

LISLAINE ANDRADE WENSING

**REGULAÇÃO DO GENE TBX3 POR TGF- β 1 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

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 mudanças 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 + 2 α , resultado do processo de *splicing* alternativo, no qual o éxon 2 α é inserido no meio da sequência que corresponde ao domínio T-box. Nas CM, TBX3 foi regulado precocemente por concentrações baixas de TGF- β 1 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 + 2 α 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 pró-sobrevivência 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- β 1, 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- β 1 induz glomeruloesclerose e fibrose tubular durante a progressão das nefropatias.

Palavras-chave: Células mesangiais. TBX3. TGF- β 1. 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.

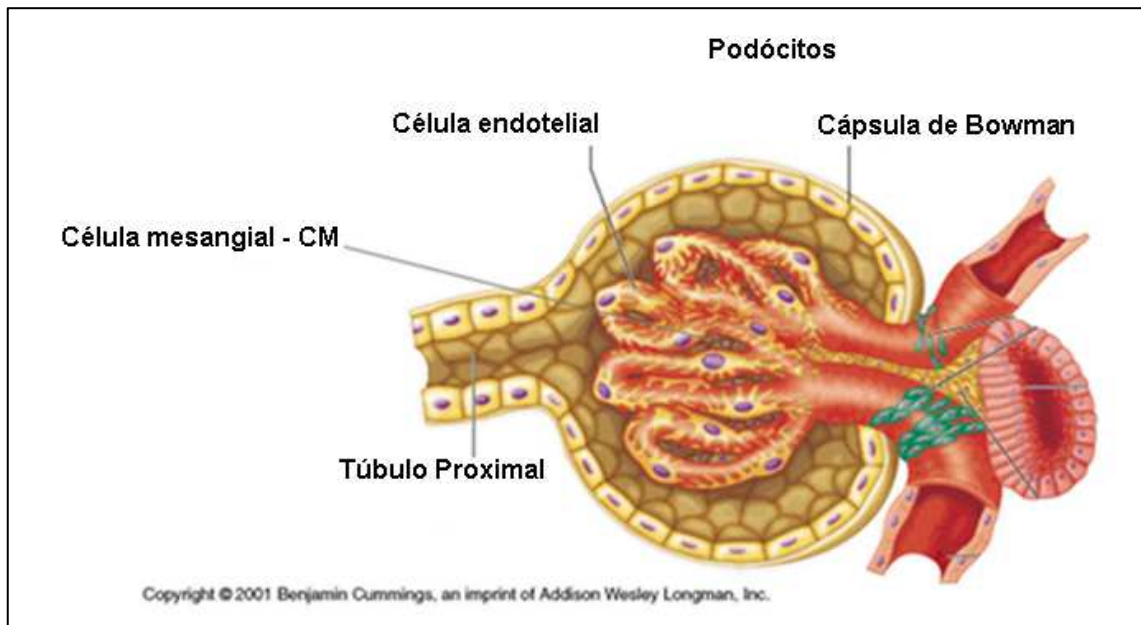
Mesangial cells (MC) synthesize extracellular matrix (ECM), providing structural support to the glomerular capillaries, and participate in the regulation of the glomerular filtration rate. During the progression of nephropathies, MC assume a myofibroblastic phenotype, characterized by changes in proliferation, 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 + 2 α , generated by alternative splicing, in which the exon 2 α is inserted into the middle of the sequence corresponding to its T-box domain. In CM, TBX3 was upregulated by low concentrations of TGF- β 1 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 + 2 α 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- β 1, 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- β 1 induces glomerulosclerosis and tubular fibrosis during the progression of nephropathies.

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

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).

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 quimiotático 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).

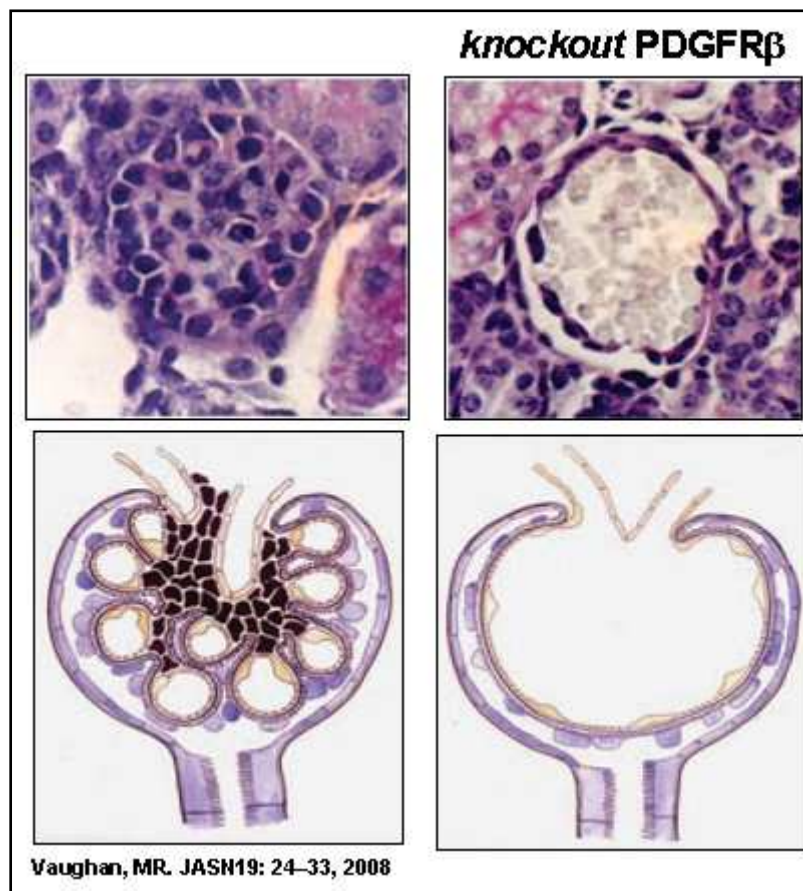
Figura 2 - Figura representativa da estrutura de um glomérulo em desenvolvimento, demonstrando o processo de formação das alças capilares induzido pelas CM.



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 hiperplasia 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 MEC²⁴. 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 pró-peptídeo 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- β 1 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- β 1; 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- β 1, 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 hiperplasticidade³⁵. Também foi observada em modelos de diabetes mellitus induzida por estreptozotocina³⁶ ou de hipertensão glomerular causada pela ablação renal (nephrectomia 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 pró-apoptótica 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 pró-apoptose (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 + 2 α) possuem a sequência de nucleotídeos totalmente conhecida, sendo, portanto, as únicas estudadas. A isoforma TBX3 + 2 α é o resultado do processo de *splicing* alternativo pelo qual ocorre a inserção de 60 pares de nucleotídeos (éxon 2 α) na sequência que corresponde ao domínio T-box da proteína⁵⁸. As isoformas TBX3.1 e TBX3 + 2 α 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 locus 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 *nanog*⁷⁰, ou relacionados à diferenciação celular, como *GATA-6*⁵⁰.

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.

2 CONCLUSÃO

Como conclusões do presente trabalho temos:

1. as isoformas do gene TBX3 são expressas constitutivamente em células mesangiais e tubulares *in vitro*;
2. as isoformas TBX3 são reguladas positivamente por TGF- β 1, 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;
5. 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;
7. a expressão de TGF- β 1, colágeno IV e fibronectina é aumentada no modelo de Nefrectomia 5/6;
8. nesse modelo, a expressão de TBX3 é regulada, apenas por mecanismo pós-transcricional, nos glomérulos e, predominantemente, na região tubular.

*REFERÊNCIAS

1. ABOUD, 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-liquididos/tema-2.-filtracion-glomerular/tema-2.-filtracion-glomerular>>: 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. Species-specific 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 mesangial-derived 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 self-renewal 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.; KLARENBECK, 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.; GUNAY, 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.