



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Efeito da proteína citosólica ligante de triiodotironina (p38CTBP) na regulação da transcrição mediada por T3 e suas interações com proteínas nucleares

Aluno: Ranieri Rodrigues de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Tese submetida à banca examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Ciências da Saúde

BRASÍLIA

2007

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia Molecular da
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Oração de agradecimento

Deus pai criador do universo!

Dirijo-Te estas humildes palavras em agradecimento pelos benefícios que obtive através da tua infinita bondade, graça e permissão.

Envio meus humildes pensamentos de gratidão, a todos os bons Espíritos, Teus emissários, que executaram e me conduziram a esta grande conquista.

Peço que afaste de mim o sentimento de orgulho que poderia impossibilitar-me o reconhecimento da minha pequenez perante a imensidão do conhecimento científico e do tão iluminado benefício que me concedestes.

Reconheço a Tua Grandeza, meu Pai, e acredito que avançaremos ainda mais na ciência quanto mais abirmos nossa mente e coração à essência divina.

Obrigado, Meu Pai!

Adaptado do livro: *Preces Espíritas* de José Lourenço Filho

Agradecimentos

Ao meu saudoso pai e minha querida mãe e irmãos que foram a base para que tudo isto pudesse acontecer.

À minha esposa Rutinha, minha maior inspiração nos últimos 10 anos de minha vida, a quem eu tenho como modelo de integridade, responsabilidade e organização. Obrigado por tornar os obstáculos do dia a dia mais fácil. Razão de minha vida, te agradeço pelo presente maior que recebi em toda minha vida, nosso lindo filho e abençoado Fernando. Hoje sei, graças a você principalmente, que o bem mais precioso que homem pode ter é uma família.

Aos meus filhos frutos de um amor verdadeiro, Fernando e Bárbara, Bárbara que depois de um mês da defesa estará nos brindando com sua presença, deixando assim, o aconchego do ventre materno. Assim a espero, pois caso contrário, provavelmente terei que sair da defesa direto para a maternidade.

Ao meu orientador, Luiz Alberto Simeoni, um verdadeiro orientador, não apenas na academia, mas também um orientador de vida. Sua vasta experiência laboratorial, paciência, organização e o senso crítico em pesquisa científica foram fundamentais para direcionar e desviar este trabalho de caminhos errôneos. Pessoa admirável e basta um tempo de convívio para percebermos a pessoa amiga que ele é. Realmente tenho muito a agradecer pelo tempo que estive sob sua orientação.

Ao professor Francisco de Assis Rocha Neves, pela imensa ajuda no presente trabalho, por sua dedicação ao laboratório e esforços bem sucedidos em manter a estrutura da Farmacologia Molecular juntamente com os demais professores, pela sua admirável capacidade de trabalho e raciocínio que beneficia a todos que o cercam.

À professora Marie Togashi, pelo auxílio fundamental prestado durante sua estada em São Francisco, Califórnia, nos enviando reagentes, bem como nos auxiliando em bancada,

dividindo sua experiência com alunos de diferentes orientadores neste início promissor que terá como professora adjunta da UnB.

Ao pesquisador Dr. Satoro Suzuki e sua equipe da Universidade e Escola de Medicina de Shinshu, Japão; pela gentileza e pelos plasmídeos enviados, que sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

A técnica e amiga de laboratório Rilva, que tenho como exemplo também de profissional dedicada e responsável. Colaboradora fundamental do laboratório de Farmacologia Molecular e uma das principais responsáveis pela ordem que ela tanto luta em implantar e manter no ambiente trabalho. À Cristina Simeoni por sua amizade colaboração fundamental em questões burocráticas e auxílio à todos, desde os alunos de graduação até os professores, pessoa maravilhosa sem dúvida.

Aos amigos que fiz no laboratório, Gustavo, Adriana, Viviane, Angélica, Manuela, Tiago, Marlon, Monalisa, Karime, karine, Daniela, Maria Cristina e Fanny. A todos que de alguma forma tornou mais agradável a convivência no laboratório ou contribuíram de maneira mais direta na execução deste trabalho. Em especial ao Gustavo, pela sua prontidão e sua grande ajuda nos ensaios de GST, também agradeço especialmente a Adriana que sempre tem uma boa palavra ou idéia para compartilhar, me perdoe se esqueci de alguém.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos alunos de PIBIC, Ana Carolina, Vinícius e Bruna, (iniciação científica), que muito contribuíram dedicando suas horas no auxílio e realização de experimentos. Em especial . Ana Carolina que está dando prosseguimento a este trabalho em São Francisco, Califórnia.

CONTEÚDO

1. LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
2. RESUMO.....	6
3. ABSTRACT.....	7
4. INTRODUÇÃO.....	8
4.1. MECANISMOS MOLECULARES DE AÇÃO DO HORMÔNIO TIREOIDEANO.....	8
4.1.1. <i>Genes regulados positivamente pelo T₃</i>	10
4.1.2. <i>Genes Regulados Negativamente pelo T₃</i>	11
4.2. MECANISMOS DE TRANSPORTE CELULAR ENVOLVIDOS NA DINÂMICA DOS HT.....	12
4.2.1. <i>Transportadores de monocarboxilatos (MCT)</i>	13
4.2.2. <i>Transportadores de ânions orgânicos (OATPs)</i>	14
4.2.3. <i>Proteínas transportadoras de aminoácidos</i>	15
4.2.4. <i>Proteína citosólica ligante de T₃ (CTBP)</i>	16
5. OBJETIVOS.....	24
5.1. GERAL.....	24
5.2. ESPECÍFICOS.....	24
6. MATERIAS E MÉTODOS.....	24
6.1. PLASMÍDEOS.....	24
6.2. TRANSFORMAÇÃO DAS BACTÉRIAS COM OS PLASMÍDEOS.....	25
6.3. PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS.....	25
6.4. CULTURA DE CÉLULAS E MÉTODO DE TRANSFEÇÃO.....	25
6.5. ENSAIOS DE “WESTERN BLOTTING”.....	27
6.6. ENSAIOS DE TRANSPORTE TOTAL DE HT EM CÉLULAS COM SUPER-EXPRESSÃO DE CTBP.....	28
6.7. ENSAIOS DE TRANSPORTE NUCLEAR.....	28
6.8. ENSAIO DE EFLUXO DE [¹²⁵ I]T ₃	29
6.9. CROMATOGRAFIA EM COLUNAS DE SEPHADEX.....	29
6.10. TRANSCRIÇÃO E TRADUÇÃO <i>IN VITRO</i>	30
6.11. ELETROFORESE DE PROTEÍNAS EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SULFATO DUODECIL SÓDICO (SDS-PAGE).....	30
6.12. EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>ESCHERICHIA COLI</i>	31
6.13. ENSAIOS DE “GST PULL-DOWN”.....	32
6.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
7. RESULTADOS.....	35
7.1. ENSAIOS DE “WESTERN BLOTTING” DAS CÉLULAS TRANSFECTADAS COM CTBP.....	35
7.2. EFEITO DA PROTEÍNA CTBP NO INFLUXO DE [¹²⁵ I]T ₃ EM CÉLULAS CHO.....	36
7.3. EFEITO DA PROTEÍNA CTBP NO EFLUXO DE [¹²⁵ I] T ₃ EM CÉLULAS CHO.....	38
7.4. EFEITO DA CTBP NOS ENSAIOS DE GENE REPÓRTER.....	40
7.5. CTBP E SUAS INTERAÇÕES COM PROTEÍNAS NUCLEARES.....	42
8. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	43

9. BIBLIOGRAFIA..... 49

10. ANEXO 63

ARTIGO: CTBP INTERACTS WITH NUCLEAR PROTEINS: TR AND SMRT, MEDIATES T3-TRANSPORT AND SELECTIVELY AFFECTS TR FUNCTION ON DIFFERENT RESPONSE ELEMENTS..... 63

1. LISTA DE ABREVIATURAS

[¹²⁵I]T₃ - 3,5,3'-triiodo-L-tironina radiomarcada com ¹²⁵I

BOD - Câmara Climática

BSA - Albumina sérica bovina

CHO - “Chinese Hamster Ovary” - células de ovário de Hamster Chinês

CMV - Citomegalovirus

COS-7 - Células de rim de macaco africano

CTBP - Proteína citosólica ligante de T₃, também p38CTBP, μ-Crystallin, CRYM.

DMSO - Dimetilsulfóxido

DR4 - Sequência correspondente à repetição direta da sequência AGGTCA espaçada por 4 nucleotídeos

D-T₃ - 3,5,3' - triiodo-D-tironina

D-T₄ - 3,5,3'5,-triiodo-D-tironina

DTT - Ditioneitol

EC50 - Concentração molar do agonista onde se obteve metade da resposta máxima.

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

F2 - Sequência correspondente a um palíndromo invertido da sequência AGGTCA

GH3 - Linhagem celular tumoral de pituitária de rato

GRIP1 - Proteína-1 de interação ao receptor glicocorticóide

GST - Enzima glutationa-S-transferase

GST SRC1 - Co-ativador SRC1 fusionado a GST

GST TR - Receptor do hormônio tireoideano fusionado a GST

GST-SMRT - Co-repressor SMRT fusionado a GST

HDACs - Desacetilases de histonas

HEK 293 - células de linhagens de rim embrionário humano

HT - Hormônios Tireoideanos

L-T₃ - 3,5,3'-triiodo-L-tironina (T3)

L-T₄ - 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina (T4)

MCT - "Monocarboxilates Transporters"- transportadores de monocarboxilatos.

NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma oxidada)

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)

NADP - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma oxidada)

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

N-COR - "Nuclear Receptor Corepressor" Co-repressor dos receptores nucleares

N-COR - Co-repressor de receptor nuclear

OCD - Ornitina-ciclodeaminase

PAL - Seqüência correspondente a um palíndromo da seqüência AGGTCA

PBS - Solução tampão fosfato

pcDNA-CTBP - Vetor de expressão da proteína CTBP

pCMX - Vetor de expressão que possui os promotores T7 e CMX

pGEX - Vetor para expressão de proteína de fusão com GST

rT₃ - 3,5',3'-triiodo-L-tironina - T₃-reverso

RXR - Receptor do ácido 9-cis-retinóico

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

SFB - Soro fetal bovino

SMRT - "Silencing Mediator of Retinoic and Thyroid Receptor" - Mediador do silenciamento do receptor do ácido retinóico e do receptor do hormônio tireoideano

SRC-1 - Co-ativador do receptor de esteróide 1.

T₃ - 3,5,3'-triiodo-L-tironina

T₄ - 3,5,3',5'-tetraiodo-L-tironina

T₇ - Bacteriófago T7

TBG - Globulina ligadora de hormônios tireoideanos

Tg - Tireoglobulina

TPO - Tireoperoxidase

TR - Receptor do hormônio tireoideano

TRE - Elemento responsivo ao hormônio tireoideano

TRE-DR4-luc - Sequência do TRE-DR4 controlando o gene da luciferase

TRE-F2-luc - Sequência do TRE-F2 controlando o gene da luciferase

TRE-PAL-luc - Sequência do TRE-PAL controlando o gene da luciferase

TRH - Hormônio liberador de TSH

TRH-LUC - Sequência do promotor TRH controlando o gene da luciferase

TRIAC - Ácido 3,3',5-triiodotiroacético.

TRIS - Hidroximetil Amino Metano

TR_{β1} - Receptor do hormônio tireoideano (isoforma β1)

TSH - Hormônio estimulador da tireóide

2. RESUMO

Introdução: A importância das proteínas citoplasmática na captação, estoque e translocação nuclear dos hormônios tireoideanos ainda é pouco conhecida. Além do mais, a relação da proteína citosólica ligante de T₃ de 38kDa (p38CTBP ou simplesmente CTBP) com transporte nuclear de T₃ e transcrição gênica T₃ mediada é ainda controversa. O objetivo deste estudo foi investigar a função da CTBP na ativação do receptor de hormônio tireoideano (TR) mediada por T₃.

Métodos: Curvas dose resposta de T₃ foram realizadas em células CHO co-transfectadas com os plasmídeos expressando TRβ1, CTBP ou o gene da enzima luciferase controlado pelo promotor do TRH e elementos responsivos ao hormônio tireoideano (DR4, F2, PAL). Ensaio de transporte celular total e nuclear foram realizados em células CHO transfectadas ou não com CTBP. Uma vez que a CTBP pode estar localizada no núcleo, nós também medimos as interações da CTBP com TR e proteínas co-reguladoras tais como SMRT, SRC1.

Resultados: A hiper-expressão de CTBP aumentou a captação de [¹²⁵I]T₃, 61,6±9,4 cpm/μg de proteína em células controle para 151,6±23,7 cpm/μg de proteína (*p*<0,05). Em ensaios de gene repórter, a co-transfecção de CTBP aumentou a ativação máxima do TR no TRE-PAL em 42%. Além disso, a alta expressão de CTBP em células CHO aumentou o EC50 do T₃ no TRE-DR4 em 5,5 vezes. Por outro lado, no TRE-F2 e promotor do TRH, um gene regulado negativamente pelo T₃, a co-transfecção da CTBP não alterou a ativação ou repressão mediada por T₃, respectivamente. De modo interessante, os ensaios de GST pull-down mostraram que a CTBP interagiu diretamente *in vitro* com GST-TRβ1 e GST-SMRT, mas não com GST-SRC1

Conclusão: Foi demonstrado neste trabalho que a CTBP aumentou as concentrações intracelulares de T₃ e modulou a transcrição gênica mediada por T₃ de um modo TRE-específico. Interessantemente, a CTBP interagiu diretamente com TRβ1 e com o co-repressor SMRT, mas não com SRC1. Numa análise geral, estes resultados sugerem que a CTBP pode afetar a ação do T₃ não somente alterando níveis intracelulares de T₃, mas também interagindo com proteínas nucleares envolvidas na resposta ao T₃

3. ABSTRACT

Background: The importance of the cytoplasmatic proteins in the uptake, storage and nuclear translocation of thyroid hormone is poorly understood. Moreover, the relation of cytosolic thyroid binding protein 38kDa (p38CTBP or simply CTBP) with nuclear transport of T₃ and T₃-mediated gene transcription is still controversial. The aim of this work was to investigate the role of CTBP in the T₃-mediated thyroid receptor (TR) activation.

Methods: T₃ dose response curves were performed in CHO cells cotransfected with plasmids expressing TRβ1, CTBP, and thyroid responsive elements driving the luciferase gene (TREs – DR4, F2, PAL and TRH promoter). Whole cell and nuclear [¹²⁵I]T₃ transport assays were performed in CHO cells transfected or not with CTBP. Since CTBP could be localized in the nucleus, we also measured the interactions of CTBP with TR and coregulator proteins such as SMRT, SRC1 through GST-pull down assays.

Results: Overexpression of CTBP increased [¹²⁵I]T₃ uptake from 61.6±9.4 cpm/μg protein in control cells to 151.6±23.7 cpm/μg protein (*p*<0.05). In reporter gene assays, CTBP cotransfection increased TR maximum activation on TRE-PAL by 42%. Additionally CTBP overexpression in CHO cells increased T₃ EC50 on TRE-DR4 by 5.5 fold. On the other hand, on the TRE-F2 and TRH promoter, a T₃ negatively regulated gene, the co-transfection of CTPB did not change T₃ activation and repression, respectively. Interesting, GST pull-down assays showed that CTBP directly interacted *in vitro* with GST-TRβ1 and GST-SMRT, but not GST-SRC1.

Conclusion: We demonstrated that CTBP increases intracellular T₃ concentration and modulates T₃-mediated gene transcription and this effect is TRE specific. Furthermore, CTBP directly interacted with TRβ1 and the corepressor SMRT, but not with coactivator GRIP1. Taken together, these results suggest that CTBP may affect T₃ action not only by changing T₃ intracellular levels, but also interacting with proteins involved in T₃ response.

4. INTRODUÇÃO

4.1. Mecanismos moleculares de ação do hormônio tireoideano.

Os hormônios tireoideanos (HT) desempenham um importante papel no desenvolvimento, diferenciação, crescimento e em inúmeros processos metabólicos de mamíferos (UNDERWOOD, 1986; WEISS, 1996; THOMPSON, 2000; BASSETT, 2003; GARDNER, 2006).

A glândula tireóide constitui a fonte da síntese e secreção dos HT. Sumariamente, a biossíntese de HT pela glândula tireóide envolve as seguintes etapas: (a) captação de iodeto a partir do plasma e transporte através da célula folicular tireóide pelo co-transportador sódio iodeto (NIS, Na⁺/I⁻Simporter) – atividade estritamente relacionada à bomba Na⁺/K⁺ ATPase; (b) oxidação do íon iodeto, catalisada pela enzima peroxidase tireóide (TPO) na presença de peróxido de hidrogênio. O iodo é incorporado a regiões específicas da Tireoglobulina (Tg) – resíduos tirosil hormonogênicos; (c) conjugação de moléculas de iodotirosina com a Tg para formar tiroxina (L-T₄) e triiodotironina (L-T₃); (d) proteólise da Tg após endocitose, com liberação de iodotironinas formadas e iodotirosinas livres; (e) desiodação de iodotirosinas na célula tireóide, com conservação e reutilização do iodeto liberado; (f) e, em certas circunstâncias, desiodação intratireoideana pela 5' desiodase do L-T₄ a L-T₃. Assim, a biossíntese hormonal é dependente da disponibilidade de iodo na região apical da célula folicular, da síntese adequada de Tireoglobulina e de enzimas envolvidas na incorporação do iodo a resíduos de tirosila (Tyr) da molécula de Tireoglobulina – etapa denominada organificação do iodo (VAISMAN, 2004).

Após a síntese dos HT ter seguido seu curso, a glândula tireóide secreta primariamente L-T₄ e, em menor quantidade, L-T₃. A secreção diária de L-T₄ é de cerca de 100 nmol e de 5 nmol de L-T₃ (GREENSPAN, 2001).

O crescimento e a função da tireóide e os efeitos periféricos dos HT são controlados basicamente por quatro mecanismos: (a) o clássico eixo hipotálamo- pituitária- tireóide, no qual o hormônio hipotalâmico de liberação da tireotropina (TRH) estimula a síntese e liberação do hormônio tireo-estimulante (TSH) que estimula o crescimento e secreção hormonal pela glândula

tireóide; (b) a pituitária e as desidases periféricas que modificam os efeitos do L-T₄ e L-T₃; (c) auto-regulação da maquinaria da síntese e secreção hormonal; (d) estimulação ou inibição da função tireoideana pelo receptor do TSH. Em adição, os efeitos do L-T₃ podem ser modificados pelo *status* do receptor do L-T₃ e potencialmente por agonistas ou antagonistas do receptor do L-T₃, (GREENSPAN, 2001). Os HT circulam no plasma sanguíneo ligado a proteínas. A ordem decrescente de afinidade de ligação é: 70% do L-T₄ e 60% de L-T₃ à globulina ligadora de HT (TBG), 15% do L-T₄ e 5% do L-T₃ à pré-albumina ligadora de hormônio tireoideano (TBPA) e à albumina em pequenas proporções (FELIG, 1995). A ligação dos HT a proteínas plasmáticas aumenta suas meias-vidas e assegura uma distribuição regular dos mesmos nos tecido-alvo (MENDEL, 1987). Na forma livre há, aproximadamente, 0,04% de L-T₄ e 0,4% de L-T₃ (FELIG, 1995).

O metabolismo periférico dos HT é um componente crítico de impacto destes hormônios na função intracelular nos tecidos. Os HT podem ser metabolizados por desidatação, conjugação, desaminação ou por reações enzimáticas de descarboxilação (KELLY, 2000). A principal fonte de produção de L-T₃ ocorre por meio da conversão do L-T₄, nos tecidos periféricos, pela enzima 5' desidase (KELLY, 2000). As desidases apresentam funções específicas devido às suas distintas características e formas de regulação. Até o momento foram clonadas três isoformas de desidases: tipo 1 (D1), tipo 2 (D2) e tipo 3 (D3) (BERRY, 1993; CROTEAU, 1995; CROTEAU, 1996). As três isoformas de desidases estão presentes em todos os mamíferos, indicando que a desidatação de HT é um componente intrínseco da homeostase destes hormônios. Assim, o T₃ derivado destas fontes é responsável pela maioria das ações genômicas dos hormônios tireoideanos (RIBEIRO, R. C., 1995; YEN, 2001; BARRA, 2004; FLAMANT, 2006).

O T₃ produz múltiplos efeitos fisiológicos, tais como: redução dos níveis de colesterol e lipoproteína de baixa densidade (LDL), emagrecimento, taquicardia e insuficiência cardíaca. Os HT circulam no plasma ligados às proteínas plasmáticas, ingressam nas células e se ligam aos receptores nucleares que promovem as suas ações sobre a transcrição gênica (BARRA, 2004; GARDNER, 2006). Estes receptores estão largamente distribuídos em diferentes tecidos (RIBEIRO, R. C. J., 1998; SHAHRARA, 1999; GARDNER, 2006) e pertencem a uma família

extensa de proteínas, a família dos receptores nucleares, que inclui os receptores para os hormônios esteróides, vitamina D e ácido retinóico (RIBEIRO, R. C. J., 1995). O T₃ exerce a sua ação no interior do núcleo celular, onde se liga às diferentes isoformas dos receptores do hormônio tireoideano (TR).

4.1.1. *Genes regulados positivamente pelo T₃*

Neste modelo, na ausência do ligante (T₃) o TR se encontra na forma de homodímeros ou heterodímeros associados a proteínas co-repressoras como “Silencing Mediator of Retinoic and Thyroid Receptor” (SMRT) e “Nuclear Receptor Corepressor” (N-COR) (MANGELSDORF, 1995; RIBEIRO, R. C., 1995; GLASS, 2000). Estes co-reguladores por meio de sua atividade desacetilase favorecem a condensação da cromatina, reprimindo assim a transcrição de genes controlados por sequências de nucleotídeos padrões, localizadas em diferentes regiões no DNA, denominadas elementos responsivos ao TR (TRE). Essas regiões são compostas pela sequência hexanucleotídica "AGGTCA" (UMESONO, 1991; WU, 2001; YEN, 2003), podendo estar organizadas em três orientações diferentes: na forma de repetição direta espaçada por 4 nucleotídeos quaisquer (DR-4), ou na forma de palíndromo invertido espaçada por seis nucleotídeos quaisquer (F2), ou, ainda, na forma de palíndromo sem nenhum espaçamento (PAL) (**figura 1**) (RIBEIRO, R. C. J., 1998). Este mecanismo é comum nos genes regulados positivamente pelo T₃. Aproximadamente trinta TREs naturais já foram identificados, sendo que a maioria é DR-4, seguido pelo F2 e mais raramente o PAL (YEN, 2001).

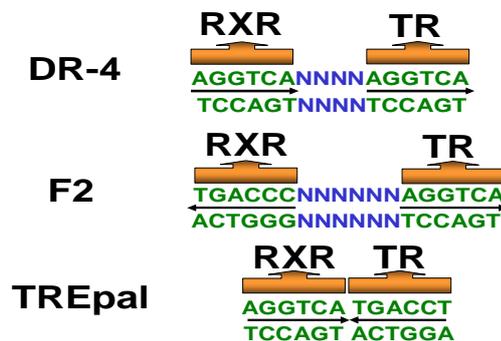


Figura 01. Elementos responsivos do receptor do hormônio tireoideano: Repetições diretas (DR-4), palíndromo invertido (F2) e palíndromo (PAL). N indica o número de nucleotídeos entre os hexâmeros. (Adaptado de (BARRA, 2004)).

Com a ligação do hormônio ao receptor, observa-se formação predominante de heterodímeros com o receptor do ácido 9-cis-retinóico (RXR), seguida de dissociação das proteínas co-repressoras e subseqüentemente, a associação com proteínas co-ativadoras como os co-ativadores do receptor de esteróide (SRC-1, SRC-2 e SRC-3) e o complexo de proteína que interage com o receptor de vitamina D/proteína associada ao TR (complexo DRIP-TRAP), dentre outras proteínas, que medeiam a estimulação de genes alvo e possuem atividade histona acetiltransferase (BANNISTER, 1996; OGRYZKO, 1996; MCKENNA, 1999). Com a acetilação das histonas, a cromatina é relaxada, o que facilita o acesso de outros fatores de transcrição e estimula o processo transcricional pela RNA polimerase (RIBEIRO, R. C. J., 1998; MCKENNA, 1999). Portanto, a ligação com o hormônio transforma o TR de um estado repressor para um estado ativador da transcrição de genes estimulados pelo T_3 (YEN, 2001).

4.1.2. Genes Regulados Negativamente pelo T_3

Os mecanismos que envolvem os genes regulados negativamente pelo HT, como o TRH (HOLLENBERG, 1995; SATOH, 1996), TSH (BURNSIDE, 1989; CHATTERJEE, 1989) são bem menos compreendidos. É provável que envolva a mesma classe de moléculas em TREs diferentes, denominados TREs negativos (nTRE ou NRE). Diferente dos elementos responsivos positivos, uma seqüência consenso para os nTREs ainda não foi estabelecida, mas já foi demonstrado que o TR é capaz de exercer a regulação inibitória da transcrição de diferentes genes por meio de nTREs divergentes em suas seqüências, da mesma forma que a ativação pelo T_3 utiliza uma variedade de TREs positivos, como o TRE-PAL, DR-4 e F2 (SATOH, 1999). Tal mecanismo é responsável pela inibição do T_3 na secreção de TRH e TSH pelo hipotálamo e hipófise respectivamente. Estudos de mutagênese localizaram esses nTREs próximos à região TATA-box, sugerindo que a regulação negativa pelo T_3 pode ser causada pela interferência do complexo de iniciação da transcrição (GUISOUMA, 2005).

4.2. Mecanismos de transporte celular envolvidos na dinâmica dos HT.

A magnitude das respostas aos HT é dependente da concentração intracelular do hormônio ativo, que por sua vez, depende da produção de HT, conversão periférica de T_4 em T_3 pelas desidases, e também do transporte de HT na membrana plasmática e nuclear das células. O controle da entrada e/ou saída de HT pode alterar sua concentração no interior da célula em até 10 vezes e ser, desta forma, um ponto regulador para a ação final do T_3 (NEVES, 2002; RITCHIE, 2003).

Com o intuito de proporcionar uma melhor compreensão da revisão sobre os estudos de transporte de hormônios tireoideanos, nos próximos parágrafos segue uma breve introdução dos protocolos utilizados para estudo de tais mecanismos.

O estudo do transporte dos HT em culturas de células é uma importante ferramenta para caracterização da captação e exportação de hormônios por diferentes tipos celulares. O transporte do HT através da membrana plasmática no sentido extracelular para o intracelular é denominado influxo e o sentido contrário recebe o nome de efluxo. Tanto o influxo quanto o efluxo do HT podem ser analisados *ex vivo* em uma cultura celular utilizando o HT marcado radioativamente (NEVES, 2002).

Até recentemente, os mecanismos de entrada de HT em células do tecido periférico eram pouco conhecidos. Devido ao caráter lipofílico dos HT, os autores deram maior destaque à difusão simples dos HT através da membrana plasmática, em detrimento dos transportes mediados por proteínas integrais de membrana (GREENSPAN, 1994; UTIGER, 1995). Entretanto, nos últimos vinte anos, diversos trabalhos vêm demonstrando que vários transportadores de membrana em diferentes tecidos carregam T_3 e/ou T_4 com diferentes cinéticas e afinidades, tais transportadores incluem: transportadores de aminoácidos, monocarboxilatos, carreadores de ânions orgânicos e proteínas “ATP-binding cassette (ABC) / multidrug-resistance” (mdr) (SAMSON, 1992; CAVALIERI, 1999; NEVES, 2002; FRIESEMA, 2003; RITCHIE, 2003; VAN DER PUTTEN, 2003; MITCHELL, 2005). Foi observado que o efluxo de T_3 varia consideravelmente entre os diversos tecidos. Por exemplo, células do tecido placentário (córion decidual) conseguem fazer o efluxo de aproximadamente 90% do conteúdo

intracelular de T₃ radiomarcado com ¹²⁵I ([¹²⁵I]T₃) acumulado após um período de 3h de pré-incubação com o hormônio marcado, enquanto que células dos ductos coletores da medula renal interna exportam próximo de 50%. D-T₄ e D-T₃ (estereoisômeros de L-T₄ e L-T₃, respectivamente) influenciam a saída de [¹²⁵I]T₃ em cultura primária de ventriculócitos de forma diferente em relação aos atriócitos, mostrando assim, uma diferença de afinidade entre os transportadores envolvidos no efluxo do T₃. De forma interessante, os transportadores responsáveis pelo influxo e efluxo de T₃ parecem ser diferentes dependendo do tipo celular, uma vez que o ácido 3,5,3'-triiodotiroacético (TRIAC), um análogo do T₃, inibe a captação de [¹²⁵I]T₃ sem interferir com sua saída em culturas primárias de cardiomiócitos (NEVES, 2002).

4.2.1. Transportadores de monocarboxilatos (MCT)

Um membro da família de proteínas transportadoras de monocarboxilatos também tem sido associado ao transporte de HT (FRIESEMA, 2003). A difusão de monocarboxilatos, tais como o lactato e o piruvato, através da membrana plasmática de células de mamíferos é facilitada por uma família de proteínas integrais de membrana conhecidas como transportadores de monocarboxilatos (MCTs).

Atualmente, no mínimo oito membros desta família foram identificados (GARCIA, 1994; LAFRENIERE, 1994; GARCIA, 1995; YOON, 1997; PRICE, 1998). Cada isoforma possui propriedades bioquímicas características tais como constante de cinética e sensibilidade e conhecidos inibidores de MCT. Muitas alterações na expressão destas proteínas podem ser desencadeadas com alterações fisiológicas, já os mecanismos moleculares que levam a estas alterações ainda são pouco conhecidos (ENERSON, 2003).

A isoforma de MCT8 foi identificada em 1994 por Lafreniere e cols. Nesta ocasião, os autores estudavam as bases cromossômicas e a regulação da inativação do cromossomo X. Enquanto caracterizavam fisicamente uma região no Xq13.2 conhecida por conter o centro de inativação X (XIC), eles identificaram um novo gene, o qual consistia de seis exons codificando para uma proteína de 12 domínios transmembrânicos, sugerindo função de um transportador (LAFRENIERE, 1994).

Posteriormente, Friesema e cols. (2003) testaram o efeito da expressão de MCT8 em ovócitos de xenopus através da injeção de cDNA codificante para esta proteína, o qual aumentou cerca de dez vezes a captação de L-T₄, L-T₃ e L-T₂ pelos ovócitos, sendo que o transporte foi fortemente inibido por L-T₄, L-T₄, D-T₄, L-T₃, D-L-T₃ e pelo ácido 3,3',5-triiodotiroacético (TRIAC) (FRIESEMA, 2003). Este carreador não transportou aminoácidos tais como Leu, Phe, Trp ou Tyr, demonstrando desta forma, que se trata de um membro da família MCT específico para o transporte de iodotironina (FRIESEMA, 2003).

Diversas mutações no receptor de hormônio tireoideano estão envolvidas em mecanismo de resistência aos HT em alguns pacientes. Entretanto, alterações do transporte de HT podem explicar síndromes de resistência a hormônios que ocorrem na ausência de mutações nos receptores (YEN, 2003). A identificação de pacientes com mutações no transportador de HT, transportador de monocarboxilatos 8 (MCT8), tem revelado uma importante função exercida por tais carreadores de membrana na disponibilidade intracelular de HT, especialmente em algumas regiões do sistema nervoso central. Indivíduos do sexo masculino hemizigotos para a proteína MCT-deficiente apresentam uma síndrome com dois componentes: um seria o defeito tireoideano caracterizado pelo aumento das concentrações séricas do T₃ total e livre e diminuição do T₄ total e livre, e também a diminuição do T₃-reverso (rT₃), bem como retardo psicomotor e do desenvolvimento, onde se pode observar distonia generalizada combinada com espasticidade, retardo mental, falta de comunicação verbal, pouco controle da cabeça e coordenação motora (SCHWARTZ, 2005). Como é comum nos casos de herança ligados ao cromossoma X, os homens são mais severamente afetados em termos dos defeitos neurológicos e tireoideanos, enquanto as mulheres portadoras apresentam somente leves alterações nos testes de função da tireóide. Recentemente, mutações no gene da MCT8 foram associadas como causa da síndrome de Allan-Herndon-Dudley, uma forma sindrômica de retardamento mental ligada ao cromossoma X descrita inicialmente em 1994 (ARAI, 1995; DUMITRESCU, 2006),

4.2.2. Transportadores de ânions orgânicos (OATPs)

Os polipeptídios transportadores de ânions orgânicos (rOatps em roedores e OATPs em humanos) pertencem a uma família em crescimento de genes de transportadores de ânions orgânicos/prostaglandina que podem mediar o transporte independente de sódio de numerosos

componentes endógenos ou xenobióticos anfipáticos (SUGIYAMA, 2003). Existem oito membros desta família em humanos, sendo que o rOATP foi o primeiro membro identificado desta família. O rOATP possui aproximadamente 80 kDa, dois sítios de glicosilação e doze domínios transmembrânicos (KULLAK-UBLICK, 1998; HAGENBUCH, 2000). A expressão tecidual dos OATPs varia entre os diferentes tipos de membros, entretanto, os tecidos com maior expressão são fígado, rins e cérebro (HSIANG, 1999). A captação de iodotironinas nativas (L-T₃ e L-T₄), bem como de seus derivados sulfatados, foi estimulada em oócitos de xenopus injetados com cRNA codificantes para alguns membros dos OATPs (FRIESEMA, 1999). Hsiang e cols. (1999) identificaram um novo membro da família dos OATPs (OATP2). Esta proteína tem expressão exclusiva no tecido hepático ao contrário de outros membros desta família de proteínas. OATP2 transporta a tiroxina, taurocolato e sulfato de desidroepiandrosterona (DHEAS) (HSIANG, 1999). Outro membro da mesma família recentemente identificado foi o Oatp14, um transportador de ânion orgânico caracterizado em tecido de ratos, possui uma expressão preferencial na barreira hemato-encefálica, mais especificamente na membrana das células dos capilares cerebrais (SUGIYAMA, 2003). A captação de L-T₃ em células de linhagens de rim embrionário humano (HEK 293) transfectadas com o gene codificante para Oatp14 aumentou significativamente em relação às células transfectadas apenas com vetor. Entretanto, a atividade de transporte para o L-T₃ foi seis vezes menor em relação ao transporte de L-T₄. A constante de taxa de eliminação de L-T₃ também foi mais rápido nas células transfectadas em relação ao grupo controle (0,032 vs 0,006min⁻¹). Estes achados sugerem que a captação e o efluxo tecidual de HT pode ser mediados por proteínas membro da família OATPs (SUGIYAMA, 2003).

4.2.3. Proteínas transportadoras de aminoácidos

Pesquisa utilizando ovócitos de Xenopus mostrou que a hiper-expressão do transportador de aminoácidos do sistema L aumentou a captação citoplasmática e nuclear de [¹²⁵I]T₃, bem como a ativação de genes responsivos ao T₃. Estes transportadores pertencem à família dos transportadores de aminoácidos, a qual envolve diferentes transportadores de membrana que são responsáveis pela captação de diferentes classes de aminoácidos pelas células de mamíferos. Estes transportadores são heterodiméricos e consistem de uma cadeia 4F2 pesada comum

(4F2hc) ligada por pontes de dissulfeto a um membro de uma família de cadeias leves homólogas (PALACIN, 1998). Os transportadores pertencentes ao sistema L fazem o transporte de aminoácidos hidrofóbicos e de cadeia lateral grande, tais como metionina, leucina, isoleucina, valina, fenilalanina, tirosina, triptofano, histidina e glutamina (CHRISTENSEN, 1990). O tratamento de linhagens de células de câncer de placenta (BeWO) com inibidores específicos para transportadores do sistema L levou à diminuição da captação de [125 I]T₃ e da atividade transcricional mediada por TR (RITCHIE, 2003). De modo interessante, o acumulado celular total e nuclear de [125 I]T₃ em ovócitos microinjetados com cRNA do mesmo transportador de aminoácidos do sistema L quando incubados com [125 I]T₃ foi maior do que o grupo controle. Entretanto, quando o [125 I]T₃ foi microinjetado diretamente no citoplasma dos ovócitos, a taxa de acúmulo de [125 I]T₃ no núcleo foi igual ao controle, sugerindo assim, que algum tipo de canalização exista entre o transporte de membrana até o ambiente nuclear, onde o T₃ exerce suas funções genômicas (RITCHIE, 2003).

Portanto, além das especulações existentes de mecanismos de transporte envolvidos em síndromes de resistência aos HT, é provável que estes mecanismos estejam também envolvidos em respostas heterogêneas aos HT em diferentes tecidos, bem como em pacientes com hipotireoidismo subclínico e com síndrome de resistência ao HT e à reposição hormonal (REFETOFF, 1993; MULLER, 1995; DUMITRESCU, 2006). O transporte de hormônios poderia também explicar porque a terapia de reposição de tiroxina para corrigir o hipotireoidismo em ratos tireoidectomizados, inclusive com doses supra-fisiológicas, não restabelece o eutireoidismo em todos os tecidos (ESCOBAR-MORREALE, 2005).

4.2.4. *Proteína citosólica ligante de T₃ (CTBP)*

Não são apenas transportadores de membrana que influenciam no transporte de HT e no seu acúmulo citoplasmático e nuclear, proteínas citosólicas ligantes de T₃ também parecem ter funções primordiais neste processo. Estas proteínas foram primeiramente descritas por Tata (1958), quem apresentou evidências baseadas em cromatografia que um extrato citosólico obtido a partir de músculo esquelético de rato possuía afinidade por [131 I]T₄ (TATA, 1958). Hamada e cols. (1970) foram os primeiros a demonstrar a possibilidade de proteínas citosólicas ligarem especificamente com T₃ (HAMADA, 1970).

Em 1986 Hashizume e cols. relataram que extratos citosólicos renais, após tratamento com carvão ativado, tinham a atividade ligante de T_3 abolida, e quando ao mesmo extrato, adicionava-se nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), a atividade ligante de T_3 era restaurada (HASHIZUME, 1986). Somente em 1991, uma proteína ligante de T_3 e dependente de NADPH (CTBP) foi identificada e purificada a partir de células hepáticas por meio de fracionamento do citosol de células hepáticas em Q-Sepharose, fenil-Sepharose, red-Sepharose e eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições não desnaturantes, nestes ensaios foi identificada uma molécula de 76 kDa (CTBP). Foi observado em análise em gel de poliacrilamida desnaturante contendo sulfato duodecil sódico (SDS) que esta proteína consistia na realidade de dímeros, onde cada um dos monômeros possuía massa molecular próxima de 38kDa. No mesmo trabalho, os autores observaram que a presença da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP), na sua forma reduzida (NADPH), aumentou a afinidade da CTBP pelo T_3 . De maneira contrária, a forma oxidada (NADP) deste nucleotídeo suprimiu a afinidade da proteína CTBP pelo T_3 (KOBAYASHI, 1991).

Posteriormente foi determinada a seqüência de aminoácidos e realizada a clonagem do cDNA da proteína CTBP e foi constatado que esta proteína que possuía 314 aminoácidos era idêntica a “ μ -crystallin”, uma proteína com expressão abundante no cristalino de marsupiais, porém, com funções desconhecidas ainda em outras espécies (VIE, 1997). A constante de afinidade calculada para a CTBP em relação ao T_3 foi de $2,4 \times 10^{-9}$ M, e a capacidade máxima de ligação foi 21.000 pmol de T_3 por mg de CTBP na presença de $3,0 \times 10^{-8}$ M de NADPH. A ordem de afinidade dos análogos do T_3 para a proteína em questão foi $D-T_3 > L-T_3 > L-T_4 > TRIAC$. O pH ótimo para ligação do T_3 à proteína CTBP foi de 7,2-7,5 (KOBAYASHI, 1991). Ensaio posteriores relacionaram a CTBP como uma proteína de estoque intracelular de T_3 , além de participar na translocação intracelular de T_3 entre núcleo e citoplasma (MORI, 2002).

Na busca de uma melhor compreensão das possíveis funções da proteína CTBP alguns autores se basearam em uma estrutura cristalográfica já publicada de uma proteína homóloga à proteína CTBP. Trata-se de uma enzima expressa em bactérias presentes no solo e em plantas, responsável por uma via do metabolismo de aminoácidos, onde a mesma faz a conversão do

aminoácido L-ornitina em L-prolina. Esta proteína é identificada pelo nome ornitina-ciclodeaminase (EC: 4.3.1.12), seu nome pode ser abreviado pela sigla “OCD”. Esta enzima tem sido classificada como um membro da família das “ μ -crystallin” devido à grande similaridade de seqüência com as mesmas, chegando até a 47% de semelhança (**Figura 2**). No modelo tridimensional da OCD é nítida a disposição dimérica, com 14 folhas beta (violeta e azul) na interface de dimerização onde se situa o domínio de ligação ao substrato, além disso, a OCD possui como co-fator o nucleotídeo doador de elétrons nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (GOODMAN, 2004).

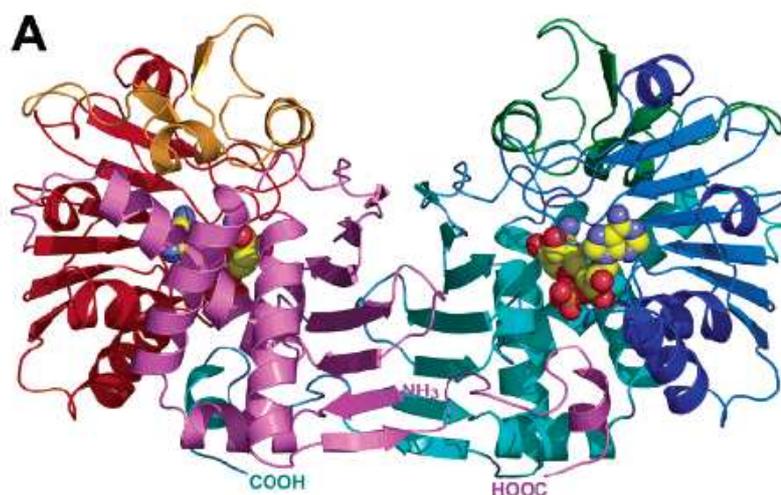


Figura 2: Modelo tridimensional da enzima ornitina-ciclodeaminase no modelo de fitas. Estrutura resolvida em difração de raio-X na qualidade de resolução igual a 1,8 Å. Proteína dimérica consistindo de dois monômeros idênticos, em destaque no modelo espacial completo observa-se o co-fator NADH. O domínio de ligação ao substrato se encontra entre as 14 folhas beta (violeta e azul) (GOODMAN, 2004).

Entretanto, recentemente um modelo tridimensional foi proposto a partir da estrutura cristalográfica da proteína CTBP humana ligada com o nucleotídeo NADPH resolvida em 2,6 Å, a qual consistiu de um dímero assimétrico (**figura 3**). A estrutura apresenta dois domínios: o domínio de ligação ao NADPH com dobra tipo Rossmann e o domínio de dimerização. A comparação da estrutura cristalográfica CTBP com a enzima OCD revelou que embora ambas as proteínas possuam funções muito distintas, existe uma grande similaridade estrutural entre elas. Estas duas proteínas existem em solução como dímeros estáveis e o modo de dimerização é muito similar entre elas (CHENG, 2007).

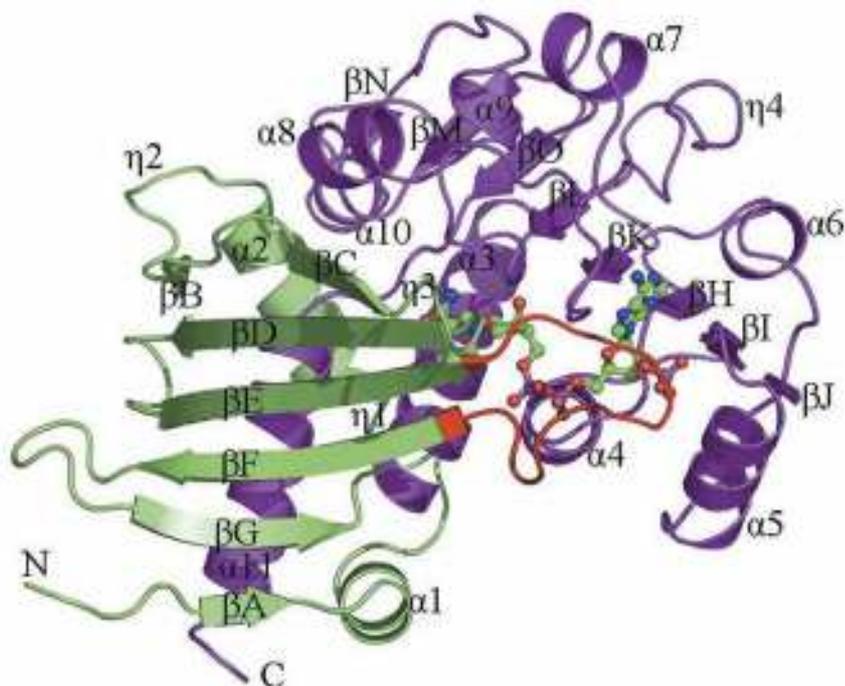


Figura 3. Monômero da CTBP humana. O domínio de dimerização está em verde, enquanto o domínio de ligação ao NADPH está na cor púrpura. A molécula de NADPH é mostrada no modelo bola e bastão (CHENG, 2007)

As proteínas CTBP e OCD possuem uma seqüência motivo de ligação de nucleotídeos GXGXXG/A, mas a CTBP humana liga-se com NADP/H e a OCD com NAD⁺/H. O NAD é usualmente utilizado como um agente oxidante em degradações oxidativas, já o NADP usualmente comporta-se como um agente redutor em reações de síntese redutivas (CHENG, 2007). A CTBP é amplamente expressa no organismo. Em estudos de Northern blotting realizados a partir de 73 diferentes tecidos humanos, foi observado uma maior expressão de mRNA da proteína CTBP em diferentes regiões do encéfalo bem como no coração. E para confirmar a localização intracelular da CTBP em tecidos neurais e cardíacos, os mesmos autores utilizaram a proteína CTBP fusionada a uma proteína verde fluorescente (GFP), o que permitiu a visualização predominante da proteína CTBP no citoplasma das células analisadas em

detrimento da localização nuclear (SUZUKI, 2003a). Entretanto, já foi demonstrado pelo mesmo grupo que a proteína CTBP pode ser transportada para o núcleo e sítios de interação para CTBP estão presentes no compartimento nuclear (HASHIZUME, 1989a; HASHIZUME, 1989b).

Em uma análise mais detalhada da expressão de mRNA da proteína CTBP em diferentes regiões do encéfalo utilizando-se a técnica de Northern Blotting, verificou-se uma maior atividade transcricional do gene da proteína CTBP no córtex cerebral, cerebelo, amígdala, hipocampo, núcleos caudato, putâmen e acumbens (SUZUKI, 2003a). Devido a OCD participar do metabolismo de aminoácidos e da CTBP possuir esta alta homologia e ser expressa em diferentes regiões do encéfalo, supõe-se que a CTBP possa participar nas vias metabólicas de síntese ou quebra de neurotransmissores nestas regiões, uma vez que alguns neurotransmissores são aminoácidos, por exemplo, o glutamato, ou são produzidos a partir deles como a noradrenalina. Corroborando ainda mais para esta hipótese, na via de síntese do glutamato existe um intermediário metabólico comum com a via metabólica de conversão de ornitina em prolina, onde a OCD exerce sua atividade catalítica, este intermediário é conhecido como 1-pirrolina-5-carboxilato (KIM, 1992).

Estudos recentes demonstraram a influência da CTBP não só no transporte e acúmulo intracelular de HT, mas também na ativação gênica mediada pelo T₃. Em cultivo de células de tumor de pituitária de rato (GH3) com hiper-expressão estável da CTBP, a atividade transcricional mediada pelo TR, no TRE palíndromo (TRE-PAL) regulando a enzima luciferase, foi influenciada pelos níveis de expressão da proteína CTBP. Neste estudo, a ativação gênica mediada por T₃ foi inversamente proporcional ao nível de expressão da CTBP de cada clone de células estudado (MORI, 2002). Os autores deste trabalho diante de tais resultados, a princípio contraditórios, levantaram as seguintes hipóteses: i) A CTBP pode acelerar o metabolismo de T₃ em células com super-expressão de CTBP; ii) A CTBP poderia aumentar a degradação de mRNA de genes regulados por T₃; iii) Possível competição entre a CTBP e o receptor nuclear de T₃ (MORI, 2002).

Ainda com relação às diferentes atividades da proteína CTBP, estudos de expressão gênica pela análise de “microarray” revelaram uma forte expressão da CTBP na cóclea e no vestibulo de humanos. No mesmo trabalho, foi descoberto que pacientes com surdez não-

sindrômica carregavam dois tipos de mutação na CTBP. A primeira delas no exon 8, ocorreu a mudança de uma adenina por uma timina na posição 945 do gene, resultando numa troca de uma lisina por uma treonina na posição 314 da proteína CTBP (K314T). Esta mutação presente em células germinativas afetou um paciente do estudo e sua mãe, ambos com surdez não-sindrômica. A segunda mutação, também no exon 8, levou a perda do “stop codon” aumentando a proteína em cinco aminoácidos (X315Y). Esta mutação foi identificada apenas em um paciente, também com surdez não-sindrômica e nenhum de seus familiares foi afetado, tratando-se provavelmente de uma mutação *de novo*. Os indivíduos afetados por ambas as mutações, K314T e X315Y, eram heterozigotos para a mutação, apresentavam estatura e inteligência normal, não havia comprometimento vestibular, visual, renal ou muscular. A perda de audição foi identificada aos dezenove anos de idade no paciente afetado pela mutação X315Y e no primeiro ano de idade no paciente afetado pela mutação K314T (ABE, 2003).

Quando a CTBP com a mutação K314T ou X315Y foi expressa em células COS-7 (células de rim de macaco africano), a distribuição intracelular das proteínas em questão foi alterada. A proteína nativa e as proteínas mutadas distribuíram-se de maneira uniforme no citoplasma das células COS-7 48h após a transfecção. Entretanto, quando se analisou 72h e 96h após a transfecção, continuou-se observando um padrão uniforme de distribuição citoplasmática da proteína nativa, enquanto que a mutação X315Y induziu a formação de vacúolos no citoplasma em 20% das células analisadas. A mutação K314T favoreceu uma distribuição predominante perinuclear em um quarto das células analisadas (OSHIMA, 2006). Por meio da técnica de imuno-histoquímica do tecido da cóclea de camundongos foi demonstrado que a CTBP é expressa na região do ligamento espiral, mais especificamente em fibrócitos do tipo II, estas células são conhecidas por manter o gradiente osmótico e homeostase desta região da cóclea. São células ricas em bombas Na/K ATPase. Foi observado também que a proteína CTBP e a bomba Na/K ATPase estavam co-localizadas nos fibrócitos (OSHIMA, 2006).

As proteínas do tipo Na/K ATPase são proteínas integrais de membrana, consistem, de no mínimo, duas subunidades - α e β - cada uma delas com diferentes isoformas ($\alpha_1, \alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \beta_1, \beta_2$ e β_3) (WALTER, 1978). A expressão da bomba Na/K ATPase em cultura de células mesangiais é estimulada por hormônios tireoideanos (OHARA, 1993; ZUO, 1996), e já foi identificado um elemento responsivo ao hormônio tireoideano na posição “upstream” à região

flanqueadora da subunidade beta 1 da proteína Na/K ATPase, caracterizado por dois hexâmeros que coincidem com a seqüência consenso do “half binding site” [AGGT(C/A)A] do receptor do hormônio tireoideano (5' GAAGGTCACTCCGGGACGCCGGA 3'). O primeiro hexâmero é idêntico à seqüência consenso, já o segundo hexâmero é uma seqüência degenerada (FENG, J., 1993).

Além de a proteína CTBP ter uma expressão co-localizada com a bomba Na/K ATPase, a mutação K314T leva a uma perda da capacidade de CTBP ligar-se ao T₃, o que não acontece com a mutação X315Y. Animais hipotireoideos apresentaram uma menor expressão da subunidade α_1 , e β_1 , Na/K ATPase, indicando que uma diminuição na quantidade de T₃ disponível no ouvido interno pode afetar a audição devido a um decréscimo nos níveis de expressão da bomba de Na/K ATPase, reduzindo desta forma, o transporte de íons e fluidos nesta região. Os achados citados corroboram para uma possível participação da CTBP na reciclagem de K da endolinfa via bomba Na/K ATPase, sendo que a mutação K314T na proteína CTBP poderia levar a surdez não-sindrômica devido ao desequilíbrio do gradiente iônico (OSHIMA, 2006).

Recentemente foi publicado um importante trabalho para o estudo da função da CTBP, onde camundongos foram nocauteados para o gene da CTBP. Estes animais apresentaram uma diminuição da concentração sérica de T₃ e T₄ quando comparado com animais controle, entretanto não houve alteração na concentração sérica de TSH. Os animais nocautes também perderam a capacidade de ligação de T₃ dependente de NADPH no citosol. Entretanto a expressão de mRNA de genes controlados pelo T₃, tais como o TSH β na hipófise, glutathione-S-transferase alfa 2 e desidase 1 tanto no fígado ou nos rins não foram alteradas nos animais nocautes em relação ao grupo controle (SUZUKI, 2007b). A audição aparentemente não foi afetada nestes animais e provavelmente a surdez associada à CTBP esteja mais relacionada à mutação da CTBP do que à sua ausência.

Portanto, com o objetivo de investigar a função da proteína CTBP na atividade transcricional induzida por T₃ em diferentes TREs, neste trabalho foram feitas curvas doses resposta de T₃ em culturas de células CHO transfectadas ou não com CTBP. Nossos resultados

mostraram que o efeito da proteína CTBP na atividade transcricional é TRE específica. No TRE-PAL, a CTBP aumentou a ativação máxima de T_3 em cerca de 70%. Entretanto, em DR4, a CTBP diminuiu significativamente a sensibilidade ao T_3 aproximadamente 5,5 vezes e não alterou o efeito de T_3 no palíndromo invertido (F2) e no promotor do hormônio liberador de tireotropina (TRH). De modo complementar, utilizando ensaio de GST-pull-down, foi observado que CTBP interage diretamente com $TR\beta 1$ e com o co-repressor SMRT, mas não com o co-ativador GRIP1. Em uma análise geral, estes resultados sugerem que a CTBP pode modular os efeitos de não somente por alterar os níveis intracelulares de T_3 , mas também interagindo com proteínas envolvidas na resposta do T_3 .

5. OBJETIVOS

5.1. Geral

- Estudar a influência da proteína CTBP na atividade transcricional mediada pelo T₃ em culturas de células CHO.

5.2. Específicos

- Estudar o influxo e o efluxo de T₃ em culturas de células de ovário de Hamster Chinês (CHO);
- Verificar os efeitos da expressão da CTBP na ativação gênica mediada pelo T₃ em culturas com expressão transiente da proteína CTBP;
- Avaliar a expressão de CTBP nesta linhagem celular;
- Investigar a existência ou não de interações entre CTBP e proteínas co- reguladoras da ação do HT.

6. MATERIAS E MÉTODOS

6.1. Plasmídeos

Duas cópias dos elementos responsivos sintéticos, DR4, F2, PAL comandando o gene luciferase e TR β 1 foram previamente descritos (LOPEZ, 1993; RIBEIRO, R. C., 2001). O gene repórter promotor do TRH-luciferase (TRH-LUC) e o plasmídeo de expressão da CTBP (pcDNA-CTBP) foram gentilmente fornecidos pela Dra. Barbara Deminieux e Dr. Satoru Suzuki, respectivamente (GUISOUMA, 2000; MORI, 2002). O vetor pCMV- β -galactosidase (Promega) foi usado para controle da eficiência da transfecção. Para síntese de proteína em bactérias, os plasmídeos codificando diferentes proteínas nucleares fusionadas à proteína glutationa-S-transferase (GST) foram usadas: GST-SRC1 (381-882) (FENG, P., 1994), GST-SMRT (987-1491) (WEBB, 2003), and GST-TR β 1 (full-length) (HORLEIN, 1995).

6.2. Transformação das bactérias com os plasmídeos

Em um tubo de microcentrífuga, 100-1000 ng do plasmídeo a ser transformado foram incubados com 50µL de *E.coli* DH5α durante 30 minutos no gelo. Após este período, as células foram submetidas a um choque térmico por 2 minutos em um banho-maria a 42°C. Em seguida, adicionou-se 500 µL de meio de cultura LB (5g de extrato de levedura, 10g de triptona e 10g de NaCl em 1L de água destilada) sem antibiótico e incubou-se por 1 hora a 37°C em uma câmara climática (BOD). Posteriormente, 50µL da transformação foram plaqueados em uma placa de Petri contendo meio de cultura LB com 1,5% de agar e 0,1 mg/mL de ampicilina. A placa foi incubada por 16 horas a 37°C em BOD.

6.3. Purificação de Plasmídeos

Após a transformação das bactérias, uma colônia resistente foi selecionada e colocada para crescer em 5 mL de meio LB, contendo 5 µL de ampicilina (100mg/mL) por 4-6 horas a 37°C em “shaker”. Em seguida, estas bactérias foram inoculadas em 500 mL do mesmo meio de cultura e colocadas para crescer por 16 horas a 37°C sob agitação em “shaker” .

Ao término do período de crescimento da cultura, as bactérias foram separadas por centrifugação e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi mantido para a extração e purificação dos plasmídeos de acordo com o protocolo do Quiagen Plasmid Maxi Kit.

6.4. Cultura de células e Método de transfecção.

As células CHO foram cultivadas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e suplementado com penicilina (100Ui/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma), em incubadora contendo 5% de CO₂ e 37°C até a sub-confluência em placas de Petri de 15 cm de diâmetro (Corning). No dia da transfecção, 4 placas eram tripsinizadas, cada uma delas com 4-5 mL solução de tripsina 0,05 % e 0,02 % diluído em solução tampão fosfato contendo 8,0g NaCl; 0,2g KCl; 1,44g Na₂HPO₄; 0,24g KH₂PO₄; H₂O q.s.p. 1L; 0,1% dextrose e pH 7,4 (PBS) a 37°C por 5 min. As células eram recolhidas em tubos de centrífuga de 15 mL, 4-5 mL de meio de

cultura RPMI com 10% SFB eram adicionados ao tubo para neutralização da tripsina. Os tubos eram centrifugados a 400g por 5 min, o sobrenadante era descartado e o sedimento ressuspenso com 6,5 mL de PBS contendo 0,1g/L CaCl₂ e 0,1% dextrose. Aproximadamente 10.000.000 de células eram transferidas para cuvetas de eletroporação individuais e colocadas em eletroporador (gene pulser II apparatus, Bio-Rad), nas voltagens de 0,300 kV e capacitância de 950 µF. Os plasmídeos utilizados continham os genes codificantes para a enzima luciferase dirigida pelos elementos responsivos positivos ao receptor do hormônio tireoideano (TRE-DR4-luc, TRE-PAL-luc, TRE-F2-luc) e promotor do TRH (TRH-luc), sequência codificante para o TR_{β1}, enzima beta-galactosidase e para a proteína CTBP (MORI, 2002). Os plasmídeos codificantes para os TRE tinham como promotor mínimo da tirosina kinase (TK-TRE), os plasmídeos codificantes para CTBP (pcDNA-CTBP) e TR_{β1} (pCMX- TR_{β1}) possuíam o promotor mínimo do citomegalovírus e do fago T7 (para síntese *in vitro*), e o plasmídeo codificante para a enzima beta-galactosidase (CMV-beta-gal) possuía o promotor mínimo do citomegalovírus .

Foram realizadas co-transfecções mantendo-se fixa a quantidade do plasmídeo pcDNA-CTBP (1 até 16µg), TR_{β1} (1µg) e TRE-luc (4 µg), as células eletroporadas foram plaqueadas em placas de 12 poços e tratadas com T₃ (10⁻⁵ até 10⁻⁹ M, (Sigma)) ou veículo (Etanol:DMSO; 9:1, (Sigma)).

Após 24h de cultivo, as células transfectadas foram lisadas em tampão de lise específico (reporter lysis buffer – Promega). A atividade luciferase foi medida adicionando 20 µL de luciferina (Luciferase Assay System – Promega) a 20 µL de lisado em uma placa de Elisa, a qual foi imediatamente levada a um contador de quimioluminescência (Microbeta-Trilux, Perkin-Elmer). A atividade β-galactosidase foi determinada utilizando-se β-galactosidase Enzyme Assay with Reporter Lysis Buffer (Promega). A taxa de ativação gênica em cada tratamento foi determinada com base na razão entre a atividade luciferase e β-galactosidase medida na presença ou ausência de T₃ (CHIELLINI, 1998). Para calcular a taxa de repressão nos experimentos realizados com o elemento responsivo negativo TRH, foi calculada a porcentagem dos valores da leitura com T₃ assumindo que o valor da leitura com o veículo (controle) é 100% e então, foi subtraído de 100 o valor encontrado.

6.5. Ensaio de “western blotting”

Após o cultivo por 24h, as células eletroporadas com 1, 2, 4, 8 e 16 μ g de pcDNA-CTBP foram lavadas duas vezes com solução tampão fosfato (PBS) e lisadas pela adição de tampão de lise RIPA. Aproximadamente 100 μ L do lisado foi ressuspendido em tampão de carregamento de proteína (4% SDS; 0,1 M Tris pH 8,9; 2 mM EDTA; 0,1% azul de bromofenol; 20% glicerol e 0,25 M DTT), as amostras foram separadas em gel de SDS-PAGE a 10%, o qual foi submetido à eletroforese em amperagem constante de 20 mAmp e aproximadamente 60 V durante 1:30h, e em seguida transferidas para membrana de fluoreto de vinilideno (PVDF), pré ativadas com metanol puro (Merck), para “Imunoblotting” (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) em um transferidor eletroforético semi-seco (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) 1h e 30 min durante 1h e 40 min, a 24 V, e a eficiência da transferência foi verificada com a coloração com ponceau red. As membranas foram bloqueadas com TBST-T (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, e 0,1% Tween 20) contendo 5% de leite em pó durante 12h. A detecção da proteína CTBP foi realizada incubando-se a membrana com 20 mL do anticorpo primário de caprino anti- μ -crystallin humana (sc22424, Santa Cruz Biotechnology, Inc), diluição 1:500 por 1:30h. Após este período, a membrana foi lavada 3 vezes com 20 mL TBS-T para retirada dos anticorpos primários livres, e em seguida foi incubada com 20 mL do anticorpo secundário de asinino anti-anticorpo de caprino acoplado à enzima peroxidase de raiz forte (sc22424, Santa Cruz Biotechnology, Inc.). A membrana foi novamente lavada com TBS-T por 6 vezes, para retirada dos anticorpos secundários não ligados. Após este processo, foi adicionado 1 mL do substrato da peroxidase à membrana, a qual foi embebida no reagente ECL (Amersham) envolvida em um filme plástico e exposta à filme de raio X por 1h. O filme foi revelado em solução reveladora (Microservice, 21569) por 2 min, lavado em água destilada e imediatamente mergulhado em solução fixadora por 2 min (Microservice, 21570).

6.6. Ensaios de transporte total de HT em células com super-expressão de CTBP

Foram realizadas determinações do transporte total de T₃ em culturas de células CHO transfectadas com 8 µg de pcDNA-CTBP ou somente com o vetor (células controle). As células transfectadas foram cultivadas em meio RPMI (Gibco BRL) contendo 10% de SFB e suplementado com penicilina (100Ui/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma), em incubadora contendo 5% de CO₂ e 37°C até a sub-confluência em placas de 6 poços. As células transfectadas foram lavadas duas vezes com PBS pré-aquecido a 37°C, as células foram incubadas com meio de cultura RPMI (Gibco) contendo 0,01% de SFB e 70 pM [¹²⁵I]T₃ (2200 Ci/mmol; Amersham Biosciences, Piscataway-NJ, USA). O influxo foi interrompido nos tempos de 5, 15, 30 e 60 min aspirando-se imediatamente o meio radioativo e lavando-se as células com 1mL de PBS gelado por seis vezes. As células foram então coletadas com 1mL de tampão de lise contendo 0,1 M de NaOH. O lisado foi destinado à contagem total de [¹²⁵I]T₃ em contador gama (Wallac 1470 Wizard Gama Counter, Perkin-Elmers). Para fins de normalização da quantidade de células de cada tratamento, uma alíquota de 20 µL de cada lisado foi utilizada para determinação da concentração de proteína por meio do método de Bradford (BRADFORD, 1976). A atividade radioativa de cada lisado, o que representou a quantidade de [¹²⁵I]T₃ incorporado, foi expressa em cpm / µg de proteína ± desvio padrão (DP).

6.7. Ensaios de transporte nuclear.

As células CHO foram transfectadas como descrito anteriormente. Cada grupo de células transfectadas era transferido para placas de Petri de 10cm, cultivado por 24h e submetido ao ensaio de influxo nuclear como descrito a seguir. O meio de cultura foi desprezado e as células transfectadas com pcDNA-CTBP e controle foram lavadas duas vezes com meio de cultivo contendo 0,01% de SFB. Foram adicionados a cada placa de Petri 2 mL de meio de cultura RPMI com 0,01% de SFB contendo 70 pM de [¹²⁵I]T₃ (Amersham, Biosciences). Após a incubação por 1h, o meio radioativo foi aspirado e as células lavadas três vezes com PBS gelado. Após as lavagens, as células foram lisadas por meio de incubação com 2 ml de 0,25 M sacarose, 1 mM MgCl₂, e 20 mM Tris-HCl (pH 7,4) adicionado 0,5% triton X-100 por 10 min. A captação

nuclear foi determinada pela mensuração da radioatividade do sedimento obtido pela centrifugação do lisado celular por 3000 x g durante 5 min. O sobrenadante foi descartado, o sedimento ressuspensionado com 1mL de PBS sem Ca^{++} e Mg^{++} , a suspensão foi novamente centrifugada a 3000 x g durante 5 min, o sedimento ressuspensionado com 1mL de PBS sem Ca^{++} e Mg^{++} , e a radioatividade da suspensão final foi medida em contador gama (Wallac 1470 Wizard Gama Counter, Perkin-Elmers) (MORI, 2002).

6.8. Ensaio de Efluxo de [^{125}I]T₃

As células CHO transfectadas com CTBP ou eletroporadas apenas com o vetor foram cultivadas até a sub-confluência, O meio de cultura foi retirado, foram lavadas três vezes com PBS aquecido a 37°C e pré-incubadas por 3 horas a 37°C com meio de pré-incubação (RPMI contendo 0,01% soro de fetal bovino e 70 pM de [^{125}I]T₃ (Amersham, Biosciences). Ao final deste período, cada poço contendo as células é lavado por 6 vezes com PBS a 4°C. Adiciona-se então 1 mL de meio de efluxo (RPMI contendo 10% soro de fetal bovino) em cada poço. Após 5 min a 37°C, o meio de efluxo foi coletado em tubos de leitura de radioativos, e repostos por outros nas mesmas condições aos 10, 30 e 60 minutos. Ao final de 60 min, as células foram lisadas com NaOH 0,1M e a atividade radioativa remanescente nas células também foi mensurada. As curvas de efluxo foram calculadas utilizando um algoritmo de ajuste de curva, e a taxa de efluxo e porcentagem remanescente nas células são expressas como média ± DP.

Os meios de efluxo coletados aos 60 min foram congelados para posterior análise do metabolismo do hormônio marcado através de cromatografia em colunas de Sephadex (CAVALIERI, 1999)

6.9. Cromatografia em colunas de sephadex.

A quantidade de compostos marcados com ^{125}I no meio de efluxo foi analisada por meio de coluna cromatográfica. Para isto, pipetas Pasteur (0,5 x 4 cm) contendo Sephadex LH-20 coberta com uma fina camada de algodão foram equilibradas com 0,1 M de HCl. Um mL de meio de efluxo foi acidificado para o pH 1,0 com 1M de HCl e aplicado na coluna. O iodeto foi

eluído com 3 x 1 mL de HCL 0,1 M. Conjugados de T₃ foram eluídos com 7 x 1 mL de H₂O. Em seguida, o T₃ foi eluído com três lavagem com 1 mL de NaOH/etanol (1:1, vol/vol). Os diferentes volumes eluídos foram quantificados quanto à atividade radioativa em contador gama (Perkin-Elmer ®).

6.10. Transcrição e Tradução *in vitro*

As proteínas CTBP e TR_{β1} utilizadas para os ensaios de GST *pull-down* foram sintetizadas utilizando-se um kit de transcrição e tradução *in vitro* (TNT T7 – Quick Coupled Transcription/Translation System – Promega) (RIBEIRO, R. C., 1994). Nesta técnica, os plasmídeos contendo os cDNAs das proteínas citadas acima regulados pelo promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7 são adicionados a um sistema que contém toda a maquinaria necessária para a transcrição e tradução da proteínas. Este sistema contém a RNA polimerase do bacteriófago T7, ribonucleotídeos, inibidor de RNase (RNAsin) e um lisado de reticulócitos de coelho suplementado com 40µM ZnCl₂ e aminoácidos (exceto a metionina). Foi adicionado 1 µL (10µCi) metionina marcada com enxofre 35 (³⁵S-Met, Amershan, Pharmacia) no momento da reação. As reações foram realizadas em microtubos de 0,5 mL com a adição de 1-2 µg do plasmídeo aos componentes necessários para a transcrição e tradução, seguindo-se uma incubação a 30°C por 90 minutos. Ao término da reação, foram coletadas amostras (1-2 µL) para a realização da eletroforese de proteínas sendo o restante da reação congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer –80°C.

6.11. Eletroforese de Proteínas em Gel de Poliacrilamida com Sulfato Duodecil Sódico (SDS-PAGE)

A eletroforese de proteínas, em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (sulfato duodecil sódico “SDS”) (LAEMMLI, 1970), foi utilizada para confirmar a eficiência da síntese protéica *in vitro* assim como o tamanho da proteína gerada. Após a corrida eletroforética, o gel foi fixado em uma solução de 30% metanol e 10% ácido acético glacial durante 30 minutos, sendo em seguida exposto por 30 minutos a uma solução amplificadora (Amplify, Amersham)

para intensificar a transmissão da energia radioativa e secado a vácuo a 70°C por 40 minutos (Geldryer, BioRad). O gel seco foi submetido a autorradiografia a -80°C utilizando-se filme de raios-X (Kodak) por um período de 8 a 24h, sendo posteriormente revelado.

6.12. Expressão e purificação de proteínas recombinantes em *Escherichia coli*.

Para verificação da existência de interações e proteína envolvidas na ativação gênica T₃ mediada, foram realizados ensaios de interação proteína-proteína utilizando a técnica de “GST pull-down”. Primeiramente foi realizada a expressão e purificação de proteínas de fusão em *E. coli*. Essas proteínas de fusão com uma seqüência codificadora para a enzima glutathione-S-transferase (GST) são proteínas quiméricas, onde o gene que codifica a proteína de interesse é clonado na mesma fase de leitura do gene que codifica a proteína GST no plasmídeo pGEX (GE Healthcare). Ao ser expresso, esta fusão de genes dará origem a uma única proteína composta pelo GST na sua porção aminoterminal e pela proteína de interesse na carboxiterminal.

Para isto, 50 µL de bactérias *E.coli* cepa BL21 foram incubadas com 1-2 µg de um dos plasmídeo PGEX contendo as construções de proteínas de fusão desejadas (GST-TRβ1; GST-SMRT e GST-SRC1) no gelo por 30 min, a 42°C por 2 min e imediatamente transferidas e incubadas em gelo por mais 2 min. As bactérias foram cultivadas em meio LB 2X: Peptona (BD) 3%, Extrato de levedura (BD) 1,5% e 3% de NaCl (Sigma) por 16–22h, a indução bacteriana foi realizada com 100µL de Isopropil-beta-D-Tiogalactopiranosida (IPTG) para cada 200 mL de LB. O meio contendo as bactérias foi centrifugado a 5700 x g por 20 min, o sedimento foi ressuspensionado com 10 mL de tampão TST (Tris 50mM, NaCl 150mM e Tween 20 0,05%). Foram adicionados 500 µL de lisozima 10mg/mL em cada suspensão de bactérias e o volume final foi incubado a 4°C por 20 min sob agitação para lise das bactérias. Em seguida, o lisado foi sonificado em ciclos de 20s com descanso de 5 min cada ciclo, num total de 4 ciclos em disruptor celular (Ultrasonic Processor, Sonics). O volume sonificado foi centrifugado em 12.000 rpm a 4°C por 30 min, o sobrenadante foi reservado em tubos de centrífuga de 50 mL em gelo para preparação das microesferas de sefarose. Duzentos microlitros de microesferas de sefarose ligadas à glutathione (Sigma) foram centrifugados a 2000 rpm / 2 min, o sedimento foi

ressuspendido com 2 mL de TST, este procedimento foi repetido por 3 vezes, o volume final de microesferas contendo glutathiona foi ressuspendido para 7 mL. O volume total de microesferas (aproximadamente 7 mL) foi adicionado ao tubo contendo o lisado de bactérias em tubos de centrífuga de 50 mL. Os tubos contendo o volume final foram incubados por 1 h e 30 min a 4°C, seguido de centrifugação a 1000 rpm / 5 min. Após este período o lisado com as microesferas foram transferidos para tubos de 15 mL, centrifugado a 1000 rpm / 5 min o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspendido com 10 mL de TST, este procedimento foi repetido 3 vezes, o sedimento obtido no final das três centrifugações foi ressuspendido com 600 µL de IPAB (TST adicionado de PMSF 0,5µM; DTT 0,1 mM) em seguida foi adicionado 1mL de glicerol, a suspensão foi agitada por 5 min e estocada a -80°C. realizada uma nova centrifugação.

6.13. Ensaio de “GST pull-down

O ensaio de “GST Pull Down”, simplificado chamado de GST, é utilizado para verificar a capacidade de duas proteínas se interagirem *in vitro*. Para isto, utilizam-se duas proteínas, sendo que uma delas necessita estar fusionada à GST e a outra deve estar radiomarcada, que neste caso será a proteína CTBP ou o TR β ₁ (utilizado como controle positivo). A proteína fusionada ao GST funcionará como uma “isca” e a proteína radiomarcada será a “presa” a ser “pescada”. A proteína de fusão funciona como uma isca porque está fixada a uma partícula pesada de aproximadamente 45-165 µm, as micro-esferas de sefarose, com moléculas glutathiona (substrato da proteína GST) na superfície, facilitando sua precipitação e separação da solução estudada (**figura 4**).

À cada reação de “GST pull-down” foram adicionados 3 µg de proteína fusionada à GST ou GST sozinho, 2 µL de lisado de reticulócito contendo [³⁵S]-p38 CTBP, 1,5 µL de T₃ 10⁻⁴ M e tampão de ligação qsp 150 µL (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, tween 20 0,05%, triton-100 0,1%, NP40 0,1%, DTT 1 mM e BSA 2µg/µL). A reação foi incubada a 4°C por 2 h . Após este período, as microesferas foram lavadas 6 vezes com tampão de ligação, para retirada da proteína radioativa que não se ligou às microesferas contendo glutathiona. Ao final da última centrifugação, foi adicionado tampão para desnaturação das proteínas (Tris 0,25 M, pH 6,8, SDS 4% glicerol 40% β-mercaptoetanol 10% e azul de bromofenol 0,005%), cada reação de GST era

colocada em água fervente por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida a 10% e submetidas à eletroforese. Os géis eram secos em Gel dryer (BioRad), uma vez seco eram expostos a filme radiográfico (Kodak) e revelados após 5 a 15 dias.

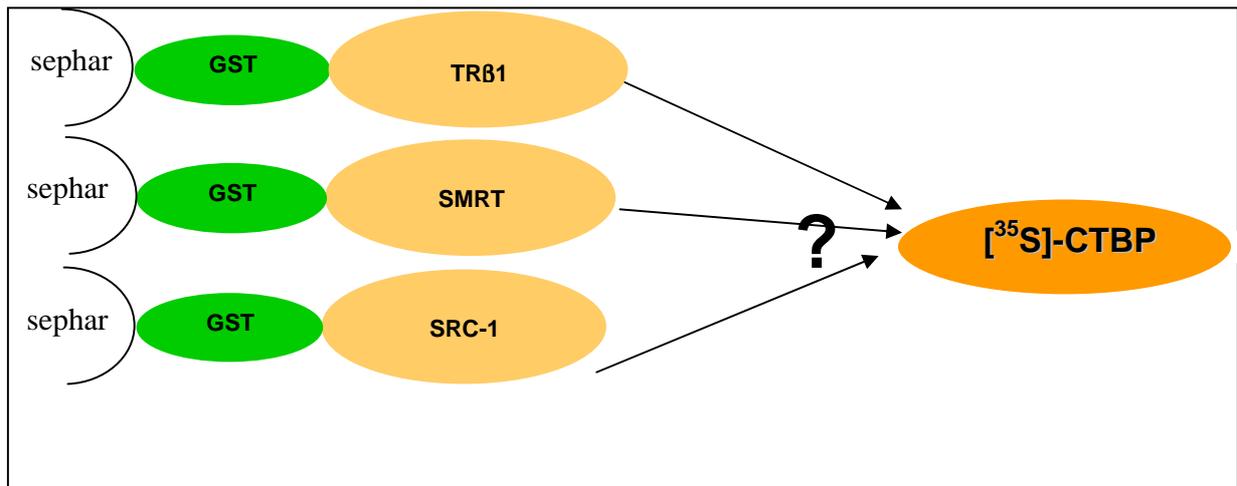


Figura 4: Esquema das proteínas de fusão (GST-TR β 1, GST-SMRT e GST-SRC-1)

Imobilizadas em microesferas de sefarose (sephar) contendo glutatona e proteína CTBP [35 S-CTBP] e TR β 1 [35 S- TR β 1] radiomarcadas utilizadas nos ensaios de “GST pull-down”.

6.14. Análise Estatística.

Os resultados são apresentados sob a forma de médias de, no mínimo, três experimentos \pm desvio padrão. As médias foram analisadas por análise de variância, quando necessário, as múltiplas comparações entre cada tratamento foram feitas por meio do teste de Newman-Keuls.

7. RESULTADOS

7.1. Ensaios de “Western Blotting” das células transfectadas com CTBP.

Para avaliar se a transfecção de pcDNA-CTBP induz uma expressão satisfatória da proteína, foram realizados ensaios de western blotting em células CHO. Como observado na **figura 5**, em condições normais, as células CHO não expressam CTBP e a transfecção de 2, 4, 8 e 16 μ g pcDNA-CTBP aumentou a expressão de maneira dose-dependente e os maiores níveis de expressão foram obtidos com 8 e 16 μ g do respectivo plasmídeo. Portanto, na maioria dos experimentos a seguir foram utilizados 8 μ g de pcDNA-CTBP.

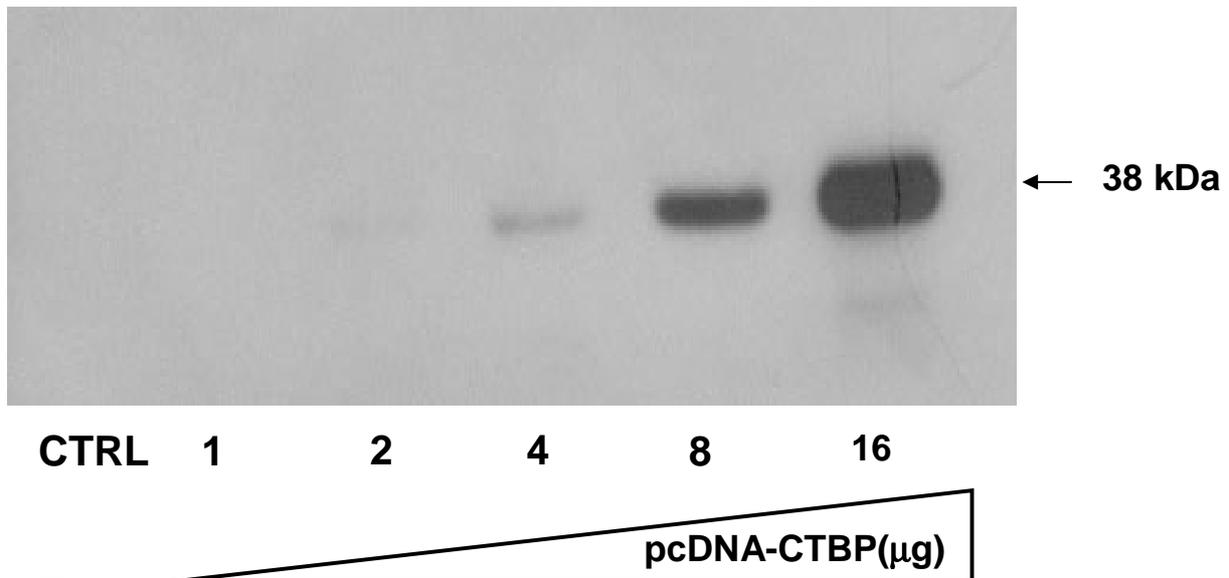


Figura 5. Análise de western blotting para avaliar a expressão de CTBP. Células CHO foram transfectadas com 1 até 16 μ g de pcDNA-CTBP e cultivadas por 24h em meio RPMI contendo 10% de SFB, o extrato celular total foi preparado usando tampão de lise. O western blotting foi conduzido seguindo a descrição prévia e os anticorpos utilizados foram o anticorpo primário (polyclonal donkey anti-human CTBP antibody) anti-CTBP humana e o anticorpo secundário (goat anti-donkey conjugated to horseradish peroxidase), além do kit ECL de quimioluminescência.

7.2. Efeito da proteína CTBP no influxo de [¹²⁵I]T₃ em células CHO.

Para verificar se a CTBP pode modular o conteúdo intracelular total de T₃, foram realizados ensaios de influxo celular total de [¹²⁵I]T₃ em células CHO tranfectadas ou não com 8μg de CTBP. A transfecção de CTBP aumentou de forma significativa a captação de [¹²⁵I]T₃. Aos 5 minutos a taxa de influxo foi 2,5 vezes maior em células tranfectadas com CTBP comparada às células controle, 151,6 ± 23,7 cpm/μg de proteína vs 61,6 ± 9,4 cpm/μg de proteína (*p*<0,05), respectivamente. Esta diferença permaneceu constante durante todo o experimento, e ao final de 60 min o influxo nas células CHO tranfectadas foi maior do que o dobro quando comparado com o controle, 234,6 ± 4,9 vs 100,3 ± 7,4 cpm/μg de proteína (*p*<0,05), **figura 6**.

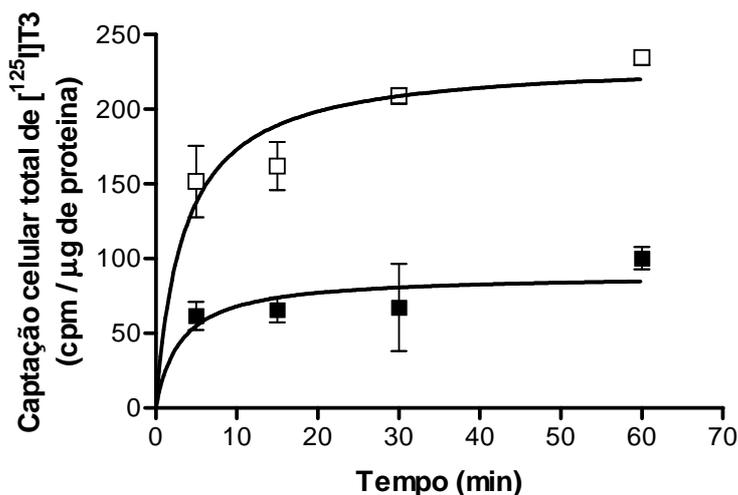


Figura 6. A CTBP aumentou a captação celular total de [¹²⁵I]T₃. Efeito da hiper-expressão na captação celular total de [¹²⁵I]T₃ em células CHO tranfectadas somente com o vetor (quadrado cheio) ou com 8 μg de pcDNA-CTBP (quadrado vazio). As células foram incubadas com 65 pM de [¹²⁵I]T₃ por 5, 15, 30 e 60 min, seguida de lise celular e o acumulado total de [¹²⁵I]T₃ foi medido em contador gama.

A seguir, foi mensurada a captação nuclear de [125 I]T $_3$ pelas células CHO transfectadas ou não com 8 μ g de pcDNA-CTBP. Como observado no transporte celular total, ao final de 60 min, o conteúdo intranuclear de [125 I]T $_3$ em células transfectadas com CTBP foi aproximadamente o dobro do observado em células controle $29,3 \pm 3,9$ vs $15,3 \pm 5,4$ cpm/ μ g de proteína respectivamente (**figura 7**).

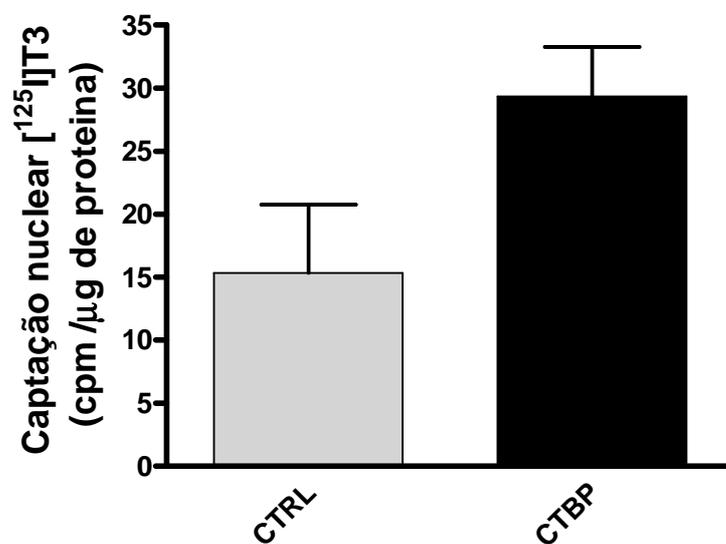


Figura 7. A CTBP aumentou a captação nuclear de [125 I]T $_3$. Efeito da hiper-expressão de CTBP na captação nuclear de [125 I]T $_3$ em células transfectadas somente com o vetor (barra cinza) ou com 8 μ g de pcDNA-CTBP (barra preta). As células destinadas a ensaios de influxo nuclear foram incubadas com 65 pM de [125 I]T $_3$ por 60 min, os núcleos foram separados por centrifugação diferencial e o [125 I]T $_3$ acumulado foi medido em contador gama.

7.3. Efeito da proteína CTBP no Efluxo de [¹²⁵I] T₃ em células CHO.

Com o intuito de avaliar o efeito da proteína CTBP no efluxo de T₃, foi mensurado o efluxo de [¹²⁵I]T₃ em células CHO transfectadas com 0, 2, 4 e 8 μg de CTBP. Apesar do aumento da captação de [¹²⁵I]T₃, como demonstrado nos experimentos anteriores de influxo celular total e nuclear, a transfecção de CTBP não modificou o efluxo de [¹²⁵I]T₃. Consequentemente, as porcentagens de [¹²⁵I]T₃ remanescente após 60 min em células transfectadas com 0, 2, 4 e 8 μg de CTBP foram 10,8 ± 1,1, 12,4 ± 2,98, 10,0 ± 1,5, e 12,1 ± 2,7, respectivamente (**figura 8**).

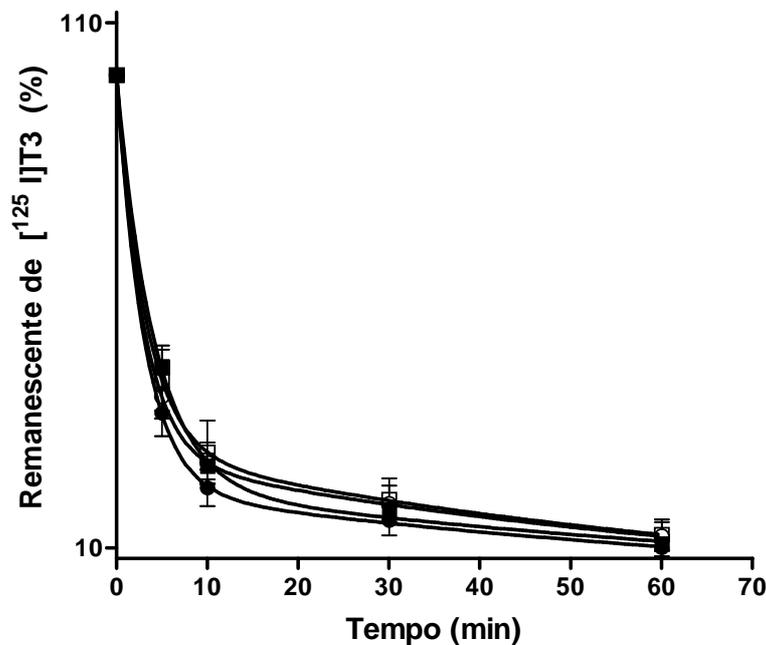


Figura 8. A proteína CTBP não influenciou o efluxo de [¹²⁵I]T₃. Células CHO foram transfectadas com o vetor somente (quadrado cheio), 2 μg (quadrado vazio), 4 μg (círculo cheio) e 8 μg (círculo vazio) de pcDNA-CTBP. As células CHO transfectadas foram incubadas com 65 pM de [¹²⁵I]T₃ por 3h, seguida da troca do meio radioativo pelo meio de efluxo contendo 10% de SFB, a quantidade de [¹²⁵I]T₃ exportada pelas células aos 5, 10, 30 e 60 min foram medidas em contador gama.

A análise cromatográfica dos compostos marcados com $[^{125}\text{I}]$ no meio de efluxo oriundo de células transfectadas com CTBP ou células controle demonstrou que a CTBP não alterou o metabolismo de T_3 o qual foi inferior a 4% em ambos os grupos (**figura 9**)

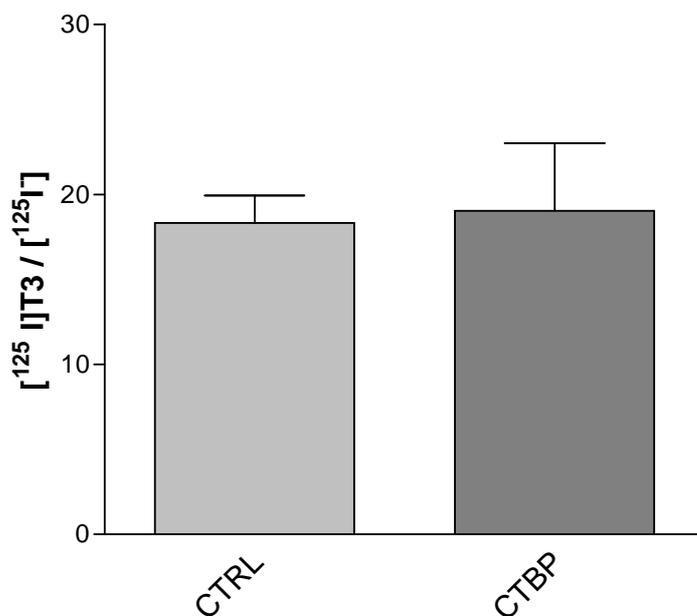


Figura 9. CTBP não alterou o metabolismo de T_3 . Uma amostra do meio de efluxo obtido ao final de 60 minutos do ensaio de efluxo foi submetido à análise cromatográfica em coluna de sefarose. A quantidade de compostos marcados com $[^{125}\text{I}]$ nas diferentes frações coletadas foi determinada em contador gama.

7.4. Efeito da CTBP nos ensaios de gene repórter.

Para investigar se os altos níveis de captação de T_3 , celular total ou nuclear, induzidos pela hiper-expressão de CTBP tem algum efeito sobre a transcrição gênica mediada por T_3 , curvas dose-resposta foram realizadas em ensaios de gene repórter. Como pode ser verificado na **figura 10-A**, embora a transfecção de CTBP não tenha alterado o EC50 em TRE-PAL ($1,0 \times 10^{-7}$ vs $1,3 \times 10^{-7}$ M, $p = 0,1$), ela aumentou a eficácia do T_3 em cerca de 42% uma vez que a resposta máxima ao T_3 na dose de 10^{-6} M foi significativamente menor no grupo controle ($3,60 \pm 0,70$) quando comparado com células com hiper-expressão de CTBP ($5,10 \pm 0,15$; $p < 0,01$). Entretanto, diferentemente de TRE-PAL, a alta expressão de CTBP não alterou a eficácia do T_3 , mas ela diminuiu a sensibilidade ao T_3 em TRE-DR4 em 5,5 vezes quando comparado com o grupo controle (EC50 do controle = $1,2 \times 10^{-7}$ M vs CTPB = $6,6 \times 10^{-7}$ M, $p < 0,05$, **(figura 10-B)**). Já no elemento responsivo F2, nenhuma mudança significativa foi observada no EC50 ou na eficácia em células com alta expressão de CTBP, ($p = 0,1$, **figura 10-C**).

Por último, para verificar o efeito da CTBP em um promotor regulado negativamente pelo T_3 , foi estudado o efeito de diferentes quantidades de CTBP (0, 1, 2, 4 e $8 \mu\text{g}$) na expressão gênica controlada por T_3 no promotor do TRH. Como mostrado na **figura 10-D**, CTBP não teve nenhuma influência na repressão exercida pelo T_3 no promotor do TRH, mesmo com $8 \mu\text{g}$ de CTBP.

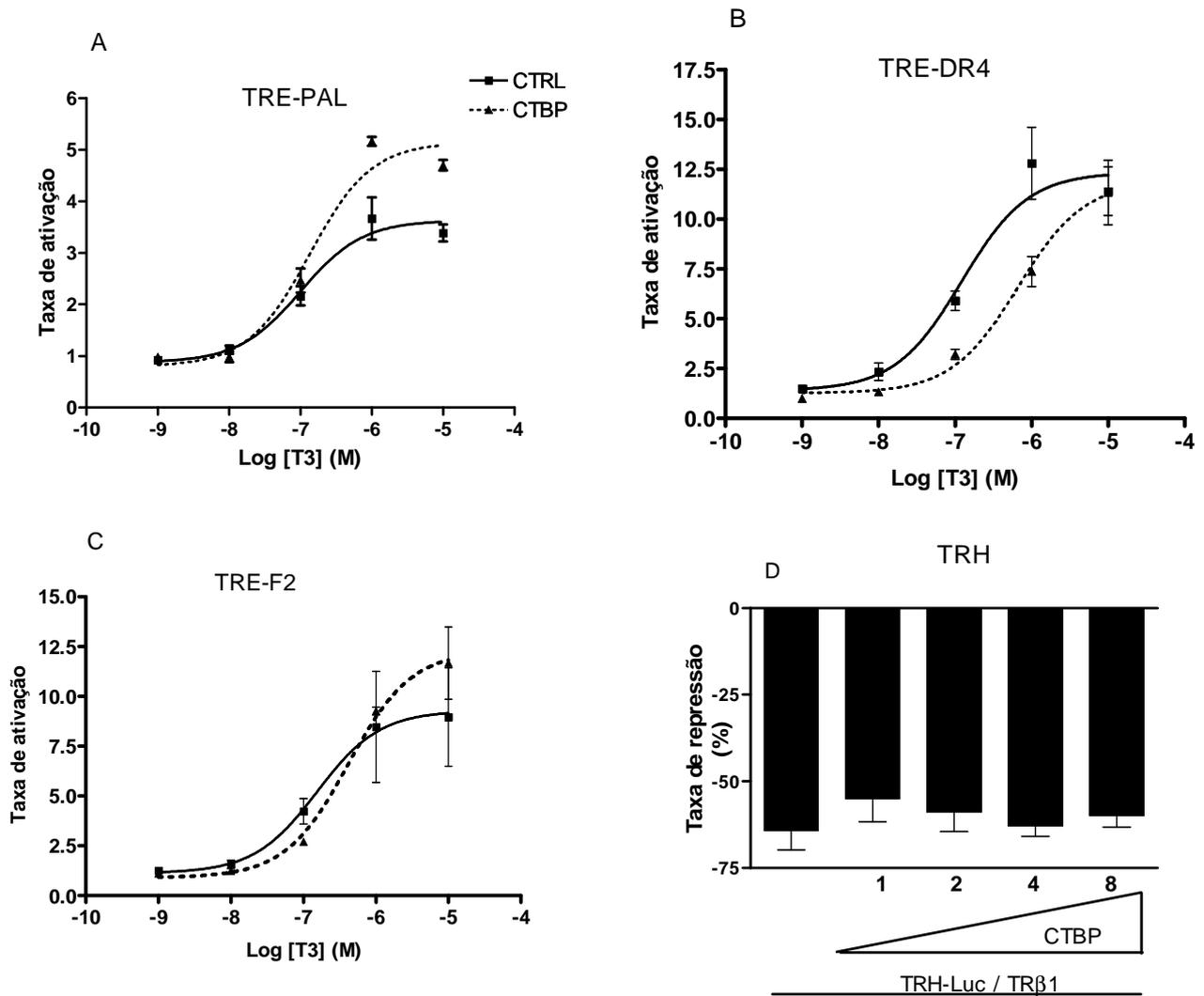


Figura 10. A ativação gênica foi regulada de maneira TRE-específica. Células CHO foram co-transfectadas com plasmídeos para expressão de TRβ1, CTBP e TRE [TRE-PAL (A), TRE-DR4 (B), TRE-F2 (C) e promotor do TRH (D)] controlando o gene repórter luciferase. Em seguida, as células transfectadas foram tratadas com doses crescentes de T₃ (10⁻⁹M - 10⁻⁵M), a atividade da luciferase foi determinada em contador de quimioluminescência para a construção das curvas dose-reposta.

7.5. CTBP e suas interações com proteínas nucleares.

Em vista dos efeitos da CTBP na atividade transcricional do T_3 se apresentarem de forma TRE-específica e não somente relacionada com a indução de maiores níveis intracelulares de T_3 , foi decidido, então, estudar se estas influências poderiam ser associadas a interações entre a CTBP com outras proteínas nucleares. Para isto, ensaios de GST pull-down foram realizados e foi observado que a CTBP interagiu diretamente com o co-repressor SMRT e com o $TR_{\beta 1}$, mas não com o co-ativador SRC1. Ainda, a adição de T_3 reduziu ligeiramente a interação entre CTBP e SMRT, mas não com $TR_{\beta 1}$ (**figura 11**)

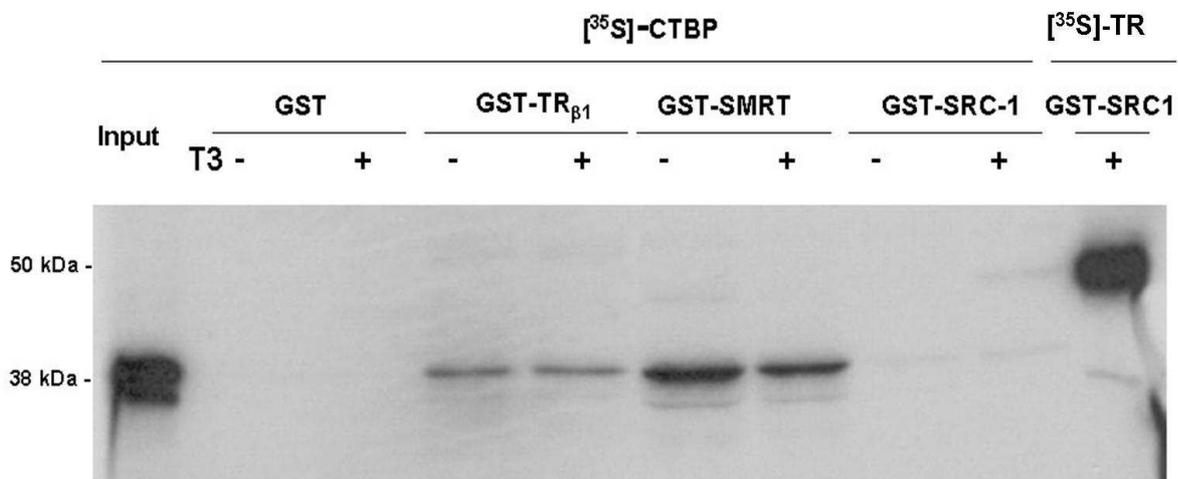


Figura 11. $TR_{\beta 1}$ e SMRT interagiram *in vitro* com CTBP. Experimentos de GST pull-down avaliando a interação entre CTBP marcada com $[^{35}\text{S}]$ e proteína nucleares fusionadas à enzima GST (GST- $TR_{\beta 1}$, GST-SMRT and GST-SRC1) foram realizados na presença do veículo ou T_3 10^{-7} M.

8. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Uma melhor compreensão dos mecanismos de transporte dos HT pode melhorar a perspectiva de utilização de hormônios que atuam em receptores nucleares como agentes terapêuticos, o que ainda é limitado, porque eles atuam de forma ampla, geralmente afetando vários órgãos e tecidos, causando desta forma, efeitos colaterais e indesejáveis importantes (TOMLINSON, 2001; SMITH, 2004; SETIAWAN, 2007). Por exemplo, a utilização dos glicocorticóides como antiinflamatórios e no controle das reações imunológicas traz consigo efeitos deletérios como osteoporose, hipertensão arterial, alterações gastrintestinais e aumento da susceptibilidade às infecções (SETIAWAN, 2007). O hormônio tireoideano, apesar de ter uma atividade lipolítica e catabólica, não é indicado para o tratamento da obesidade e da hipercolesterolemia devido aos efeitos deletérios que o excesso de HT exerce sobre vários sistemas, dentre eles, o sistema cardiovascular (SMITH, 2004). Muitos destes efeitos indesejados poderiam ser evitados controlando de maneira seletiva o acesso dos HT em diferentes tecidos, mas para isso é necessário um melhor entendimento dos mecanismos de transporte não só da membrana plasmática, mas também no tráfego intracelular, especialmente na transição citoplasma-núcleo. Neste contexto, novos horizontes estão se abrindo e diversas proteínas citoplasmáticas que possuem alta afinidade pelos HT estão sendo descobertas, sendo que algumas delas já demonstraram influenciar o acúmulo intracelular de T_3 *in vitro* e *ex vivo*, bem como a atividade transcricional mediada pelo T_3 (SUZUKI, 2003a).

Diversos trabalhos têm mostrado que CTBP possui alta afinidade por T_3 e exerce função regulatória no transporte deste hormônio para o interior do núcleo de células-alvo, e sua expressão pode modular a transcrição mediada por T_3 devido a alterações na distribuição citoplasmática e nuclear de T_3 (HASHIZUME, 1991; MORI, 2002; SUZUKI, 2003a; SUZUKI, 2003b). Em humanos, a relevância clínica da CTBP é observada em mutantes K314T e X315Y que são associados com a surdez não-sindrômica (ABE, 2003; OSHIMA, 2006). Recentemente, a estrutura cristalográfica da CTBP ligada ao NADPH na resolução de 2,6Å foi resolvida, mostrando um dímero assimétrico e um sítio pré-dito de ligação de T_3 (CHENG, 2007). Este resultado reforça as evidências para uma função regulatória da CTBP na expressão gênica

mediada pelo T₃/TR. Contudo, os mecanismos pelos quais a CTBP influencia as ações do T₃ ainda não estão claros.

Ensaio utilizando a técnica de “microarray” demonstraram elevada expressão de mRNA de CTBP (ABE, 2003). Análise imunistoquímica mostrou que esta proteína é expressa preferencialmente em fibrócitos do tipo II, onde existe uma alta expressão do gene da Na-K ATPase (OSHIMA, 2006).

No presente estudo, as células expressando CTBP mostraram maior captação celular total e nuclear de [¹²⁵I]T₃ do que as células não transfectadas. Estes resultados estão em acordo com trabalhos prévios onde se utilizou células GH3 (MORI, 2002; SUZUKI, 2007a). Como pode ser observado na **figura 6**, aos 5 min de influxo celular total, já existe uma grande indução da captação de [¹²⁵I]T₃ pelas células transfectadas com CTBP. Esta rápida resposta observada no influxo de hormônio tireoideano sugere mecanismos de ação da CTBP além do acúmulo intracelular de T₃ por aumento de sítios de alta afinidade para este hormônio, mas pode-se também levantar hipóteses para mecanismos mais ativos da CTBP no controle da captação de T₃, por exemplo, possíveis induções de transportadores de membrana pela CTBP. Outro achado que reforça a hipótese de possíveis induções de transportadores de membrana pela proteína CTBP/T₃ é que um elemento responsivo ao hormônio tireoideano foi reconhecido na região promotora do gene Na-K-ATPaseβ1 (FENG, J., 1993), e a atividade Na-K-ATPase foi estimulada pelo T₃ em diferentes tecidos, este resultado é uma evidência de uma provável função do T₃ na regulação da expressão de um transportador de membrana, o que pode depender ou não da proteína CTBP. Além disso, foi observado que existe uma co-localização entre CTBP e Na-K-ATPase em fibrócitos do tipo II nos tecidos obtidos da cóclea de ratos. Portanto, a CTBP poderia também regular o transporte destes dois íons em fibrócitos do tipo II por mecanismos não-genômicos, interagindo diretamente com a Na-K-ATPase e tal regulação poderia depender da ligação do hormônio tireoideano, o que levaria a alterações estruturais na CTBP, regulando desta forma a afinidade da CTBP por este transportador (OSHIMA, 2006).

Em contraste, as células CHO transfectadas com CTBP não exibiram qualquer diferença no efluxo de T₃ quando comparadas com as células controle, sugerindo que CTBP regula

somente o influxo, mas não o efluxo neste tipo celular. Este resultado difere de um relato prévio onde a transfecção de CTBP em células GH3 inibiu o efluxo de [125 I]T₃ quando comparado com o efluxo em células controle, o mesmo autor atribuiu a reduzida taxa de efluxo devido a uma retenção maior do hormônio no citoplasma (MORI, 2002). Ainda especulando sobre a atividade da CTBP na regulação da atividade de transportadores de membrana responsáveis pelo influxo de HT, seja por mecanismos de regulação da expressão gênica ou por interações diretas com os mesmos, pode-se também supor que a CTBP regule a atividade de transportadores responsáveis pelo efluxo do hormônio tireoideano direta ou indiretamente. Tal mecanismo pode ser específico para cada tipo celular, podendo assim, explicar a equivalência entre o efluxo de [125 I]T₃ em células CHO transfectadas ou não com CTBP. Outra provável explicação reside no fato da capacidade destas células em exportar o T₃ ser significativamente superior quando comparado com as células GH3, Como mostrado na **figura 8**, no final dos primeiros 10 min, próximo de 70% do [125 I]T₃ havia sido exportado das células, enquanto as células GH3 estudadas por Mori e cols não transfectadas com CTBP levaram aproximadamente 3h para conseguirem eliminar metade do conteúdo de [125 I]T₃ acumulado durante o período de pré-incubação (MORI, 2002).

Interessante notar que em células CHO, os altos níveis de CTBP afetaram seletivamente a ação do T₃ em diferentes elementos responsivos. Em TRE-PAL a CTBP aumentou em 42% a eficácia do T₃ em ativar a transcrição gênica (**figura 10-A**). Este resultado está condizente com o aumento na quantidade de T₃ intranuclear obtido nos ensaios de transporte nuclear de T₃. Entretanto, já foi relatado que em ensaios de gene-repórter a proteína CTBP diminuiu a taxa de ativação em culturas de células GH3 (MORI, 2002). Uma possível explicação para esta diferença pode ser o tipo celular envolvido nas condições experimentais do presente trabalho desta tese. Além do mais, levando em consideração que a CTBP esteja regulando a atividade transcricional induzida por T₃ de uma maneira direta, interagindo inclusive com proteínas do complexo de repressão, a disponibilidade de fatores de transcrição específicos, de maneira diferenciada em cada tipo celular, pode contribuir sobremaneira para esta variedade de resposta da CTBP nos ensaios de gene-repórter neste elemento responsivo.

Ainda não havia sido descrito nenhuma atividade da CTBP em nível transcricional em alguns dos TREs usados neste estudo (TRE-DR4, TRE-F2 e promotor do TRH) e quando foi

avaliado o elemento responsivo DR4, apesar dos altos níveis de T₃ intranuclear, a transfecção de CTBP diminuiu a sensibilidade do T₃ em regular a expressão gênica, uma vez que a alta expressão de CTBP induziu um aumento da EC50 (desvio da curva dose-resposta para a direita) caracterizando assim uma diminuição da potência do T₃ em ativar a transcrição gênica, aumentando desta forma o valor do EC50 (**figura 10-B**). Por outro lado, no elemento responsivo palíndromo invertido (TRE-F2) e no promotor do TRH, a expressão da CTBP não modificou a curva dose-resposta de T₃ (**figuras 10-D e C**). Estes diferentes efeitos da CTBP em cada um dos TREs estudados sugerem que a CTBP influencia a ação do T₃ não somente por aumentar os conteúdos celulares total e intranucleares de T₃, mas também, é possível que a CTBP diminua a disponibilidade intranuclear de T₃ livre para ligar ao seu receptor - o TR. Esta possibilidade foi desconsiderada em um trabalho prévio, onde claramente a expressão de CTBP foi inversamente proporcional à expressão do gene do hormônio GH em células GH3, quando foi aumentada a quantidade de T₃ disponível no ensaio, esta inibição não foi revertida caracterizando deste modo uma inibição provavelmente não competitiva (MORI, 2002). Adicionalmente, a CTBP pode interagir com outras proteínas envolvidas na via de sinalização do T₃, tais como o próprio TR e/ou proteínas co-reguladoras.

Esta hipótese foi confirmada *in vitro* por ensaios de GST pull-down realizados neste trabalho e que, pela primeira vez, foi demonstrado que a CTBP interagiu com TR β 1 e com o co-repressor SMRT, mas não com o co-ativador SRC-1. Todavia, a função das interações da proteína CTBP na expressão de genes regulados por T₃ permanece desconhecida. Foi mostrado em um trabalho prévio de nosso grupo que a orientação de cada sítio dos TREs (*half sites*) determina a composição da forma ativa do TR *in vivo*. Em células de leveduras e mamíferos heterodímeros de RXR-TRs ativam a transcrição em DR-4 e, ainda, homodímeros e monômeros medeiam a resposta de T₃ em palíndromo invertido (F2) e palíndromo (PAL), respectivamente. Tais achados sugerem que a orientação específica das metades dos sítios dos TREs ditam o recrutamento de oligômeros de TR e a responsividade do T₃ *in vivo* (VELASCO, 2007). Consequentemente, é possível que cada metade dos sítios em diferentes TREs determine se CTBP pode estar envolvida no complexo oligomérico que controla a transcrição de T₃, embora esta especulação necessite de futuras investigações.

As interações protéicas entre a CTBP e proteínas nucleares (SMRT e TR β 1) vêm corroborar para uma função mais ativa da proteína CTBP nos mecanismos moleculares do T₃ e conseqüentemente na fisiologia humana como observado também em um trabalho recente, onde tal proteína foi associada a uma patologia relacionada a este tecido conhecida como distonia facioescapuloumeral (REED, 2007). Esta patologia é uma miopatia de fundo genético, caracterizada por fraqueza muscular na região da face, ombros e membros anteriores (REED, 2007). A análise do proteoma de pacientes afetados por esta patologia quando comparado com indivíduos normais, levou a descoberta de uma alta expressão da CTBP nos pacientes afetados. Com as evidências apresentadas no presente trabalho de uma função moduladora da CTBP sobre o T₃ em nível transcricional, provavelmente interagindo com proteína nucleares e sabendo-se que um dos principais tecidos alvos do T₃ é o tecido muscular, apesar do mecanismo ainda não ser totalmente conhecido, a possibilidade de participação da CTBP na etiologia desta patologia se torna ainda mais plausível.

Com a intenção de verificar a hipótese da CTBP interferir na atividade transcricional do T₃ modulando o metabolismo/degradação deste hormônio foram feitos ensaios de cromatografia em coluna. A análise cromatográfica dos compostos marcados com [¹²⁵I] no meio de efluxo mostraram que o metabolismo de T₃ não foi alterado pela expressão de CTBP, a relação entre a quantidade de iodo livre [¹²⁵I]/conjugado com o T₃. Assim, a influência da CTBP na ativação gênica mediada por T₃ não é causada por mudanças no metabolismo deste hormônio em células com alta expressão de CTBP.

No presente trabalho foram encontradas mudanças na ativação gênica induzida por CTBP, e pela primeira vez foi mostrada uma interação *in vitro* entre CTBP e as proteínas nucleares - SMRT e TR β 1 - que são conhecidas por modular a ativação gênica mediada por T₃. Com base nestes achados, pode-se sugerir que a CTBP module a função de genes ativados por T₃ *in vitro* não somente por influenciar os conteúdos intracelulares de T₃, mas também interagindo com proteínas nucleares. Até agora não é possível concluir sobre funções específicas da CTBP no complexo de ativação, mas existem fortes evidências de suas ações TRE-específicas na transcrição gênica mediada por T₃. Mais estudos serão necessários para encontrar outras

interações da CTBP com proteínas nucleares, e, assim, caracterizar a função e mecanismos da CTBP na ativação ou repressão induzida por T3 em diferentes tecidos e células.

9. BIBLIOGRAFIA

ABE, S.; KATAGIRI, T.; SAITO-HISAMINATO, A.; USAMI, S.; INOUE, Y.; TSUNODA, T.; NAKAMURA, Y. Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. **Am J Hum Genet**, v.72, n.1, Jan, p.73-82. 2003.

ARAI, K.; CHROUSOS, G. P. Syndromes of glucocorticoid and mineralocorticoid resistance. **Steroids**, v.60, n.1, Jan, p.173-9. 1995.

BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. **Nature**, v.384, n.6610, Dec 19-26, p.641-3. 1996.

BARRA, G. B.; VELASCO, L. F.; PESSANHA, R. P.; CAMPOS, A. M.; MOURA, F. N.; DIAS, S. M.; POLIKARPOV, I.; RIBEIRO, R. C.; SIMEONI, L. A.; NEVES, F. A. [Molecular mechanism of thyroid hormone action]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.48, n.1, Feb, p.25-39. 2004.

BASSETT, J. H.; HARVEY, C. B.; WILLIAMS, G. R. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. **Mol Cell Endocrinol**, v.213, n.1, Dec 31, p.1-11. 2003.

BERRY, M. J.; LARSEN, P. R. Molecular cloning of the selenocysteine-containing enzyme type I iodothyronine deiodinase. **Am J Clin Nutr**, v.57, n.2 Suppl, Feb, p.249S-255S. 1993.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

BURNSIDE, J.; DARLING, D. S.; CARR, F. E.; CHIN, W. W. Thyroid hormone regulation of the rat glycoprotein hormone alpha-subunit gene promoter activity. **J Biol Chem**, v.264, n.12, Apr 25, p.6886-91. 1989.

CAVALIERI, R. R.; SIMEONI, L. A.; PARK, S. W.; BAXTER, J. D.; SCHARSCHMIDT, B. F.; RIBEIRO, R. C.; LOMRI, N. Thyroid hormone export in rat FRTL-5 thyroid cells and mouse NIH-3T3 cells is carrier-mediated, verapamil-sensitive, and stereospecific. **Endocrinology**, v.140, n.11, Nov, p.4948-54. 1999.

CHATTERJEE, V. K.; LEE, J. K.; RENTOUMIS, A.; JAMESON, J. L. Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone alpha gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.86, n.23, Dec, p.9114-8. 1989.

CHENG, Z.; SUN, L.; HE, J.; GONG, W. Crystal structure of human micro-crystallin complexed with NADPH. **Protein Sci**, v.16, n.2, Feb, p.329-35. 2007.

CHIELLINI, G.; APRILETTI, J. W.; YOSHIHARA, H. A.; BAXTER, J. D.; RIBEIRO, R. C.; SCANLAN, T. S. A High Affinity Subtype-Selective Agonist Ligand for the Thyroid Hormone Receptor. **Chemistry and Biology**, v.5, n.6, p.299-306. 1998.

CHRISTENSEN, H. N. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. **Physiol Rev**, v.70, n.1, Jan, p.43-77. 1990.

CROTEAU, W.; DAVEY, J. C.; GALTON, V. A.; ST GERMAIN, D. L. Cloning of the mammalian type II iodothyronine deiodinase. A selenoprotein differentially expressed and regulated in human and rat brain and other tissues. **J Clin Invest**, v.98, n.2, Jul 15, p.405-17. 1996.

CROTEAU, W.; WHITTEMORE, S. L.; SCHNEIDER, M. J.; ST GERMAIN, D. L. Cloning and expression of a cDNA for a mammalian type III iodothyronine deiodinase. **J Biol Chem**, v.270, n.28, Jul 14, p.16569-75. 1995.

DUMITRESCU, A. M.; LIAO, X. H.; WEISS, R. E.; MILLEN, K.; REFETOFF, S. Tissue-specific thyroid hormone deprivation and excess in monocarboxylate transporter (mct) 8-deficient mice. **Endocrinology**, v.147, n.9, Sep, p.4036-43. 2006.

ENERSON, B. E.; DREWES, L. R. Molecular features, regulation, and function of monocarboxylate transporters: implications for drug delivery. **J Pharm Sci**, v.92, n.8, Aug, p.1531-44. 2003.

ESCOBAR-MORREALE, H. F.; BOTELLA-CARRETERO, J. I.; ESCOBAR DEL REY, F.; MORREALE DE ESCOBAR, G. REVIEW: Treatment of hypothyroidism with combinations of levothyroxine plus liothyronine. **J Clin Endocrinol Metab**, v.90, n.8, Aug, p.4946-54. 2005.

FELIG, P.; BAXTER, J. D.; FROHMAN, L. A. **Endocrinology and metabolism**. New York: McGraw-Hill. 1995. xxxv, 1940 p.

FENG, J.; ORLOWSKI, J.; LINGREL, J. B. Identification of a functional thyroid hormone response element in the upstream flanking region of the human Na,K-ATPase beta 1 gene. **Nucleic Acids Res**, v.21, n.11, Jun 11, p.2619-26. 1993.

FENG, P.; LI, Q. L.; SATOH, T.; WILBER, J. F. Ligand (T₃) dependent and independent effects of thyroid hormone receptors upon human TRH gene transcription in neuroblastoma cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.200, n.1, Apr 15, p.171-7. 1994.

FLAMANT, F.; BAXTER, J. D.; FORREST, D.; REFETOFF, S.; SAMUELS, H.; SCANLAN, T. S.; VENNSTROM, B.; SAMARUT, J. International Union of Pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors. **Pharmacol Rev**, v.58, n.4, Dec, p.705-11. 2006.

FRIESEMA, E. C.; DOCTER, R.; MOERINGS, E. P.; STIEGER, B.; HAGENBUCH, B.; MEIER, P. J.; KRENNING, E. P.; HENNEMANN, G.; VISSER, T. J. Identification of thyroid hormone transporters. **Biochem Biophys Res Commun**, v.254, n.2, Jan 19, p.497-501. 1999.

FRIESEMA, E. C.; GANGULY, S.; ABDALLA, A.; MANNING FOX, J. E.; HALESTRAP, A. P.; VISSER, T. J. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. **J Biol Chem**, v.278, n.41, Oct 10, p.40128-35. 2003.

GARCIA, C. K.; BROWN, M. S.; PATHAK, R. K.; GOLDSTEIN, J. L. cDNA cloning of MCT2, a second monocarboxylate transporter expressed in different cells than MCT1. **J Biol Chem**, v.270, n.4, Jan 27, p.1843-9. 1995.

GARCIA, C. K.; GOLDSTEIN, J. L.; PATHAK, R. K.; ANDERSON, R. G.; BROWN, M. S. Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. **Cell**, v.76, n.5, Mar 11, p.865-73. 1994.

GARDNER, D. G.; SHOBACK, D. **Basic & clinical endocrinology**. Norwalk, Conn.: McGraw-Hill. 2006. xv, 811 p.

GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. **Genes Dev**, v.14, n.2, Jan 15, p.121-41. 2000.

GOODMAN, J. L.; WANG, S.; ALAM, S.; RUZICKA, F. J.; FREY, P. A.; WEDEKIND, J. E. Ornithine cyclodeaminase: structure, mechanism of action, and implications for the mu-crystallin family. **Biochemistry**, v.43, n.44, Nov 9, p.13883-91. 2004.

GREENSPAN, F. S. The thyroid gland. In: F. S. GREENSPANJ. D. BAXTER (Ed.). **Basic & Clinical Endocrinology**. Norwalk: Appleton & Lange, v.1, 1994. The thyroid gland, p.160-226

_____. The thyroid gland. In: F. S. GREENSPANJ. D. BAXTER (Ed.). **Basic & Clinical Endocrinology**. Norwalk: McGraw Hill, v.1, 2001. The thyroid gland, p.160-226

GUISSOUMA, H.; BECKER, N.; SEUGNET, I.; DEMENEIX, B. A. Transcriptional repression of TRH promoter function by T3: analysis by in vivo gene transfer. **Biochem Cell Biol**, v.78, n.3, p.155-63. 2000.

IGUISSOUMA, H.; DUPRE, S. M.; DEMENEIX, B. A. [Transcriptional repression of the TRH gene]. **Med Sci (Paris)**, v.21, n.10, Oct, p.854-9. 2005.

HAGENBUCH, B.; ADLER, I. D.; SCHMID, T. E. Molecular cloning and functional characterization of the mouse organic-anion-transporting polypeptide 1 (Oatp1) and mapping of the gene to chromosome X. **Biochem J**, v.345 Pt 1, Jan 1, p.115-20. 2000.

HAMADA, S.; TORIZUKA, K.; MIYAKE, T.; FUKASE, M. Specific binding proteins of thyroxine and triiodothyronine in liver soluble proteins. **Biochim Biophys Acta**, v.201, n.3, Mar 24, p.479-92. 1970.

HASHIZUME, K.; KOBAYASHI, M.; MIYAMOTO, T. Active and inactive forms of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3)-binding protein in rat kidney cytosol: possible role of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in activation of T3 binding. **Endocrinology**, v.119, n.2, Aug, p.710-9. 1986.

HASHIZUME, K.; MIYAMOTO, T.; ICHIKAWA, K.; YAMAUCHI, K.; SAKURAI, A.; OHTSUKA, H.; KOBAYASHI, M.; NISHII, Y.; YAMADA, T. Evidence for the presence of two active forms of cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3)-binding protein (CTBP) in rat kidney. Specialized functions of two CTBPs in intracellular T3 translocation. **J Biol Chem**, v.264, n.9, Mar 25, p.4864-71. 1989a.

HASHIZUME, K.; MIYAMOTO, T.; KOBAYASHI, M.; SUZUKI, S.; ICHIKAWA, K.; YAMAUCHI, K.; OHTSUKA, H.; TAKEDA, T. Cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3)-binding protein (CTBP) regulation of nuclear T3 binding: evidence for the presence of T3-CTBP complex-binding sites in nuclei. **Endocrinology**, v.124, n.6, Jun, p.2851-6. 1989b.

HASHIZUME, K.; SUZUKI, S.; ICHIKAWA, K.; TAKEDA, T. Purification of cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine(T3)-binding protein(CTBP) which regulates nuclear T3 translocation. **Biochem Biophys Res Commun**, v.174, n.3, Feb 14, p.1084-9. 1991.

HOLLENBERG, A. N.; MONDEN, T.; FLYNN, T. R.; BOERS, M. E.; COHEN, O.; WONDISFORD, F. E. The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements. **Mol Endocrinol**, v.9, n.5, May, p.540-50. 1995.

HORLEIN, A. J.; NAAR, A. M.; HEINZEL, T.; TORCHIA, J.; GLOSS, B.; KUROKAWA, R.; RYAN, A.; KAMEI, Y.; SODERSTROM, M.; GLASS, C. K.; ET AL. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. **Nature**, v.377, n.6548, Oct 5, p.397-404. 1995.

HSIANG, B.; ZHU, Y.; WANG, Z.; WU, Y.; SASSEVILLE, V.; YANG, W. P.; KIRCHGESSNER, T. G. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. **J Biol Chem**, v.274, n.52, Dec 24, p.37161-8. 1999.

KELLY, G. S. Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review. **Altern Med Rev**, v.5, n.4, Aug, p.306-33. 2000.

KIM, R. Y.; GASSER, R.; WISTOW, G. J. mu-crystallin is a mammalian homologue of Agrobacterium ornithine cyclodeaminase and is expressed in human retina. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.19, Oct 1, p.9292-6. 1992.

KOBAYASHI, M.; HASHIZUME, K.; SUZUKI, S.; ICHIKAWA, K.; TAKEDA, T. A novel NADPH-dependent cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine-binding protein (CTBP; 5.1S) in rat

liver: a comparison with 4.7S NADPH-dependent CTBP. **Endocrinology**, v.129, n.4, Oct, p.1701-8. 1991.

KULLAK-UBLICK, G. A.; FISCH, T.; OSWALD, M.; HAGENBUCH, B.; MEIER, P. J.; BEUERS, U.; PAUMGARTNER, G. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS): identification of a carrier protein in human liver and brain. **FEBS Lett**, v.424, n.3, Mar 13, p.173-6. 1998.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.

LAFRENIERE, R. G.; CARREL, L.; WILLARD, H. F. A novel transmembrane transporter encoded by the XPCT gene in Xq13.2. **Hum Mol Genet**, v.3, n.7, Jul, p.1133-9. 1994.

LOPEZ, G.; SCHAUFLELE, F.; WEBB, P.; HOLLOWAY, J. M.; BAXTER, J. D.; KUSHNER, P. J. Positive and negative modulation of Jun action by thyroid hormone receptor at a unique AP1 site. **Mol Cell Biol**, v.13, n.5, May, p.3042-9. 1993.

MANGELSDORF, D. J.; EVANS, R. M. The RXR heterodimers and orphan receptors. **Cell**, v.83, n.6, Dec 15, p.841-50. 1995.

MCKENNA, N. J.; LANZ, R. B.; O'MALLEY, B. W. Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. **Endocr Rev**, v.20, n.3, Jun, p.321-44. 1999.

MENDEL, C. M.; WEISIGER, R. A.; JONES, A. L.; CAVALIERI, R. R. Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study. **Endocrinology**, v.120, n.5, p.1742-9. 1987.

MITCHELL, A. M.; TOM, M.; MORTIMER, R. H. Thyroid hormone export from cells: contribution of P-glycoprotein. **J Endocrinol**, v.185, n.1, Apr, p.93-8. 2005.

MORI, J.; SUZUKI, S.; KOBAYASHI, M.; INAGAKI, T.; KOMATSU, A.; TAKEDA, T.; MIYAMOTO, T.; ICHIKAWA, K.; HASHIZUME, K. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent cytosolic T(3) binding protein as a regulator for T(3)-mediated transactivation. **Endocrinology**, v.143, n.4, Apr, p.1538-44. 2002.

MULLER, B.; ZULEWSKI, H.; HUBER, P.; RATCLIFFE, J. G.; STAUB, J. J. Impaired action of thyroid hormone associated with smoking in women with hypothyroidism. **N Engl J Med**, v.333, n.15, Oct 12, p.964-9. 1995.

NEVES, F. A.; CAVALIERI, R. R.; SIMEONI, L. A.; GARDNER, D. G.; BAXTER, J. D.; SCHARSCHMIDT, B. F.; LOMRI, N.; RIBEIRO, R. C. Thyroid hormone export varies among primary cells and appears to differ from hormone uptake. **Endocrinology**, v.143, n.2, Feb, p.476-83. 2002.

OGRYZKO, V. V.; SCHILTZ, R. L.; RUSSANOVA, V.; HOWARD, B. H.; NAKATANI, Y. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. **Cell**, v.87, n.5, Nov 29, p.953-9. 1996.

OHARA, T.; IKEDA, U.; MUTO, S.; OGUCHI, A.; TSURUYA, Y.; YAMAMOTO, K.; KAWAKAMI, K.; SHIMADA, K.; ASANO, Y. Thyroid hormone stimulates Na(+)-K(+)-ATPase gene expression in cultured rat mesangial cells. **Am J Physiol**, v.265, n.3 Pt 2, Sep, p.F370-6. 1993.

OSHIMA, A.; SUZUKI, S.; TAKUMI, Y.; HASHIZUME, K.; ABE, S.; USAMI, S. CRYM mutations cause deafness through thyroid hormone binding properties in the fibrocytes of the cochlea. **J Med Genet**, v.43, n.6, Jun, p.e25. 2006.

PALACIN, M.; ESTEVEZ, R.; BERTRAN, J.; ZORZANO, A. Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. **Physiol Rev**, v.78, n.4, Oct, p.969-1054. 1998.

PRICE, N. T.; JACKSON, V. N.; HALESTRAP, A. P. Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. **Biochem J**, v.329 (Pt 2), Jan 15, p.321-8. 1998.

REED, P. W.; CORSE, A. M.; PORTER, N. C.; FLANIGAN, K. M.; BLOCH, R. J. Abnormal expression of mu-crystallin in facioscapulohumeral muscular dystrophy. **Exp Neurol**, v.205, n.2, Jun, p.583-6. 2007.

REFETOFF, S.; WEISS, R. E.; USALA, S. J. The syndromes of resistance to thyroid hormone. **Endocr Rev**, v.14, n.3, Jun, p.348-99. 1993.

RIBEIRO, R. C.; APRILETTI, J. W.; WEST, B. L.; WAGNER, R. L.; FLETTERICK, R. J.; SCHAUFLELE, F.; BAXTER, J. D. The molecular biology of thyroid hormone action. **Ann N Y Acad Sci**, v.758, Jun 30, p.366-89. 1995.

RIBEIRO, R. C.; APRILETTI, J. W.; YEN, P. M.; CHIN, W. W.; BAXTER, J. D. Heterodimerization and deoxyribonucleic acid-binding properties of a retinoid X receptor-related factor. **Endocrinology**, v.135, n.5, p.2076-85. 1994.

RIBEIRO, R. C.; FENG, W.; WAGNER, R. L.; COSTA, C. H.; PEREIRA, A. C.; APRILETTI, J. W.; FLETTERICK, R. J.; BAXTER, J. D. Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. **J Biol Chem**, v.276, n.18, May 4, p.14987-95. 2001.

RIBEIRO, R. C. J.; APRILETTI, J. W.; WAGNER, R. L.; WEST, B. L.; FENG, W.; HUBER, R.; KUSHNER, P. J.; NILSSON, S.; SCANLAN, T. S.; FLETTERICK, R. J.; SCHAUFLELE, F.; BAXTER, J. D. Mechanisms of Thyroid Hormone Action: Insights from X-ray Crystallographic and Functional Studies. **Recent Prog Horm Res**, v.53, p.351-394. 1998.

RIBEIRO, R. C. J.; KUSHNER, P. J.; BAXTER, J. D. The nuclear hormone receptor gene superfamily. **Annu. Rev. Med.**, v.46, p.443-453. 1995.

RITCHIE, J. W.; SHI, Y. B.; HAYASHI, Y.; BAIRD, F. E.; MUCHEKEHU, R. W.; CHRISTIE, G. R.; TAYLOR, P. M. A role for thyroid hormone transporters in transcriptional regulation by thyroid hormone receptors. **Mol Endocrinol**, v.17, n.4, Apr, p.653-61. 2003.

SAMSON, M.; OSTY, J.; FRANCON, J.; BLONDEAU, J. P. Triiodothyronine binding sites in the rat erythrocyte membrane: involvement in triiodothyronine transport and relation to the tryptophan transport System T. **Biochim Biophys Acta**, v.1108, n.1, Jul 8, p.91-8. 1992.

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. **Mol Cell Endocrinol**, v.154, n.1-2, Aug 20, p.137-49. 1999.

SATOH, T.; YAMADA, M.; IWASAKI, T.; MORI, M. Negative regulation of the gene for the preprothyrotropin-releasing hormone from the mouse by thyroid hormone requires additional factors in conjunction with thyroid hormone receptors. **J Biol Chem**, v.271, n.44, Nov 1, p.27919-26. 1996.

SCHWARTZ, C. E.; MAY, M. M.; CARPENTER, N. J.; ROGERS, R. C.; MARTIN, J.; BIALER, M. G.; WARD, J.; SANABRIA, J.; MARSA, S.; LEWIS, J. A.; ECHEVERRI, R.; LUBS, H. A.; VOELLER, K.; SIMENSEN, R. J.; STEVENSON, R. E. Allan-Herndon-Dudley syndrome and the monocarboxylate transporter 8 (MCT8) gene. **Am J Hum Genet**, v.77, n.1, Jul, p.41-53. 2005.

SETIAWAN, E.; JACKSON, M. F.; MACDONALD, J. F.; MATTHEWS, S. G. Effects of repeated prenatal glucocorticoid exposure on long-term potentiation in the juvenile guinea-pig hippocampus. **J Physiol**, v.581, n.Pt 3, Jun 15, p.1033-42. 2007.

SHAHRARA, S.; DRVOTA, V.; SYLVEN, C. Organ specific expression of thyroid hormone receptor mRNA and protein in different human tissues. **Biol Pharm Bull**, v.22, n.10, Oct, p.1027-33. 1999.

SMITH, J. C. Hormone replacement therapy in hypopituitarism. **Expert Opin Pharmacother**, v.5, n.5, May, p.1023-31. 2004.

SUGIYAMA, D.; KUSUHARA, H.; TANIGUCHI, H.; ISHIKAWA, S.; NOZAKI, Y.; ABURATANI, H.; SUGIYAMA, Y. Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: high affinity transporter for thyroxine. **J Biol Chem**, v.278, n.44, Oct 31, p.43489-95. 2003.

SUZUKI, S.; MORI, J.; HASHIZUME, K. mu-crystallin, a NADPH-dependent T(3)-binding protein in cytosol. **Trends Endocrinol Metab**, v.18, n.7, Sep, p.286-9. 2007a.

SUZUKI, S.; MORI, J.; KOBAYASHI, M.; INAGAKI, T.; INABA, H.; KOMATSU, A.; YAMASHITA, K.; TAKEDA, T.; MIYAMOTO, T.; ICHIKAWA, K.; HASHIZUME, K. Cell-specific expression of NADPH-dependent cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine-binding protein (p38CTBP). **Eur J Endocrinol**, v.148, n.2, Feb, p.259-68. 2003a.

SUZUKI, S.; MORI, J. I.; KOBAYASHI, M.; INAGAKI, T.; KOMATSU, A.; YAMASHITA, K.; TAKEDA, T.; MIYAMOTO, T.; ICHIKAWA, K.; HASHIZUME, K. Presence of functional domains in NADPH-dependent cytosolic 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine (T3)-binding protein (p38CTBP) molecule: analyses with deletion mutants. **Horm Metab Res**, v.35, n.10, Oct, p.577-82. 2003b.

SUZUKI, S.; SUZUKI, N.; MORI, J.; OSHIMA, A.; USAMI, S.; HASHIZUME, K. micro-Crystallin as an intracellular 3,5,3'-triiodothyronine holder in vivo. **Mol Endocrinol**, v.21, n.4, Apr, p.885-94. 2007b.

TATA, J. R. A cellular thyroxine-binding protein fraction. **Biochim Biophys Acta**, v.28, n.1, Apr, p.91-4. 1958.

THOMPSON, C. C.; POTTER, G. B. Thyroid hormone action in neural development. **Cereb Cortex**, v.10, n.10, Oct, p.939-45. 2000.

TOMLINSON, J. W.; HOLDEN, N.; HILLS, R. K.; WHEATLEY, K.; CLAYTON, R. N.; BATES, A. S.; SHEPPARD, M. C.; STEWART, P. M. Association between premature mortality and hypopituitarism. West Midlands Prospective Hypopituitary Study Group. **Lancet**, v.357, n.9254, Feb 10, p.425-31. 2001.

UMESONO, K.; MURAKAMI, K. K.; THOMPSON, C. C.; EVANS, R. M. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. **Cell**, v.65, n.7, Jun 28, p.1255-66. 1991.

UNDERWOOD, A. H.; EMMETT, J. C.; ELLIS, D.; FLYNN, S. B.; LEESON, P. D.; BENSON, G. M.; NOVELLI, R.; PEARCE, N. J.; SHAH, V. P. A thyromimetic that decreases plasma cholesterol levels without increasing cardiac activity. **Nature**, v.324, n.6096, Dec 4-10, p.425-9. 1986.

UTIGER, R. D. The thyroid: physiology, thyrotoxicosis, hypothyroidism, and the painful thyroid. In: P. F. FELIG; J. D. BAXTER. A. FROHMAN (Ed.). **Endocrinology and Metabolism**. New York: MacGraw-Hill, 1995. The thyroid: physiology, thyrotoxicosis, hypothyroidism, and the painful thyroid, p.435-519

VAISMAN, M., ROSENTHAL, DORIS AND CARVALHO, DENISE P. Enzimas envolvidas na organificação tireoideana do iodo. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.48, n.1, p.9-15. 2004.

VAN DER PUTTEN, H. H.; FRIESEMA, E. C.; ABUMRAD, N. A.; EVERTS, M. E.; VISSER, T. J. Thyroid hormone transport by the rat fatty acid translocase. **Endocrinology**, v.144, n.4, Apr, p.1315-23. 2003.

VELASCO, L. F.; TOGASHI, M.; WALFISH, P. G.; PESSANHA, R. P.; MOURA, F. N.; BARRA, G. B.; NGUYEN, P.; REBONG, R.; YUAN, C.; SIMEONI, L. A.; RIBEIRO, R. C.; BAXTER, J. D.; WEBB, P.; NEVES, F. A. Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor. **J Biol Chem**, v.282, n.17, Apr 27, p.12458-66. 2007.

VIE, M. P.; EVRARD, C.; OSTY, J.; BRETON-GILET, A.; BLANCHET, P.; POMERANCE, M.; ROUGET, P.; FRANCON, J.; BLONDEAU, J. P. Purification, molecular cloning, and functional expression of the human nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-regulated thyroid hormone-binding protein. **Mol Endocrinol**, v.11, n.11, Oct, p.1728-36. 1997.

WALTER, H.; BADER, H. Effect of intravesicular monovalent cations on the steady state of the phosphoenzyme of adenosine triphosphatase dependent on sodium and potassium ions in inside-out plasma-membrane vesicles. **Eur J Biochem**, v.83, n.1, Feb 1, p.125-30. 1978.

WEBB, P.; NGUYEN, P.; KUSHNER, P. J. Differential SERM effects on corepressor binding dictate ERalpha activity in vivo. **J Biol Chem**, v.278, n.9, Feb 28, p.6912-20. 2003.

WEISS, R. E.; REFETOFF, S. Effect of thyroid hormone on growth. Lessons from the syndrome of resistance to thyroid hormone. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.25, n.3, Sep, p.719-30. 1996.

WU, Y.; XU, B.; KOENIG, R. J. Thyroid hormone response element sequence and the recruitment of retinoid X receptors for thyroid hormone responsiveness. **J Biol Chem**, v.276, n.6, Feb 9, p.3929-36. 2001.

YEN, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. **Physiol Rev**, v.81, n.3, Jul, p.1097-142. 2001.

_____. Molecular basis of resistance to thyroid hormone. **Trends Endocrinol Metab**, v.14, n.7, Sep, p.327-33. 2003.

YOON, H.; FANELLI, A.; GROLLMAN, E. F.; PHILP, N. J. Identification of a unique monocarboxylate transporter (MCT3) in retinal pigment epithelium. **Biochem Biophys Res Commun**, v.234, n.1, May 8, p.90-4. 1997.

ZUO, J.; RAREY, K. E. Responsiveness of alpha 1 and beta 1 cochlear Na, K-ATPase isoforms to thyroid hormone. **Acta Otolaryngol**, v.116, n.3, May, p.422-8. 1996.

10. ANEXO

CTBP INTERACTS WITH NUCLEAR PROTEINS: TR AND SMRT, MEDIATES T3-TRANSPORT AND SELECTIVELY AFFECTS TR FUNCTION ON DIFFERENT RESPONSE ELEMENTS

RANIERI R OLIVEIRA, ANA C C SÁ, GUSTAVO B BARRA, RUTNÉIA P PESSANHA, VINICIUS M COSTA; MARIE TOGASHI, FRANCISCO A R NEVES, LUIZ A SIMEONI.

Laboratory of Molecular Pharmacology - - University of Brasilia - DF - Brazil

Graduate Program in Health Sciences - Faculty of Health Sciences - University of Brasilia - DF - Brazil

Abbreviations: **SMRT**, silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor; **GRIP**, member of p160 family of co-activators; **SRC1**, Steroid receptor coactivator-1, **GST**; glutathione S-transferase, CTBP, human μ -crystallin.

Correspondence to: Luiz Alberto Simeoni, lsimeoni@unb.br, phone: 55-61-33072098,

Keywords: Cytosolic thyroid binding protein, T3, Thyroid receptor, gene activation.

Background: The importance of the cytoplasmatic proteins in the uptake, storage and nuclear translocation of thyroid hormone is poorly understood. Moreover, the relation of cytosolic thyroid binding protein 38kDa (CTBP) with nuclear transport of T3 and T3-mediated gene transcription is still controversial. The aim of this work was to investigate the role of CTBP in the T3-mediated thyroid receptor (TR) activation.

Methods: T3 dose response curves were performed in CHO cells cotransfected with plasmids expressing TR β 1, CTBP, and thyroid responsive elements driving the luciferase gene (TREs – DR4, F2, PAL and TRH promoter). Whole cell and nuclear [¹²⁵I]T3 transport assays were performed in CHO cells transfected or not with CTBP. Since CTBP could be localized in the nucleus, we also measured the interactions of CTBP with TR and coregulator proteins such as SMRT, SRC1 through GST-pull down assays.

Results: Overexpression of CTBP increased [¹²⁵I]T3 uptake from 61.6 \pm 9.4 cpm/ μ g protein in control cells to 151.6 \pm 23.7 cpm/ μ g protein (p <0.05). In reporter gene assays, CTBP cotransfection increased TR maximum activation on TRE-PAL by 42%. Additionally CTBP overexpression in CHO cells increased T3 EC50 on TRE-DR4 by 5.5 fold. On the other hand, on the TRE-F2 and TRH promoter, a T3 negatively regulated gene, the co-transfection of CTPB did not change T3 activation and repression, respectively. Interesting, GST pull-down assays showed that CTBP directly interacted *in vitro* with GST-TR β 1 and GST-SMRT, but not GST-SRC1.

Conclusion: We demonstrated that CTBP increases intracellular T3 concentration and modulates T3-mediated gene transcription and this effect is TRE specific. Furthermore, CTBP directly with TR β 1 and the corepressor SMRT, but not with coactivator SRC1. Taken together, these results suggest that CTBP may affect T3 action not only by changing T3 intracellular levels, but also interacting with proteins involved in T3 response.

INTRODUCTION

The thyroid hormones (TH), thyroxin (T4) and 3,5,3'-triiodothyronine (T3), are essential for proper development, tissue differentiation and metabolism of mammals. Most actions of these hormones are mediated by the binding of T₃ to thyroid hormone receptors (TRs). (Underwood *et al.*, 1986; Weiss *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 2000; Yen, 2001; Bassett *et al.*, 2003; Gardner *et al.*, 2006) TRs are ligand-regulated transcription factors of the nuclear receptor superfamily (Mangelsdorf *et al.*, 1995; Aranda *et al.*, 2001; Yen, 2001) that modulate gene expression by binding specific DNA sequences, known as thyroid response elements (TREs), found in the promoters of TR-regulated genes. TREs are composed of repeats of the consensus half-site AGGTCA in a variety of different orientations, including direct repeats spaced by four nucleotides (DR-4), inverted palindromes (F2) and palindromes (TRE-PAL). (Umesono *et al.*, 1989; Umesono *et al.*, 1991)

The amplitude of T3 responses is totally related to its intracellular concentration, which depends on thyroid production, T3 conversion from T4 in tissues by deiodinases, and its transport from plasma and interstitial fluid through cell and nuclear membrane. Many transporters, such as amino acid, monocarboxylates, organic anions, fatty acid, and ATP-binding cassette (ABC) proteins, have contributed to TH transport across the membrane. (Cavaliere *et al.*, 1999; Pizzagalli *et al.*, 2002; Ritchie *et al.*, 2003; Van Der Putten *et al.*, 2003; Dumitrescu *et al.*, 2004)

Nonetheless, intracellular T3 and T4 levels can be regulated not only by membrane transporters, but also by cytosolic proteins possessing high affinity for T3 and T4. In this context, the cytosolic thyroid - binding proteins (CTBPs) have been shown to play an important role in T3 action. The 38-kDa cytosolic thyroid binding protein (CTBP), also called μ -crystallin, was purified from rat hepatic tissue, and can be found as a homodimer of 76 kDa. CTBP is widely expressed in many human tissues, (Suzuki, Mori, Kobayashi, Inagaki, Inaba *et al.*, 2003) specially in cochlea and vestibule. Mutations in this protein are associated with nonsyndromic deafness. (Abe *et al.*, 2003; Suzuki, Mori, Kobayashi, Inagaki, Inaba *et al.*, 2003) In addition, previous results showed that an overexpression of CTBP increased intracellular and intranuclear

[¹²⁵I]T3 content in GH3 cells. Contradictorily, despite of the high levels of T3 in the nucleus, T3 transcription activation was sensibly reduced on TRE-PAL. These results suggest that CTBP can modulate T3 availability to bind to TR in the nucleus or CTBP can interact with other proteins involved in TR signaling pathway inhibiting T3 response. (Mori *et al.*, 2002)

Therefore, in order to investigate the role of CTBP on T3-mediated gene activation in different TREs, we performed a T3 dose-response curve in CHO cells transfected or not with CTBP. Our results showed that the CTBP effect on T3 transcription action is TRE specific. On TRE-PAL, CTBP increased T3 maximum activation by 70%. However, on DR4, CTPB significantly decreased T3 sensibility by 5.5 fold, did not change T3 effect on inverted palindrome (F2) and Thyrotropin-releasing hormone (TRH) promoter. Additionally, using GST pull-down assays, we observed that CTBP interacts directly with TR β 1 and the corepressor SMRT, but not with coactivator GRIP1. Collectively, these results suggest that CTBP may modulate T3 effect not only by changing T3 intracellular levels, but also interacting with proteins involved in T3 response.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids

Two copies of synthetic responsive elements, DR4, F2, PAL driving the Luciferase gene and TR β 1 were previously described. (Lopez *et al.*, 1993; Ribeiro *et al.*, 2001) TRH promoter Luciferase reporter gene (TRH-Luc) and pcDNA-CTBP were kindly provide by Barbara Deminieux and Satoru Suzuki, respectively (Guissouma *et al.*, 2000; Mori *et al.*, 2002). pCMV- β -galactosidase vector was used as transfection efficiency control. For protein synthesis in bacteria, plasmids encoding different nuclear proteins fused to glutathione-S-transferase (GST) were used: (Darimont *et al.*, 1998) GST-SRC1 (381-882), (Feng *et al.*, 1998) GST-SMRT (987-1491), (Webb *et al.*, 2003) and GST-TR β 1 (full-length). (Horlein *et al.*, 1995)

Cell Culture and gene reporter assay

CHO cells were cotransfected with pCMX- TR β 1 (1 μ g) and TRE-luc (4 μ g) and pcDNA-CTBP (1 to 16 μ g). Cells were electroporated, plated in twelve-well plates, and treated with T3 (10⁻⁵ to 10⁻⁹M) or vehicle (Ethanol:DMSO; 9:1). 24 h after treatment, cells were lysated in reporter lysis buffer (Luciferase Assay System - Promega). Luciferase activity was determined with the Luciferase Assay System - Promega according to the manufactures instructions using a luminescence counter (Microbeta Trilux, Perkin-Elmers). β -galactosidase activity was determined with β -galactosidase Enzyme Assay with Reporter Lysis Buffer (Promega). Fold activation was calculated based on the ration between luciferase and β -galactosidase activity measured in the presence and absence of T3 in positively regulated TRE. (Chiellini *et al.*, 1998)

Western blotting Assay

CHO cells transfected with 1 to 16 μ g of pcDNA-CTBP were washed twice in ice-cold PBS and lysated with RIPA lysis buffer (10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 137mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH 8 and 2mM EDTA). Lysed cells were resuspended in Protein Loading Buffer (4% SDS; 0.1 M Tris pH 8.9; 2 mM EDTA; 0.1% bromophenol blue; 20% glycerol and 0.25 M

DTT), and samples were separated in 10% SDS PAGE gels and transferred to Immuno-Blot polyvinylidene difluoride (PVDF) Membrane (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA) by semidry electrophoretic transfer (Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA). Membranes were blocked with TBS-T (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, and 0.1% Tween 20) containing 5% skim milk. Detection was done by incubating the blocked membrane with primary goat antihuman μ -Crystallin (sc22424, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) and measuring the enhanced chemiluminescence of the secondary antibody horseradish peroxidase-coupled donkey-antigoat IgG antibody (sc 2020, Santa Cruz Biotechnology, Inc). (Mori *et al.*, 2002)

Whole and nuclear cell uptake of [¹²⁵I]T3

Measurements of whole and nuclear T3 uptake were made in CHO cells transfected with 8 μ g of pcDNA-CTBP or only with vector (control cells). The transfected cells were grown on six-well or 10 cm plates to whole and nuclear cell, respectively. Transfected cells were washed twice with PBS prewarmed to 37°C or to nuclear transport, nucleus of the transfected cells were separated by lysing the transfected cells with 2 mL of 0.25 mM sucrose, 1 mM MgCl₂, and 20 mM Tris-HCl (pH 7.4) containing 0.5% Triton X-100, followed by centrifugation of the suspension at 1,500 g for 10 min, both whole cells and nucleus were incubated with RPMI medium containing 0.01% newborn bovine serum and 65 pM [¹²⁵I]T3 (2200 Ci/mmol; Amersham Biosciences, Piscataway-NJ, USA). Uptake was stopped at 5, 15, 30 and 60 min (only 60 min to nuclear transport), by aspirating rapidly the medium and washing the cells six times with 1 mL of ice cold PBS. (Neves *et al.*, 2002). Whole cells were then lysed and harvested with 1 ml NaOH 0,1M. The whole and nuclear cell uptake was determined by measuring the radioactivity of the lysed of whole cells or in the nucleus obtained by centrifugation, results were expressed as average of cpm/ μ g of protein \pm SD.

Efflux of T3

Efflux studies were conducted as described previously. (Neves *et al.*, 2002) Briefly, CHO cells transfected with 0 to 8 μ g of pcDNA-CTBP were preincubated for 3 h at 37°C with RPMI

medium containing [125 I]T₃ (65 pM) and 0.01% FCS. Following that, cells were washed six times with ice-cold PBS (as in the uptake studies described above). Efflux was initiated by adding 1 mL of efflux medium to each well (RPMI medium containing 10% FCS without tracer, prewarmed to 37°C). Addition of 10% FCS to the medium effectively prevented reuptake of [125 I]T₃ during the efflux study. This medium was collected and replaced by fresh prewarmed efflux medium at 5, 10, 30, and 60 min. At the end of the efflux period, cells were removed from the plates by adding 1 mL NaOH 0.1% per well. (Neves *et al.*, 2002) Rates of efflux was expressed as the means \pm SD. Efflux media collected at 60 min were analysed for T₃ metabolism by column sephadex chromatography. (Docter *et al.*, 1982)

Glutathione S-Transferase Pull-Down Assay

CTBP and TR β 1 were expressed in a cou to produce radio labeled full-length CTBP and TR receptor *in vitro*, using the TNT-Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega) radio labeled with [35 S]-methionine (Perkin-Elmer). GST-TR β 1, GST-SRC1 (381-882) and GST-SMRT (987-1491) fusion proteins were produced in BL21 competent cells. GST-fusion proteins were purified by linking to glutathione-Sepharose 4B beads. For the binding assay, the glutathione-Sepharose 4B beads suspension containing 4 μ g of GST fusion protein was incubated with 3 μ l of 35 S-labeled protein in 150 μ L of 1x TST buffer (0.1% Nonidet P-40, 0.1% Triton X-100, 1 mM DTT, and 2 μ g/mL bovine serum albumin), in the presence of 10^{-6} M T₃ or vehicle. After 2h of incubation at 4°C, beads were washed with the same buffer. Beads with associated proteins were resuspended in SDS-loading buffer and proteins were separated using a 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and visualized by autoradiography.

Statistics

The results are representative of at least five independent experiments and show the mean \pm SD. Averages were analysed using analyses of variance (Anova), if necessary the multiple comparisons between each treatment were performed using Newman-Keuls test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Western Blotting assay

To evaluate whether pcDNA-CTBP transfection induces the expression of the protein, we performed a western blotting assay in CHO cells. As observed in Figure 1, in normal conditions, CHO cells do not express CTBP, and transfection of 2, 4, 8 and 16 μ g pcDNA-CTBP increased CTBP expression in a dose dependent manner and the highest levels was observed with 8 and 16 μ g. Therefore, we further used 8 μ g of pcDNA-CTBP in the next experiments.

Effect of CTBP on [¹²⁵I]T3 uptake in CHO cells

To verify whether CTBP can modulate intracellular (whole and nuclear) contents of T3, we performed [¹²⁵I]T3 uptake assay in CHO cells transfected or not with 8 μ g CTBP. As it was described before, CTBP transfection significantly increased T3 uptake. At 5 min the influx rate was 2.5 times higher in CTBP transfected cells than control cells (151.6 ± 23.7 cpm/ μ g of protein *vs* 61.6 ± 9.4 cpm/ μ g of protein ($p < 0.05$), respectively). This difference remained constant during whole experiment, and at end of 60 min of influx, the influx in CTBP transfected CHO cells was more than the double of the control (234.6 ± 4.9 *vs* 100.3 ± 7.4 cpm/ μ g of protein ($p < 0.05$), fig 2A).

Next, we measured nuclear uptake of [¹²⁵I]T3 by CHO cells transfected or not with 8 μg of pcDNA-CTBP. As observed with whole cell uptake, at the end of 60 min, [¹²⁵I]T3 content in the nucleus of CTBP transfected CHO cells were almost the double of the observed in control cells, 29.3 ± 3.9 versus 15.3 ± 5.4 cpm/μg of protein respectively (Fig. 2-B).

Effect of CTBP on [¹²⁵I]T3 efflux in CHO cells

To further analyze the effect of CTBP on T3 export, we determined [¹²⁵I]T3 efflux on CHO cells transfected with 2, 4 and 8 μg of CTBP. Despite increasing in the uptake of [¹²⁵I]T3, CTBP transfection did modify [¹²⁵I]T3 efflux. Therefore, the percentages of cellular [¹²⁵I]T3 remaining after 60 min in transfected cells with 0, 2, 4 and 8 μg of CTBP were 10.8±1.1, 12.4±2.98, 10.0±1.5, and 12.1±2.7, respectively (fig 3).

Chromatographic analysis of the [¹²⁵I]-labeled compounds in the efflux medium from CTBP transfected or control cells, demonstrated that CTBP did not change T3 metabolism that was less than 4%.

Effect of CTBP on reporter gene assay

To investigate if the observed high levels of whole cells and nuclear T3 contents induced by overexpression of CTBP have an effect in T3-mediated gene transcription, a T3 dose response curves were performed in gene reporter assays. As we can see in Figure 4A, although CTBP transfection did not change the EC50 on TRE-PAL (1.0x10⁻⁷ vs 1.3x10⁻⁷M, p = 0.1), it increased the T3 efficacy by 42% since the maximum response at T3 10⁻⁶M was significantly lower in control group (3.60±0.70) when compared to CTBP expressing cells (5.10±0.15; p<0.01). However, different from TRE-PAL, CTBP overexpression did not alter T3 efficacy although it impaired T3 sensibility on TRE-DR4 in 5.5 fold, since when compared to the control group (control EC50 = 1.2x10⁻⁷ M versus CTPB 6.6x10⁻⁷ M, p<0.05, fig 4B). Furthermore, on F2 response element, no significant changes were observed in the EC50 and efficacy in the CTBP

expressing cells, ($p=0.10$, fig. 4C). Lastly, to investigate the effect of CTBP on negative T3 regulated promoter, we examined the effect of different amount of transfected CTBP (0, 1, 2, 4 and 8 μ g) in T3 controlled repression on TRH promoter. As shown in Fig 4D, CTBP did not have any influence in T3 repression of TRH promoter, even with 8 μ g of CTBP.

CTBP and its interactions with nuclear proteins

In view of the fact that CTBP effect on T3 transcription action is TRE specific and is not only related with T3 nuclear concentration, we decided to study whether these influences could be associated to interactions between CTBP with other nuclear proteins. In order to do this, we performed GST pull-down assays, where we could observe that CTBP directly interacted with a corepressor, SMRT, and TR β 1, but not SRC1. Furthermore, addition of T3 slightly reduced the interaction between CTBP and SMRT but not with TR β 1. (fig. 5)

DISCUSSION

Several reports have shown that CTBP binds T3 and plays an important regulatory role in T3 transport into the nucleus, and its expression can modulates T3-transcription regulation by changing the cytoplasmic and nuclear distribution of T3. (Hashizume *et al.*, 1991; Mori *et al.*, 2002; Suzuki, Mori, Kobayashi, Inagaki, Inaba *et al.*, 2003; Suzuki, Mori, Kobayashi, Inagaki, Komatsu *et al.*, 2003) In humans, the clinical relevance of CTBP is observed in K314T and X315Y mutants that are associated with nonsyndromic deafness. (Abe *et al.*, 2003; Oshima *et al.*, 2006) Recently, the crystallography structure of CTBP bound with NADPH refined to 2.6Å was resolved, showing a dimer in the asymmetric unit and a putative T3 binding site. (Cheng *et al.*, 2007) This result reinforced evidences for a regulatory role of CTBP in T3 mediated gene expression. Nevertheless, the mechanism through which CTBP influences T3 action is still unclear.

Microarray expression investigation demonstrated elevated expression of CTBP mRNA in the human inner ear (Abe *et al.*, 2003). Immunohistochemical analyses showed that this protein is expressed preferentially in type II fibrocytes where Na,K-ATPase is enriched. (Oshima *et al.*, 2006). A T3 response element was recognized in the promoter region of the Na-K-ATPase β 1 gene, (Feng *et al.*, 1993) and Na-K-ATPase activity was stimulated by T3 in various tissues. Since the two proteins, CTBP and Na-K-ATPase, are likely to be co-localized in type II fibrocytes, CTBP might be involved in the potassium ion recycling system through Na,K-ATPase, and this way, it can influence the hearing function in humans. (Oshima *et al.*, 2006)

In our study, CTBP expressing cells showed a higher whole cell and nuclear [125 I]T3 uptake than non transfected CHO cells. These results are in accordance with previous report using GH3 cells. (Mori *et al.*, 2002) In contrast, CHO cells transfected with CTBP did not exhibited any difference of T3 efflux, suggesting that CTBP regulates only influx but not the efflux in this cell type. This result is different from other reports where CTBP transfection in GH3 cells reduced T3 efflux. The absence of any difference on efflux rate in CTBP expressing CHO cells can be attributed by the high ability of CHO cells to export T3 when compared to GH3 cells. As shown in figure 2, at the end of the first 10 min, nearly 70% of [125 I]T3 had been released from the cells (fig 3).

Interestingly, in CHO cells, the high levels of CTBP selectively affected T3 action at each different TR response element. At TRE-PAL (fig 4A), CTBP increased T3 efficacy to activate the gene transcription by two fold. This result is in accordance with the rise in the amount of intranuclear T3. However, at DR4 response element, despite the high nuclear cell T3 content, CTBP transfection impaired T3 sensitivity to regulate gene expression since it shifted T3 dose response curve to the right increasing T3 EC50 value (fig 4B). On the other hand, at the inverted palindrome response element (TRE-F2) and at the TRH promoter, CTBP expression did not modify T3 dose response curve. These different effects of CTBP for each TRE suggest that CTBP influences the T3 action not only by increasing the intracellular amount of T3, but also, it is possible that CTBP diminishes the available intranuclear free T3 to bind to TR. Additionally, CTBP may interact with other proteins involved in T3 signaling pathway, such as TR and coregulators.

This hypothesis was confirmed *in vitro* by GST pull-down assays, where we demonstrated for first time that CTBP interacted with TR β 1 and corepressor SMRT, but not with the coactivator SRC-1. Nonetheless, the role of CTBP protein interactions in T3-regulated genes expression for each thyroid response element remains unknown. It is noteworthy that we have shown that TRE half site orientation dictates the composition of the active form of TR *in vivo*. In yeast and in mammalian cells RXR-TRs heterodimer activate transcription at DR-4 and TR homodimers and monomers mediate T3 response at inverted palindrome (F2) and palindrome (PAL) respectively. Such findings suggest that TRE half site dictates TR oligomer recruitment which is one important factor that should be considered in regulation of TR action and T₃ responsiveness *in vivo* (Velasco *et al.*, 2007). Consequently, it is possible that the half site response element dictate whether CTBP should be involved in the oligomeric complex that controls T3 transcription regulation, although this speculation certainly requires further investigation.

Chromatography analysis of the [¹²⁵I]-labeled compounds in the efflux medium showed that T3 metabolism was not changed by CTBP expression. Thus, the influence of CTBP on T3-mediated gene activation is not caused by change in T3 metabolism in CTBP expressing cells.

We found changes in the CTBP induced gene activation, and for the first time we showed an *in vitro* interaction between CTBP and nuclear proteins, SMRT and TR β 1, that are known to modulate T3 mediated gene activation. Based on these findings, we suggest that CTBP modulates function of T3-activated genes *in vitro*, not only by influencing the intracellular T3 contents, but also interacting with nuclear proteins. Until now it is not possible to conclude the specific function of CTBP in the activation complex, but there is a strong evidence of its TRE-specific role in T3-mediated gene transcription. More studies are necessary to find other interactions of CTBP with nuclear proteins, and, thus, characterize the role and mechanism of CTBP in the activation or repression induced by T3 in different tissues and cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

Ranieri R. Oliveira was supported by a fellowship from CNPq. We thank FINATEC and CNPq for financial support. We thank Dr. Satoro Suzuki for kindly supplying the plasmids of pcDNA-CTBP.

RESULTS

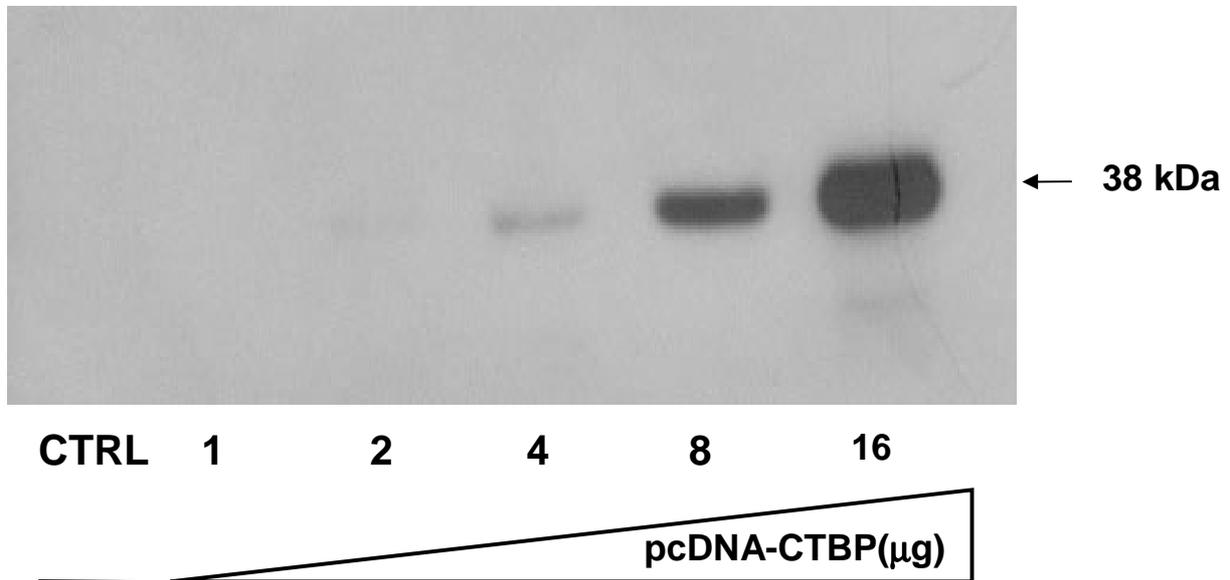


Figure 1. Western blotting analysis for CTBP expression. CHO cells were transfected with 1 to 16 μg of pcDNA-CTBP and cultured for 24h in fresh RPMI containing 10% BFS, whole cell extract was prepared using lysis buffer. Western blotting was carried out following previous description using the polyclonal donkey anti-human CTBP antibody, goat anti-donkey conjugated to horseradish peroxidase, and the ECL chemiluminescence kit.

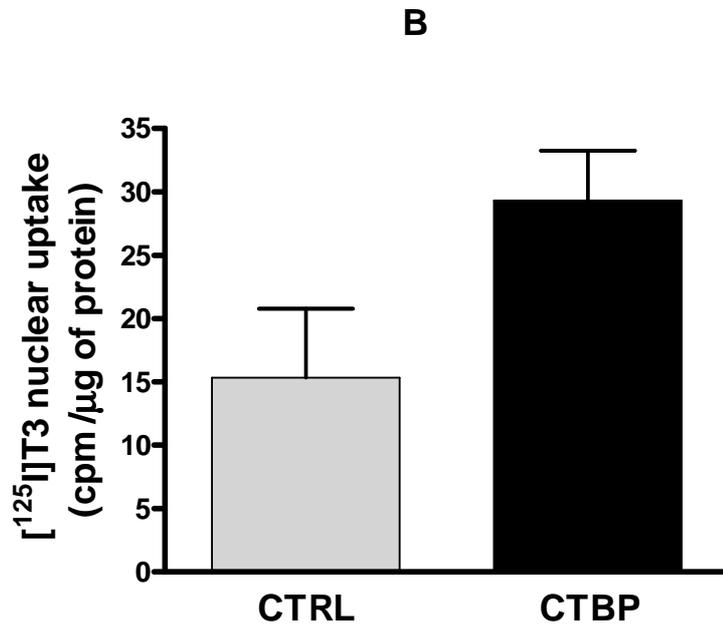
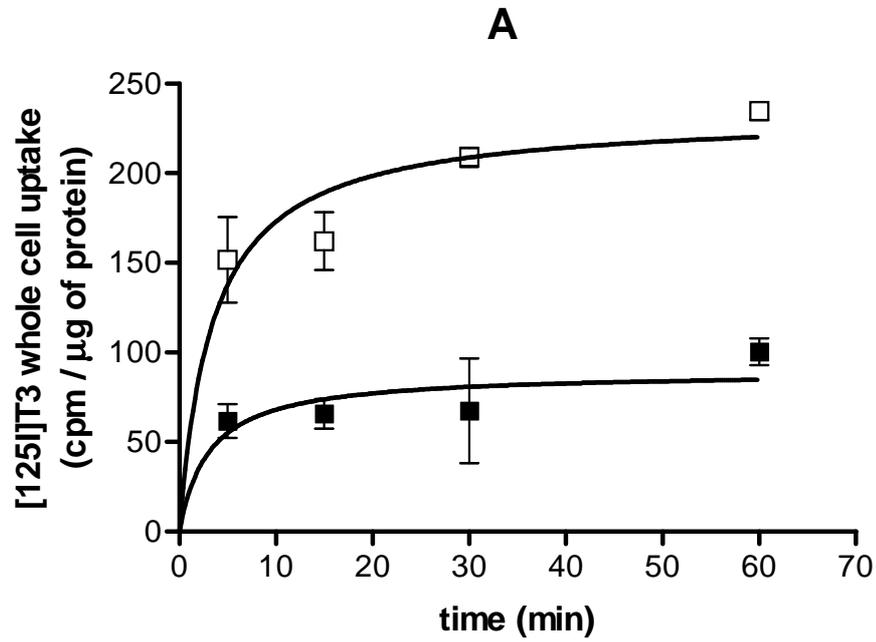


Figure 2. CTBP increased the whole cell and nuclear [125 I]T3 uptake. (A) Effect of CTBP overexpression on whole [125 I]T3 uptake in CHO cells transfected only with vector (closed square) or with 8 μ g of pcDNA-CTBP (opened square). Cells were incubated with 65 pM

$[^{125}\text{I}]\text{T3}$ for 5, 15, 30 and 60 min, followed by cellular lysis and the whole $[^{125}\text{I}]\text{T3}$ accumulated was measured in a gamma counter. (B) Effect of CTBP overexpression on nuclear $[^{125}\text{I}]\text{T3}$ uptake in CHO cells transfected only with vector (gray bar) or with 8 μg of pcDNA-CTBP (black bar). Cells for nuclear uptake were incubated with 65 pM $[^{125}\text{I}]\text{T3}$ for 60 min, and the nuclear $[^{125}\text{I}]\text{T3}$ accumulated was measured in a gamma counter.

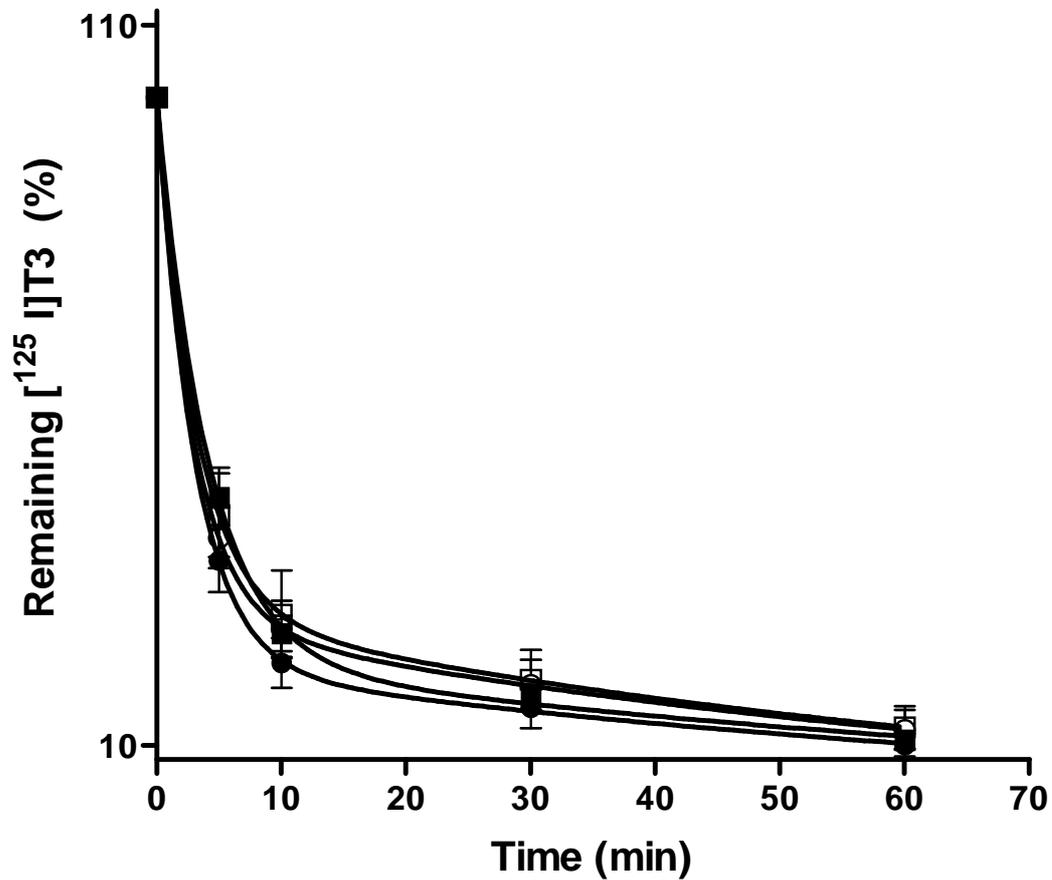


Figure 3. CTBP did not influence the [¹²⁵I]T3 efflux. CHO cells were transfected with vector (closed square), 2 μg (open square), 4 μg (closed circle) and 8 μg (open circle) of pcDNA-CTBP. Transfected CHO cells were incubated with medium containing 65 pM [¹²⁵I]T3 for 3 h, followed by replacement of radioactive medium for efflux medium containing 10% of FBS, and the amount of [¹²⁵I]T3 exported by cells at 5, 10, 30 and 60 min were measured in a gamma-counter.

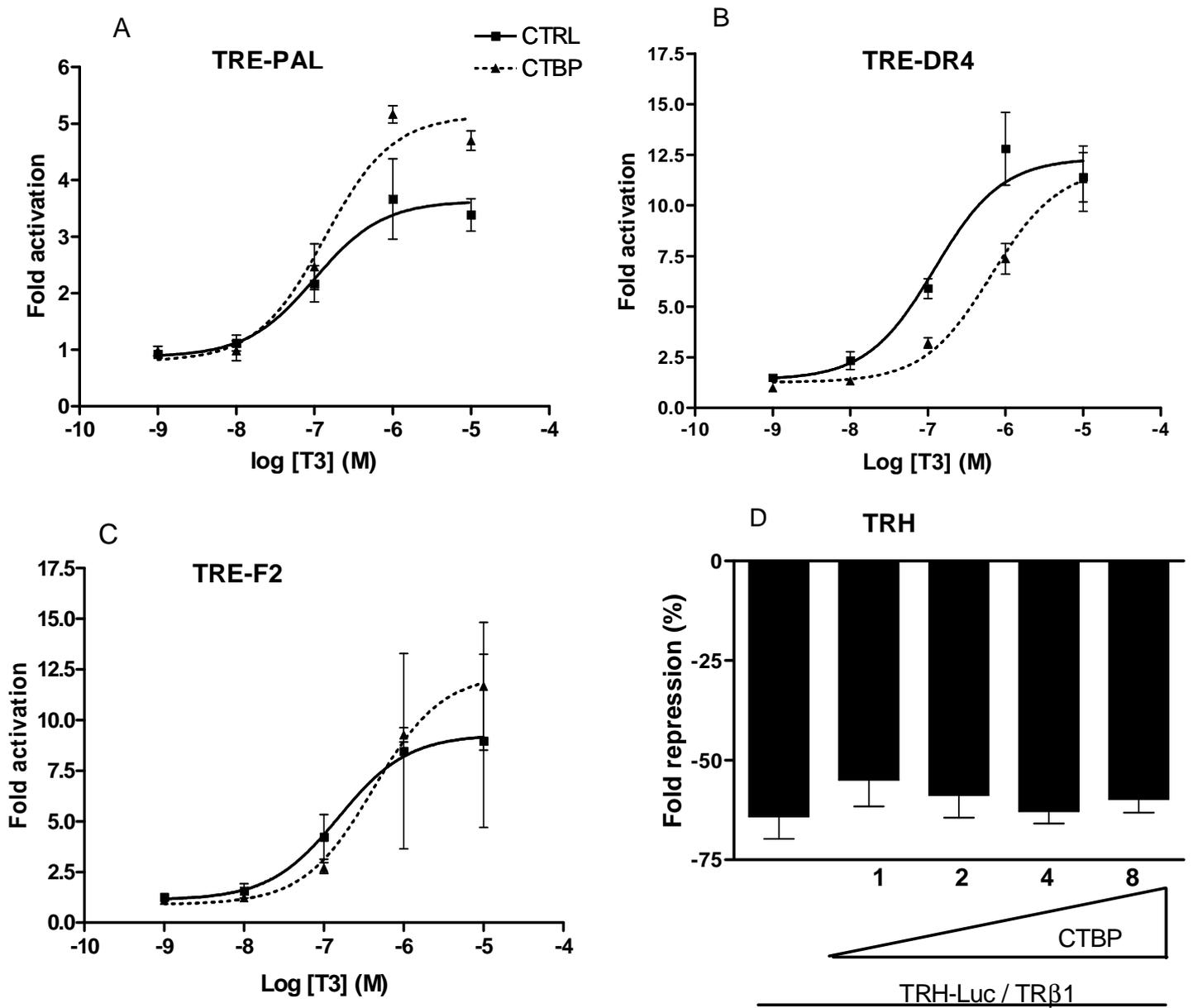


Figure 4. The gene activation was regulated in a TRE-specific way. CHO cells were cotransfected with plasmids for expression of TR β 1, CTBP and TRE (TRE-PAL (A), TRE-DR4 (B), TRE-F2 (C), and TRH promoter (D)) driving the luciferase gene reporter. Subsequently, transfected cells were treated with increasing doses of T3 (10^{-9} M - 10^{-5} M), luciferase activity was determined in a chemiluminescence counter for construction of dose-response curves

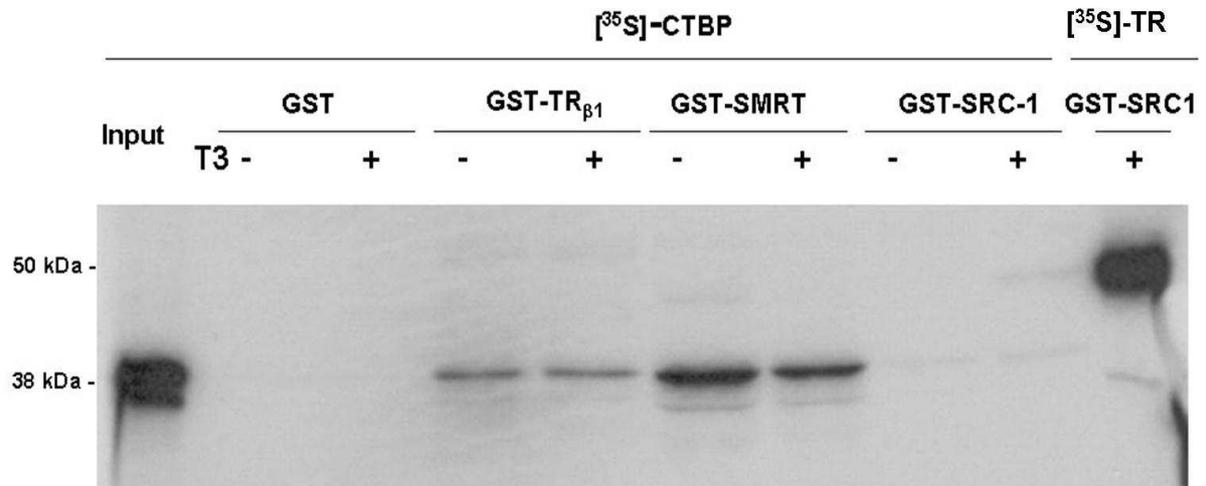


Figure 5. TR β 1 and SMRT interacted in vitro with CTBP. GST pull-down experiments examining the binding of [³⁵S]-labeled CTBP with GST-TR, GST-SMRT and GST-SRC1 were performed in the presence of vehicle or 10⁻⁷ M of T3.

REFERENCES

- Abe, S., T. Katagiri, A. Saito-Hisaminato, S. Usami, Y. Inoue, T. Tsunoda e Y. Nakamura. Identification of CRYM as a candidate responsible for nonsyndromic deafness, through cDNA microarray analysis of human cochlear and vestibular tissues. Am J Hum Genet, v.72, n.1, Jan, p.73-82. 2003.
- Aranda, A. e A. Pascual. Nuclear hormone receptors and gene expression. Physiol Rev, v.81, n.3, Jul, p.1269-304. 2001.
- Bassett, J. H., C. B. Harvey e G. R. Williams. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. Mol Cell Endocrinol, v.213, n.1, Dec 31, p.1-11. 2003.
- Cavalieri, R. R., L. A. Simeoni, S. W. Park, J. D. Baxter, B. F. Scharschmidt, R. C. Ribeiro e N. Lomri. Thyroid hormone export in rat FRTL-5 thyroid cells and mouse NIH-3T3 cells is carrier-mediated, verapamil-sensitive, and stereospecific. Endocrinology, v.140, n.11, Nov, p.4948-54. 1999.
- Cheng, Z., L. Sun, J. He e W. Gong. Crystal structure of human micro-crystallin complexed with NADPH. Protein Sci, v.16, n.2, Feb, p.329-35. 2007.
- Chiellini, G., J. W. Apriletti, H. A. Yoshihara, J. D. Baxter, R. C. Ribeiro e T. S. Scanlan. A High Affinity Subtype-Selective Agonist Ligand for the Thyroid Hormone Receptor. Chemistry and Biology, v.5, n.6, p.299-306. 1998.
- Darimont, B. D., R. L. Wagner, J. W. Apriletti, M. R. Stallcup, P. J. Kushner, J. D. Baxter, R. J. Fletterick e K. R. Yamamoto. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. Genes Dev, v.12, n.21, Nov 1, p.3343-56. 1998.
- Docter, R., E. P. Krenning, G. Bos, D. F. Fekkes e G. Hennemann. Evidence that the uptake of tri-iodo-L-thyronine by human erythrocytes is carrier-mediated but not energy-dependent. Biochem J, v.208, n.1, Oct 15, p.27-34. 1982.

Dumitrescu, A. M., X. H. Liao, T. B. Best, K. Brockmann e S. Refetoff. A novel syndrome combining thyroid and neurological abnormalities is associated with mutations in a monocarboxylate transporter gene. Am J Hum Genet, v.74, n.1, Jan, p.168-75. 2004.

Feng, J., J. Orłowski e J. B. Lingrel. Identification of a functional thyroid hormone response element in the upstream flanking region of the human Na,K-ATPase beta 1 gene. Nucleic Acids Res, v.21, n.11, Jun 11, p.2619-26. 1993.

Feng, W., R. C. Ribeiro, R. L. Wagner, H. Nguyen, J. W. Apriletti, R. J. Fletterick, J. D. Baxter, P. J. Kushner e B. L. West. Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. Science, v.280, n.5370, Jun 12, p.1747-9. 1998.

Gardner, D. G. e D. Shoback. Basic & clinical endocrinology. Norwalk, Conn.: McGraw-Hill. 2006. xv, 811 p.

Guissouma, H., N. Becker, I. Seugnet e B. A. Demeneix. Transcriptional repression of TRH promoter function by T3: analysis by in vivo gene transfer. Biochem Cell Biol, v.78, n.3, p.155-63. 2000.

Hashizume, K., S. Suzuki, K. Ichikawa e T. Takeda. Purification of cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine(T3)-binding protein(CTBP) which regulates nuclear T3 translocation. Biochem Biophys Res Commun, v.174, n.3, Feb 14, p.1084-9. 1991.

Horlein, A. J., A. M. Naar, T. Heinzl, J. Torchia, B. Gloss, R. Kurokawa, A. Ryan, Y. Kamei, M. Soderstrom, C. K. Glass e Et Al. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. Nature, v.377, n.6548, Oct 5, p.397-404. 1995.

Lopez, G., F. Schaufele, P. Webb, J. M. Holloway, J. D. Baxter e P. J. Kushner. Positive and negative modulation of Jun action by thyroid hormone receptor at a unique AP1 site. Mol Cell Biol, v.13, n.5, May, p.3042-9. 1993.

Mangelsdorf, D. J. e R. M. Evans. The RXR heterodimers and orphan receptors. Cell, v.83, n.6, Dec 15, p.841-50. 1995.

Mori, J., S. Suzuki, M. Kobayashi, T. Inagaki, A. Komatsu, T. Takeda, T. Miyamoto, K. Ichikawa e K. Hashizume. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent cytosolic T(3) binding protein as a regulator for T(3)-mediated transactivation. Endocrinology, v.143, n.4, Apr, p.1538-44. 2002.

Neves, F. A., R. R. Cavalieri, L. A. Simeoni, D. G. Gardner, J. D. Baxter, B. F. Scharschmidt, N. Lomri e R. C. Ribeiro. Thyroid hormone export varies among primary cells and appears to differ from hormone uptake. Endocrinology, v.143, n.2, Feb, p.476-83. 2002.

Oshima, A., S. Suzuki, Y. Takumi, K. Hashizume, S. Abe e S. Usami. CRYM mutations cause deafness through thyroid hormone binding properties in the fibrocytes of the cochlea. J Med Genet, v.43, n.6, Jun, p.e25. 2006.

Pizzagalli, F., B. Hagenbuch, B. Stieger, U. Klenk, G. Folkers e P. J. Meier. Identification of a novel human organic anion transporting polypeptide as a high affinity thyroxine transporter. Mol Endocrinol, v.16, n.10, Oct, p.2283-96. 2002.

Ribeiro, R. C., W. Feng, R. L. Wagner, C. H. Costa, A. C. Pereira, J. W. Apriletti, R. J. Fletterick e J. D. Baxter. Definition of the surface in the thyroid hormone receptor ligand binding domain for association as homodimers and heterodimers with retinoid X receptor. J Biol Chem, v.276, n.18, May 4, p.14987-95. 2001.

Ritchie, J. W., Y. B. Shi, Y. Hayashi, F. E. Baird, R. W. Mucchekehu, G. R. Christie e P. M. Taylor. A role for thyroid hormone transporters in transcriptional regulation by thyroid hormone receptors. Mol Endocrinol, v.17, n.4, Apr, p.653-61. 2003.

Suzuki, S., J. Mori, M. Kobayashi, T. Inagaki, H. Inaba, A. Komatsu, K. Yamashita, T. Takeda, T. Miyamoto, K. Ichikawa e K. Hashizume. Cell-specific expression of NADPH-dependent cytosolic 3,5,3'-triiodo-L-thyronine-binding protein (p38CTBP). Eur J Endocrinol, v.148, n.2, Feb, p.259-68. 2003.

Suzuki, S., J. I. Mori, M. Kobayashi, T. Inagaki, A. Komatsu, K. Yamashita, T. Takeda, T. Miyamoto, K. Ichikawa e K. Hashizume. Presence of functional domains in NADPH-dependent cytosolic 3,5,3'-Triiodo-L-thyronine (T3)-binding protein (p38CTBP) molecule: analyses with deletion mutants. Horm Metab Res, v.35, n.10, Oct, p.577-82. 2003.

Thompson, C. C. e G. B. Potter. Thyroid hormone action in neural development. Cereb Cortex, v.10, n.10, Oct, p.939-45. 2000.

Umesono, K. e R. M. Evans. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. Cell, v.57, n.7, Jun 30, p.1139-46. 1989.

Umesono, K., K. K. Murakami, C. C. Thompson e R. M. Evans. Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors. Cell, v.65, n.7, Jun 28, p.1255-66. 1991.

Underwood, A. H., J. C. Emmett, D. Ellis, S. B. Flynn, P. D. Leeson, G. M. Benson, R. Novelli, N. J. Pearce e V. P. Shah. A thyromimetic that decreases plasma cholesterol levels without increasing cardiac activity. Nature, v.324, n.6096, Dec 4-10, p.425-9. 1986.

Van Der Putten, H. H., E. C. Friesema, N. A. Abumrad, M. E. Everts e T. J. Visser. Thyroid hormone transport by the rat fatty acid translocase. Endocrinology, v.144, n.4, Apr, p.1315-23. 2003.

Velasco, L. F., M. Togashi, P. G. Walfish, R. P. Pessanha, F. N. Moura, G. B. Barra, P. Nguyen, R. Rebong, C. Yuan, L. A. Simeoni, R. C. Ribeiro, J. D. Baxter, P. Webb e F. A. Neves. Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor. J Biol Chem, v.282, n.17, Apr 27, p.12458-66. 2007.

Webb, P., P. Nguyen e P. J. Kushner. Differential SERM effects on corepressor binding dictate ERalpha activity in vivo. J Biol Chem, v.278, n.9, Feb 28, p.6912-20. 2003.

Weiss, R. E. e S. Refetoff. Effect of thyroid hormone on growth. Lessons from the syndrome of resistance to thyroid hormone. Endocrinol Metab Clin North Am, v.25, n.3, Sep, p.719-30. 1996.

Yen, P. M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. Physiol Rev, v.81, n.3, Jul, p.1097-142. 2001.