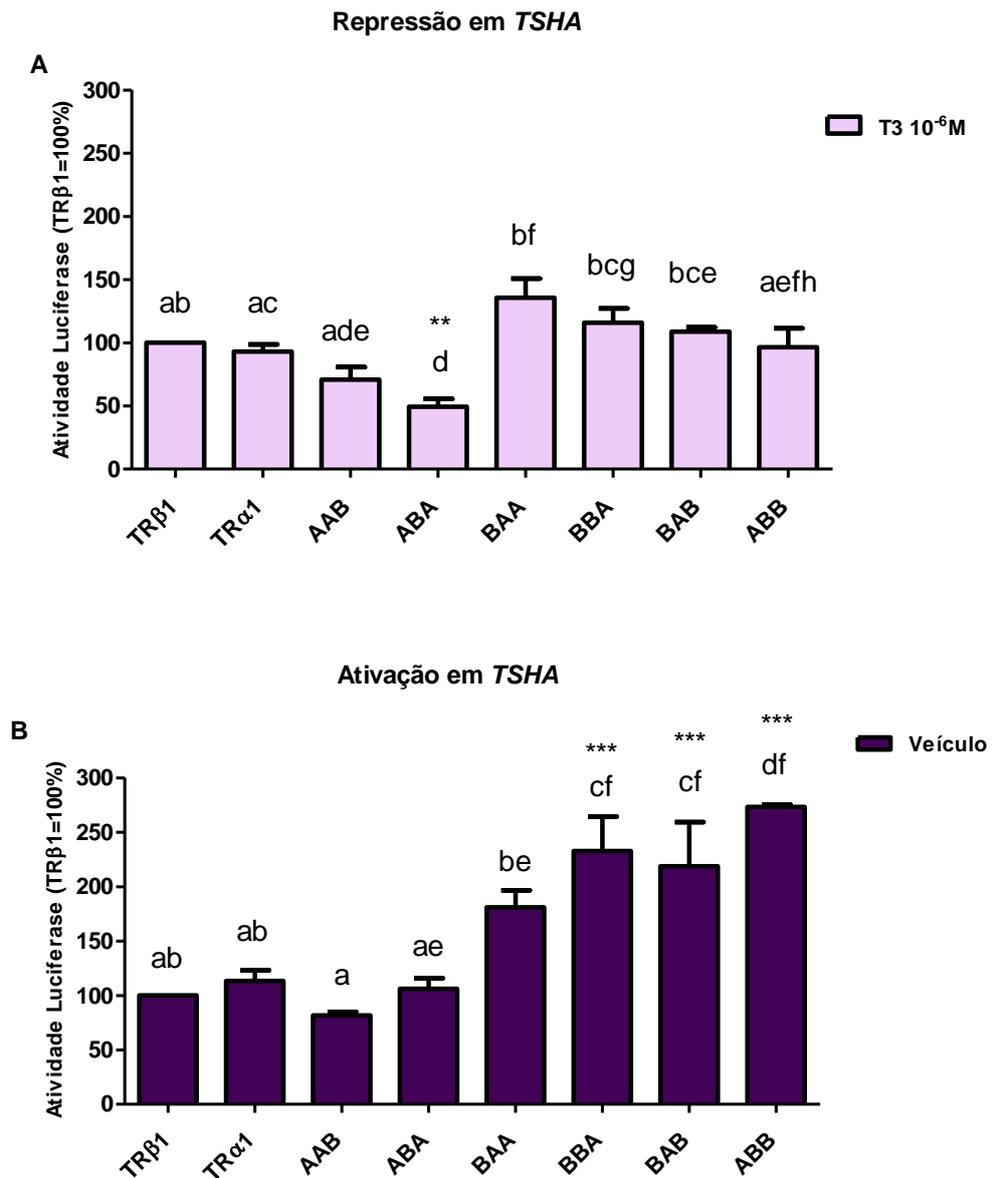


Figura 33. Efeito das trocas dos domínios entre as isoformas TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 em promotor TSHA na ausência e presença de T3.

(A), repressão na presença de T3. (B), ativação na ausência de T3. Atividade transcricional normalizada para TR $\beta$ 1=100%. Células HeLa foram cotransfectadas com 50ng de vetores de expressão, pCMV-Tag2B hTR $\alpha$ 1, pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 1 e pCMV-Tag2B hTR $\beta$ 2 e 300ng de vetor repórter TSHA -LUC, tratadas com ligante ( $10^{-6}$ M de T3 em DMSO/ETOH, v/v 1:9) ou veículo (DMSO/ETOH, v/v 1:9) durante 24 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM da atividade da luciferase de 3 experimentos independentes em triplicata. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre si, \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  em relação a TR $\beta$ 1. Análise de variância One-Way (ANOVA), seguida do teste de Bonferroni.

Tabela 2 - Resumo dos resultados em promotor de *TSHA*

Isoforma /Quimera	Domínio evidência	em	Repressão (+T3)	Ativação (-T3)	Sugestão - Resultados
<b>Receptores selvagens</b>					
TR $\alpha$ 1 TR $\beta$ 1					Apresentaram atividade transcricional semelhantes entre si, na presença e na ausência de T3.
TR $\beta$ 2					TR $\beta$ 2 não reprime na presença de T3 apresentou atividade transcricional semelhante ao TR $\beta$ 1 na ausência de T3.
<b>Quimeras com NTD do TR<math>\beta</math>2</b>					
2BA	NTD TR $\beta$ 2 LBD- $\beta$ / DBD- $\alpha$		Reprimiu em aproximadamente 50% a mais em relação ao TR $\beta$ 1.	Interação não ocorreu na ausência de T3.	A interação entre os domínios LBD- $\beta$ / DBD- $\alpha$ aumenta a repressão na presença de T3.
2AB	DBD- $\alpha$		Restaurou em relação ao TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1.		Restaurou a repressão na presença do ligante.
2AA	NTD TR $\beta$ 2		Impediu a repressão.		NTD de TR $\beta$ 2 parece ser o responsável por a isoforma não apresentar repressão na presença de T3
2BA, 2AB, 2AA	NTD TR $\beta$ 2			Inibiram a atividade transcricional quando comparadas ao TR $\beta$ 1.	A interação entre os domínios LBD- $\beta$ / DBD- $\alpha$ inibe a atividade transcricional na ausência de T3.
<b>Quimeras com deleção NTD das isoformas (TR<math>\alpha</math>1/TR<math>\beta</math>1)</b>					
$\Delta$ BB	NTD- $\beta$		Ausência do NTD interferiu impedindo a repressão.	Impediu a ativação em 50% em relação ao TR $\beta$ 1.	Logo: NTD- $\beta$ é necessário para que ocorra a repressão transcricional na presença de T3 e a ativação na ausência de T3.
$\Delta$ AA	NTD- $\alpha$		Ausência do NTD não reprimiu.	Ausência do NTD impediu a ativação.	Logo: NTD- $\alpha$ NTD $\alpha$ parece exercer influência apenas na ativação dependente do ligante.
$\Delta$ AB	LBD- $\beta$ / DBD- $\alpha$		Não reprimiu.		Interação não ocorreu na ausência do NTD.

## Continuação

<b>Quimeras com a troca de domínios entre as isoformas (TR<math>\alpha</math>1/TR<math>\beta</math>1)</b>				
<u>ABA</u>	LBD- $\beta$ / DBD- $\alpha$	Reprimiu em 50% em relação ao TR $\beta$ 1.		A interação entre os domínios promove repressão na presença de T3.
<u>ABA</u>	DBD- $\beta$	Reprimiu com interação LBD- $\beta$ / DBD- $\alpha$ .		Mas, o DBD $\beta$ não parece ter favorecido a repressão nas demais quimeras.
BAB	DBD- $\alpha$	Maior ativação.	Inibiu a repressão.	DBD- $\alpha$ / <i>Hinge</i> exerce u um importante papel na atividade transcricional dependente do ligante, aumentando-as, e impede a repressão na ausência do ligante.
BBA, ABB	Troca de $\beta$ por $\alpha$ .	Não apresentou repressão.	Maiores respostas de ativação.	A troca de qualquer de um dos domínios da isoforma TR $\beta$ 1, pela isoforma TR $\alpha$ 1, favoreceu a ativação da isoforma TR $\beta$ 1, na ausência de T3, mas, não interferiu na repressão na dependente do ligante.

Nota: Os resultados foram apresentados em forma de “Tabela de resumo dos resultados”, descritos na mesma ordem das figuras apresentadas, colocando em evidência qual quimera e domínio pareceu ser responsável por sugerir o resultado encontrado.

## 7 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 7.1 EM F2

Os resultados obtidos em genes regulados positivamente, F2, observamos que a atividade transcricional de TR $\beta$ 2 foi a mais acentuada entre as três isoformas, seguida da isoforma TR $\beta$ 1 e TR $\alpha$ 1, quando na presença de T3.

O efeito da atividade transcricional das isoformas em relação aos domínios sugerem que o NTD TR $\beta$ 2 foi o responsável pela maior ativação. Isto pode ser observado, principalmente, na quimera 2AB que mostrou um aumento de cerca de 10 vezes maior que TR $\beta$ 1, quando associado ao LBD- $\beta$ . A mesma quimera sugeriu ainda um sinergismo entre os DBD- $\alpha$  e LBD- $\beta$  ocasionado por essa interação. Tal interação também foi sugerida por outras quimeras, nas quais se observou que, além de aumentar a ativação dependente de T3, interferia na repressão na ausência de T3.

No entanto, a troca de domínios de TR $\alpha$ 1 por TR $\beta$ 1 não influenciou a atividade da isoforma, porém apresentou repressão, um indicativo de que a resposta do TR $\alpha$  tende a ser menor para esse elemento responsivo.

No entanto, o NTD do TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 parece exercer papéis semelhantes inibindo a ativação, mas somente o NTD do TR $\alpha$ 1 exerceu influência na repressão, enquanto o NTD do TR $\beta$ 2, apesar de ter a capacidade de realizar contatos com correpressores, não se mostrou eficiente na repressão. O LBD- $\alpha$ , além de impedir a ativação, parece exercer importante papel repressor, sugerindo que este possa ser o domínio responsável por TR $\alpha$ 1 apresentar menor ativação do que TR $\beta$ 1, enquanto o LBD- $\beta$  parece ser o responsável por sua maior ativação. Ambos os DBDs de TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 parecem promover a ativação. Abaixo, encontram-se as tabelas 3 e 4 que resumem a análise dos resultados encontrados.

**Tabela 3 - Efeito com a troca dos domínios e interação entre os domínios, na ativação transcricional em F2**

Quimeras	Ligante	Interação	Efeitos
2AB, BAB	Ativação	DBD- $\alpha$ / LBD- $\beta$	$\uparrow\uparrow$
	+T3	DBD- $\alpha$	$\uparrow\uparrow$
2AB, BAB	Repressão	DBD- $\alpha$ / LBD- $\beta$	$\top$
	- T3		
AAB,ABA,BAA	Ativação	Troca de $\alpha$ por $\beta$	$\leftrightarrow$
	+T3		
ABA,BAA	Repressão	Troca de $\alpha$ por $\beta$	$\downarrow$
	- T3		

Legenda- atividade transcricional:  $\uparrow\uparrow$  ativa mais,  $\top$  impede,  $\leftrightarrow$  não interfere,  $\downarrow$  reprime. Considerações: DBD- $\alpha$  refere-se a DBD + *hinge*.

**Tabela 4 - Efeito da troca dos domínios na ativação transcricional em F2**

Isoforma	Ligante	Domínios/efeitos		
		NTD	DBD	LBD
TR $\alpha$ 1	Ativação +T3	$\top$	$\uparrow\uparrow$	$\top$
TR $\alpha$ 1	Repressão - T3	$\downarrow$	$\top$	$\downarrow\downarrow$
TR $\beta$ 1	Ativação +T3	$\top$	$\uparrow$	$\uparrow\uparrow$
TR $\beta$ 1	Repressão - T3	$\leftrightarrow$	$\leftrightarrow$	$\top$
TR $\beta$ 2	Ativação +T3	$\uparrow\uparrow$		
TR $\beta$ 2	Repressão - T3	$\top$		

Legenda - atividade transcricional:  $\uparrow$  ativa,  $\uparrow\uparrow$  ativa mais,  $\downarrow$  reprime,  $\downarrow\downarrow$  reprime mais,  $\leftrightarrow$  não interfere,  $\top$  impede. Considerações: DBD- $\alpha$  refere-se a DBD + *Hinge*.

## 7.2 EM PROMOTOR DE *TSHA*

No gene regulado negativamente, *TSHA*, TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 apresentaram repressões semelhantes. Contudo TR $\beta$ 2 inibiu a repressão na presença de T3.

Observamos que as maiores respostas de ativação independente do ligante ocorreram nas quimeras com a presença de qualquer um dos domínios da isoforma

alfa. Observou-se sinergismo entre DBD- $\beta$  e LBD- $\alpha$  na quimera 2BA, diferente daquele observado em gene regulado positivamente que foi em 2AB. Sugere-se que a interação entre DBD- $\beta$  e LBD- $\alpha$  tanto pode atuar na repressão na presença do ligante como pode inibir a ativação na ausência de T3. Interação entre DBD- $\beta$  e LBD- $\alpha$  não ocorreu na ausência do NTD.

A troca de qualquer de um dos domínios de TR $\beta$ 1 por TR $\alpha$ 1, favoreceu a ativação independente do ligante, mas não interferiu na repressão na dependente do ligante. Nestes, o NTD do TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1 exerceram papéis distintos. O NTD- $\beta$  atua na ativação independente do ligante e na repressão dependente do ligante, enquanto o NTD- $\alpha$  não parece exercer influência na ativação independente do ligante e, tão pouco, na repressão dependente do ligante. O NTD de TR $\beta$ 2 parece ser o responsável por a isoforma não apresentar repressão na presença de T3. Abaixo, encontram-se as tabelas 5 e que resumem a análise dos resultados obtidos.

**Tabela 5 - Efeito com a troca dos domínios e interação entre os domínios na ativação transcricional em promotor de *TSHA***

Quimeras	Ligante	Interação	Efeitos
2BA, $\Delta$ BA, ABA	Repressão +T3	DBD- $\alpha$ / LBD- $\beta$	$\Downarrow\Downarrow$
2BA	Ativação – T3	DBD- $\alpha$ / LBD- $\beta$	$\top$
$\Delta$ BA, ABA	Ativação – T3	DBD- $\alpha$ / LBD- $\beta$	$\leftrightarrow$
BBA, BAB, ABB	Repressão +T3	Troca de $\beta$ por $\alpha$	$\leftrightarrow$
BBA, BAB, ABB	Ativação – T3	Troca de $\beta$ por $\alpha$	$\Uparrow\Uparrow$

Legenda - atividade transcricional:  $\Uparrow\Uparrow$  ativa mais,  $\Downarrow\Downarrow$  reprime mais,  $\leftrightarrow$  não interfere,  $\top$  impede.

Considerações: DBD- $\alpha$  refere-se a DBD + *Hinge*.

**Tabela 6 - Efeito da troca dos domínios na ativação transcricional em promotor de *TSHA***

Isoforma	Ligante	Domínios/efeitos		
		NTD	DBD	LBD
TR $\alpha$ +T3	Repressão +T3	↔		↓↓
TR $\alpha$ -T3	Ativação – T3	↑	↑↓	
TR $\beta$ +T3	Repressão +T3	↓↓	↓↓	
TR $\beta$ -T3	Ativação – T3	↑↑		
TR $\beta$ 2 +T3	Repressão +T3	⊥		
TR $\beta$ 2 -T3	Ativação – T3	↔		

Legenda - atividade transcricional: ↑ ativa, ↑↑ ativa mais, ↓ reprime, ↓↓ reprime mais, ↔ não interfere, ↑↓ restaura, ⊥ impede. Considerações: DBD- refere-se a DBD + *Hinge*.

### 7.3 PERSPECTIVAS FUTURAS

As quimeras foram construídas com a finalidade de apontar quais regiões dos receptores são responsáveis pelas diferentes funções entre as isoformas do TR em um dado promotor regulado positivamente ou negativamente. A intenção de investigar a atividade transcricional a partir da troca entre os domínios contribuiu para entender o papel de alguns domínios em diferentes respostas ao T3, em promotores regulados positivamente e negativamente.

No entanto, para entender e avaliar melhor a mecanismos de ação dos receptores e a função de cada domínio a partir de mudanças no receptor e quimeras por meio de interação como proteína/proteína, proteína/DNA, recrutamento de cofatores, além de afinidade com ligante, seria necessário uma maior diversidade de ensaios, como “GST pull-down” e ensaio de mobilidade eletroforética “EMSA” e outros. É necessária ainda a avaliação em promotores naturais.

Em conclusão, as diferentes respostas do TR ao T3, aqui observadas, são de fundamental importância para a compreensão das diferenças entre as isoformas do TR. O uso das quimeras pode ser considerado uma ferramenta importante para auxiliar na compreensão da ação do TR em promotores naturais e, ainda, no desenvolvimento de tiromiméticos seletivos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological reviews*. 2001 Jul;81(3):1097-142. PubMed PMID: 11427693. Epub 2001/06/28. eng.
2. Oetting A, Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2007 Jun;21(2):193-208. PubMed PMID: 17574003. Epub 2007/06/19. eng.
3. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine reviews*. 2010 Apr;31(2):139-70. PubMed PMID: 20051527. Pubmed Central PMCID: PMC2852208. Epub 2010/01/07. eng.
4. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *The Journal of clinical investigation*. 2012 Sep;122(9):3035-43. PubMed PMID: 22945636. Pubmed Central PMCID: PMC3433956. Epub 2012/09/05. eng.
5. David S. Cooper, Paul W. Ladenson, F.S. Greenspan. The thyroid gland in *Basic & Clinical Endocrinology*. 9 ed: Lange; 1999. 192 - 262 p.
6. Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*. 2009 Mar;150(3):1091-6. PubMed PMID: 19179434. Epub 2009/01/31. eng.
7. Shupnik MA, Greenspan SL, Ridgway EC. Transcriptional regulation of thyrotropin subunit genes by thyrotropin-releasing hormone and dopamine in pituitary cell culture. *The Journal of biological chemistry*. 1986 Sep 25;261(27):12675-9. PubMed PMID: 2427524. Epub 1986/09/25. eng.
8. Shupnik MA, Chin WW, Habener JF, Ridgway EC. Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone. *The Journal of biological*

chemistry. 1985 Mar 10;260(5):2900-3. PubMed PMID: 3972809. Epub 1985/03/10. eng.

9. Hollenberg AN, Monden T, Flynn TR, Boers ME, Cohen O, Wondisford FE. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1995 May;9(5):540-50. PubMed PMID: 7565802. Epub 1995/05/01. eng.

10. Carvalho GA, Ramos HE. [Thyroid hormone resistance syndrome]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2004 Feb;48(1):83-92. PubMed PMID: 15611821. Epub 2004/12/22.

11. Sinha R, Yen PM. Cellular Action of Thyroid Hormone. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth MA: MDTText.com, Inc.; 2000.

12. Thompson CC, Weinberger C, Lebo R, Evans RM. Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system. *Science (New York, NY)*. 1987 Sep 25;237(4822):1610-4. PubMed PMID: 3629259. Epub 1987/09/25. eng.

13. Sonoda J, Pei L, Evans RM. Nuclear receptors: decoding metabolic disease. *FEBS letters*. 2008 Jan 9;582(1):2-9. PubMed PMID: 18023286. Pubmed Central PMCID: PMC2254310. Epub 2007/11/21. eng.

14. Robinson-Rechavi M, Carpentier AS, Duffraisse M, Laudet V. How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? *Trends in genetics : TIG*. 2001 Oct;17(10):554-6. PubMed PMID: 11585645. Epub 2001/10/05. eng.

15. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. 1999 Apr 16;97(2):161-3. PubMed PMID: 10219237. Epub 1999/04/29. eng.

16. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological reviews*. 2006 Dec;58(4):685-704. PubMed PMID: 17132848. Epub 2006/11/30. eng.
17. Aranda A, Pascual A. Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews*. 2001 Jul;81(3):1269-304. PubMed PMID: 11427696. Epub 2001/06/28. eng.
18. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schutz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995 Dec 15;83(6):835-9. PubMed PMID: 8521507. Epub 1995/12/15. eng.
19. Huang P, Chandra V, Rastinejad F. Structural overview of the nuclear receptor superfamily: insights into physiology and therapeutics. *Annual review of physiology*. 2010;72:247-72. PubMed PMID: 20148675. Pubmed Central PMCID: PMC3677810. Epub 2010/02/13. eng.
20. Fattori J, de Carvalho Indolfo N, de Oliveira Campos JCL, Videira NB, Bridi AV, Doratioto TR, et al. Investigation of Interactions between DNA and Nuclear Receptors: A Review of the Most Used Methods. *Nuclear Receptor Research*. 2014;1.
21. Glass CK. Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *The Journal of clinical investigation*. 2006 Mar 1;116(3):556-60. PubMed PMID: 16511587.
22. Barra GBVLFPR, Rutnéia P; Alessandra M. Campos; Fanny N. Moura; Sandra M.G. Dias; Igor Polikarpov; Ralff C.J. Ribeiro; Luiz Alberto Simeoni; Francisco A.R. Neves. Mecanismo molecular da ação do hormônio tireoideano *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2004;vol.48(no.1 São Paulo).
23. Nelson CC, Hendy SC, Romaniuk PJ. Relationship between P-box amino acid sequence and DNA binding specificity of the thyroid hormone receptor. The effects of sequences flanking half-sites in thyroid hormone response elements. *The Journal of*

biological chemistry. 1995 Jul 14;270(28):16988-94. PubMed PMID: 7622519. Epub 1995/07/14. eng.

24. Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* (New York, NY). 1988 May 13;240(4854):889-95. PubMed PMID: 3283939. Epub 1988/05/13. eng.

25. Schwabe JW, Neuhaus D, Rhodes D. Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature*. 1990 Nov 29;348(6300):458-61. PubMed PMID: 2247153. Epub 1990/11/29. eng.

26. Nolte RT, Wisely GB, Westin S, Cobb JE, Lambert MH, Kurokawa R, et al. Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature*. 1998 Sep 10;395(6698):137-43. PubMed PMID: 9744270. Epub 1998/09/23. eng.

27. Cavailles V, Dauvois S, Danielian PS, Parker MG. Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 Oct 11;91(21):10009-13. PubMed PMID: 7937828.

28. Ribeiro RC, Apriletti JW, Wagner RL, Feng W, Kushner PJ, Nilsson S, et al. X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 1998 Apr;65(1-6):133-41. PubMed PMID: 9699866. Epub 1998/08/12. eng.

29. Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*. 1995 Dec 14;378(6558):690-7. PubMed PMID: 7501015. Epub 1995/12/14. eng.

30. Renaud JP, Rochel N, Ruff M, Vivat V, Chambon P, Gronemeyer H, et al. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*. 1995 Dec 14;378(6558):681-9. PubMed PMID: 7501014. Epub 1995/12/14. eng.

31. Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature*. 1995 Jun 1;375(6530):377-82. PubMed PMID: 7760929. Epub 1995/06/01. eng.
32. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):753-8. PubMed PMID: 9338790. Epub 1997/10/24 21:29. eng.
33. Privalsky ML. The role of corepressors in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Annual review of physiology*. 2004;66:315-60. PubMed PMID: 14977406. Epub 2004/02/24. eng.
34. 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. *Pharmacological reviews*. 2006 Dec;58(4):705-11. PubMed PMID: 17132849. Epub 2006/11/30. eng.
35. Rastinejad F, Huang P, Chandra V, Khorasanizadeh S. Understanding nuclear receptor form and function using structural biology. *Journal of molecular endocrinology*. 2013 Dec;51(3):T1-T21. PubMed PMID: 24103914. Pubmed Central PMCID: PMC3871882. Epub 2013/10/10. eng.
36. Glass CK. Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers. *Endocrine reviews*. 1994 Jun;15(3):391-407. PubMed PMID: 8076589. Epub 1994/06/01. eng.
37. Feng DF, Doolittle RF. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *Journal of molecular evolution*. 1987;25(4):351-60. PubMed PMID: 3118049. Epub 1987/01/01. eng.
38. Biddie SC, John S. Minireview: Conversing with chromatin: the language of nuclear receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2014 Jan;28(1):3-15.

PubMed PMID: 24196351. Pubmed Central PMCID: PMC3874455. Epub 2013/11/08. eng.

39. Darimont BD, Wagner RL, Apriletti JW, Stallcup MR, Kushner PJ, Baxter JD, et al. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes & development*. 1998 Nov 1;12(21):3343-56. PubMed PMID: 9808622. Pubmed Central PMCID: PMC317236. Epub 1998/11/10. eng.

40. Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*. 1986 Dec 18-31;324(6098):641-6. PubMed PMID: 2879243. Epub 1986/12/18. eng.

41. Zhao RL, Sun B, Liu Y, Li JH, Xiong WL, Liang DC, et al. Cloning and identification of a novel thyroid hormone receptor beta isoform expressed in the pituitary gland. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014 Apr;389(1-2):141-50. PubMed PMID: 24481752. Epub 2014/02/01. eng.

42. Nakai A, Sakurai A, Bell GI, DeGroot LJ. Characterization of a third human thyroid hormone receptor coexpressed with other thyroid hormone receptors in several tissues. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 1988 Nov;2(11):1087-92. PubMed PMID: 2464749. Epub 1988/11/01. eng.

43. Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, et al. Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science (New York, NY)*. 1989 Apr 7;244(4900):76-9. PubMed PMID: 2539642. Epub 1989/04/07. Eng.

44. Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocrine reviews*. 1993 Apr;14(2):184-93. PubMed PMID: 8325251. Epub 1993/04/01. eng.

45. Flamant F, Samarut J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2003 Mar;14(2):85-90. PubMed PMID: 12591179. Epub 2003/02/20. eng.

46. Williams GR. Cloning and characterization of two novel thyroid hormone receptor beta isoforms. *Molecular and cellular biology*. 2000 Nov;20(22):8329-42. PubMed PMID: 11046130. Pubmed Central PMCID: PMC102140. Epub 2000/10/25. eng.
47. Jones I, Ng L, Liu H, Forrest D. An intron control region differentially regulates expression of thyroid hormone receptor beta2 in the cochlea, pituitary, and cone photoreceptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2007 May;21(5):1108-19. PubMed PMID: 17341594. Epub 2007/03/08. eng.
48. Wikstrom L, Johansson C, Salto C, Barlow C, Campos Barros A, Baas F, et al. Abnormal heart rate and body temperature in mice lacking thyroid hormone receptor alpha 1. *The EMBO journal*. 1998 Jan 15;17(2):455-61. PubMed PMID: 9430637. Pubmed Central PMCID: PMC1170396. Epub 1998/02/28. eng.
49. Forrest D, Hanebuth E, Smeyne RJ, Everds N, Stewart CL, Wehner JM, et al. Recessive resistance to thyroid hormone in mice lacking thyroid hormone receptor beta: evidence for tissue-specific modulation of receptor function. *The EMBO journal*. 1996 Jun 17;15(12):3006-15. PubMed PMID: 8670802. Pubmed Central PMCID: PMC450242. Epub 1996/06/17. eng.
50. Fraichard A, Chassande O, Plateroti M, Roux JP, Trouillas J, Dehay C, et al. The T3R alpha gene encoding a thyroid hormone receptor is essential for post-natal development and thyroid hormone production. *The EMBO journal*. 1997 Jul 16;16(14):4412-20. PubMed PMID: 9250685. Pubmed Central PMCID: PMC1170067. Epub 1997/07/16. eng.
51. Gothe S, Wang Z, Ng L, Kindblom JM, Barros AC, Ohlsson C, et al. Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation. *Genes & development*. 1999 May 15;13(10):1329-41. PubMed PMID: 10346821. Pubmed Central PMCID: PMC316730. Epub 1999/05/27. eng.

52. Refetoff S, Weiss RE, Usala SJ. The syndromes of resistance to thyroid hormone. *Endocrine reviews*. 1993 Jun;14(3):348-99. PubMed PMID: 8319599. Epub 1993/06/01. eng.
53. Weiss RE, Forrest D, Pohlenz J, Cua K, Curran T, Refetoff S. Thyrotropin regulation by thyroid hormone in thyroid hormone receptor beta-deficient mice. *Endocrinology*. 1997 Sep;138(9):3624-9. PubMed PMID: 9275045. Epub 1997/09/01. Eng.
54. Abel ED, Ahima RS, Boers ME, Elmquist JK, Wondisford FE. Critical role for thyroid hormone receptor beta2 in the regulation of paraventricular thyrotropin-releasing hormone neurons. *The Journal of clinical investigation*. 2001 Apr;107(8):1017-23. PubMed PMID: 11306605. Pubmed Central PMCID: PMC199552. Epub 2001/04/18. eng.
55. Abel ED, Boers ME, Pazos-Moura C, Moura E, Kaulbach H, Zakaria M, et al. Divergent roles for thyroid hormone receptor beta isoforms in the endocrine axis and auditory system. *The Journal of clinical investigation*. 1999 Aug;104(3):291-300. PubMed PMID: 10430610. Pubmed Central PMCID: PMC408418. Epub 1999/08/03. Eng.
56. Chiamolera MI, Sidhaye AR, Matsumoto S, He Q, Hashimoto K, Ortiga-Carvalho TM, et al. Fundamentally distinct roles of thyroid hormone receptor isoforms in a thyrotroph cell line are due to differential DNA binding. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2012 Jun;26(6):926-39. PubMed PMID: 22570333. Pubmed Central PMCID: PMC3355539. Epub 2012/05/10. eng.
57. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine reviews*. 1999 Jun;20(3):321-44. PubMed PMID: 10368774. Epub 1999/06/16. eng.
58. Wu Y, Koenig RJ. Gene Regulation by Thyroid Hormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2000 8/1/;11(6):207-11.

59. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2007 Apr 27;282(17):12458-66. PubMed PMID: 17311926. Epub 2007/02/22. eng.
60. Liu Y, Xia X, Fondell JD, Yen PM. Thyroid hormone-regulated target genes have distinct patterns of coactivator recruitment and histone acetylation. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2006 Mar;20(3):483-90. PubMed PMID: 16254015. Epub 2005/10/29. eng.
61. Baniahmad A, Ha I, Reinberg D, Tsai S, Tsai MJ, O'Malley BW. Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993 Oct 1;90(19):8832-6. PubMed PMID: 8415616.
62. Hadzic E, Desai-Yajnik V, Helmer E, Guo S, Wu S, Koudinova N, et al. A 10-amino-acid sequence in the N-terminal A/B domain of thyroid hormone receptor alpha is essential for transcriptional activation and interaction with the general transcription factor TFIIB. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(8):4507-17.
63. Zhang J, Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Annual review of physiology*. 2000;62:439-66. PubMed PMID: 10845098. Epub 2000/06/09. eng.
64. Bodenner DL, Mroczynski MA, Weintraub BD, Radovick S, Wondisford FE. A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene. *The Journal of biological chemistry*. 1991 Nov 15;266(32):21666-73. PubMed PMID: 1657975. Epub 1991/11/15. eng.
65. Pernasetti F, Caccavelli L, Van de Weerd C, Martial JA, Muller M. Thyroid hormone inhibits the human prolactin gene promoter by interfering with activating

protein-1 and estrogen stimulations. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md). 1997 Jun;11(7):986-96. PubMed PMID: 9178758. Epub 1997/06/01. eng.

66. Schmidt ED, Cramer SJ, Offringa R. The thyroid hormone receptor interferes with transcriptional activation via the AP-1 complex. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993 Apr 15;192(1):151-60. PubMed PMID: 8386506. Epub 1993/04/15. eng.

67. 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. *Molecular and cellular biology*. 1997 May;17(5):2642-8. PubMed PMID: 9111334. Pubmed Central PMCID: PMC232114. Epub 1997/05/01. eng.

68. Tagami T, Park Y, Jameson JL. Mechanisms that mediate negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by the thyroid hormone receptor. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Aug 6;274(32):22345-53. PubMed PMID: 10428804. Epub 1999/07/31. eng.

69. Lazar MA. Thyroid hormone action: a binding contract. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Aug;112(4):497-9. PubMed PMID: 12925689. Pubmed Central PMCID: PMC171396. Epub 2003/08/20. eng.

70. Berghagen H, Ragnhildstveit E, Krogsrud K, Thuestad G, Apriletti J, Saatcioglu F. Corepressor SMRT functions as a coactivator for thyroid hormone receptor T3Ralpha from a negative hormone response element. *The Journal of biological chemistry*. 2002 Dec 20;277(51):49517-22. PubMed PMID: 12388540. Epub 2002/10/22. eng.

71. Sasaki S, Lesoon-Wood LA, Dey A, Kuwata T, Weintraub BD, Humphrey G, et al. Ligand-induced recruitment of a histone deacetylase in the negative-feedback regulation of the thyrotropin beta gene. *The EMBO journal*. 1999 Oct 1;18(19):5389-98. PubMed PMID: 10508171.

72. Shibusawa N, Hashimoto K, Yamada M. Thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the cerebellum. *Cerebellum* (London, England). 2008;7(1):84-95. PubMed PMID: 18418668. Epub 2008/04/18. eng.
73. Madison LD, Ahlquist JA, Rogers SD, Jameson JL. Negative regulation of the glycoprotein hormone alpha gene promoter by thyroid hormone: mutagenesis of a proximal receptor binding site preserves transcriptional repression. *Molecular and cellular endocrinology*. 1993 Jul;94(1):129-36. PubMed PMID: 7690722. Epub 1993/07/01. eng.
74. Kamei Y, Xu L, Heinzl T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, et al. A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*. 1996 May 3;85(3):403-14. PubMed PMID: 8616895. Epub 1996/05/03. eng.
75. Caelles C, Gonzalez-Sancho JM, Munoz A. Nuclear hormone receptor antagonism with AP-1 by inhibition of the JNK pathway. *Genes & development*. 1997 Dec 15;11(24):3351-64. PubMed PMID: 9407028. Pubmed Central PMCID: PMC316827. Epub 1998/02/07. eng.
76. Santos GM, Afonso V, Barra GB, Togashi M, Webb P, Neves FA, et al. Negative regulation of superoxide dismutase-1 promoter by thyroid hormone. *Molecular pharmacology*. 2006 Sep;70(3):793-800. PubMed PMID: 16738222. Epub 2006/06/02. eng.
77. Wang D, Xia X, Liu Y, Oetting A, Walker RL, Zhu Y, et al. Negative regulation of TSHalpha target gene by thyroid hormone involves histone acetylation and corepressor complex dissociation. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md). 2009 May;23(5):600-9. PubMed PMID: 19196836. Pubmed Central PMCID: PMC2675953. Epub 2009/02/07. Eng.
78. Wang D, Xia X, Weiss RE, Refetoff S, Yen PM. Distinct and histone-specific modifications mediate positive versus negative transcriptional regulation of TSHalpha

promoter. PloS one. 2010 Mar 24;5(3):e9853. PubMed PMID: 20352046. Pubmed Central PMCID: PMC2844428. Epub 2010/03/31. Eng.

79. Angel P, Karim M. The role of jun, fos and the ap-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochim Biophys Acta 1991. p. 129-57 p.

80. Chatterjee VK, Lee JK, Rentoumis A, Jameson JL. Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1989 Dec;86(23):9114-8. PubMed PMID: 2480596. Pubmed Central PMCID: PMC298444. Epub 1989/12/01. eng.

81. Glass CK, Holloway JM, Devary OV, Rosenfeld MG. The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid hormone and estrogen response elements. Cell. 1988 Jul 29;54(3):313-23. PubMed PMID: 3396073. Epub 1988/07/29. eng.

82. Shupnik MA. Thyroid hormone suppression of pituitary hormone gene expression. Reviews in endocrine & metabolic disorders. 2000 Jan;1(1-2):35-42. PubMed PMID: 11704990. Epub 2001/11/14. eng.

83. Satoh T, Monden T, Ishizuka T, Mitsuhashi T, Yamada M, Mori M. DNA binding and interaction with the nuclear receptor corepressor of thyroid hormone receptor are required for ligand-independent stimulation of the mouse preprothyrotropin-releasing hormone gene. Molecular and cellular endocrinology. 1999 Aug 20;154(1-2):137-49. PubMed PMID: 10509808. Epub 1999/10/06. eng.

84. Guissouma H, Dupre SM, Becker N, Jeannin E, Seugnet I, Desvergne B, et al. Feedback on hypothalamic TRH transcription is dependent on thyroid hormone receptor N terminus. Molecular endocrinology (Baltimore, Md). 2002 Jul;16(7):1652-66. PubMed PMID: 12089358. Epub 2002/06/29. eng.

85. Chan IH, Privalsky ML. Isoform-specific transcriptional activity of overlapping target genes that respond to thyroid hormone receptors alpha1 and beta1. Molecular

endocrinology (Baltimore, Md). 2009 Nov;23(11):1758-75. PubMed PMID: 19628582. Pubmed Central PMCID: PMC2775939. Epub 2009/07/25. eng.

86. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2001 May 4;276(18):14987-95. PubMed PMID: 11145963. Epub 2001/01/19. Eng.

87. Togashi M, Borngraeber S, Sandler B, Fletterick RJ, Webb P, Baxter JD. Conformational adaptation of nuclear receptor ligand binding domains to agonists: potential for novel approaches to ligand design. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2005 Feb;93(2-5):127-37. PubMed PMID: 15860255. Epub 2005/04/30. Eng.

88. Figueira ACM, Saidenberg DM, Souza PCT, Martínez L, Scanlan TS, Baxter JD, et al. Analysis of Agonist and Antagonist Effects on Thyroid Hormone Receptor Conformation by Hydrogen/Deuterium Exchange. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2011 Jan;25(1):15-31. PubMed PMID: 21106879.

89. 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. *Journal of molecular biology*. 2006 Jul 14;360(3):586-98. PubMed PMID: 16781732. Epub 2006/06/20. Eng.

90. Chiellini G, Apriletti JW, Yoshihara HA, Baxter JD, Ribeiro RC, Scanlan TS. A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor. *Chemistry & biology*. 1998 Jun;5(6):299-306. PubMed PMID: 9653548. Epub 1998/07/08. eng.

91. Wagner RL, Huber BR, Shiau AK, Kelly A, Cunha Lima ST, Scanlan TS, et al. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2001 Mar;15(3):398-410. PubMed PMID: 11222741. Epub 2001/02/27. eng.

92. Bleicher L, Aparicio R, Nunes FM, Martinez L, Gomes Dias SM, Figueira ACM, et al. Structural basis of GC-1 selectivity for thyroid hormone receptor isoforms. *BMC Structural Biology*. 2008;8:8. PubMed PMID: 18237438.
93. Hollenberg AN, Monden T, Wondisford FE. Ligand-independent and -dependent functions of thyroid hormone receptor isoforms depend upon their distinct amino termini. *The Journal of biological chemistry*. 1995 Jun 16;270(24):14274-80. PubMed PMID: 7782283. Epub 1995/06/16. eng.
94. Zhu XG, McPhie P, Lin KH, Cheng SY. The differential hormone-dependent transcriptional activation of thyroid hormone receptor isoforms is mediated by interplay of their domains. *The Journal of biological chemistry*. 1997 Apr 4;272(14):9048-54. PubMed PMID: 9083030. Epub 1997/04/04. eng.
95. Hahm JB, Privalsky ML. Research resource: identification of novel coregulators specific for thyroid hormone receptor-beta2. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2013 May;27(5):840-59. PubMed PMID: 23558175. Pubmed Central PMCID: PMC3634115. Epub 2013/04/06. eng.
96. Hahm JB, Schroeder AC, Privalsky ML. The two major isoforms of thyroid hormone receptor, TRalpha1 and TRbeta1, preferentially partner with distinct panels of auxiliary proteins. *Molecular and cellular endocrinology*. 2014 Mar 5;383(1-2):80-95. PubMed PMID: 24325866. Epub 2013/12/12. eng.
97. Baxter JD, Dillmann WH, West BL, Huber R, Furlow JD, Fletterick RJ, et al. Selective modulation of thyroid hormone receptor action. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2001 Jan-Mar;76(1-5):31-42. PubMed PMID: 11384861. Epub 2001/06/01. eng.
98. Masters JR. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature reviews Cancer*. 2002 Apr;2(4):315-9. PubMed PMID: 12001993. Epub 2002/05/11. eng.

99. Jiang T, Xing B, Rao J. Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. *Biotechnology & genetic engineering reviews*. 2008;25:41-75. PubMed PMID: 21412349. Epub 2008/01/01. eng.
100. Lin CJ, Barbosa AS. Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2002;46:330-40.
101. Kim TK, Eberwine JH. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2010 Aug;397(8):3173-8. PubMed PMID: 20549496. Pubmed Central PMCID: PMC2911531. Epub 2010/06/16. eng.
102. Tian H, Mahajan MA, Wong CT, Habeos I, Samuels HH. The N-Terminal A/B domain of the thyroid hormone receptor-beta2 isoform influences ligand-dependent recruitment of coactivators to the ligand-binding domain. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2006 Sep;20(9):2036-51. PubMed PMID: 16645037. Epub 2006/04/29. Eng.
103. Yang Z, Hong SH, Privalsky ML. Transcriptional anti-repression. Thyroid hormone receptor beta-2 recruits SMRT corepressor but interferes with subsequent assembly of a functional corepressor complex. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Dec 24;274(52):37131-8. PubMed PMID: 10601274. Pubmed Central PMCID: PMC2701910. Epub 1999/12/22. Eng.
104. Hollenberg AN, Monden T, Madura JP, Lee K, Wondisford FE. Function of nuclear co-repressor protein on thyroid hormone response elements is regulated by the receptor A/B domain. *The Journal of biological chemistry*. 1996 Nov 8;271(45):28516-20. PubMed PMID: 8910480. Epub 1996/11/08. Eng.
105. Langlois M, ZANGER K MT, SAFER JD, HOLLENBERG AN, AND, FE. W. A unique role of the beta-2 thyroid hormone receptor isoform in negative regulation by thyroid hormone. Mapping of a novel amino-terminal domain important for ligand-independent activation. *The Journal of biological chemistry*. 1997;272(24927-33).