LISLAINE ANDRADE WENSING

REGULAÇÃO DO GENE TBX3 POR TGF-β1 EM CÉLULAS MESANGIAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2012

LISLAINE ANDRADE WENSING

REGULAÇÃO DO GENE TBX3 POR TGF-β1 EM CÉLULAS MESANGIAIS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Dr. Alexandre Holthausen Campos

Versão original

São Paulo 2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Wensing, Lislaine Andrade.

Regulação do geneTBX3 por TGF-β1 em células mesangiais / Lislaine Andrade Wensing. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Dr. Alexandre Holthausen Campos.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Biologia das células mesangiais.

Versão do título para o inglês: Regulation of TBX3 gene by TGF- β 1 in mesangial cells.

 Nefropatias 2. Glomérulos renais 3. Expressão gênica
 Apoptose 5. Biologia celular 6. Biologia molecular I. Campos, Dr. Alexandre Holthausen II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0208/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Lislaine Andra	de Wensing.
Título da Tese:	Regulação do	geneTBX3 por TGF-β1 em células mesangiais.
Orientador(a):	Dr. Alexandre	Holthausen Campos.
A Comissão Ju públic	ulgadora dos trabalhos o ca realizada a	le Defesa da Tese de Doutorado, em sessão ./, considerou
	() Aprovado(a)	() Reprovado(a)
	Assistant	
Examinador(a).	Nome: Instituição:	
Examinador(a):	Assinatura: Nome:	
Examinador(a):	Assinatura: Nome:	
Examinador(a):	Assinatura: Nome:	

	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



São Paulo, 20 de setembro 2007

Ref. CEUA/Einstein Nº 313-07

Título: Regulação do gene TBX3 por TGF-beta 1 em células mesangiais.

Pesquisador Responsável: Dr. Alexandre Holthausen Campos

Ilmo. Sr.

Dr. Alexandre Holthausen Campos

O Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA) analisou e aprovou o curso/projeto de pesquisa em questão, coordenado por V.Sa.

Aproveitamos a oportunidade para informar que:

• O (treinamento ou pesquisa) deve ser desenvolvido conforme delineado no processo aprovado.

 O CEUA/Einstein deve ser informado de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo ou treinamento. É papel do responsável assegurar medidas imediatas adequadas frente a eventos não previstos.

 Eventuais modificações ou emendas ao processo devem ser apresentadas ao CEUA/Einstein de forma clara e sucinta, identificando a parte a ser modificada e suas justificativas;

 Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein

 Av. Albert Einstein, 627 – Morumbi – São Paulo – SP – 05651 901 – Brasil

 Tel: (55 – 11) 3747 0291
 Fax: (55 – 11) 3747 0273

 Internet: www.einstein.br
 e-mail: cep@einstein.br

1



• O Relatório final deve ser apresentado ao CEUA/Einstein após o encerramento das atividades previstas.

 No caso de treinamento, esta aprovação tem validade de 12 meses a partir da data de aprovação pelo CEUA/Einstein e, para cada evento realizado nesse período, um relatório específico deverá ser encaminhado.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Oscar Fernando Pavão dos Santos

Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação - CEUA

 Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein

 Av. Albert Einstein, 627 – Morumbi – São Paulo – SP – 05651 901 – Brasil

 Tel: (55 – 11) 3747 0291
 Fax: (55 – 11) 3747 0273

 Internet: www.einstein.br
 e-mail: cep@einstein.br

2

Aos meus pais, pelo amor e dedicação com os quais criaram a mim e aos meus irmãos.

Ao Rodrigo, pela companhia, carinho e apoio nos bons e maus momentos da vida de um pesquisador.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Alexandre H. Campos, orientador extremamente competente e exigente. Seu esforço e paciência me tornaram uma pesquisadora melhor.

Aos meus amigos de laboratório, Daniele, Eliane, Alex, Paula Lopes, Paula Poço e Thiago, pela amizade e companheirismo.

A todos os integrantes do grupo de pesquisa experimentado do IIEP, em especial à Martinha.

Aos professores Dr. Carlos Cassola, Dra. Nancy Amaral Rebouças e Dra. Maria Oliveira de Souza, por terem nos acolhido enquanto estivemos no ICB-1/USP.

À secretaria de pós-graduação do departamento, pela assistência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa (IIEP) por fornecer a infraestrutura e o financiamento.

RESUMO

WENSING, L. A. **Regulação do gene TBX3 por TGF-**β**1 em células mesangiais.** 2012. 91 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

As células mesangiais (CM) produzem a matriz extracelular (MEC), que fornece suporte estrutural aos capilares glomerulares, e participam da regulação do ritmo de filtração glomerular. Durante a progressão das nefropatias, as CM assumem um fenótipo miofibroblástico, caracterizado por alterações na proliferação, produção de MEC e apoptose, que refletem mudancas no seu padrão de expressão gênica. Por meio da técnica de microarrays de DNA, identificamos TBX3 como um dos genes cuja expressão foi regulada positivamente em células estimuladas com soro bovino fetal (SBF), condição na qual as CM apresentam um fenótipo similar ao observado nas nefropatias. TBX3 é um repressor de transcrição que possui um domínio de ligação ao DNA (T-box), o qual se liga ao sítio T-consenso, presente na região promotora de genes-alvo. Esse gene possui duas isoformas, TBX3.1 e TBX3 + 2α , resultado do processo de splicing alternativo, no qual o éxon 2α é inserido no meio da sequência que corresponde ao domínio T-box. Nas CM, TBX3 foi regulado precocemente por concentrações baixas de TGF-B1 por um mecanismo preferencialmente pós-transcricional. As isoformas desse gene, quando superexpressas separadamente por transdução adenoviral. apresentaram localização subcelular distinta: TBX3.1 foi localizada no núcleo e TBX3 + 2α foi detectada no citoplasma. A superexpressão das isoformas não alterou a proliferação das CM e, tampouco, a produção de MEC. Entretanto, diminuiu a apoptose induzida pela privação de SBF. TBX3.1, em especial, reduziu o nível de morte celular para próximo ao observado nas células mantidas em meio suplementado com SBF. Ademais, o silenciamento do gene TBX3 sensibilizou as CM ao estímulo pró-apoptótico causado pela remoção do SBF, além de aumentar, ainda que modestamente, a apoptose das CM, mesmo na condição prósobrevivência induzida pela presença de SBF. Por fim, observamos aumento da expressão protéica de TBX3 nos glomérulos e região tubular em um modelo de nefropatia (nefrectomia 5/6), guardando correlação temporal com o aumento dos níveis de TGF-B1, colágeno IV e fibronectina. Nossos resultados indicam que o gene TBX3 atua como um fator antiapoptótico nas CM in vitro e pode estar envolvido no mecanismo pelo qual TGF-β1 induz glomeruloesclerose e fibrose tubular durante a progressão das nefropatias.

Palavras-chave: Células mesangiais. TBX3. TGF-β1. Apoptose. Glomeruloesclerose. Expressão gênica.

ABSTRACT

WENSING, L. A. **Regulation of TBX3 gene by TGF-**β**1 in mesangial cells.** 2012. 91 p. Ph. D. thesis (Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Mesangial cells (MC) synthesize extracellular matrix (ECM), providing structural support to the glomerular capillaries, and participate in the regulation of the glomerular filtration rate. During the progression of nephropathies, MC assume a myofibroblastic phenotype, characterized by changes in proliferation, apoptosis and ECM production, which reflect modifications in their gene expression pattern. Using DNA microarrays, we identified TBX3 as a gene upregulated in cells stimulated with fetal bovine serum (FBS), condition in which MC display a phenotype similar to that observed in nephropathies. TBX3 is a transcriptional repressor containing a DNA binding domain (T-box), which binds to the consensus T-site present in the promoter region of target genes. This gene encodes for two isoforms, TBX3.1 and TBX3 + 2α , generated by alternative splicing, in which the exon 2α is inserted into the middle of the sequence corresponding to its T-box domain. In CM, TBX3 was upregulated by low concentrations of TGF-B1 preferentially through a post-transcriptional mechanism. TBX3 isoforms, when overexpressed separately by adenoviral transduction, showed distinct subcellular localizations: TBX3.1 was localized in the nucleus and TBX3 + 2α was detected in the cytoplasm. Overexpression of the isoforms did not affect proliferation or matrix production in MC. However, both forms of the gene decreased MC apoptosis induced by FBS deprivation. TBX3.1, in particular, reduced the level of cell death next to that observed in cells maintained in medium supplemented with FBS. Moreover, TBX3 gene silencing sensitized MC to the proapoptotic stimuli caused by FBS removal, and increase, although modestly, apoptosis rates of CM, even under the pro-survival condition induced by the presence of FBS. Finally, we observed an increase in TBX3 protein expression both in glomerular and tubular regions in a model of diabetic nephropathy (5/6 nephrectomy), temporally related to increased expression of TGF-B1, collagen IV and fibronectin. Our results indicate that TBX3 acts as an antiapoptotic factor in MC in vitro and may be involved in the mechanism by which TGF-B1 induces glomerulosclerosis and tubular fibrosis during the progression of nephropathies.

Keywords: Mesangial cells. TBX3. TGF- β 1. Apoptosis. Glomeruloesclerosis. Gene expression.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT: proteína guinase B Angll: angiotensina II **ARF:** alternate reading frame α-SMA: α-actina de músculo liso AT-1: receptor de angiotensina II tipo 1 BAD: promoter de morte associado ao Bcl-2 Bcl-2: linfoma de células B 2 BH3: domínio 3 de homologia à Bcl-2 Bid: domínio agonista de morte de interação com BH3 **β-ME:** β-mercaptoetanol BMP: proteína morfogenética óssea BSA: albumina bovina sérica cDNA: DNA complementar CKD: quinase dependente de ciclina CM: células mesangial Co-Smad: Smad co-reguladora CTGF: fator de crescimento de tecido conjuntivo **Cx:** conexina DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium DNA: ácido desoxirribonucléico **dNTP:** mistura de desoxinucleotídeos DRC: doença renal crônica EDTA: ácido etilenodiaminotetracético ERK: guinase reguladora da sinalização extracelular EROS: espécies reativas de oxigênio FACS: análise por citometria de fluxo FADD: proteína de domínio de morte associada a Fas FasL: ligante do Fas **G1:** fase do ciclo celular (*Gap 1*) **G2:** fase do ciclo celular (*Gap 2*) GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato **hCMI:** CM humana imortalizada HDAC: histona deacetilase HEK-293: células embrionárias de rim humano HK-2: células tubulares proximais humanas ID-1: gene inibidor de diferenciação tipo 1 JNK: c-Jun guinase amino terminal LAP: peptídeo associado à latência M: mitose MDCK: células de linhagem de rim canino Madin-Darby **MEC:** matriz extracelular MGB: membrana basal glomerular **MMP:** metaloproteinases de matriz MOI: multiplicidade de infecção NLS: sinal de localização nuclear NO: óxido nítrico Nppa: peptídeo natriurético precursor PAI-1: inibidor do ativador de plasminogênio 1

PBS: tampão fosfato salino PCR: reação em cadeia da polimerase **PDGF:** fator de crescimento derivado de plaguetas **PDGFR-** β : receptor de PDGF tipo β PFA 4%: paraformaldeído a 4% PI3K: fosfoinositídio-3-quinase PTEN: homológo da fosfatase e tensina **qPCR:** PCR quantitativa em tempo real RD1: domínio de repressão RIPA: tampão para ensaio de radio-imunoprecipitação RNA: ácido ribonucleico **RNAm:** RNA mensageiro R-Smad: Smad reguladora Runx2: fator de transcrição com domínio Runt S: fase de síntese do ciclo celular **SBE:** elementos de ligação a Smads SBF: soro bovino fetal SDS: dodecil sulfato de sódio siRNA: pequeno RNA de interferência Smad: Similar to Mothers against decapentaplegic TBST: tampão Tris salino com Tween 20 TE: tampão Tris com EDTA **TGF-** β **1**: fator de crescimento transformador tipo β 1 TIMP: inibidor tecidual de metaloproteinases **TNF-** α : fator de necrose tumoral tipo α UMS: Síndrome Ulnar Mamária

1 INTRODUÇÃO	14				
2 OBJETIVOS					
3 MÉTODOS	27				
3.1 Cultura celular					
3.2 Tratamento com fatores de crescimento 3.3 Curva tempo-resposta para TGF-β1					
3.5 Isolamento de RNA total	29				
3.6 Reação de transcrição reversa	29				
3.7 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	29				
3.8 Extração de proteína	30				
3.9 Western Blot	30				
3.10 Vetores	31				
3.11 Construção dos plasmídeos e do vetor lentiviral					
3.11.1 Reação de digestão	31 32				
3.11.2 Reação de ligação					
3.11.3 Transformação de E. coli para propagação dos plasmídeos ou vetores	virais				
	32				
3.11.4 Transfecção transitória por eletroporação	33				
3.11.5 Transfecção transitória de sequências de siRNA	33				
3.12 Construção dos vetores adenovirais	34				
3.12.1 Reação de PCR para amplificação da sequência codificadora completa	i das				
isoformas	34				
3.12.2 Reação de Topo clonagem	34				
3.12.3 Reação de recombinação homóloga	34				
3.12.4 Produção de adenovírus	35				
3.12.5 Titulação dos adenovírus	35				
3.13 Transdução das células como os adenovírus	35				
3.14 Ciclo celular por citometria de fluxo					
3.15 Detecção de apoptose por dosagem de atividade de caspase 3					
3.16 Modelo experimental de nefrectomia 5/6	37				
3.17 Imunohistoquímica	37				

SUMÁRIO

3.18 Imunofluorescência	
3.19 Análise estatística	
4 RESULTADOS	
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÃO	
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

As células mesangiais (CM) são células mononucleares de aspecto estrelado que ocupam a região central dos lóbulos glomerulares, representando um terço da população celular do glomérulo decapsulado¹ (Figura 1).



Túbulo Proximal

Copyright @ 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Figura 1 - Figura representativa da estrutura de um glomérulo, indicando os tipos celulares que o compõem.

Fonte: Modificado de Cummings (2007)².

Durante o desenvolvimento renal essas células migram para os glomérulos seguindo o estímulo quimiotáxico produzido por PDGF-B secretado pelas células endoteliais e, uma vez nos glomérulos, envolvem o único capilar existente, sendo responsáveis pela formação das alças capilares (Figura 2).

Figura 2 - Figura representativa da estrutura de um glomérulo em desenvolvimento, demonstrando o processo de formação das alças capilares induzido pelas CM.



Fonte: Modificado de Vaughan (2008)³.

A importância das CM para o desenvolvimento completo dos glomérulos é demonstrada por estudos em animais *knockout* para PDGF-B nas células endoteliais ou para seu receptor nas CM, que bloqueiam a migração das últimas para o glomérulo. Nesse modelo foi observada apenas uma alça capilar em forma de balão, sendo esta condição letal³ (Figura 3).

Figura 3 - Figura representativa de um glomérulo normal e de outro apresentando apenas um único capilar, observado em animais *knockout* para o receptor de PDGF.



Fonte: Modificado de Vaughan (2008)³.

No rim adulto as CM ainda são fundamentais para a manutenção da estrutura glomerular e a eliminação dessas células pelo tratamento com toxinas ou por anticorpos contra antígenos mesangiais resulta em fenótipo similar ao defeito congênito observado quando a sinalização por PDGF-B é interrompida durante o desenvolvimento do glomérulo⁴.

Em condições normais as CM secretam matriz extracelular (MEC) constituída principalmente por colágenos do tipo IV e V, laminina, fibronectina e quantidades

consideráveis de heparan sulfato e proteoglicanos^{1,4}. Além disso, as CM secretam proteases como as matriz-metaloproteinases (MMP), que degradam aquelas moléculas⁵, e dessa maneira regulam a homeostasia da MEC¹.

As CM apresentam prolongamentos citoplasmáticos ricos em microfilamentos de actina e miosina que se infiltram na MEC. Sua membrana celular, por meio dessa rede de microfibrilas, ancora-se à fibronectina da matriz, tornando esta uma extensão da própria célula. Assim, CM e MEC formam uma unidade funcional conhecida como mesângio⁶, cujas funções incluem fornecer suporte estrutural para os capilares glomerulares.

A MEC não atua apenas como uma estrutura de sustentação, visto que seus componentes podem afetar o comportamento das CM em relação à proliferação, migração, diferenciação, bem como morte celular⁷. Foi ainda demonstrado que a MEC regula o comportamento das CM de forma direta por meio da interação de componentes específicos, como fibronectina, com as integrinas presentes na superfície celular⁸ ou, de forma indireta, ao controlar, por sequestro, a disponibilidade de fatores de crescimento e outras moléculas que influenciam o fenótipo das CM. Assim, é constituída uma alça de sinalização entre as CM e MEC, fazendo com que alterações funcionais das células influenciem quantitativa e qualitativamente a MEC, que por sua vez, regula o comportamento das CM⁹.

As CM estão em contato íntimo com as células endoteliais nas regiões nas quais a membrana basal glomerular (MBG) não é contínua, podendo ser observada a presença de interdigitações entre suas membranas celulares¹⁰. Também são capazes de conectar-se à MBG por meio de interações com a MEC e, juntamente com a primeira, exercer tensão sobre a parede dos capilares glomerulares^{11,12}. Devido a essas duas últimas propriedades, a atividade contrátil das CM pode ser transmitida para o endotélio, permitindo que essas células alterem a área de superfície de filtração dos capilares e contribuam para o ajuste fino do ritmo de filtração glomerular por néfron⁴.

Além das funções descritas acima, as CM também atuam como fagócitos semiprofissionais, apresentando apenas 10% da eficiência de um macrófago. São, contudo, as principais responsáveis pela remoção de células apoptóticas residentes ou infiltrantes, que de outra forma poderiam se desintegrar em um processo de necrose secundária e desencadear inflamação^{4,13}. As CM também secretam fatores de crescimento, substâncias vasoativas e mediadores inflamatórios que, de maneira

autócrina e parácrina, regulam o seu próprio fenótipo e o das outras células glomerulares⁶. Esse fenômeno é observado mais claramente em doenças glomerulares, nas quais as CM ativadas induzem alterações fenotípicas em podócitos^{14,15} e células endoteliais¹⁰.

Pelo descrito, compreende-se facilmente que qualquer alteração no fenótipo de CM compromete a homeostasia funcional dos glomérulos e, potencialmente, repercute na função renal. As CM são alvos primários em nefropatias imunomediadas, decorrentes do diabetes mellitus ou da hipertensão arterial sistêmica, além de serem afetadas secundariamente em doenças que envolvem inicialmente podócitos, células endoteliais ou a MBG⁴. Em resposta a estímulos danosos de ordem imunológica, metabólica ou hemodinâmica, as CM adquirem um fenótipo miofibroblástico¹⁶, caracterizado por aumento da expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA), bem como por alterações em seu perfil de proliferação, migração, apoptose e produção de MEC¹⁷.

A proliferação de CM é observada preferencialmente nas nefropatias imunomediadas¹⁸, nas quais o depósito de imunocomplexos IgA (ou tratamento com anticorpos contra o antígeno mesangial - Thy-1 - em modelos experimentais) provocam extensa mesangiólise, seguida por proliferação das CM remanescentes. Nesse caso, a proliferação das CM e a produção de MEC constituem um mecanismo regenerativo que, quando desregulado, causa hipercelularidade e depósito de MEC, iniciando um processo fibrótico que leva ao desenvolvimento da doença renal crônica (DRC).

Na nefropatia diabética é observada proliferação limitada das CM no estágio inicial, induzida por PDGF-B, que logo é inibida pelo aumento dos níveis renais de TGF- β 1¹⁹, que induz a hipertrofia das CM e favorece o acúmulo de MEC²⁰. Na progressão da nefropatia hipertensiva também é observada hipertrofia celular e produção de MEC^{21,22}, nesse caso induzidas por Ang II tanto por mecanismo hemodinâmico quanto pela ativação de seus receptores AT1 presentes nas CM, envolvendo indiretamente aumento da ação de TGF- β 1²³.

Independentemente do estímulo patogênico, bem como da resposta inicial das CM ao mesmo, o desequilíbrio entre a produção e degradação da MEC, assim como modificações em sua composição, constituem a alteração morfológica comum na progressão das nefropatias mencionadas¹.

Em diferentes modelos animais de nefropatia foi detectado o aumento da expressão dos colágenos do tipo IV, V e VI, além de fibronectina e laminina, proteínas normalmente presentes na MEC^{24} . Também é induzida a expressão dos colágenos intersticiais do tipo I e III, ausentes em condições normais e detectados apenas no estágio final da glomeruloesclerose, estando associados à formação dos nódulos de Kimmelstiel-Wilson²⁴. Além do aumento da produção de MEC, também é observada redução do seu metabolismo causada pela sub-regulação das MMP, bem como de plasmina, responsável por clivá-las em sua forma ativa. Ademais, ocorre aumento na expressão de PAI-1 e TIMP, inibidores da plasmina e das MMPs, respectivamente²⁴. Essas alterações no processamento da MEC causam seu acúmulo progressivo e TGF- β 1 é a principal molécula efetora desse processo por ativar as CM.

A expressão de TGF- β 1 está associada ao desenvolvimento da DRC, como demonstrado em estudos nos quais o aumento da expressão de TGF- β 1 em animais transgênicos²⁵ ou induzida por transfecção *in vivo*²⁶ causa glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial. Por outro lado, a redução da expressão de TGF- β 1 pela infusão de oligonucleotídeos *antisense*²⁷ ou a neutralização de sua atividade pelo tratamento com anticorpos²⁸ previnem o desenvolvimento de glomeruloesclerose em modelos experimentais de nefropatia.

TGF- β 1 é sintetizado na forma de uma molécula precursora contendo um própeptídeo em adição à sequência biologicamente ativa, que é clivado intracelularmente, mas que permanece covalentemente ligado ao TGF- β 1, inativando-o. Quando secretado, esse complexo interage com a proteína LAP e associa-se à MEC. A forma latente de TGF- β 1 pode ser ativada por clivagem protéica ou pela dissociação da LAP, induzida pela interação com trombospondina 1 e integrinas, ou por espécies reativas de oxigênio (EROs) e acidificação do meio²⁹.

Uma vez na forma ativa, TGF-β1 interage com o receptor do tipo II que recruta e ativa o receptor do tipo I, que por sua vez fosforila as R-Smad 2/3. Estas dissociam-se de um complexo ligado à membrana citoplasmática, interagem com a Co-Smad 4 e são translocadas para o núcleo, onde formam complexos com coativadores ou correpressores de transcrição, regulando a expressão de genes cuja região promotora possui elementos de ligação à Smads (SBE)³⁰. Essa cascata de ativação protéica e translocação nuclear compreende a via canônica de

sinalização por TGF-β1; todavia, não é o único mecanismo pelo qual essa citocina controla a expressão gênica. Também pode ocorrer cooperação entre a via das Smads e outras vias de sinalização intracelular, como das quinases ERK1/2, JNK, p38 MAPK e PI3K^{31,32}, que propagam e diversificam o estímulo por TGF-β1, conferindo a essa citocina sua multifuncionalidade.

Alguns estudos sugerem que o depósito de MEC observado nos estágios mais avançados das nefropatias poderia induzir a apoptose das CM, e desse modo contribuir para a redução do conteúdo celular do mesângio, observada na DRC³³. Em concordância com essa hipótese, experimentos *in vitro* demonstraram que quando cultivadas em placas revestidas com fibronectina ou colágeno do tipo I as CM ficaram mais susceptíveis à apoptose induzida pela privação de soro bovino fetal (SBF)³⁴.

A apoptose foi detectada em modelos animais de doença imunomediada, tanto no processo inicial de mesangiólise como na etapa final da resolução da hipercelularidade³⁵. Também foi observada em modelos de diabetes mellitus induzida por estreptozotocina³⁶ ou de hipertensão glomerular causada pela ablação renal (nefrectomia 5/6), estando associada à fibrose glomerular³⁷.

Alguns estudos indicam que além de depósito de matriz, TGF- β 1 também contribui para o desenvolvimento da glomeruloesclerose por estimular a morte de células glomerulares nos estágios mais avançados da doença^{38,39}. Entretanto, existem poucas evidências que correlacionem a morte de CM com a ação próapoptótica de TGF- β 1 em modelos de nefropatia³⁹.

Apoptose é um processo extremamente organizado, pelo qual as células são eliminadas sem que seja iniciada uma resposta inflamatória. Esta modalidade de morte é observada desde o início do desenvolvimento embrionário, participando do processo de remodelamento tecidual. Em adultos, a apoptose controla a homeostasia do sistema imune, renovação ou atrofia tecidual. Sua desregulação está associada ao desenvolvimento de câncer e autoimunidade, lesão tecidual em doenças agudas (lesão cerebral e infarto do miocárdio) e crônicas (diabetes e neurodegeneração)⁴⁰.

Diversos são os fatores que podem desencadear a morte celular por apoptose, entre eles: ligação de moléculas aos receptores de membrana, agentes quimioterápicos, radiação ionizante, privação de fatores de crescimento e baixa quantidade de nutrientes, além de níveis elevados de EROs. Dependendo do estímulo, a apoptose pode ser iniciada por mecanismo extrínseco ou intrínseco. Embora sejam estudados separadamente, não são totalmente independentes e convergem para ativação de uma família de cisteíno-proteases (caspases), sintetizadas como precursores inativos⁴¹. A chamada via extrínseca é ativada pela ligação de FasL ou TNF- α aos seus respectivos receptores de morte, causando o recrutamento da proteína adaptadora FADD à porção citoplasmática do receptor. Esse complexo, por sua vez, recruta e agrega diversas moléculas de caspase 8, que, em seguida, processa e ativa as caspases efetoras 3 e 7⁴⁰. A via intrínseca é iniciada quando o balanço entre os membros pró-sobrevivência (Bcl-2 e Bcl-x) e próapoptose (Bax, Bad e Bid) da família Bcl-2 é desregulado em favor do aumento de atividade dos últimos. Isso altera a permeabilidade da membrana mitocondrial, favorecendo a liberação do citocromo c. Uma vez no citoplasma, o citocromo c forma um complexo com APAF1 e caspase 9, o apoptossomo, que ativa as caspases 3 e 7⁴², responsáveis por clivar diversos substratos e induzir as alterações bioquímicas e morfológicas que culminam na desintegração celular em corpos apoptóticos⁴³.

O estímulo com SBF é considerado um modelo *in vitro* para estudar alterações funcionais das CM que estão associadas ao desenvolvimento da glomeruloesclerose. Quando em cultura, na presença de SBF, as CM apresentam comportamento semelhante ao fenótipo miofibroblástico, como a expressão de α-SMA, proliferação, produção de colágenos intersticiais e resistência à apoptose^{44,45}. Em nosso laboratório empregamos a técnica de *microarrays* de DNA para explorar mudanças na expressão gênica das CM quando mantidas em meio puro em comparação às células cultivadas na presença de SBF. Nessas condições, criamos um cenário de quiescência *versus* proliferação, bem como de apoptose *versus* sobrevivência, que representam a dinâmica das mudanças que ocorrem no fenótipo das CM durante o desenvolvimento da glomeruloesclerose. Dentre os genes cuja expressão foi regulada nesse cenário, detectamos TBX3 que teve o RNA mensageiro (RNAm) aumentado em aproximadamente duas vezes pela presença de SBF.

TBX3 é um repressor de transcrição, pertencente à família de genes T-box, que codifica fatores críticos para o desenvolvimento embrionário⁴⁶ expressos tanto em invertebrados quanto em mamíferos. A análise filogenética classifica-o como membro da subfamília do gene TBX2, com o qual compartilha homologia,

principalmente em termos do domínio de ligação ao DNA. Além disso, ambos têm diversos alvos comuns e em alguns casos possuem funções sobreponíveis⁴⁷. A mutação dos genes T-box está associada a doenças congênitas envolvendo defeitos do desenvolvimento de tecidos e órgãos. A haploinsuficiência de TBX3 causa a síndrome ulnar-mamária (UMS), caracterizada por malformações nos membros superiores e coração, hipoplasia mamária e de outras glândulas⁴⁸. A principal característica das proteínas T-box consiste em uma região conservada de 180 resíduos de aminoácidos, que corresponde ao domínio de ligação ao DNA, T-box. Ele confere a essas proteínas a capacidade de ligarem-se como monômeros ou homodímeros a uma sequência de DNA palindrômica, o sítio T-consenso, presente na região promotora de genes-alvo⁴⁹. No desenvolvimento embrionário, TBX3 está envolvido no processo de organogênese por promover a renovação das células embrionárias, facilitar a colonização dos tecidos germinais pelas células tronco, bem como regular a diferenciação celular⁵⁰, participando, dessa maneira, do desenvolvimento dos membros superiores, coração, glândulas mamárias e fígado⁵¹⁻ ⁵³. Foi demonstrado que a suprarregulação de TBX3 promove a oncogênese por facilitar a imortalização celular e potencializar a capacidade invasiva das células cancerígenas^{54,55}. A expressão aumentada de TBX3 foi observada em algumas linhagens de câncer de mama, câncer de pulmão de células pequenas, carcinoma de bexiga, tumores hepáticos e melanoma⁵⁶. A proteína TBX3 é detectada no plasma de aproximadamente 80% dos pacientes com câncer de ovário e mama⁵⁷. Isso sugere que esse gene poderia ser usado como ferramenta no diagnóstico de câncer e potencial alvo terapêutico de drogas anticancerígenas, inibindo proliferação e invasão celular e/ou induzindo apoptose⁵⁶.

O gene TBX3 codifica diferentes isoformas; entretanto, apenas duas delas (TBX3.1 e TBX3 + 2α) possuem a sequência de nucleotídeos totalmente conhecida, sendo, portanto, as únicas estudadas. A isoforma TBX3 + 2α é o resultado do processo de *splicing* alternativo pelo qual ocorre a inserção de 60 pares de nucleotídeos (éxon 2α) na sequência que corresponde ao domínio T-box da proteína⁵⁸. As isoformas TBX3.1 e TBX3 + 2α são expressas em diversos tecidos humanos, sendo a primeira delas o transcrito dominante⁵⁸.

A proteína TBX3 possui em sua região C-terminal um domínio de repressão de transcrição (RD1), cuja mutação está associada ao desenvolvimento da UMS.

Também foi identificado um domínio de ativação de transcrição que foi capaz de induzir expressão gênica apenas quando isolado do RD1. Sua relevância para a função de TBX3 não foi esclarecida⁵⁹. Além dos domínios associados à regulação da transcrição gênica, TBX3 também possui uma sequência de 6 resíduos de aminoácidos que corresponde a um sinal de localização nuclear, sem o qual a proteína fica retida na região perinuclear ou no citoplasma⁵⁹.

TBX3 inibe senescência⁶⁰, promove proliferação e imortalização celular⁶⁰, além de prevenir apoptose⁵⁴, sendo suprarregulado pela via de sobrevivência Wnt-β-catenina⁶¹. O principal alvo da ação de TBX3 consiste no transcrito gerado pelo *alternate reading frame* (ARF) do lócus CDKN2A, o supressor de tumor p14^{ARF}. Sua região promotora possui 13 dos 20 nucleotídeos que compõem o sítio T consenso, na qual TBX3 se liga, reprimindo sua transcrição⁴⁷. Foi demonstrado também que TBX3 suprime a expressão de p14^{ARF} indiretamente por recrutar histona-deacetilases (HDACs) para sua região promotora. A deacetilação das histonas reforça a ligação de alta afinidade entre estas e a estrutura do DNA, impedindo o acesso da maquinaria de transcrição gênica⁶².

A proteína p14^{ARF} induz senescência por meio da ativação indireta do supressor de tumor p53, que interrompe o ciclo celular na fase G1^{63,64}. Ao reprimir a expressão de p14^{ARF}, TBX3 torna a proteína p53 suscetível à degradação induzida por Mdm2, favorecendo a redução dos seus níveis nucleares. Dessa maneira, previne a senescência e apoptose induzidos por p53, além de facilitar a transformação celular^{54,60}. TBX3 também pode inibir o processo de senescência celular por um mecanismo independente do bloqueio da via p14^{ARF}-Mdm2-p53, que envolve a repressão da expressão de p21^{cip}, um inibidor das quinases dependentes de ciclinas (CDKs)⁶⁵.

TBX3 promove a formação do sistema de condução elétrica central do coração pela repressão da expressão dos genes Cx40, Cx43 e Nppa, por meio de um mecanismo que envolve a interação com outros fatores de transcrição, como Sox4⁶⁶ e Msx2⁶⁷. Ademais, estimula proliferação e inibe a diferenciação de osteoblastos por induzir a sub-regulação dos genes Runx2 e Osterix⁶⁸. No processo de tumorigênese, reprime a expressão do supressor de tumor PTEN e assim ativa a via pró-sobrevivência PI3K/PTEN/AKT⁶⁹, além de aumentar a capacidade invasora de células cancerígenas por reprimir a expressão da proteína de adesão E-caderina⁵⁵. Foi ainda demonstrado que em alguns casos TBX3 pode atuar como um

ativador de transcrição e induzir a expressão de genes envolvidos na manutenção da pluripotência celular, como nanog⁷⁰, ou relacionados à diferenciação celular, como GATA-6⁵⁰.

Os estudos mencionados apresentam evidências de que TBX3 pode regular proliferação e diferenciação celular, bem como, apoptose em diferentes contextos fisiológicos ou envolvidos na gênese e manutenção de doenças. Já está bem definido que as CM são responsáveis por iniciar o processo fibrótico na glomeruloesclerose e que a alteração do seu fenótipo nessa condição é o resultado da perturbação do seu programa de expressão gênica⁷¹. Apesar do extenso estudo acerca da mudança do estado quiescente das CM para o fenótipo miofibroblástico, ainda restam lacunas no conhecimento a respeito de todos os aspectos desse fenômeno. Sabemos que TGF-β1 é uma das principais moléculas que iniciam esse processo e que o mesmo modula a atividade de diversas vias de sinalização nas CM. Também sabemos que o resultado final da estimulação por TGF-β1 consiste no aumento da produção de MEC, hipertrofia e apoptose das CM. Entretanto ainda não são conhecidos todos os fatores de transcrição que alteram a expressão dos genes envolvidos nesses eventos celulares. Assim, justifica-se o estudo do gene TBX3 em CM. A expressão desse gene já foi demonstrada no tecido renal; entretanto, sua função em condições normais ou em doenças não foi avaliada. Acreditamos que o gene TBX3 possa estar envolvido no mecanismo pelo qual o perfil de expressão gênica da CM é alterado nas nefropatias.



Dentre os objetivos específicos, temos:

- identificar o mecanismo de regulação das isoformas do gene TBX3 nas CM estimuladas por TGF-β1;
- 2. determinar o papel do gene TBX3 no fenótipo das CM;
- avaliar a expressão do gene TBX3 em um modelo *in vivo* de glomeruloesclerose;



3.1 Cultura celular

Células mesangiais humanas imortalizadas (hCMI), doadas pelo Dr. Bernhard Banas (Munique, Alemanha) e células tubulares proximais humanas imortalizadas (HK-2) foram cultivadas em meio de cultura DMEM *low glucose* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) suplementado com SBF (10%, Invitrogen), penicilina e estreptomicina (50.000 u/L, Invitrogen). As células foram mantidas a 37 °C, com CO₂ a 5% em incubadora umidificada. Foram utilizadas em passagens semelhantes para manutenção de uniformidade dos experimentos.

3.2 Tratamento com fatores de crescimento

As hCMI foram semeadas em placas de cultura de 6 poços. Após atingirem a confluência, as células foram lavadas com PBS e mantidas em DMEM puro por 24 horas. A seguir foi adicionado DMEM puro contendo PDGF-BB (10 ng/mL; Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA), TGF- β 1 (2 ng/mL; Sigma Aldrich) ou BMPs 2, 4 e 7 (10 ng/mL; Sigma Aldrich) ou a solução veículo (1 mg/mL de BSA e 4 mM de HCI). O RNA total foi extraído após 6 horas de tratamento para análise por qPCR.

3.3 Curva tempo-resposta para TGF-β1

As hCMI foram semeadas em placas de cultura de 6 poços. Após atingirem a confluência, foram lavadas com PBS e mantidas em DMEM puro por 24 horas. A seguir foi adicionado DMEM puro contendo TGF-β1 (2 ng/mL), enquanto o grupo controle foi mantido em meio puro. O RNA total foi extraído após 1, 3, 6 e 12 horas de tratamento para análise por qPCR.

3.4 Curva concentração-resposta para TGF-β1

Utilizando o mesmo procedimento do método anterior tratamos as células com as concentrações de 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL ou 5 ng/mL de TGF- β 1. O RNA total foi extraído após 6 horas de tratamento para análise por qPCR.

3.5 Isolamento de RNA total

As hCMI foram raspadas com o tampão de lise RA1 contendo β-ME. O RNA total foi extraído seguindo as recomendações do kit RNAspin (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Para extração de RNA de amostras de tecido, fragmentos de aproximadamente 20 mg foram congelados em nitrogênio líquido, macerados e ressuspendidos com o tampão de lise. A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria, a partir da absorbância em 260 nm. A pureza das amostras foi determinada pela razão entre os valores de absorbância em 260 nm e 280 nm. Somente as amostras que apresentarem razões entre 1.7 e 2.1 foram utilizadas. A integridade do RNA foi averiguada por eletroforese em gel de agarose.

3.6 Reação de transcrição reversa

O cDNA foi preparado utilizando o kit ImProm II (Promega Corporation, Madison, WI, USA) seguindo as recomendações do fabricante. Para tanto, 1 μ g de RNA total foi incubado com 0,5 μ g oligo-dT em uma reação final de 5 μ L. Depois foram adicionados a cada amostra 15 μ L de mix contendo a enzima, MgCl₂ (3 mM) e dNTP mix (500 μ M). Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 hora a 42 °C.

3.7 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

Uma alíquota de cDNA foi combinada aos componentes do kit SYBR GREEN PCR Master Mix (QIAGEN GmbH, Hilden, Alemanha) e *primers* específicos para cada gene (Quadro 1). A reação consistiu na ativação da enzima Taq DNA polimerase a 95 °C por 15 minutos, seguida de 35 ciclos com as seguintes etapas: denaturação do DNA a 94 °C por 30 segundos, anelamento dos *primers* (temperatura determinada pelo par de *primers* utilizado na reação) por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Diluições seriadas de amostras controle foram analisadas simultaneamente para estabelecimento de uma curva padrão. Os produtos foram quantificados e comparados a controles a partir da análise do número de ciclos necessários para obtenção de dado valor de fluorescência na fase log-linear da reação. Reações utilizando *primers* para o gene do GAPDH foram utilizadas para normalizar os resultados obtidos. A especificidade do produto gerado

foi confirmada por análise da curva de dissociação, bem como por eletroforese em gel de agarose.

Gene	Primer	Sequência	ТА	Produto
GAPDH	Forward	5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC - 3'	58 °C	452 pb
Humano/Rato	Reverse	5' - TCCACCACCCTGTTGCTGTA - 3'		
Isoforma	Forward	5' - CATGGAGCCCGAAGAAGA - 3'	58 °C	403 pb
TBX3.1	Reverse	5' - GTGCATGGAGTTCAATATAGTAAATC - 3'		
Isoforma	Forward	5' - GTGGCAGGGGAATTATAGTTTTGG - 3'	58 °C	369 pb
TBX3 + 2α	Reverse	5' - GCCTGGGCGAAGCAGTTG - 3'		
p14 ^{ARF}	Forward	5' - ATGGTGCGCAGGTTCTTGGTGAC - 3'	58 °C	93 pb
Humano	Reverse	5' - CGTGAGCCGCGGATGTGA - 3'		
PAI-1	Forward	5' - CCCGATGGCCATTACTACGA - 3'	58 °C	395 pb
Humano	Reverse	5' - ATGCGGGCTGAGACTATGACA - 3'		
Fibronectina	Forward	5' - GTAGTTGCGGCAGGAGAAGGTATC - 3'	58 °C	169 pb
Humano	Reverse	5' - ACAGCCGTTTGTTGTGTCAGTGTAG - 3'		
TGF-β1	Forward	5' - GCTGCCGCTTCTGCTCCCACTC - 3'	60 °C	120 pb
Rato	Reverse	5' - GCTTCGATGCGCTTCCGTTTCAC - 3'		
TBX3	Forward	5' - CACCGCCACCCGTTCCTC - 3'	60 °C	158 pb
Rato	Reverse	5' - ACCGCCGATTTGCCGTCTA - 3'		
Colágeno Rato	Forward	5' - CCCCCAGGTCCCTACGATGTC - 3'	55 °C	120 pb
	Reverse	5' - AAGCCCACGGAGCCTGTCAC - 3'		
Fibronectina	Forward	5' - GGGGAGTGGAAGTGTGAGCGAC - 3'	55 °C	158 pb
Rato	Reverse	5' - GTGGGTCTGGGGTTGGTAAATA - 3'		

Quadro 1 – Características dos primers utilizados nas reações de qPCR.

3.8 Extração de proteína

Após o tratamento específico para cada experimento, as células foram lavadas com PBS gelado e as placas congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. As células foram raspadas com o tampão de lise RIPA (Sigma Aldrich) contendo inibidores de proteases (Sigma Aldrich). O lisado celular foi homogeneizado, centrifugado e o sobrenadante coletado. A concentração de proteína de cada amostra foi determinada pelo método de Lowry modificado (BCA, Bioagency, São Paulo, SP, Brasil).

3.9 Western Blot

Alíquotas das amostras de proteína variando entre 30-50 µg foram submetidas à SDS-PAGE, sendo posteriormente transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão Tris-Glicina metanol. Os sítios inespecíficos foram

bloqueados por 1 hora com tampão TBST (Tris-salino com Tween 20) a 0,5% contendo 5% de leite desnatado. Em seguida as membranas foram incubadas (1hora em temperatura ambiente ou 12 horas a 4 °C) com os anticorpos primários diluídos na solução de bloqueio. As membranas de nitrocelulose foram lavadas em tampão TBST e depois incubadas por 1 hora com os anticorpos secundários diluídos no tampão de bloqueio. Após novas lavagens da membrana, as bandas foram reveladas por quimiluminescência (ECL Plus, GE Healthcare). Foram utilizados os anticorpos primários para TBX3 (humano/rato 1:200, Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA) e anticorpos secundários conjugados com HRP (1:2000, Santa Cruz Biotechnology).

3.10 Vetores

Foram utilizados os vetores listados abaixo:

- pCS2⁺ TBX3-HA: plasmídeo contendo a sequência codificadora completa da isoforma TBX3.1. Doado por Peter J. Hurlin, Shriners Hospitals for Children, Portland, Oregon;
- pFB-Neo TBX3 + 2α: vetor lentiviral que contém a sequência completa da isoforma TBX3 + 2α. Doado por Taosheng Huang, Division of Genetics, Department of Pediatrics, University California, Irvine;
- pLenti Id1: vetor lentiviral contendo a sequência codificadora do gene Id1, construído previamente em nosso laboratório;
- pcDNA3.1 Zeo: plasmídeo disponível comercialmente para construção de vetores para superexpressão gênica (Invitrogen).

3.11 Construção dos plasmídeos e do vetor lentiviral

3.11.1 Reação de digestão

Alíquotas dos plasmídeos pcDNA3.1 Zeo e pCS2⁺ TBX3-HA foram digeridas pelas endonucleases BamHI e Xho1 a 37 °C por 6 horas. Esse procedimento causou a linearização do vetor pcDNA3.1 Zeo e a separação da sequência da isoforma TBX3.1 do vetor pCS2⁺ TBX3-HA. O volume total da reação foi submetido à

eletroforese em gel de agarose. Em seguida as bandas correspondentes ao vetor pcDNA3.1 Zeo linearizado e ao fragmento da isoforma TBX3.1 foram extraídas e purificados pelo kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo as recomendações do fabricante.

3.11.2 Reação de ligação

Alíquotas dos fragmentos da isoforma TBX3.1 e do vetor pcDNA3.1 Zeo linearizado foram combinadas em uma proporção molar de 1:2 juntamente com a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen) e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Por meio dessa reação, o fragmento da isoforma TBX3 foi inserido ao vetor pcDNA3.1 Zeo, produzindo o plasmídeo pcDNA TBX3.1. Esse vetor, por sua vez, foi utilizado para a construção do lentivírus pLenti TBX3.1. Para tanto, a sequência do gene Id1 foi excluída do lentivírus pLenti Id1 pela digestão com as endonucleases BamHI e XhoI. O fragmento do lentivírus foi extraído e purificado. Em seguida, foi combinado em uma proporção molar de 4:1 com o fragmento da isoforma TBX3.1 isolado do vetor pcDNA TBX3.1 pela digestão com as mesmas endonucleases e incubado com a enzima ligase por 1 hora a 26 °C. Amostras das reações de ligação foram usadas para transformar cepas de células competentes.

3.11.3 Transformação de E. coli para propagação dos plasmídeos ou vetores virais

Alíquotas da reação de ligação foram incubadas com uma cepa específica de *E. coli* One Shot (Invitrogen) e mantidas em gelo por 30 minutos. A seguir as bactérias foram submetidas a um choque térmico (42 °C, 45 segundos) e novamente colocadas em gelo. A mistura foi semeada em placas contendo LB ágar com ampicilina (100 µg/mL) para seleção de colônias transformadas (que incorporaram o plasmídeo de interesse e que, portanto, são resistentes ao antibiótico) e transferidas para incubadora a 37 °C por 12-20 horas. A seguir, colônias individuais foram selecionadas e transferidas para tubos (1 por colônia) contendo 4 mL de meio LB com antibiótico. Os tubos foram agitados a 280 rpm, 37 °C, por 12-20 horas e a seguir uma amostra da mistura (3 mL) foi utilizada para confirmação da identidade do plasmídeo. Foi utilizado o kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi digerido por enzimas de restrição

e analisado em gel de agarose. Uma vez comprovada a identidade do plasmídeo, parte do preparado foi aplicada a 250 mL de meio LB para geração de plasmídeo em larga escala. A solução foi agitada conforme descrito acima e após 12-20 horas o DNA foi extraído com o kit illustra plasmidPrep Midi Flow (GE Healthcare). Os plasmídeos foram então precipitados e lavados em etanol, e ressuspendidos em tampão Tris-EDTA (TE), estando, então, prontos para transfecção transitória.

3.11.4 Transfecção transitória por eletroporação

Aproximadamente 1 x 10^6 células foram ressuspendidas em 1 mL de tampão hipo-osmolar. Em seguida foi adicionada uma alíquota dos vetores pcDNA TBX3.1 ou pcDNA Zeo para concentração final de 10 µg de DNA/mL. A suspensão de células (400 µL) foi transferida para cubetas próprias para eletroporação. As células foram eletroporadas utilizando o equipamento Multiporator (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), com 1 pulso de 220 V por 100 µs. Passados 10 minutos de incubação em temperatura ambiente, o conteúdo de cada cubeta foi diluído em meio de cultura e distribuído em placas de cultura. Decorridos 4 ou 6 dias da eletroporação, as células foram coletadas para extração de RNA total ou para citometria de fluxo, respectivamente.

3.11.5 Transfecção transitória de sequências de siRNA

Foi utilizado o kit N-TER Nanoparticle siRNA transfection System (Sigma), seguindo recomendações do fabricante. Basicamente, as sequências de siRNA, adquiridas comercialmente (siRNA Negative Control e SASI_Hs01_00110889 – TBX3, Sigma Aldrich), foram diluídas em tampão e combinadas com o peptídeo N-TER diluído em água para atingir a concentração de 120 nM. Após incubação de 20 minutos em temperatura ambiente, a solução foi adicionada ao meio de cultura. Após 24 horas as células foram raspadas para extração de RNA total ou privadas de SBF por 24 horas, seguindo-se a extração de proteína para o ensaio de caspase.

3.12 Construção dos vetores adenovirais

3.12.1 Reação de PCR para amplificação da sequência codificadora completa das isoformas

Seguindo as recomendações do manual do Kit pENTR Directional TOPO Cloning (Invitrogen), desenhamos um par de *primers* que se anela às extremidades do fragmento da isoforma TBX3.1 presente no vetor pLenti TBX3-HA ou da isoforma TBX3 + 2α presente no vetor pFB Neo TBX3 + 2α . A sequência codificadora completa das isoformas TBX3 foi amplificada por meio de uma reação de PCR contendo os *primers*, alíquotas dos vetores mencionados acima e os componentes do kit PFX taq DNA Polymerase (Invitrogen). O volume total da reação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%. Os fragmentos correspondentes às isoformas foram extraídos e purificados.

3.12.2 Reação de Topo clonagem

Alíquotas do vetor pENTR/SD-D (conjugado com a enzima topoisomerase) fornecido pelo kit pENTR Directional TOPO Cloning (Invitrogen) e dos fragmentos das isoformas, obtidos pelo método descrito acima, foram combinados na proporção molar de 1:1 e incubados por 30 minutos a 23 °C. Uma alíquota de cada reação foi utilizada para transformar células competentes para a produção dos vetores pENTR TBX3.1 ou pENTR TBX3 + 2α .

3.12.3 Reação de recombinação homóloga

Alíquotas dos vetores pENTR TBX3.1 ou pENTR TBX3 + 2α foram combinados com o vetor pAd/CMV/V5-DEST juntamente com o mix de enzimas Gateway LR Clonase II (Invitrogen) e incubados por 18 horas. Após esse período foi adicionado 1 µL de proteinase K e a reação foi incubada por mais 10 minutos a 37°C. Amostras dos novos vetores resultantes da reação de recombinação (pAd TBX3.1 e pAd TBX3 + 2α) ou do vetor controle pAd Lac Z foram usadas para transformar células competentes para produção em larga escala. Posteriormente os vetores foram digeridos com a enzima Pac I e extraídos com o kit illustra GFX.

3.12.4 Produção de adenovírus

Células empacotadoras 293A foram transfectadas com 1 μ g dos vetores adenovirais digeridos utilizando o reagente Lipofectamine 2000 (Invitrogen), seguindo instruções do fabricante. Após 48 horas as células foram replicadas e transferidas para placas de cultura maiores. As células foram mantidas em cultura até apresentarem efeito citopático de aproximadamente 80%. O sobrenadante com adenovírus foi coletado e processado seguindo as recomendações do fabricante. Para a amplificação dos estoques adenovirais, uma alíquota de 100 μ L de cada adenovírus foi aplicada ao meio de cultura das células 293A. Após 72 horas o sobrenadante foi coletado e processado seguindo o procedimento descrito anteriormente.

3.12.5 Titulação dos adenovírus

Foi efetuado o procedimento descrito no manual ViraPower[™] Adenoviral Expression System (Invitrogen). Basicamente, células 293A foram semeadas em placas de 6 poços (1 x 10⁶ células por poço) e no dia seguinte foi adicionado 1 mL de alíquotas da diluição seriada dos adenovírus amplificados. Passadas 48 horas, o meio de cultura foi substituído por 2 mL de solução de agarose. Após 8 dias as células foram coradas com MTT. O título de adenovírus foi determinado pelo número de placas de efeito citopático observadas em cada diluição. O título de cada adenovírus foi utilizado para calcular o volume do estoque adenoviral que deveria ser adicionado a 1 mL de meio de cultura para se obter o MOI multiplicidade de infecção desejado para uma densidade celular específica.

3.13 Transdução das células como os adenovírus

As células foram semeadas em uma densidade específica para cada experimento. No dia seguinte o meio de cultura foi substituído por meio contendo os adenovírus diluídos para atingir os MOIs 10, 30 ou 60. Passadas 24 horas, o meio de cultura foi renovado e as células submetidas às condições experimentais desejadas.
3.14 Ciclo celular por citometria de fluxo

As células transduzidas por 48 horas ou eletroporadas foram tripsinizadas, coletadas e centrifugadas. O pellet de células foi lavado com PBS e fixado em etanol 100%. Após 24 horas as células foram lavadas e ressuspendidas em solução de PBS contendo iodeto de propídio (50 µg/mL) e ribonuclease A (200 µg/mL, Concert RNAse, Invitrogen) e incubadas por 1 hora em 37 °C. Em seguida as células foram lavadas e ressuspendidas em PBS para concentração final de 1 x 10⁶ células por mL. A solução de células foi aplicada no citômetro de fluxo (FACS Calibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) e os níveis de fluorescência foram processados pelo software FACSDiva (Becton Dickinson). Os dados adquiridos demonstraram o valor de fluorescência para cada célula. Após a análise de 10.000 eventos um histograma foi gerado. A partir deste, determinamos a porcentagem de células com quantidade similar de DNA por meio do cálculo da área de cada pico apresentado no histograma. O primeiro pico reúne células com quantidade de DNA diplóide, ou seja, na fase G0/G1 do ciclo celular. Após o início da fase S, com duplicação do material genético, a quantidade de DNA das células aumenta gradativamente (representado pelo vale no gráfico). Durante a fase G2/M, as células já possuem seu DNA totalmente duplicado, apresentando uma quantidade maior de fluorescência, constituindo assim o segundo pico.

3.15 Detecção de apoptose por dosagem de atividade de caspase 3

As células foram semeadas em placas de 6 poços em uma densidade de 9 $\times 10^4$ células/poço. No dia seguinte foram transduzidas com o MOI 60 dos adenovírus pAd Lac Z, pAd TBX3.1 ou pAd TBX3 + 2 α ou ainda transfectadas com as sequências de siRNA. No terceiro dia após a transdução com os adenovírus ou após 24 horas da transfecção com siRNA, as células foram lavadas com PBS e incubadas com meio contendo 10% de SBF ou meio puro. Passadas 24 horas, a proteína total foi extraída e dosada. Alíquotas de 30-40 μ g de proteína foram aplicadas em placas de 96 poços específicas para leitura de fluorescência, juntamente com tampão contendo substrato da enzima caspase 3 (Ac-DEVD-AMC, Sigma Aldrich). Após 1 hora de incubação a 37 °C foi feita a análise na leitora de fluorescência DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA). Os parâmetros de leitura

utilizados foram: excitação em 360 nm e emissão em 460 nm. Os resultados foram expressos como média de unidades arbitrárias de fluorescência.

3.16 Modelo experimental de nefrectomia 5/6

Ratos Wistar machos foram anestesiados com quetamina/xilazina. Por meio de uma incisão mediana na região abdominal o rim esquerdo foi exteriorizado e a artéria renal exposta, tendo o ramo inferior e posterior ligados. Com esse procedimento o suplemento sanguíneo de aproximadamente 2/3 do rim esquerdo foi interrompido, deixando apenas a área irrigada pelo ramo médio intacta. Em seguida, o rim direito foi isolado e exteriorizado, a cápsula renal foi removida e a pelve renal foi ligada. O rim foi então removido e a pele suturada. Após 2 ou 4 semanas, os animais foram sacrificados e amostras de tecido renal foram congeladas para extração de RNA total ou fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA 4%) por 48 horas.

3.17 Imunohistoquímica

As amostras de tecido renal fixadas em PFA 4% foram submetidas ao procedimento de inclusão em parafina. Cortes histológicos de 5 µm foram obtidos, desparafinizados e hidratados. Os cortes foram submetidos ao processo de recuperação antigênica por microondas com tampão de ácido cítrico/citrato de sódio pH 6 e depois mantidos à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida foram incubados com solução de peróxido de hidrogênio a 3% para o bloqueio das peroxidases endógenas. Após lavagem com tampão TBST foram incubados por 1 hora com solução de BSA a 3% em tampão TBST para bloquear as interações inespecíficas. Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-TBX3 (humano/rato 1:50, Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora. Os cortes foram lavados com tampão Tris-Tween e incubados por 1 hora com o anticorpo secundário (1:200, Santa Cruz Biotechnology). Após as lavagens, foram incubados com solução DAB para detecção da proteína de interesse e contracorados com hematoxilina de Harris. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico.

3.18 Imunofluorescência

As células foram semeadas em placas de cultura contendo lamínulas. Após 24 horas foram transduzidas com adenovírus ou estimuladas com TGF-β1. Após 48 horas da transdução ou 24 horas de tratamento com TGF-β1, as células foram fixadas com PFA 4% por 15 minutos. Depois de lavagens com PBS, as lamínulas foram incubadas por 1 hora em solução de BSA a 3% em tampão TBST. Em seguida foram incubadas com o anticorpo primário anti-TBX3 (1:50) por mais 1 hora. Após lavagens, foram incubadas com o anticorpo secundário marcado com FITC (1:20, Santa Cruz Biotechnology) por 1 hora. As lamínulas foram lavadas e montadas em lâminas com o reagente Vectashield (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, CA, USA). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência.

3.19 Análise estatística

Os dados relativos a cada grupo experimental foram comparados independentemente ao grupo controle. Os resultados foram expressos como média ± EPM. Na PCR quantitativa os resultados foram transformados para log². Foram aplicados os testes estatísticos ANOVA ou teste t não-pareado. p< 0,05 foi considerado significante em todos os experimentos. Para a análise de correlação foi feita regressão linear e aplicado teste estatístico de Fisher.

4 RESULTADOS

O resultado obtido pelo experimento de *microarrays* de DNA foi confirmando posteriormente por qPCR utilizando um par de *primers* desenhado especificamente para o RNAm do gene TBX3. Como estes *primers* não distinguiam os transcritos deste gene desenhamos outros específicos para cada isoforma para determinarmos sua expressão separadamente. Para isoforma TBX3.1 foi desenhado um *primer* que anela-se na intersecção entre os éxons 2 e 3, ausente na outra isoforma. Já no caso da isoforma TBX3 + 2α , um dos *primers* anela-se em uma sequência de bases contida no éxon 2α , presente exclusivamente nessa isoforma (Figura 4). A especificidade das reações de qPCR utilizando esses *primers* foi confirmada por eletroforese em gel de agarose, que demonstrou a presença de uma única banda com o tamanho correspondente ao esperado para o fragmento amplificado de cada isoforma (Figura 5). Utilizando esses *primers*, podemos demonstrar que as isoforma TBX3.1 e TBX3 + 2α são expressas constitutivamente em CM e que são suprarreguladas em 1,9 e 2,2 vezes, respectivamente, pela exposição a 10% de SBF por 6 horas (Figura 6).



Figura 4 - Esquema da localização dos primers específicos para cada isoforma.

Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose 3%.



P: padrão de 100 pb. Visualização dos fragmentos gerados pelas reações de qPCR com os *primers* para TBX3.1 (403 pb) ou TBX3 + 2α (369 pb).

Figura 6 - Expressão das isoformas TBX3 em hCMI estimuladas com SBF por 6 horas.



qPCR. Células confluentes foram privadas de soro por 24 horas e então estimuladas com 0,5% ou 10% de SBF por 6 horas. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo 0,5% SBF. N=3. *p<0,05 *versus* grupo 0,5% SBF.

Visando estudar a regulação do gene TBX3 nas CM, avaliamos a expressão de suas isoformas após a administração de fatores de crescimento, descritos na literatura como capazes de produzir alterações no perfil de expressão gênica de CM e, consequentemente, modificar seu fenótipo. Para tanto, tratamos as CM por 6 horas com PDGF-BB, TGF- β 1 ou BMPs. Observamos que BMP-4 e, especialmente, TGF- β 1 induziram suprarregulação de TBX3.1 em 1,4 e 1,7 vezes, respectivamente, e de TBX3 + 2 α em 1,85 e 1,9 vezes, respectivamente. Tanto o tratamento com BMP-2 quanto com BMP-7, assim como com PDGF-BB, não afetaram a expressão das isoformas nas CM (Figura 7).

Figura 7 - Expressão das isoformas TBX3 em hCMI estimuladas com fatores de crescimento por 6 horas.



qPCR. Células confluentes foram privadas de soro por 24 horas e então estimuladas com TGF-β1 (2 ng/mL), PDGF-BB (10 ng/mL), BMPs 2, 4 e 7 (10 ng/mL) ou veículo por 6 horas. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo veículo. N=3. *p<0,05 *versus* grupo veículo.

Devido ao papel de TGB-β1 na indução de alterações fenotípicas de CM durante o desenvolvimento das glomerulopatias, concentramo-nos em estudar o padrão de regulação do gene TBX3 por esse fator de crescimento.

Devemos ressaltar que o tempo e concentração de TGF-β1 aos quais as CM são submetidas em estudos da literatura são bastante variáveis, sendo que o

período pelo qual as CM são expostas pode variar de poucos minutos até vários dias e a concentração de TGF-β1 varia de picogramas a nanogramas. Partimos de concentrações e períodos de tempos já avaliados em nosso laboratório, os quais induziram modificações na expressão de genes mediadores de sua ação prófibrótica, como CTGF, ou relacionados ao acúmulo de MEC como colágeno IV, fibronectina e PAI-1.

Para determinar o quanto a expressão das isoformas era sensível ao estímulo por TGF- β 1, realizamos um experimento do tipo concentração-resposta, no qual as células foram expostas por 6 horas a concentrações crescentes de TGF- β 1. A regulação da expressão de TBX3 + 2 α foi mais sensível a TGF- β 1 em comparação ao observado para a outra isoforma. Foi possível observar aumento de 2,2 vezes da expressão de TBX3 + 2 α a partir da concentração de 0,5 ng/mL, enquanto a expressão de TBX3.1 foi aumentada, em 3 vezes, apenas a partir da concentração de 1 ng/mL. O aumento da expressão das isoformas manteve-se constante, mesmo quando as células foram expostas a concentrações maiores de TGF- β 1 (Figura 8). Também observamos que o tratamento com apenas 1 ng/mL de TGF- β 1 foi capaz de induzir suprarregulação das isoformas superior à observada quando as células foram tratadas com SBF 10%.



Figura 8 - Expressão das isoformas TBX3 em hCMI estimuladas com TGF-β1 por 6 horas.

qPCR. Células confluentes foram privadas de soro por 24 horas e então estimuladas com TGF- β 1 nas concentrações de 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 2 ng/mL, 5 ng/mL ou veículo por 6 horas. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo veículo. N=3. *p<0,05 grupo TBX3 *versus* grupo veículo e #p<0,05 grupo TBX3 + 2 α *versus* grupo veículo.

Em seguida, realizamos uma curva de tempo-resposta no qual as CM foram tratadas com 2 ng/mL de TGF- β 1 por diferentes períodos de tempo. Dessa maneira, seria possível determinar se TBX3 é um gene de resposta rápida ou se sua expressão é regulada tardiamente por TGF- β 1. Observamos que a regulação da expressão das isoformas por TGF- β 1 é rápida. O aumento na expressão de TBX3.1 e TBX3 + 2 α de 2,1 e 2,2 vezes, respectivamente, foi significativo a partir de 3 horas, e manteve-se constante durante o período de tempo estudado (Figuras 9 e 10).



Figura 9 - Expressão da isoforma TBX3.1 em hCMI estimuladas com TGF- β 1.

qPCR. Células confluentes foram privadas de soro por 24 h e então estimuladas com TGF- β 1 (2 ng/mL) ou veículo por 1, 3, 6 ou 12 horas. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo veículo. N=3. *p<0,05 *versus* grupo veículo.



Figura 10 - Expressão da isoforma TBX3 + 2α em hCMI estimuladas com TGF- β 1.

qPCR. Células confluentes foram privadas de soro por 24 h e então estimuladas com TGF-β1 (2 ng/mL) ou veículo por 1, 3, 6 ou 12 horas. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo veículo. N=3. *p<0,05 *versus* grupo veículo.

Também avaliamos a expressão protéica do gene TBX3 nas células tratadas com TGF-β1 por 24 horas por meio da técnica de imunofluorescência. Devemos ressaltar que o anticorpo utilizado reconhece um epítopo comum a ambas isoformas, impossibilitando determinar a contribuição de cada uma das isoformas para a fluorescência detectada. Houve aumento significativo da proteína TBX3 que apresentou localização preferencialmente nuclear (Figura 11).

Veículo 200 µm TGF-β1 lgG não imune 200 µm

Figura 11 - Expressão protéica de TBX3 em hCMI estimuladas com TGF-β1.

Imunofluorescência. As células foram privadas de soro por 24 horas e então estimuladas com TGF-β1 (2 ng/mL). Após 24 horas as células foram fixadas. Fotos das lâminas visualizadas em microscópio de fluorescência com aumento de 200x.

Para determinar o papel de TBX3 no fenótipo das CM induzimos a superexpressão das isoformas por meio da transdução com vetores adenovirais contendo a sequência de TBX3.1 ou TBX3 + 2α e, em seguida, averiguamos a expressão de possíveis genes-alvo e funções celulares.

Observamos um aumento exuberante dos níveis de RNAm das isoformas, principalmente nas células transduzidas com o MOI 60, nas quais a expressão de TBX3.1 e TBX3 + 2α foi 345 e 81 vezes maior que a observada nas células transduzidas com o adenovírus controle, respectivamente (Figuras 12 e 13).

Figura 12 - Expressão da isoforma TBX3.1 em hCMI transduzidas com adenovírus.



qPCR. Células foram transduzidas com o MOI 60 do adenovírus pAd Lac Z ou MOIs 10, 30 ou 60 do adenovírus pAd TBX3.1. Após 48 horas as células foram coletadas para extração de RNA total. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo veículo. N=3. *p<0,05 *versus* grupo pAd Lac Z.

Figura 13 - Expressão da isoforma TBX3 + 2α em hCMI transduzidas com adenovírus.



qPCR. Células foram transduzidas com o MOI 60 do adenovírus pAd Lac Z ou MOIs 10, 30 ou 60 do adenovírus pAd TBX3 + 2α. Após 48 horas as células foram coletadas para extração de RNA total. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo veículo. N=3. *p<0,05 *versus* grupo pAd Lac Z.

Também detectamos aumento na expressão protéica das isoformas nas células transduzidas, como demonstrado pela técnica de *western blot*, na qual podemos diferenciar as isoformas pelo seu tamanho (Figura 14). Como induzimos a expressão das isoformas individualmente foi possível analisar o padrão de distribuição subcelular de cada uma delas por imunofluorescência (Figura 15). A isoforma TBX3.1 apresentou localização predominantemente nuclear, enquanto TBX3 + 2α foi detectada preferencialmente no citoplasma.

Figura 14 - Expressão protéica das isoformas TBX3 em CM transduzidas.



Western Blot. Células foram transduzidas com os adenovírus pAd Lac Z (1), pAd TBX3.1 (2) e pAd TBX3 + 2α (3) com o MOI 60. Após 48 horas as células foram coletadas para extração de proteína.



Figura 15 - Expressão protéica das isoformas TBX3 em CM transduzidas.

Imunofluorescência. Células foram transduzidas com os adenovírus pAd Lac Z, pAd TBX3.1 e pAd TBX3 + 2α. Após 48 horas as células foram fixadas. Fotos das lâminas visualizadas em microscópio de fluorescência com aumento de 600x (as fotos do primeiro quadro foram reduzidas). Marcação em verde (FITC) para a proteína TBX3 e em azul (DAPI) para o núcleo.

Em seguida, avaliamos a expressão de RNAm de p14^{ARF} por qPCR nas CM que superexpressavam as isoformas TBX3. Observamos apenas uma tendência de redução de sua expressão nas células transduzidas com o vetor pAd TBX3.1 (Figura 16). A regulação de p14^{ARF} e outros possíveis alvos das isoformas TBX3 poderia depender de uma maior período de superexpressão destas. Segundo o fabricante do kit dos adenovírus, a expressão do transgene é observada a partir do segundo dia após a transdução e mantém-se elevada por até cinco dias. Portanto, decidimos analisar a expressão de p14^{ARF} nas células passados 3 dias após a transdução. Desse modo foi possível observar sub-regulação estatisticamente significativa, embora modesta, de p14^{ARF} nas células transduzidas (Figura 17). A expressão de p14^{ARF} foi reduzida em 29% e 26% nas células transduzidas com pAd TBX3.1 e pAd TBX3 + 2 α , respectivamente.

Figura 16 - Expressão de p14^{ARF} em hCMI transduzidas após 48 horas.



qPCR. Células foram transduzidas com o MOI 60 dos adenovírus pAd Lac Z, pAd TBX3.1 e pAd TBX3 + 2α. Após 48 horas as células foram coletadas para extração de RNA total. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo pAd Lac Z. N=6.



Figura 17 - Expressão de p14^{ARF} em hCMI transduzidas após 72 horas.

qPCR. As células foram transduzidas com MOI 60 dos adenovírus pAd Lac Z, pAd TBX3.1 e pAd TBX3 + 2α MOI 60. Após 72 horas as células foram coletadas para extração de RNA total. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo pAd Lac Z. N=6. *p<0,05 *versus* grupo pAd Lac Z.

Tentamos avaliar a proliferação das CM superexpressando as isoformas TBX3 utilizando o método de análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Entretanto, a presença do DNA adenoviral nas células transduzidas tanto com os vetores para superexpressão das isoformas quanto com o vetor controle produziu aumento artificial no conteúdo de DNA observado no pico correspondente as fases G2/M, comprometendo, desta forma, a análise do ciclo celular das CM por meio dessa técnica (Figura 18). Esse fenômeno já foi descrito para alguns tipos de vetores virais⁷².



Figura 18 - Ciclo celular de hCMI transduzidas.

Citometria de Fluxo. Células foram mantidas em condições normais de cultura na presença de SBF (A) ou foram transduzidas com o MOI 60 do adenovírus pAd Lac Z (B). Após 96 horas as células foram coletadas e fixadas. O pico correspondente à fase G2/M nas células transduzidas está anormalmente elevado em comparação ás células não transduzidas.

Para contornar essa dificuldade induzimos a superexpressão da isoforma TBX3.1 por meio de transfecção com o plasmídeo pcDNA TBX3.1. Optamos pelo método de transfecção mediado por eletroporação que, no caso das CM, possui melhor taxa de eficiência quando comparado à transfecção utilizando complexos lipossomais. Passadas 96 horas da eletroporação observamos um aumento de 160 vezes na expressão de TBX3.1 (Figura 19). Contudo, esse aumento forçado na expressão de TBX3 não influenciou o perfil proliferativo das CM após 144 horas da eletroporação (Figura 20).



Figura 19 - Expressão da isoforma TBX3.1 em hCMI eletroporadas.

qPCR. Células foram eletroporadas com os plasmídeos pcDNA Zeo ou pcDNA TBX3-HA. Após 96 horas as células foram coletadas para extração de RNA total. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do



Figura 20 - Ciclo celular de hCMI eletroporadas.

grupo pcDNA Zeo. N=3. *p<0,05 versus grupo pcDNA Zeo.

Citometria de Fluxo. Células foram eletroporadas com os plasmídeos pcDNA Zeo (A) ou pcDNA TBX3-HA (B). Após 144 horas as células foram coletadas e fixadas.

Passamos, então, à avaliação das funções celulares que são moduladas por TGF- β 1 como produção de MEC e apoptose. Primeiramente, avaliamos a expressão de genes relacionados ao acúmulo de MEC, como fibronectina e PAI-1, nas CM transduzidas. Observamos que TBX3.1 e TBX3 + 2 α não alteraram a produção de MEC pelas CM. TGF- β 1 como esperado, induziu aumento significativo na expressão desses genes (Figura 21).

Figura 21 - Expressão de PAI-1 e fibronectina em hCMI transduzidas com adenovírus ou estimuladas com TGF-β1.



qPCR. Células foram transduzidas com o MOI 60 dos adenovírus pAd Lac Z, pAd TBX3.1 e pAd TBX3 + 2α . Após 72 horas as células foram coletadas para extração de RNA total. As células foram estimuladas com TGF- β 1 (2ng/mL) por 24 horas e depois coletadas para extração de RNA total. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo pAd Lac Z. N=3. *p<0,05 *versus* grupo pAd Lac Z.

Ainda visando definir o papel do gene TBX3, examinamos o impacto da superexpressão das isoformas TBX3 na apoptose de CM. Para tanto, células foram transduzidas com os adenovírus e após 2 dias foram privadas de SBF por 24 horas, sendo o nível de apoptose determinado pelo ensaio de ativação de caspase 3. Observamos que a superexpressão das isoformas preveniu o aumento de apoptose induzido pela ausência de SBF. TBX3.1, em particular, reduziu o nível de morte nas células cultivadas em meio puro em aproximadamente 43%, fazendo com que se aproximasse ao nível observado nas células cultivadas na presença de SBF.

Ademais, essa isoforma também reduziu o que seria considerado o nível basal de morte celular, observado nas células transduzidas com pAd Lac Z e cultivadas em meio com 10% de SBF. A isoforma TBX3 + 2α , por sua vez, reduziu em apenas 17% o nível de morte no grupo que teve o SBF removido e não alterou o nível basal de apoptose (Figura 22).

 $\left[\begin{array}{c} & & & \\$

Figura 22 - Nível de apoptose em hCMI transduzidas.

Ensaio de caspase-3 ativada. Células foram transduzidas com o MOI 60 dos adenovírus pAd Lac Z, pAd TBX3.1 e pAd TBX3 + 2α . Após 48 horas o SBF foi removido da metade dos grupos. Após 24 horas as células foram coletadas para extração de proteína total. Os dados foram expressos como média±EPM em relação à fluorescência do grupo pAd Lac Z. N=6. *p<0,05 grupo pAd TBX3.1 *versus* respectivo grupo pAd Lac Z. #p<0,05 grupo pAd TBX3 + 2α *versus* respectivo grupo pAd Lac Z.

Com base nesse resultado de ganho de função, utilizamos outra abordagem para estudar o papel do gene TBX3 na apoptose. A expressão dos transcritos de TBX3 foi reduzida por meio de transfecção com uma sequência de siRNA específica para esse gene. Observamos que a expressão de ambas isoformas foi reduzida em aproximadamente 40% (Figura 23).



Figura 23 - Expressão das isoformas TBX3 em hCMI transfectadas com siRNA.

qPCR. Células foram transfectadas com as sequências de siRNA controle ou siRNA TBX3 na concentração de 120 nM. Após 24 horas as células foram coletadas para extração de RNA total. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo siRNA controle. N=3. *p<0,05 *versus* grupo siRNA controle.

Em seguida, avaliamos o perfil de apoptose nas CM após a perda de função do gene TBX3. Observamos que a redução na expressão das isoformas, ainda que parcial, sensibilizou as células à apoptose induzida pela privação de SBF. O nível de morte celular foi 40% maior que o observado nas células transfectadas com a sequência controle e mantidas em meio puro. O silenciamento do gene TBX3 também foi capaz de induzir morte celular mesmo na condição de pró-sobrevivência criada pela presença de SBF. Houve um aumento de aproximadamente 20% no nível de apoptose no grupo transfectado com o siRNA para TBX3 em comparação ao grupo controle (Figura 24).



Figura 24 - Nível de apoptose em hCMI transfectadas com siRNA.

Ensaio de caspase-3 ativada. Células foram transfectadas com as sequências de siRNA controle ou siRNA TBX3 na concentração de 120 nM. Após 24 horas o SBF foi removido em metade dos grupos. Passadas 24 horas as células foram coletadas para extração de proteína total. Os dados foram expressos como média±EPM em relação à fluorescência do grupo siRNA controle. N=6. *p<0,05 grupo siRNA TBX3 SBF 0% ou 10% *versus* respectivos grupos siRNA controle.

Por fim, examinamos a expressão de TBX3 *in vivo*, em um modelo de doença renal crônica, causada pela ablação de aproximadamente 5/6 da massa renal total (Nx5/6). O desenvolvimento da doença renal nesse modelo é caracterizado por uma fase inicial de hipertrofia glomerular, na qual é observado aumento progressivo da expressão de TGF- β 1. A isso segue-se uma fase com alterações histológicas mínimas e por fim é observada glomeruloesclerose segmentar e fibrose tubulointersticial, que progridem comprometendo a função renal.

Aqui uma ressalva em relação ao modelo merece ser feita. Devido às alterações anatômicas da distribuição dos ramos da artéria renal nem sempre é possível reduzir o suplemento sanguíneo consistentemente para que 2/3 da massa renal seja infartada. Em alguns casos, apenas uma pequena porção do rim é comprometida e, dessa maneira, ocorre variabilidade que repercute no grau de alteração histológica e no nível de expressão gênica observados em cada animal.

A partir da 2º semana após a ablação renal foi possível detectar aumento na expressão de RNAm de TGF- β 1 (1,8 vezes), colágeno IV (2,2 vezes) e fibronectina (5,2 vezes) em comparação ao grupo controle (Figura 25). A expressão de colágeno IV e de fibronectina, genes envolvidos no acúmulo de MEC, correlacionou-se positivamente com a expressão de TGF- β 1 (Figura 26).





Após 2 semanas do procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados e amostras do tecido renal do animais do grupo *sham* ou Nx5/6 foram coletadas para extração de RNA total. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo *sham*. Grupo *sham* N=4 e grupo Nx5/6 N=7. *p<0,05 *versus* respectivo grupo *sham*

Figura 26 - Correlação entre a expressão de TGF-β1 e colágeno IV (A) ou fibronectina (B) no modelo Nx5/6 após 2 semanas.



(A) r² = 0,6549; p<0,05. (B) r² = 0,8259; p<0,05.

Não observamos alterações morfológicas significativas nos glomérulos entre os animais controle e os nefrectomizados no período de 2 semanas, como visto pelas técnicas de coloração de HE (Figura 27) e por Masson (Figura 28).



Figura 27 - Coloração de HE.

Após 2 semanas do procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados e amostras do tecido renal dos animais do grupo *sham* ou Nx5/6 foram fixadas em PFA 4%.Cortes histológicos dos rins de animais *sham* ou Nx5/6 foram submetidos à coloração por HE. Fotos das lâminas visualizadas em microscópio óptico com aumento de 200 e 400 vezes.

Figura 28 - Coloração por Masson.



Após 2 semanas do procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados e amostras do tecido renal dos animais do grupo *sham* ou Nx5/6 foram fixadas em PFA 4%.Cortes histológicos dos rins foram submetidos à coloração por HE. Fotos das lâminas visualizadas em microscópio óptico com aumento de 200 e 400 vezes.

Com relação ao gene TBX3, observamos uma flutuação grande em sua expressão nos animais nefrectomizados. Considerando a média de sua expressão, houve uma tendência de redução nos animais nefrectomizados em comparação ao grupo controle passadas 2 semanas da ablação renal (Figura 29), sem, no entanto, apresentar correlação com a expressão de TGF-β1 (Figura 30).



Figura 29 - Expressão de TBX3 no modelo Nx5/6 após 2 semanas.

Após 2 semanas do procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados e amostras do tecido renal do animais do grupo *sham* ou Nx5/6 foram coletadas para extração de RNA total. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo *sham*. Grupo *sham* N=3 e grupo Nx5/6 N=7. *p<0,05 *versus* grupo *sham*.

Figura 30 - Correlação entre a expressão de TBX3 e TGF-β1 no modelo Nx 5/6 após 2 semanas.



 $r^2 = 0,2266.$

Como foram utilizadas amostras de tecido renal total para os experimentos de qPCR, analisamos a expressão gênica renal global, que muitas vezes não é representativa da expressão gênica nas diversas estruturas que compõem a massa renal. Assim, a detecção da expressão de genes pouco expressos e/ou regulados é comprometida, podendo ser o caso do gene TBX3, cuja expressão estudamos especificamente em células mesangiais glomerulares.

Assim, decidimos avaliar a expressão protéica de TBX3 *in situ* por imunohistoquímica. Curiosamente, detectamos aumento na expressão de TBX3 nos glomérulos e especialmente no compartimento tubular de animais nefrectomizados em comparação ao grupo controle passadas 2 semanas da ablação renal (Figura 31). O resultado negativo que obtivemos quanto a expressão de RNAm pode ser justificado pelo fato do gene TBX3 ter sido regulado por mecanismo póstranscricional em nosso modelo.



Figura 31 - Expressão protéica de TBX3 no modelo Nx5/6 após 2 semanas.

Imunohistoquímica. Após 2 semanas do procedimento cirúrgico amostras do tecido renal do animais *sham* ou Nx5/6 foram coletadas, fixadas e processadas. As lâminas foram coradas com DAB e contra-coradas com hematoxilina de Haris. A coloração foi ausente em ensaios com IgG não imune. Fotos das lâminas visualizadas em microscópio óptico com aumento de 600 ou 200 vezes.

Após a 4º semana da ablação renal, a regulação de TGF-β1, colágeno e especialmente de fibronectina foi intensificada (Figura 32), em concordância com o agravamento da nefropatia.





Após 4 semanas do procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados e amostras do tecido renal dos animais do grupo *sham* ou Nx5/6 foram coletadas para extração de RNA total. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo *sham*. Grupo *sham* N=4 e grupo Nx5/6 N=7. *p<0,05 *versus* respectivo grupo *sham*.

A expressão de colágeno e fibronectina correlacionou-se positivamente com a expressão de TGF-β1 (Figura 33) e a suprarregulação desses genes causou depósito de MEC como o observado pelas colorações de HE e por Masson (Figura 34).

Figura 33 - Correlação entre a expressão de TGF-β1 e colágeno IV (A) ou fibronectina (B) no modelo Nx5/6 após 4 semanas.



(A) r² = 0,8635; p<0,05. (B) r² = 0,9113; p<0,05.

Novamente, não observamos regulação da expressão de RNAm de TBX3 e correlação com TGF-β1 no animais nefrectomizados em comparação ao grupo *sham* (Figuras 35 e 36).



Figura 34 - Expansão da área glomerular e depósito de colágenos nos animais nefrectomizados após a 4º semana.

Após 4 semanas do procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados e amostras do tecido renal dos animais do grupo *sham* ou Nx5/6 foram fixadas em PFA 4%. Cortes histológicos dos rins foram submetidos à coloração de HE ou por Masson. Fotos das lâminas visualizadas em microscópio óptico com aumento de 200 e 400 vezes.



Figura 35 - Expressão de TBX3 no modelo Nx 5/6 após 4 semanas.

Após 4 semanas do procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados e amostras do tecido renal do animais do grupo *sham* ou Nx5/6 foram coletadas para extração de RNA total. Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo *sham*. Grupo *sham* N=14 e grupo Nx5/6 N=19. *p<0,05 *versus* grupo *sham*.

Figura 36 - Correlação entre a expressão de TBX3 e TGF-β1 no modelo Nx 5/6 após 4 semanas.



r² = 0,1462.

O aumento da expressão protéica de TBX3 nos animais nefrectomizados foi intensificado, tornando mais evidente a sua regulação nesse grupo em comparação ao grupo *sham* (Figura 37). Mais uma vez, sua expressão foi maior nos túbulos, em comparação aos glomérulos.





Imunohistoquímica. Após 4 semanas do procedimento cirúrgico amostras do tecido renal do animais *sham* ou Nx5/6 foram coletadas, fixadas e processadas. As lâminas foram coradas com DAB e contracoradas com hematoxilina de Harris. A coloração foi ausente em ensaios com IgG não imune. Fotos das lâminas visualizadas em microscópio óptico com aumento de 200 ou 400 vezes.

Como detectamos a presença TBX3 nos túbulos, decidimos avaliar sua expressão em uma linhagem humana de células proximais tubulares (HK-2) tratadas com 2 ng/mL de TGF- β 1 por 6 horas, mesma condição que resultou na regulação do gene TBX3 em CM. Observamos um aumento de apenas 1,5 vezes na expressão da isoforma TBX3.1 nas células tratadas com TGF- β 1 em comparação ao grupo controle, enquanto a expressão da isoforma TBX3 + 2 α não foi alterada (Figura 38).



Figura 38 - Expressão das isoformas TBX3 em HK-2 estimuladas com TGF-β1.

qPCR. Células confluentes foram privadas de soro por 24 horas e então estimuladas com TGF-β1 (2 ng/mL) ou veículo por 6 horas Os dados foram normalizados pela amplificação do gene GAPDH e expressos como média±EPM em relação ao nível de expressão do grupo veículo. N=3. *p<0,05 *versus* grupo veículo.



Em resposta a estímulos patológicos, sejam de origem imunológica, hemodinâmica ou metabólica, as CM se transdiferenciam em miofibroblastos, apresentando alterações em seu padrão de proliferação, apoptose, produção de MEC e secreção de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Assim, as CM, antes mantenedoras da homeostasia glomerular, tornam-se agentes ativos no processo fisiopatológico das glomerulopatias, sendo as principais responsáveis pelo acúmulo de MEC observando nessas condições¹⁶. Esse fenótipo diferenciado é o resultado da alteração no perfil de expressão de genes envolvidos na regulação de ciclo, diferenciação e morte celular, bem como da produção de MEC. Dentre os mecanismos envolvidos no controle da expressão gênica destaca-se a ação dos fatores de transcrição que promovem ou inibem o recrutamento da maquinaria de transcrição para regiões promotoras específicas, regulando a taxa de transcrição de determinados genes que controlam os processos biológicos citados acima⁷³.

Na busca de genes que poderiam estar envolvidos no processo de mudança do estado quiescente para o fenótipo "ativado" das CM, identificamos o gene TBX3, um fator de transcrição, cujas principais isoformas (TBX3.1 e TBX3 + 2α) encontramse expressas constitutivamente nas CM e suprarreguladas pelo tratamento com SBF. Sabendo que expressão gênica das CM pode ser alterada por diferentes fatores de crescimento, estimulamo-las separadamente com alguns daqueles que estão envolvidos na fisiopatologia das nefropatias, como PDGF-BB e membros da família TGF- β .

Apesar do gene TBX3 estar relacionado com a indução de proliferação em diversos tipos celulares^{60,74,75}, a expressão de suas isoformas não foi alterada pelo tratamento com PDGF-BB, um importante mitógeno para as CM e responsável pela hiperproliferação dessas células nos estágios iniciais das nefropatias, principalmente nas imunomediadas⁷⁶. Confirmando esse resultado, a superexpressão das isoformas não alterou o ciclo celular das CM. Além disso, regulou apenas modestamente a expressão de p14^{ARF}, alvo mais conhecido de TBX3, cuja repressão está envolvida no mecanismo pelo qual esse gene previne senescência e induz proliferação celular. Nossos dados indicam que TBX3 não está envolvido na regulação da mitogênese das CM *in vitro*.

Nas nefropatias diabética e hipertensiva, a família de fatores de crescimento TGF-β destaca-se pela ação antagônica que seus membros desempenham. Nesse
contexto, emergem as subfamílias TGF-β com atividade fibrogênica e BMP com papel antifibrótico, cujos estímulos modificam a expressão de genes envolvidos em diversas funções biológicas nas CM.

TGF- β 1, o principal agente pró-fibrótico no processo da glomeruloesclerose, induziu a expressão das isoformas TBX3. Até o momento não havia sido demonstrada a associação entre essa citocina e a regulação de TBX3. Entretanto, recentemente mostrou-se que o gene TBX2, outro membro da família T-Box com o qual TBX3 apresenta alta similaridade, é suprarregulado por TGF- β 1 durante o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) de células epiteliais mamárias⁷⁷.

BMP-7 e BMP-2 são antagonistas da ação pró-fibrótica de TGF-^β1 por inibirem o acúmulo de MEC, prevenindo o desenvolvimento da glomeruloesclerose⁷⁸. BMP-4, por sua vez, atua como um agente fibrogênico, induzindo a expressão de α actina de musculo liso em CM, característica fortemente associada ao fenótipo miofibroblástico⁷⁹, além de estimular a produção dos colágenos I e IV⁸⁰. A associação entre TBX3 e membros da subfamília BMP já havia sido observada no desenvolvimento embrionário, durante o qual as BMP-2, 4 e 7, por meio da via canônica das Smads, regulam a expressão desse gene^{51,81,82}, que, por sua vez, é capaz de reprimir a expressão das BMPs formando uma alça de sinalização. Dentre as BMPs, apenas BMP-4 regulou a expressão do gene TBX3 nas CM. Devemos ressaltar que a expressão de TBX3 foi induzida apenas pelos fatores que apresentam ação pró-fibrótica, sugerindo um possível papel desse gene no processo fibrogênico observado no desenvolvimento da glomeruloesclerose. Para explorar essa hipótese, avaliamos a expressão de fibronectina e PAI-1 nas CM. Após a superexpressão das isoformas não observamos, todavia, regulação desses genes. Já o tratamento com TGF-B1, na mesma concentração na qual aumentou a expressão do gene TBX3, induziu suprarregulação de PAI-1 e fibronectina. Esses dados sugerem que TBX3 não esteja envolvido no mecanismo pelo qual TGF-β1 induz a expressão de genes de MEC. Entretanto, como não avaliamos diretamente o depósito de MEC, não podemos excluir completamente essa possibilidade apenas a partir dos resultados negativos apresentados.

Para explorar a regulação do gene TBX3 por TGF-β1, realizamos experimentos de concentração e tempo-resposa, os quais demonstraram que a expressão de RNAm das isoformas foi suprarregulada por concentrações baixas da

citocina e a partir de 3 horas de estimulação. O programa transcricional ativado por fatores de crescimento é classicamente dividido em duas etapas: inicialmente ocorre indução imediata de genes cuja expressão é independente de síntese protéica de novo, mediada por fatores de transcrição previamente sintetizados. Em seguida, ocorre a indução dos genes de resposta secundária, cuja expressão é retardada pelo tempo necessário para que ocorra tradução dos transcritos produzidos durante o primeiro estágio⁸³. Nesse contexto, TBX3 compõe o grupo de genes de resposta secundária, pois não possui sequências TATA-box em sua região promotora, além de codificar transcritos relativamente longos, caracteristicas que retardam sua dinâmica de transcrição⁸⁴. No programa transcricional ativado por TGF- β 1 é inicialmente observado aumento na expressão de genes de resposta rápida, cuja região promotora possui o elemento de ligação à Smad (SBE) como, por exemplo, CTGF. Em seguida, ocorre a regulação gênica mediada pelas proteínas codificadas na primeira etapa, as quais controlam a expressão de genes envolvidos na produção/degradação de MEC, controle do ciclo celular e apoptose^{85,86}. Como TBX3 foi regulado precocemente por TGF- β 1, pode ser considerado um gene de resposta rápida-intermediária. Nesse contexto, TBX3 atuaria como um regulador do programa transcricional das CM da mesma forma que o faz em diferentes tecidos durante a embriogênese^{52,87}.

Ainda não sabemos por qual ou quais vias de sinalização TGF- β 1 induz a expressão das isoformas. Como o gene TBX3 possui o SBE em sua região promotora, podemos sugerir que a via canônica é uma potencial candidata. Todavia, na ausência de experimentos confirmatórios, não podemos excluir a participação de outras vias de sinalização como, a via Wnt/ β -catenina com a qual TGF- β 1 pode cooperar para regular a expressão gênica⁸⁸ e que induz a expressão do gene TBX3 em linhagens de câncer de fígado⁶¹.

TGF-β1 também induziu aumento da proteína TBX3, que apresentou localização preferencialmente no compartimento nuclear, e cuja regulação se mostrou maior que a observada para o RNAm, indicando que esse gene também é regulado por mecanismo pós-transcripcional. Em concordância com esse resultado, foi demonstrado, por experimento de *pulse-chase*, que a proteína TBX3 apresenta retardo na sua taxa de degradação, que, no entanto, é acelerada quando sua região C-terminal é eliminada, o que sugere a presença de algum elemento que confere

estabilidade à proteína⁵⁹. Foi ainda demonstrado, que a proteína homóloga TBX2 é fosforilada em alguns resíduos de serina pela p38MAKP, com correspondentes também vistos na proteína TBX3, e tem sua estabilidade aumentada⁸⁹. Especulamos que a expressão do gene TBX3 seja regulada por mecanismos análogos e nossos dados sugerem que a avaliação apenas do nível de RNAm não represente fidedignamente a expressão de TBX3.

De forma interessante, quando superexpressas por transdução adenoviral, as isoformas apresentaram distribuição subcelular distinta: TBX3.1 foi detectada no núcleo, enquanto TBX3 + 2α estava localizada no citoplasma. Como qualquer outro transcrito, TBX3 é traduzido no citoplasma e a localização intracelular da proteína recém-sintetizada é definida pela presença de sequências sinalizadoras específicas que determinam se esta permanecerá no citosol ou será direcionada para a membrana citoplasmática, núcleo ou organelas^{90,91}. As isoformas TBX3 possuem em seu domínio de ligação ao DNA uma sequência correspondente ao sinal de localização nuclear (NLS), que as direciona para esse compartimento celular. Entretanto, a presença dessa sequência sinalizadora não garante translocação nuclear automática. Em certas circunstâncias, o fator de transcrição está retido no citoplasma e é direcionado para o núcleo apenas após sofrer modificações póstraducionais ou interagir com proteínas acessórias, tornando a sua distribuição subcelular dinâmica, que se alterna entre o citoplasma e o núcleo⁹². Esse processo faz parte do mecanismo pelo qual a expressão gênica está atrelada ao estado de ativação de vias de sinalização intracelular, as quais controlam a translocação de fatores de transcrição⁹³. Os poucos trabalhos que avaliaram a distribuição subcelular de TBX3 utilizaram linhagens celulares de diferentes espécies, algumas das quais expressam apenas um transcrito do gene^{94,95}, e demonstraram que a proteína estava localizada no núcleo. No caso das isoformas humanas, estudos independentes, que as superexpressaram na linhagem HEK-293, apresentaram resultados contraditórios. Em um deles, a isoforma TBX3.1 foi detectada exclusivamente no núcleo, apresentando localização citoplasmática apenas guando a sequência correspondente ao NLS foi excluída⁵⁹. Já em outro estudo, ambas as isoformas apresentaram localização preferencialmente citoplasmática⁶⁶, sendo translocadas apenas após a superexpressão dos fatores de transcrição Nkx2.5 ou Sox4, com os quais interagem por meio de seu domínio de ligação ao DNA⁶⁵. Por fim, outro trabalho utilizando linhagem de células renais caninas (MDCK) identificou um sítio de fosforilação, alvo da quinase p38MAPK, que induz a translocação de TBX3 para o núcleo⁹⁴. Esses dados indicam que a localização das isoformas TBX3, em alguns casos, é controlada por modificações pós-traducionais ou interação com outras proteínas. Acreditamos que o padrão diferenciado de distribuição subcelular das isoformas nas CM seja conferido exclusivamente pela presença dos 20 resíduos de aminoácidos codificados pelo éxon 2α . Como a protéina TBX3 + 2α já foi detectada no núcleo de outros tipos celulares, é menos provável que alterações conformacionais da proteína, causadas pelos resíduos adicionais, tenham impedido o reconhecimento do NLS pela maquinaria de importação nuclear. Consideramos que seja necessária a ocorrência de modificações pós-traducionais ou interação com proteínas acessórias para que TBX3 + 2α seja translocada para o núcleo. Esse processo seria controlado por vias de sinalização diferentes daquelas envolvidas na translocação de TBX3.1, cujo estado de ativação não é alterado nas nossas condições experimentais. Em vista desses dados, devemos dar atenção não apenas alterações ao nível de expressão das isoformas, mas também a sua localização subcelular para processo de análise da regulação de genes alvos. Com base em nossos achados quanto à distribuição subcelular das isoformas TBX3 poderíamos assumir que essas proteínas possuam alvos diferentes e, consequentemente, funções distintas nas CM. De fato, como discutido a seguir, nossos resultados demonstraram que as isoformas previnem apoptose em graus bastante distintos.

Quando avaliamos o papel do gene TBX3 no processo de morte celular das CM, observamos que esse gene atua como um fator antiapoptótico, visto que a superexpressão das isoformas, em particular de TBX3.1, reduziu consideravelmente o nível de apoptose nas CM privadas de SBF e que o seu silenciamento sensibilizou as células a um estímulo pró-apoptótico.

A ação pró-sobrevivência do gene TBX3 está associada à resistência de células cancerígenas a estímulos pró-apoptóticos. A superexpressão da isoforma TBX3.1 previniu a morte celular induzida pela superexpressão de c-myc⁵⁴ ou pelo tratamento com o quimoterápico doxorubicina⁶¹, estímulos que desencadeiam a ativação de p53. Em outro trabalho, a sub-regulação do gene TBX3 aumentou a apoptose de uma linhagem de carcinoma de bexiga, além reduzir a adesão e crescimento celular⁷⁴. Nesse estudo não foi observada alteração na expressão de p14^{ARF}, sugerindo que, assim como visto em nossos experimentos,, a regulação desse transcrito não é necessária para que o gene TBX3 previna a morte celular.

Poucos estudos avaliram a função de TBX3 + 2α , com publicação de resultados contraditórios. Em um deles TBX3 + 2α não foi capaz de ligar-se à sequência de DNA correspondente ao sítio T-consenso, além de induzir senescência. Os autores sugeriram que esta isoforma atuaria como um dominante negativo da isoforma TBX3.1, formando heterodímeros com a mesma, impedindo-a de interagir com o DNA. Em contrapartida, recentemente foi demonstrado que TBX3 + 2α é capaz de ligar-se ao sitío T-consenso⁶⁵. Um modelo da estrutura do domínio T-box sugere que a sequência de aminoácidos codificada pelo éxon 2α não interfira na interação da proteína com o DNA. Foi ainda demonstrado que TBX3 + 2α possui os mesmos alvos e interage com as mesmas proteínas acessórias que TBX3.1^{65,66}, sendo, portanto, funcionalmente similiar a essa isoforma.

Especulamos que a isoforma TBX3.1 atue como fator antiapoptótico por meio da regulação transcricional de genes envolvidos no controle da apoptose, por mecanismo independente de p14^{ARF}. Com respeito a TBX3 + 2α , ainda não sabemos por qual mecanismo previne morte celular nas CM. Estando retida no citoplasma essa isoforma não poderia atuar diretamente como um fator de transcrição. Dada a capacidade das isoformas TBX3 em interagirem com outras proteínas, podemos sugerir que TBX3 + 2α interage com proteínas envolvidas no processo de morte celular, modulando sua função. Um exemplo desse fenômeno consiste na interação entre os membros da familía Bcl-2, no qual as proteínas *BH3-only* ligam-se e bloqueiam a ação dos fatores pró-sobrevivência, induzindo a ativação da via intrínseca da apoptose. É possível ainda que uma pequena parte das proteínas TBX3 + 2α atinja o núcleo e atue como fator de transcrição. Isso explicaria a menor taxa de proteção contra apotpose de CM conferida por esta isoforma em relação a TBX3.1 em nossos estudos.

É interessante observar que as isoformas foram reguladas por um fator que promove tanto morte quanto sobrevivência celular. Esse paradoxo é explicado pela plasticidade da sinalização de TGF- β 1, na qual a cooperação entre a via canônica das Smads e outras vias de sinalização intracelular define o resultado final do estímulo por TGF- β 1 de maneira célula e contexto-dependente.

TGF-β1 induz apoptose de CM pela ativação de Smad7 ou p53, bem como pela geração de óxido nítrico^{96,97} e, em contrapartida, é capaz de previnir a morte celular, induzida pela privação de soro, por meio da colaboração com a via de

sobrevivência PI3K/AKT^{98,99}. A principal diferença entre os estudos que forneceram esses resultados contrastantes consite na concentração de TGF-β1 utilizada para estimular as CM. Naqueles na qual TGF-β1 induziu apoptose, as CM foram tratadas com concentrações baixas ou intermediárias, variando entre 1-5 ng/mL, ao passo que nos estudos que indicaram o papel antiapoptótico, as CM foram estimuladas com a concentração de 10 ng/mL. Sabe-se que a função de TGF-β1 na proliferação, apoptose e diferenciação é dependente de sua concentração, podendo ser observados efeitos opostos no mesmo tipo celular¹⁰⁰⁻¹⁰². Em nossas mãos, TGF-β1 em baixas concentrações (2 ng/mL) induziu marcadamente apoptose em CM humanas. Esse processo foi dependente da suprarregulação de USF2 e aumento na expressão de Bax, proteína pró-apoptótica da família Bcl-2¹⁰³. Observamos que as isoformas TBX3 foram reguladas positivamente por TGF-β1 nas mesmas condições; É importante mencionar que não avaliamos o efeito de concentrações maiores sobre morte celular ou expressão de TBX3 em CM.

Em nossos estudos in vivo demonstramos aumento da expressão protéica de TBX3 em um modelo de DRC (Nx 5/6), que se correlacionou temporalmente com a expressão de TGF-β1 e foi intensificado com a progressão da doença. Devemos ressaltar que a regulação de TBX3 foi observada apenas em termos de expressão proteíca, em concordância com nossos resultados in vitro, sendo detectada nos glomérulos e especialmente no compartimento tubular. O modelo Nx 5/6 é caracterizado pelo aumento adaptativo no tamanho e função dos glomérulos remanescentes, seguido pelo desenvolvimento de proteinúria, glomeroloesclerose e fibrose tubolointersticial. Isso resulta em substituição progressiva do conteúdo celular por tecido fibrótico, que culmina no comprometimento da função renal. TGFβ1 é o principal fator fibrogênico envolvido no mecanismo fisiopatológico desse processo. Apesar de TGF-B1 ter sido indentificado como um regulador da apoptose nas CM in vitro, seu envolvimento nesse processo durante a evolução das nefropatias ainda não está bem definido. A expressão de TGF-B1 no modelo de Nx 5/6 é detectada a partir da 2ª-4ª semana após a ablação renal e a apoptose de CM é observada somente após um período mais prolongado^{104,105}. Da mesma forma, em outro modelo de doença renal, induzida por níveis plasmáticos elevados da forma ativa de TGF- β 1, a apoptose de CM foi detectada apenas no estágio mais avançado da glomeruloesclerose³⁹. Alguns estudos sugerem que a ocorrência de apoptose das

CM depende do estágio de desenvolvimento da DRC. Inicialmente, a apoptose seria inibida, favorecendo a transdiferenciação das CM em miofibroblastos e o início do processo fibrogênico, resultando na expansão mesangial⁹⁸. Já nos estágios finais da glomeruloesclerose, a apoptose estaria associada ao depósito de MEC e contribuiria para a redução da celularidade do mesângio³³. Acredita-se que mudanças quantitativas e, principalmente, qualitativas da MEC interrompam o estímulo prósobrevivência para as CM, tornando-as susceptíveis ao estímulos pró-apoptóticos presentes durante o desenvolvimento glomeruloesclerose. Nesse contexto, TGF-β1 iniciaria o processo de glomeruloesclerose por previnir a morte das CM e induzir acúmulo de matriz e, nos estágios mais avançados, estaria envolvido no processo de morte celular. Com base em nossos resultados, podemos sugerir que o gene TBX3 é um mediador da ação antiapoptótica inicial de TGF-β1 e, desse modo, sua expressão estaria associada ao desenvolvimento da glomeruloesclerose por previnir a morte das CM.

Em vista da expressão exuberante de TBX3 nas células tubulares, detectado no modelo *in vivo*, decidimos avaliar a expressão das isoformas em células tubulares humanas (HK-2). Nestas células, TGF-β1 induziu um aumento modesto apenas de TBX3.1. Além de alterações no compartimento glomerular, a progressão da DRC também envolve fibrose tubulointersticial, iniciada pela EMT das células tubulares, que assumem um fenótipo caracterizado por produção excessiva de MEC, perda de polaridade celular e aumento de sua capacidade migratória. Esse processo é desencadeado por TGF-\beta1 e envolve a redução na expressão de proteínas marcadoras de epitélio, como E-caderina e citoqueratina, em favor da expressão de marcadores mesenguimais, como vimentina e α -SMA, além de proteínas de MEC (fibronectina e colágeno I)¹⁰⁶. Alguns estudos indicaram que TBX3 reprime a expressão de E-caderina nas linhagens MDCK e de melanoma humano⁵⁵ e que TGF-^{β1} induz a suprarregulação de TBX2 durante o processo de EMT das células epiteliais mamárias⁷⁷. Embora fora do objetivo original deste estudo e considerando nossos dados e a literatura, podemos propor que TBX3 também esteja envolvido no processo de EMT das células tubulares, desencadeado por TGF-β1 durante a progressão da DRC. Isso deveria ser esclarecido em estudos adicionais.

Em suma, o presente trabalho identificou um gene cuja expressão é regulada por TGF-β1, possui ação antiapoptótica em CM *in vitro* e foi regulado positivamente

em um modelo de DRC (nefrectomia 5/6). Novos ensaios devem ser executados para determinar o possível papel desse gene na indução de glomeruloesclerose e fibrose tubulointersticial por TGF-β1 durante a progressão de doenças renais.



Como conclusões do presente trabalho temos:

- as isoformas do gene TBX3 são expressas constitutivamente em células mesangiais e tubulares *in vitro*;
- as isoformas TBX3 são reguladas positivamente por TGF-β1, preferencialmente por mecanismo pós-transcricional;
- 3. as isoformas TBX3 possuem perfil de distribuição subcelular diferente;
- 4. a expressão de p14^{ARF} é regulada apenas modestamente pela superexpressão das isoformas nas CM;
- as isoformas TBX3 não estão envolvidas no processo de proliferação e produção de MEC em CM;
- 6. o gene TBX3 apresenta ação antiapoptótica nas CM;
- a expressão de TGF-β1, colágeno IV e fibronectina é aumentada no modelo de Nefrectomia 5/6;
- 8. nesse modelo, a expressão de TBX3 é regulada, apenas por mecanismo póstranscricional, nos glomérulos e, predominantemente, na região tubular.

*REFERÊNCIAS

1. ABBOUD, H. E. Mesangial cell biology. Exp. Cell. Res., v. 318, p. 979-985, 2012.

2. CUMMING, B. **Pearson Education, 2007.** Disponível em: <http://ocw.unican.es/ ciencias-de-la-salud/fisiologia-humana-2011-g367/material-de-clase/bloque-tematico -4.-fisiologia-del-rinon-y-liquidos/tema-2.-filtracion-glomerular/tema-2.-filtracionglomerular>: Acesso em: 01 set. 2012.

3. VAUGHAN, M. R.; QUAGGIN, S. E. How do mesangial and endothelial cells form the glomerular tuft? **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 19, p. 24-33, 2008.

4. SCHLONDORFF, D.; BANAS, B. The mesangial cell revisited: no cell is an island. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 20, p. 1179-1187, 2009.

5. BARICOS, W. H.; REED, J. C.; CORTEZ, S. L. Extracellular matrix degradation by cultured mesangial cells: mediators and modulators. **Exp. Biol. Med. (Maywood)**, v. 228, p. 1018-1022, 2003.

6. SRAER, J. D.; ADIDA, C.; PERALDI, M. N.; RONDEAU, E.; KANFER, A. Speciesspecific properties of the glomerular mesangium. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 3, p. 1342-1350, 1993.

7. MOONEY, A.; JACKSON, K.; BACON, R.; STREULI, C.; EDWARDS, G.; BASSUK, J.; SAVILL, J. Type IV collagen and laminin regulate glomerular mesangial cell susceptibility to apoptosis via beta(1) integrin-mediated survival signals. **Am. J. Pathol.**, v. 155, p. 599-606, 1999.

8. SCHNAPER, H. W. Integrin receptors, the cytoskeleton, and glomerular cell function. **Pediatr. Nephrol.**, v. 10, p. 523-528, 1996.

9. STERZEL, R. B.; SCHULZE-LOHOFF, E.; WEBER, M.; GOODMAN, S. L. Interactions between glomerular mesangial cells, cytokines, and extracellular matrix. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 2, p. S126-131, 1992.

10. KRIZ, W.; ELGER, M.; LEMLEY, K.; SAKAI, T. Structure of the glomerular mesangium: a biomechanical interpretation. **Kidney. Int. Suppl.**, v. 30, p. S2-9, 1990.

11. KIKKAWA, Y.; VIRTANEN, I.; MINER, J. H. Mesangial cells organize the glomerular capillaries by adhering to the G domain of laminin alpha5 in the glomerular basement membrane. **J. Cell Biol.**, v. 161, p. 187-196, 2003.

12. SAKAI, T.; KRIZ, W. The structural relationship between mesangial cells and basement membrane of the renal glomerulus. **Anat. Embryol. (Berl)**, v. 176, p. 373-386, 1987.

^{*} De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

13. SAVILL, J.; SMITH, J.; SARRAF, C.; REN, Y.; ABBOTT, F.; REES, A. Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis. **Kidney Int.**, v. 42, p. 924-936, 1992.

14. LEE, H. S.; SONG, C. Y. Differential role of mesangial cells and podocytes in TGF-beta-induced mesangial matrix synthesis in chronic glomerular disease. **Histol. Histopathol.**, v. 24, p. 901-908, 2009.

15. LAI, K. N.; LEUNG, J. C.; CHAN, L. Y.; SALEEM, M. A.; MATHIESON, P. W.; TAM, K. Y.; XIAO, J.; LAI, F. M.; TANG, S. C. Podocyte injury induced by mesangialderived cytokines in IgA nephropathy. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 24, p. 62-72, 2009.

16. JOHNSON, R. J.; FLOEGE, J.; YOSHIMURA, A.; IIDA, H.; COUSER, W. G.; ALPERS, C. E. The activated mesangial cell: a glomerular "myofibroblast"? **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 2, p. S190-197, 1992.

17. MARSHALL, C. B.; SHANKLAND, S. J. Cell cycle and glomerular disease: a minireview. **Nephron. Exp. Nephrol.**, v. 102, p. e39-48, 2006.

18. PICKEN, M. M. The role of mesangial homeostasis in glomerular injury progression: hope for mesangial sclerosis reversal. **Kidney Int.**, v. 75, p. 574-576, 2009.

19. YOUNG, B. A.; JOHNSON, R. J.; ALPERS, C. E.; ENG, E.; GORDON, K.; FLOEGE, J.; COUSER, W. G.; SEIDEL, K. Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, v. 47, p. 935-944, 1995.

20. WOLF, G. Molecular mechanisms of diabetic mesangial cell hypertrophy: a proliferation of novel factors. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 13, p. 2611-2613, 2002.

21. ZUCCHELLI, P.; ZUCCALA, A. Progression of renal failure and hypertensive nephrosclerosis. **Kidney. Int. Suppl.**, v. 68, p. S55-59, 1998.

22. FOGO, A. B. Glomerular hypertension, abnormal glomerular growth, and progression of renal diseases. **Kidney. Int. Suppl.**, v. 75, p. S15-21, 2000.

23. KAGAMI, S.; BORDER, W. A.; MILLER, D. E.; NOBLE, N. A. Angiotensin II stimulates extracellular matrix protein synthesis through induction of transforming growth factor-beta expression in rat glomerular mesangial cells. **J. Clin. Invest.**, v. 93, p. 2431-2437, 1994.

24. MASON, R. M.; WAHAB, N. A. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 14, p. 1358-1373, 2003.

25. KOPP, J. B.; FACTOR, V. M.; MOZES, M.; NAGY, P.; SANDERSON, N.; BOTTINGER, E. P.; KLOTMAN, P. E.; THORGEIRSSON, S. S. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. **Lab. Invest.**, v. 74, p. 991-1003, 1996.

26. ISAKA, Y.; FUJIWARA, Y.; UEDA, N.; KANEDA, Y.; KAMADA, T.; IMAI, E. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor-beta or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 2597-2601, 1993.

27. HAN, D. C.; HOFFMAN, B. B.; HONG, S. W.; GUO, J.; ZIYADEH, F. N. Therapy with antisense TGF-beta1 oligodeoxynucleotides reduces kidney weight and matrix mRNAs in diabetic mice. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, v. 278, p. F628-634, 2000.

28. HILL, C.; FLYVBJERG, A.; RASCH, R.; BAK, M.; LOGAN, A. Transforming growth factor-beta2 antibody attenuates fibrosis in the experimental diabetic rat kidney. **J. Endocrinol.**, v. 170, p. 647-651, 2001.

29. ANNES, J. P.; MUNGER, J. S.; RIFKIN, D. B. Making sense of latent TGFbeta activation. **J. Cell Sci.**, v. 116, p. 217-224, 2003.

30. ATTISANO, L.; WRANA, J. L. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. **Science**, v. 296, p. 1646-1647, 2002.

31. MASSAGUE, J.; SEOANE, J.; WOTTON, D. Smad transcription factors. **Genes Dev.**, v. 19, p. 2783-2810, 2005.

32. MASSAGUE, J. How cells read TGF-beta signals. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 1, p. 169-178, 2000.

33. KASHIHARA, N.; SUGIYAMA, H.; MAKINO, H. Mechanisms for induction of apoptosis and glomerular disease. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 14 Suppl 1, p. 52-54, 1999.

34. SUGIYAMA, H.; KASHIHARA, N.; MAESHIMA, Y.; OKAMOTO, K.; KANAO, K.; SEKIKAWA, T.; MAKINO, H. Regulation of survival and death of mesangial cells by extracellular matrix. **Kidney Int.**, v. 54, p. 1188-1196, 1998.

35. BAKER, A. J.; MOONEY, A.; HUGHES, J.; LOMBARDI, D.; JOHNSON, R. J.; SAVILL, J. Mesangial cell apoptosis: the major mechanism for resolution of glomerular hypercellularity in experimental mesangial proliferative nephritis. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 2105-2116, 1994.

36. PESCE, C.; MENINI, S.; PRICCI, F.; FAVRE, A.; LETO, G.; DIMARIO, U.; PUGLIESE, G. Glomerular cell replication and cell loss through apoptosis in experimental diabetes mellitus. **Nephron**, v. 90, p. 484-488, 2002.

37. MAKINO, H.; SUGIYAMA, H.; KASHIHARA, N. Apoptosis and extracellular matrix-cell interactions in kidney disease. **Kidney. Int. Suppl.**, v. 77, p. S67-75, 2000.

38. CHIHARA, Y.; ONO, H.; ISHIMITSU, T.; ONO, Y.; ISHIKAWA, K.; RAKUGI, H.; OGIHARA, T.; MATSUOKA, H. Roles of TGF-beta1 and apoptosis in the progression

of glomerulosclerosis in human IgA nephropathy. Clin. Nephrol., v. 65, p. 385-392, 2006.

39. SCHIFFER, M.; BITZER, M.; ROBERTS, I. S.; KOPP, J. B.; TEN DIJKE, P.; MUNDEL, P.; BOTTINGER, E. P. Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7. J. Clin. Invest., v. 108, p. 807-816, 2001.

40. TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 9, p. 231-241, 2008.

41. EARNSHAW, W. C.; MARTINS, L. M.; KAUFMANN, S. H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 68, p. 383-424, 1999.

42. YOULE, R. J.; STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 9, p. 47-59, 2008.

43. LUTHI, A. U.; MARTIN, S. J. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. **Cell Death Differ.**, v. 14, p. 641-650, 2007.

44. DAVIES, M. The mesangial cell: a tissue culture view. **Kidney Int.**, v. 45, p. 320-327, 1994.

45. MENE, P. Mesangial cell cultures. J. Nephrol., v. 14, p. 198-203, 2001.

46. NAICHE, L. A.; HARRELSON, Z.; KELLY, R. G.; PAPAIOANNOU, V. E. T-box genes in vertebrate development. **Annu. Rev. Genet.**, v. 39, p. 219-239, 2005.

47. LINGBEEK, M. E.; JACOBS, J. J.; VAN LOHUIZEN, M. The T-box repressors TBX2 and TBX3 specifically regulate the tumor suppressor gene p14ARF via a variant T-site in the initiator. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 26120-26127, 2002.

48. PACKHAM, E. A.; BROOK, J. D. T-box genes in human disorders. **Hum. Mol. Genet.**, v. 12 Spec No 1, p. R37-44, 2003.

49. COLL, M.; SEIDMAN, J. G.; MULLER, C. W. Structure of the DNA-bound T-box domain of human TBX3, a transcription factor responsible for ulnar-mammary syndrome. **Structure (Camb)**, v. 10, p. 343-356, 2002.

50. LU, R.; YANG, A.; JIN, Y. Dual functions of T-box 3 (Tbx3) in the control of selfrenewal and extraembryonic endoderm differentiation in mouse embryonic stem cells. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 8425-8436, 2011.

51. SINGH, R.; HOOGAARS, W. M.; BARNETT, P.; GRIESKAMP, T.; RANA, M. S.; BUERMANS, H.; FARIN, H. F.; PETRY, M.; HEALLEN, T.; MARTIN, J. F.; MOORMAN, A. F.; T HOEN, P. A.; KISPERT, A.; CHRISTOFFELS, V. M. Tbx2 and Tbx3 induce atrioventricular myocardial development and endocardial cushion formation. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 69, p. 1377-1389, 2012.

52. RALLIS, C.; DEL BUONO, J.; LOGAN, M. P. Tbx3 can alter limb position along the rostrocaudal axis of the developing embryo. **Development**, v. 132, p. 1961-1970, 2005.

53. SUZUKI, A.; SEKIYA, S.; BUSCHER, D.; IZPISUA BELMONTE, J. C.; TANIGUCHI, H. Tbx3 controls the fate of hepatic progenitor cells in liver development by suppressing p19ARF expression. **Development**, v. 135, p. 1589-1595, 2008.

54. CARLSON, H.; OTA, S.; SONG, Y.; CHEN, Y.; HURLIN, P. J. Tbx3 impinges on the p53 pathway to suppress apoptosis, facilitate cell transformation and block myogenic differentiation. **Oncogene**, v. 21, p. 3827-3835, 2002.

55. RODRIGUEZ, M.; ALADOWICZ, E.; LANFRANCONE, L.; GODING, C. R. Tbx3 represses E-cadherin expression and enhances melanoma invasiveness. **Cancer Res.**, v. 68, p. 7872-7881, 2008.

56. LU, J.; LI, X. P.; DONG, Q.; KUNG, H. F.; HE, M. L. TBX2 and TBX3: the special value for anticancer drug targets. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1806, p. 268-274, 2010.

57. LOMNYTSKA, M.; DUBROVSKA, A.; HELLMAN, U.; VOLODKO, N.; SOUCHELNYTSKYI, S. Increased expression of cSHMT, Tbx3 and utrophin in plasma of ovarian and breast cancer patients. **Int. J. Cancer**, v. 118, p. 412-421, 2006.

58. FAN, W.; HUANG, X.; CHEN, C.; GRAY, J.; HUANG, T. TBX3 and its isoform TBX3+2a are functionally distinctive in inhibition of senescence and are overexpressed in a subset of breast cancer cell lines. **Cancer Res.**, v. 64, p. 5132-5139, 2004.

59. CARLSON, H.; OTA, S.; CAMPBELL, C. E.; HURLIN, P. J. A dominant repression domain in Tbx3 mediates transcriptional repression and cell immortalization: relevance to mutations in Tbx3 that cause ulnar-mammary syndrome. **Hum. Mol. Genet.**, v. 10, p. 2403-2413, 2001.

60. BRUMMELKAMP, T. R.; KORTLEVER, R. M.; LINGBEEK, M.; TRETTEL, F.; MACDONALD, M. E.; VAN LOHUIZEN, M.; BERNARDS, R. TBX-3, the gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 6567-6572, 2002.

61. RENARD, C. A.; LABALETTE, C.; ARMENGOL, C.; COUGOT, D.; WEI, Y.; CAIRO, S.; PINEAU, P.; NEUVEUT, C.; DE REYNIES, A.; DEJEAN, A.; PERRET, C.; BUENDIA, M. A. Tbx3 is a downstream target of the Wnt/beta-catenin pathway and a critical mediator of beta-catenin survival functions in liver cancer. **Cancer Res.**, v. 67, p. 901-910, 2007.

62. YAROSH, W.; BARRIENTOS, T.; ESMAILPOUR, T.; LIN, L.; CARPENTER, P. M.; OSANN, K.; ANTON-CULVER, H.; HUANG, T. TBX3 is overexpressed in breast cancer and represses p14 ARF by interacting with histone deacetylases. **Cancer Res.**, v. 68, p. 693-699, 2008.

63. TAO, W.; LEVINE, A. J. P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 6937-6941, 1999.

64. WEI, W.; HEMMER, R. M.; SEDIVY, J. M. Role of p14(ARF) in replicative and induced senescence of human fibroblasts. **Mol. Cell. Biol.**, v. 21, p. 6748-6757, 2001.

65. HOOGAARS, W. M.; BARNETT, P.; RODRIGUEZ, M.; CLOUT, D. E.; MOORMAN, A. F.; GODING, C. R.; CHRISTOFFELS, V. M. TBX3 and its splice variant TBX3 + exon 2a are functionally similar. **Pigment Cell Melanoma Res.**, v. 21, p. 379-387, 2008.

66. BOOGERD, C. J.; WONG, L. Y.; VAN DEN BOOGAARD, M.; BAKKER, M. L.; TESSADORI, F.; BAKKERS, J.; T HOEN, P. A.; MOORMAN, A. F.; CHRISTOFFELS, V. M.; BARNETT, P. Sox4 mediates Tbx3 transcriptional regulation of the gap junction protein Cx43. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 68, p. 3949-3961, 2011.

67. BOOGERD, K. J.; WONG, L. Y.; CHRISTOFFELS, V. M.; KLARENBEEK, M.; RUIJTER, J. M.; MOORMAN, A. F.; BARNETT, P. Msx1 and Msx2 are functional interacting partners of T-box factors in the regulation of Connexin43. **Cardiovasc. Res.**, v. 78, p. 485-493, 2008.

68. LEE, H. S.; CHO, H. H.; KIM, H. K.; BAE, Y. C.; BAIK, H. S.; JUNG, J. S. Tbx3, a transcriptional factor, involves in proliferation and osteogenic differentiation of human adipose stromal cells. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 296, p. 129-136, 2007.

69. BURGUCU, D.; GUNEY, K.; SAHINTURK, D.; OZBUDAK, I. H.; OZEL, D.; OZBILIM, G.; YAVUZER, U. Tbx3 represses PTEN and is over-expressed in head and neck squamous cell carcinoma. **BMC cancer**, v. 12, p. 481, 2012.

70. NIWA, H.; OGAWA, K.; SHIMOSATO, D.; ADACHI, K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. **Nature**, v. 460, p. 118-122, 2009.

71. BRUNSKILL, E. W.; POTTER, S. S. Changes in the gene expression programs of renal mesangial cells during diabetic nephropathy. **BMC Nephrol**, v. 13, p. 70, 2012.

72. BRAND, K.; KLOCKE, R.; POSSLING, A.; PAUL, D.; STRAUSS, M. Induction of apoptosis and G2/M arrest by infection with replication-deficient adenovirus at high multiplicity of infection. **Gene Ther.**, v. 6, p. 1054-1063, 1999.

73. VAQUERIZAS, J. M.; KUMMERFELD, S. K.; TEICHMANN, S. A.; LUSCOMBE, N. M. A census of human transcription factors: function, expression and evolution. **Nat. Rev. Genet.**, v. 10, p. 252-263, 2009.

74. ITO, A.; ASAMOTO, M.; HOKAIWADO, N.; TAKAHASHI, S.; SHIRAI, T. Tbx3 expression is related to apoptosis and cell proliferation in rat bladder both hyperplastic epithelial cells and carcinoma cells. **Cancer Lett.**, v. 219, p. 105-112, 2005.

75. RIBEIRO, I.; KAWAKAMI, Y.; BUSCHER, D.; RAYA, A.; RODRIGUEZ-LEON, J.; MORITA, M.; RODRIGUEZ ESTEBAN, C.; IZPISUA BELMONTE, J. C. Tbx2 and Tbx3 regulate the dynamics of cell proliferation during heart remodeling. **PLoS One**, v. 2, p. e398, 2007.

76. FLOEGE, J.; JOHNSON, R. J.; COUSER, W. G. Mesangial cells in the pathogenesis of progressive glomerular disease in animal models. **Clin. Investig.**, v. 70, p. 857-864, 1992.

77. WANG, B.; LINDLEY, L. E.; FERNANDEZ-VEGA, V.; RIEGER, M. E.; SIMS, A. H.; BRIEGEL, K. J. The T Box Transcription Factor TBX2 Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Invasion of Normal and Malignant Breast Epithelial Cells. **PLoS One**, v. 7, p. e41355, 2012.

78. WANG, S.; HIRSCHBERG, R. BMP7 antagonizes TGF-beta -dependent fibrogenesis in mesangial cells. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, v. 284, p. F1006-1013, 2003.

79. ABE, H.; TOMINAGA, T.; MATSUBARA, T.; ABE, N.; KISHI, S.; NAGAI, K.; MURAKAMI, T.; ARAOKA, T.; DOI, T. Scleraxis modulates bone morphogenetic protein 4 (BMP4)-Smad1 protein-smooth muscle alpha-actin (SMA) signal transduction in diabetic nephropathy. **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 20430-20442, 2012.

80. TOMINAGA, T.; ABE, H.; UEDA, O.; GOTO, C.; NAKAHARA, K.; MURAKAMI, T.; MATSUBARA, T.; MIMA, A.; NAGAI, K.; ARAOKA, T.; KISHI, S.; FUKUSHIMA, N.; JISHAGE, K.; DOI, T. Activation of bone morphogenetic protein 4 signaling leads to glomerulosclerosis that mimics diabetic nephropathy. **J. Biol. Chem.**, v. 286, p. 20109-20116, 2011.

81. SUZUKI, T.; TAKEUCHI, J.; KOSHIBA-TAKEUCHI, K.; OGURA, T. Tbx Genes Specify Posterior Digit Identity through Shh and BMP Signaling. **Dev. Cell**, v. 6, p. 43-53, 2004.

82. LEE, J. M.; KIM, J. Y.; CHO, K. W.; LEE, M. J.; CHO, S. W.; ZHANG, Y.; BYUN, S. K.; YI, C. K.; JUNG, H. S. Modulation of cell proliferation during palatogenesis by the interplay between Tbx3 and Bmp4. **Cell Tissue Res.**, v. 327, p. 285-292, 2007.

83. TULLAI, J. W.; SCHAFFER, M. E.; MULLENBROCK, S.; SHOLDER, G.; KASIF, S.; COOPER, G. M. Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 23981-23995, 2007.

84. SMITH, J.; MOWLA, S.; PRINCE, S. Basal transcription of the human TBX3 gene, a key developmental regulator which is overexpressed in several cancers, requires functional NF-Y and Sp1 sites. **Gene**, v. 486, p. 41-46, 2011.

85. WESTON, B. S.; WAHAB, N. A.; MASON, R. M. CTGF mediates TGF-betainduced fibronectin matrix deposition by upregulating active alpha5beta1 integrin in human mesangial cells. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 14, p. 601-610, 2003. 86. ABDEL-WAHAB, N.; WESTON, B. S.; ROBERTS, T.; MASON, R. M. Connective tissue growth factor and regulation of the mesangial cell cycle: role in cellular hypertrophy. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 13, p. 2437-2445, 2002.

87. HOOGAARS, W. M.; TESSARI, A.; MOORMAN, A. F.; DE BOER, P. A.; HAGOORT, J.; SOUFAN, A. T.; CAMPIONE, M.; CHRISTOFFELS, V. M. The transcriptional repressor Tbx3 delineates the developing central conduction system of the heart. **Cardiovasc. Res.**, v. 62, p. 489-499, 2004.

88. WARNER, D. R.; GREENE, R. M.; PISANO, M. M. Cross-talk between the TGFbeta and Wnt signaling pathways in murine embryonic maxillary mesenchymal cells. **FEBS Lett.**, v. 579, p. 3539-3546, 2005.

89. ABRAHAMS, A.; MOWLA, S.; PARKER, M. I.; GODING, C. R.; PRINCE, S. UVmediated regulation of the anti-senescence factor Tbx2. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 2223-2230, 2008.

90. EMANUELSSON, O.; NIELSEN, H.; BRUNAK, S.; VON HEIJNE, G. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. **J. Mol. Biol.**, v. 300, p. 1005-1016, 2000.

91. CHUDERLAND, D.; KONSON, A.; SEGER, R. Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. **Mol. Cell**, v. 31, p. 850-861, 2008.

92. BRIVANLOU, A. H.; DARNELL, J. E., JR. Signal transduction and the control of gene expression. **Science**, v. 295, p. 813-818, 2002.

93. XU, L.; MASSAGUE, J. Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, p. 209-219, 2004.

94. YANO, T.; YAMAZAKI, Y.; ADACHI, M.; OKAWA, K.; FORT, P.; UJI, M.; TSUKITA, S.; TSUKITA, S. Tara up-regulates E-cadherin transcription by binding to the Trio RhoGEF and inhibiting Rac signaling. **J. Cell Biol.**, v. 193, p. 319-332, 2011.

95. BEGUM, S.; PAPAIOANNOU, V. E. Dynamic expression of Tbx2 and Tbx3 in developing mouse pancreas. **Gene Expr. Patterns**, v. 11, p. 476-483, 2011.

96. OKADO, T.; TERADA, Y.; TANAKA, H.; INOSHITA, S.; NAKAO, A.; SASAKI, S. Smad7 mediates transforming growth factor-beta-induced apoptosis in mesangial cells. **Kidney Int.**, v. 62, p. 1178-1186, 2002.

97. PATEL, P.; VARGHESE, E.; DING, G.; FAN, S.; KAPASI, A.; REDDY, K.; FRANKI, N.; NAHAR, N.; SINGHAL, P. Transforming growth factor beta induces mesangial cell apoptosis through NO- and p53-dependent and -independent pathways. **J. Investig. Med.**, v. 48, p. 403-410, 2000.

98. KATO, M.; YUAN, H.; XU, Z. G.; LANTING, L.; LI, S. L.; WANG, M.; HU, M. C.; REDDY, M. A.; NATARAJAN, R. Role of the Akt/FoxO3a pathway in TGF-beta1-

mediated mesangial cell dysfunction: a novel mechanism related to diabetic kidney disease. J. Am. Soc. Nephrol., v. 17, p. 3325-3335, 2006.

99. DING, Y.; KIM, J. K.; KIM, S. I.; NA, H. J.; JUN, S. Y.; LEE, S. J.; CHOI, M. E. TGF-{beta}1 protects against mesangial cell apoptosis via induction of autophagy. **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 37909-37919, 2010.

100. WU, D. T.; BITZER, M.; JU, W.; MUNDEL, P.; BOTTINGER, E. P. TGF-beta concentration specifies differential signaling profiles of growth arrest/differentiation and apoptosis in podocytes. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 16, p. 3211-3221, 2005.

101. HUANG, X.; LEE, C. Regulation of stromal proliferation, growth arrest, differentiation and apoptosis in benign prostatic hyperplasia by TGF-beta. **Front. Biosci.**, v. 8, p. s740-749, 2003.

102. SANCHEZ, A.; ALVAREZ, A. M.; BENITO, M.; FABREGAT, I. Apoptosis induced by transforming growth factor-beta in fetal hepatocyte primary cultures: involvement of reactive oxygen intermediates. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 7416-7422, 1996.

103. SATO, A. Y.; ANTONIOLI, E.; TAMBELLINI, R.; CAMPOS, A. H. ID1 inhibits USF2 and blocks TGF-beta-induced apoptosis in mesangial cells. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, v. 301, p. F1260-1269, 2011.

104. SUGIYAMA, H.; KASHIHARA, N.; MAKINO, H.; YAMASAKI, Y.; OTA, A. Apoptosis in glomerular sclerosis. **Kidney Int.**, v. 49, p. 103-111, 1996.

105. THOMAS, G. L.; YANG, B.; WAGNER, B. E.; SAVILL, J.; EL NAHAS, A. M. Cellular apoptosis and proliferation in experimental renal fibrosis. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 13, p. 2216-2226, 1998.

106. LIU, Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 21, p. 212-222, 2009.